

Caracterización morfológica y molecular de las poblaciones de *Cryphonectria parasitica* en castaños de Galicia

O. AGUÍN, D. MONTENEGRO, M. J. SAINZ, M. HERMIDA, J. P. MANSILLA

El cancro del castaño, causado por *Cryphonectria parasitica*, es una enfermedad ampliamente extendida en las zonas de castaño de todo el mundo. Las únicas perspectivas actuales para su control se basan en el conocimiento de las poblaciones del hongo en los sotos afectados y la aplicación de cepas hipovirulentas. Se realizó un estudio de la biología de las poblaciones de *C. parasitica* en castaños de las provincias de Lugo y Ourense para conocer la diversidad de los tipos de compatibilidad vegetativa (vc) y sexual, y la incidencia de cepas hipovirulentas. Se obtuvieron 610 aislados, que en cultivo, mostraron en su mayoría un fenotipo virulento. Solo cuatro aislados de la provincia de Lugo presentaron ARNbc, demostrando la presencia de hipovirulencia. La caracterización molecular de los hipovirus determinó que pertenecían al subtipo E del *Cryphonectria hypovirus* 1 (CHV1-E).

La diversidad de la compatibilidad vegetativa fue muy baja. Se encontraron en total 9 tipos vc, compartiendo 5 de ellos las dos provincias. Cuatro tipos fueron compatibles con tipos vc europeos conocidos. Los otros 5 son nuevos tipos europeos que denominamos E1, E2, E5, E6 y E7. Los tipos vc dominantes en ambas poblaciones fueron E1, E2 y E5, abarcando entre los tres el 97% de los aislados. Se encontraron cuatro cepas hipovirulentas: dos compatibles con el tipo vc E1, una con E2 y otra con E5. El estudio de compatibilidad sexual mostró que el idiomorfo MAT-1 dominaba ambas poblaciones.

La reproducción principalmente asexual, junto con la baja diversidad de tipos de compatibilidad vegetativa y la presencia de cepas hipovirulentas compatibles con los tipos vc dominantes, son factores que favorecen la aplicación de técnicas de control biológico del cancro en los castaños afectados de Lugo y Ourense.

O. AGUÍN, D. MONTENEGRO, M. HERMIDA, J. P. MANSILLA. Estación Fitopatológica do Areeiro. Deputación Pontevedra. Subida a la Robleda s/n. 36153 Pontevedra. www.efa-dip.org
M. J. SAINZ. Departamento de Producción Vegetal, Universidad de Santiago de Compostela, 27002 Lugo.

Palabras clave: cancro, *Castanea sativa*, compatibilidad vegetativa, hipovirulencia, mating-types.

INTRODUCCIÓN

El cancro del castaño, causado por *Cryphonectria parasitica*, es una enfermedad ampliamente extendida en el centro y sur de Europa, en las costas este y oeste de Estados Unidos y en el este de Asia, habiendo sido detectado también en Túnez (África) (EPPO, 2008). En Europa, es una enfermedad de cuarentena incluida en la lista A2 de la EPPO. Los árboles más sensibles a este

ascomiceto son los de las especies *Castanea sativa*, presente en Europa, y *C. dentata*, que se encuentra en América del Norte, mientras que los castaños asiáticos de las especies *C. crenata* y *C. mollissima* se consideran tolerantes a la enfermedad (EPPO, 2005).

Cryphonectria parasitica se caracteriza por presentar dos tipos de cepas, unas que contienen un virus con ARN de doble cadena (ARNbc) y ocasionan canchros superficiales, que apenas producen daños en el árbol, y



Figura 1. Síntomas característicos del cancro. A: enrojecimiento. B: grietas longitudinales sobre la corteza. C: cuerpos de fructificación de *Cryphonectria parasitica*. D: micelio de *Cryphonectria parasitica* en forma de abanico bajo la corteza.

otras libres del virus que causan canchros importantes, con muerte de ramas y troncos afectados (Figura 1) (DAY *et al.*, 1977, MILGROOM y CORTESI, 2004). Desafortunadamente, en la naturaleza las cepas virulentas son las más abundantes y la enfermedad se transmite con facilidad a través de esporas fúngicas, que son transportadas por el aire, la lluvia e insectos y que penetran sobre todo en heridas o lesiones naturales del árbol. El hombre también participa en la propagación del cancro mediante el uso de herramientas y maquinaria no desinfectadas en árboles

enfermos y sanos y el traslado de material vegetal infectado. Una vez detectada la enfermedad en una determinada zona, pueden establecerse medidas preventivas para evitar su diseminación, pero por el momento no se conocen métodos curativos. Solo la aplicación de cepas hipovirulentas que puedan transmitir su virus a las virulentas ha demostrado eficacia en el control del cancro del castaño en poblaciones donde la diversidad de los grupos de compatibilidad vegetativa sea baja y la reproducción predominantemente asexual (HEINIGER y RIGLING, 1994).

Hasta finales de los años 90, se creía que el número de grupos vc europeos era de 64 (CORTESI *et al.*, 1998), pero actualmente se reconocen ya 74. Este número se incrementará en un futuro cercano, ya que investigadores de distintos países han publicado recientemente la existencia de nuevos tipos vc no descritos (AGUÍN *et al.*, 2005a,b; BRANGANÇA *et al.*, 2007). Aunque el número es alto, la diversidad de grupos vc en las poblaciones europeas de *C. parasitica* es baja, con índices de Shannon generalmente inferiores a 2 (GARBELOTTO *et al.*, 1992; SOTIROVSKI *et al.*, 2004), mientras que en poblaciones de Estados Unidos, y sobre todo de países asiáticos como China y Japón, de donde es nativa *C. parasitica*, la diversidad de grupos vc es muy alta (ANAGNOSTAKIS y KRANZ, 1987; LIU y MILGROOM, 2007).

La compatibilidad sexual en *Cryphonectria parasitica* está controlada por un único locus de tipo de compatibilidad (*MAT*), que presenta dos alelos o idiomorfos, *MAT-1* y *MAT-2* (MARRA y MILGROOM, 1999). Investigaciones realizadas en poblaciones de *C. parasitica* de Suiza (HOEGGER *et al.*, 2000), España (MONTENEGRO *et al.*, 2008) y Macedonia y Grecia (SOTIROVSKI *et al.*, 2004) indican que el grupo *MAT-1* predomina sobre el *MAT-2*.

Por tanto, las características de compatibilidad vegetativa y sexual en las poblaciones europeas de *C. parasitica* las hace candidatas idóneas para la aplicación con éxito de técnicas de control biológico basadas en la introducción de cepas hipovirulentas. El problema radica entonces en detectar este tipo de cepas en las zonas afectadas que sean además compatibles con los tipos vc dominantes.

En cepas hipovirulentas de *C. parasitica*, se han detectado virus de ARN de las familias *Hypoviridae*, *Reoviridae*, *Narnaviridae*, *Partiviridae* y *Chrysoviridae* (HILLMAN y SUZUKI, 2004), pero únicamente los virus CHV1, CHV2 y CHV3, que pertenecen a la familia *Hypoviridae*, son considerados apropiados para el control biológico del cancro del castaño (MILGROOM y CORTESI, 2004). En Europa, todas las cepas hipovirulentas

encontradas hasta el momento presentaron el hipovirus CHV1, que tiene una alta diversidad genotípica. ALLEMANN *et al.* (1999), mediante marcadores RFLP, detectaron 41 genotipos genéticamente diferentes de CHV1, clasificándolos en 5 subtipos: uno italiano (CHV1-I), uno alemán (CHV1-D), uno español (CHV1-E) y dos franceses (CHV1-F1, CHV1-F2).

En estudios anteriores realizados por nuestro equipo, se constató la amplia incidencia de *C. parasitica* en sotos gallegos, especialmente en las provincias de Lugo y Ourense, que tienen mayor superficie ocupada por castaño; se detectaron en Lugo dos cepas hipovirulentas no compatibles con los 8 tipos vc establecidos en las zonas muestreadas (AGUÍN *et al.*, 2005a), por lo que en principio no son utilizables como agentes de biocontrol del cancro. El objetivo de este trabajo fue llevar a cabo un muestreo extensivo e intensivo de árboles afectados en sotos de Lugo y Ourense, para determinar la diversidad genética de *C. parasitica* respecto a los tipos de compatibilidad vegetativa (vc) y sexual, detectar cepas hipovirulentas compatibles con los tipos vc existentes y caracterizar en su caso el hipovirus.

MATERIAL Y MÉTODOS

Durante el año 2007, se inspeccionaron castaños de Lugo y Ourense. Usando la información recogida en el Tercer Inventario Forestal Español (Ministerio de Medio Ambiente, 2001), se dividió la superficie de las dos provincias en cuadrículas de 4 x 4 km². Dentro de cada cuadrícula, se escogió un soto de castaños al azar, cuando fue posible. La mayor parte de ellos eran de propiedad privada y, por lo general, de pequeño tamaño, con menos de 0,5 ha. En cada soto, se seleccionaron árboles con síntomas de la enfermedad del que se cogieron trozos de corteza (de aprox. 12 x 5 cm) de los márgenes de cada uno de los cancos. El número de muestras por punto de muestreo y árbol varió según el estado de infección. Las muestras se almacenaron a 4 °C hasta su utilización.

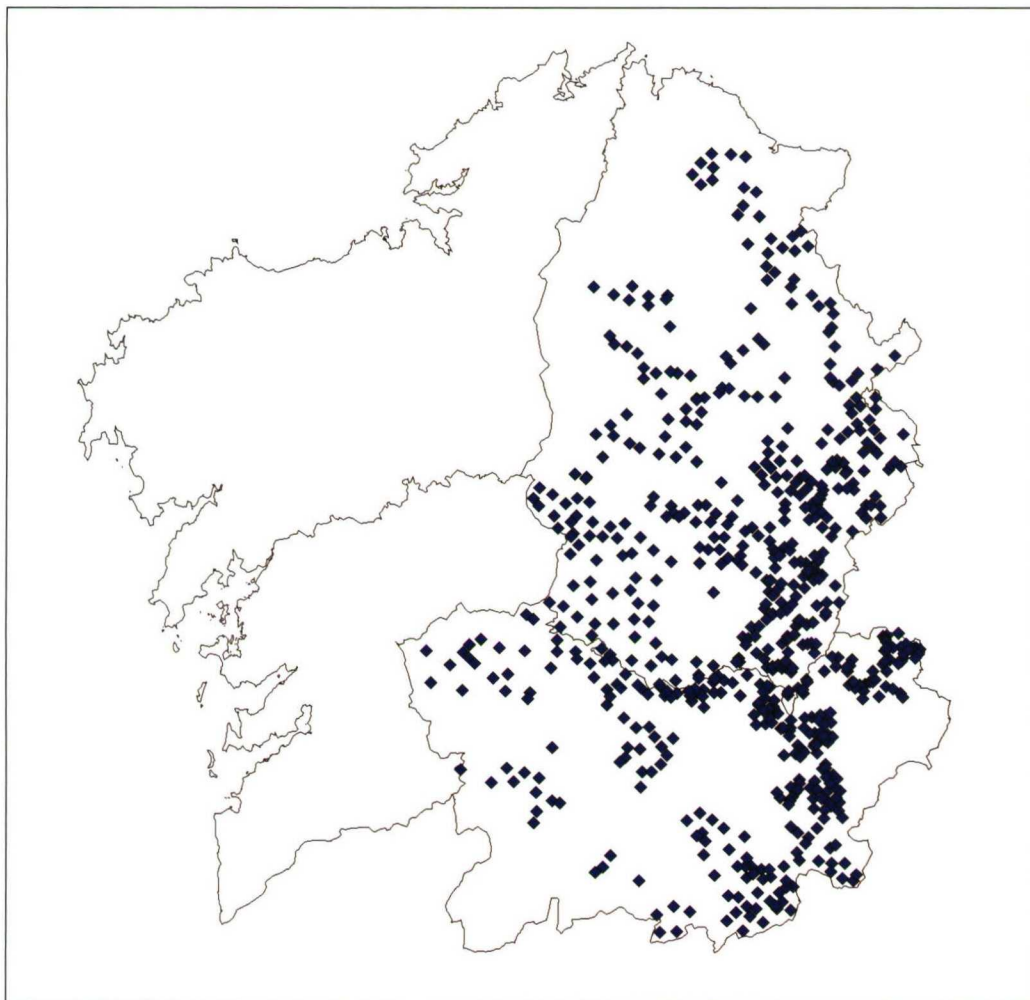


Figura 2. Localización de los puntos de muestreo de *Cryphonectria parasitica* en Galicia.

En total se recogieron 740 muestras de corteza con síntomas de cancro: 341 procedentes de Lugo y 399 de Ourense. En la Figura 2, se presenta un mapa indicando los puntos de muestreo, que se localizaron en un total de 102 ayuntamientos (46 en Lugo y 56 en Ourense).

El aislamiento de *C. parasitica* se realizó siguiendo el procedimiento descrito por CORTESI *et al.* (1996), pero cambiando el medio de cultivo inicial. Cada muestra se

dividió en trozos de aproximadamente 3 x 2 cm, que se desinfectaron en superficie primero con etanol al 70% y a continuación con hipoclorito de sodio al 0,5%, después se lavaron con agua estéril y se secaron sobre papel de filtro. Los fragmentos desinfectados y secos se dispusieron sobre medio PDA (Patata-Dextrosa-Agar) suplementado con metionina (100 mg L⁻¹) y biotina (1 mg L⁻¹) (PDAMB) en placas Petri. Los cultivos se mantuvieron a 24 °C en oscuridad. Después

de 4-5 días de crecimiento, se transfirió un fragmento de micelio de cada una de las placas a una nueva placa con medio PDA y se incubaron a 24 °C bajo un fotoperíodo de 16 h durante 7 días. La virulencia de cada aislado de *C. parasitica* se determinó mediante la observación del color y la presencia/ausencia de picnidios en las colonias (GARBELOTTO *et al.*, 1992). Fueron considerados posibles hipovirulentos sólo aquellos aislados que mostraron un micelio blanco que no formaba picnidios, mientras que las colonias anaranjadas que formaron picnidios se consideraron en un primer momento como libres del virus.

Los aislados obtenidos en cada provincia se consideraron como una población diferente de *C. parasitica*.

Extracción del ARNbc

Se llevó a cabo el aislamiento del ARNbc vírico en todos los aislados obtenidos, un total de 610, utilizando el método de MORRIS *et al.* (1983). Muestras de micelio de los aislados mantenidos en PDA se transfirieron a nuevas placas con medio PDA cubierto con celofán, que facilitó la posterior recolección del micelio. Para cada aislado, después de 7 días de cultivo, se recogieron 100 mg de micelio que se introdujeron en un tubo de microcentrífuga, al que se añadieron 700 µL de un tampón de lisis. La muestra se trituró con un pistón estéril y se incubó a 65 °C durante al menos 15 minutos. A continuación se añadió una mezcla de fenol, cloroformo y alcohol isoamílico 25:24:1. Tras varios pasos de centrifugación se obtuvo una solución de ARNbc en un tampón de conservación.

Posteriormente, la solución de ARNbc se incubó con 1 µL de ADNasa libre de ARNasa (Fermentas) a 37 °C durante 15 min y se almacenó a -20 °C. La calidad y cantidad de ARNbc obtenido se estimó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%. En cada prueba se incluyó un control positivo (que consistió en una cepa hipovirulenta perteneciente a la colección que se mantiene en el laboratorio de la EFA) y otro negativo, además del marcador de peso molecular λDNAHindIII (Fermentas), con el que se comparó el tamaño del ARNbc aislado.

Caracterización molecular de los virus de cepas hipovirulentas

Se determinó la especie y subtipo de virus al que pertenecían los ARNbc obtenidos a partir de cepas hipovirulentas mediante transcripción reversa – reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR), para amplificar un fragmento del ARNbc correspondiente a la región ORF A y secuenciación de 280 pb pertenecientes a una zona de alta variabilidad, localizada entre los nucleótidos 1495-1792 de la secuencia del hipovirus CHV1-EP713, como propone GOBBIN *et al.* (2003).

La síntesis del ADN complementario (ADNc) se llevó a cabo a partir de ARNbc utilizando el kit comercial Omniscript® Reverse Transcription Kit (Qiagen). Para la PCR se utilizó la pareja de primers desarrollados por ALLEMANN *et al.* (1999) y GRIMALDI *et al.* (1993) a partir de la secuencia de la cepa CHV1-EP713: EP713-5/R2280, que amplifican un fragmento de 1400 pb de la región ORF A (Cuadro 1).

En la PCR se utilizó indistintamente el ADNc recién sintetizado o una dilución

Cuadro 1. Nombre, localización genómica en la región ORF A, secuencia y referencia de los primers utilizados en las reacciones de PCR y secuenciación.

Primer	Localización	Secuencia (5'-3')	Referencia
EP713-5	841-860	TTGGATTCCCGATTCTTCA	Allemann <i>et al.</i> (1999)
R2280	2260-2280	CTTACCATCTCGCTTGACAAA	Grimaldi <i>et al.</i> (1993)
hvep1	-	TGACACGGAAGCTGAGTGTC	Gobbin <i>et al.</i> (2003)
hvep2	-	AGCGCGAATTTCTTGTCG	Gobbin <i>et al.</i> (2003)

1/100 del mismo. La reacción de amplificación se llevó a cabo en un termociclador Thermo Hybaid modelo PCR express y consistió en: desnaturalización inicial a 94 °C durante 5 minutos, 45 ciclos de desnaturalización a 94 °C 60 segundos, anillamiento a 55 °C 90 segundos, extensión a 72 °C 2 minutos, seguidos de una extensión final a 72 °C durante 8 minutos. La temperatura de anillamiento se redujo a 52 °C en los casos en los que no se obtuvo un rendimiento óptimo. El producto de la amplificación se analizó mediante electroforesis en gel de agarosa al 2%. Se utilizó un marcador de peso molecular de 100 pb (MWM XIV, Roche Diagnostics).

La purificación se realizó utilizando el kit comercial Nucleo Spin Extract II (Macherey-Nagel). Alícuotas de los productos purificados se sometieron a electroforesis en gel de agarosa al 2% para estimar la concentración del ADN purificado, tomando como referencia el marcador MWM XIV (Roche Diagnostics).

La reacción de secuenciación se realizó a partir del producto de RT-PCR purificado con los mismos primers utilizados en la PCR. Para secuenciar el fragmento de 280 pb de la región ORF A, se seleccionaron los primers hvep1 y hvep2 desarrollados por GOBBIN *et al.* (2003) (Cuadro 1).

La secuenciación se llevó a cabo utilizando el kit Big Dye Terminator V3.1 Cycle Sequencing (Applied Biosystems). Las condiciones de la reacción de secuenciación cíclica fueron: desnaturalización inicial a 96 °C durante 1 min y 25 ciclos a 96 °C 10 s, 50 °C 5 s, y 60 °C 4 min en un termociclador Thermo hybaid, modelo PCR express. Los productos de la secuenciación se precipitaron con etanol y se desnaturalizaron con formamida siguiendo las instrucciones del fabricante. Los productos desnaturalizados se cargaron en un secuenciador ABI PRISM™ 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems).

Las secuencias de ADN obtenidas se analizaron con el programa Sequencing Analysis 5.1 (AP Biotech) y se compararon con las secuencias disponibles en la base de datos

del National Center for Biotechnology Information (NCBI) utilizando la aplicación para el alineamiento y comparación de secuencias BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) (ALTSCHUL *et al.*, 1997), escogiendo el programa BLAST nucleotide y el algoritmo Megablast, optimizado para secuencias de nucleótidos con niveles altos de similitud.

La determinación del subtipo de hipovirus se realizó mediante análisis filogenético de las secuencias obtenidas con los primers hvep1 y hvep2. Además de éstas se incluyeron las obtenidas por GOBBIN *et al.* (2003) correspondientes a los diferentes subtipos de CHV1 presentes en Europa, a las especies tipo CHV1-EP713 (SHAPIRA *et al.*, 1991a) y CHV1-Euro7 (CHEN y NUSS, 1999) y la secuencia de la especie CHV2-NB58 (HILLMAN *et al.*, 1994) como outgroup. El alineamiento de las secuencias y el análisis filogenético se realizó con el programa Clustal X v1.83 (THOMPSON *et al.*, 1997) y PHYLIP v3.66 (FELSESTEIN, 1989), respectivamente. La robustez de cada filogenia fue determinada mediante el análisis bootstrap de 500 replicados, a partir de los cuales se elaboró un árbol consenso. Para la visualización y edición del árbol consenso se utilizó el programa TreeView (PAGE, 1996).

Determinación de los tipos de compatibilidad vegetativa

Se estudió la compatibilidad vegetativa de 610 aislados de *C. parasitica* mediante el procedimiento descrito por ANAGNOSTAKIS (1988), sólo que sustituyendo el medio PDAMB por el medio PDAG propuesto por POWELL (1995), que contiene el indicador de pH verde de bromocresol. Según CORTESI *et al.* (1996), los estudios de compatibilidad vegetativa realizados con PDAG poseen una mayor resolución que los efectuados con PDAMB. Los aislados de cada población (Lugo y Ourense) se confrontaron en todas las combinaciones posibles dos a dos. Para cada pareja de aislados, se cortaron pequeños trozos de agar-micelio de colonias cultivadas en PDA y se dispusieron enfrentadas, con la superficie del micelio hacia abajo,

separadas 1 mm entre sí y a 5 mm del borde de una placa Petri de 9 cm. En cada placa, se realizaron seis confrontaciones.

Las placas se incubaron a 24° C en la oscuridad. La compatibilidad vegetativa se observó a los 7 y 14 días de incubación. Los enfrentamientos se consideraron incompatibles cuando se observó una barrera de color negro entre los dos micelios y cuando el agar PDAg mostró una coloración oscura, mientras que una confrontación se consideró compatible cuando los dos micelios se fusionaron completamente y no se apreciaron cambios en el color del agar (POWELL, 1995).

Para cada población, se mantuvo un aislado de cada tipo vc encontrado como cepa de referencia. Posteriormente, las cepas de referencia de cada población (Lugo y Ourense) se enfrentaron en todas las combinaciones posibles, dos a dos, para obtener los tipos de compatibilidad vegetativa conjuntos, seleccionando un aislado tipo como cepa de referencia final. Cada cepa gallega de referencia se enfrentó a continuación con cada una de las 74 cepas de referencia europeas (EU), EU1-EU64, proporcionadas por el Dr. Paolo Cortesi (Istituto di Patologia Vegetale, Università degli Studi di Milano, Milán, Italia) y el Dr. Michael G. Milgroom (Department of Plant Pathology, Cornell University, Ithaca, Nueva York, EEUU), y EU65-EU74 por la Dra. Cecile Robin (Unité de Recherches Santé Végétale, INRA Burdeos, Villenave d'Ornon, Francia).

La diversidad de tipos de compatibilidad vegetativa se calculó mediante la relación S/N y el índice de diversidad de Shannon ($H' = -\sum p_i (\ln p_i)$, $i = 1, \dots, S$, donde p_i es la frecuencia de cada tipo de compatibilidad vegetativa y S es el número de tipos de compatibilidad vegetativa).

Mating-types

Se llevó a cabo el estudio del mating-type en los 610 aislados obtenidos. Se recogieron entre diez a cuarenta mg de micelio con un escalpelo estéril a partir del borde de las colonias que se desarrollaban en placas de PDA cubiertas por láminas de celofán.

El ADN genómico del hongo fue extraído mediante el EZNA Fungal DNA Miniprep kit (Omega Biotek).

El tipo de compatibilidad sexual de los aislados de *C. parasitica* se determinó mediante el método desarrollado por MARRA y MILGROOM (1999). El ADN molde se amplificó mediante nested-PCR, utilizando en la primera reacción los pares de primers M1-GS1/M1-GS2-rev para el idiomorfo *MAT-1* y InvA5n/M2-GS2 para *MAT-2*. Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en tubos de microcentrífuga, cada uno con 16 mM (NH₄)₂SO₄, 67 mM Tris-HCl (pH 8,8), 0,01% Tween-20, 200 μM de una mezcla de un dNTPs (Bioline), 5 mM MgCl₂ (Bioline), 0,75 U de BioTaq™ ADN polimerasa (Bioline), 0,2 μM de cada cebador, y 1 μL de ADN molde con un volumen final de 30 μL. Las reacciones de amplificación de ADN se llevaron a cabo en un termociclador PCR Express (Thermo Hybaid) en las siguientes condiciones: desnaturalización inicial a 94 °C durante 5 minutos, 30 ciclos de desnaturalización a 95 °C durante 30 segundos, anillado a 66 °C durante 60 segundos, extensión a 72 °C durante 4 minutos, y una extensión final a 72 °C durante 3 minutos. En todos los experimentos se utilizaron controles negativos (sin ADN) para detectar cualquier contaminación.

La segunda etapa de la nested-PCR se llevó a cabo con 1 μL de los productos de reacción a partir de la primera amplificación (diluidos 1/50 con agua purificada) y con las parejas de primers M1-GS1n/M1-GS3-rev para *MAT-1* y gsl-d-1/M2-GS3 para *MAT-2* (MARRA, 1998). Las condiciones de PCR fueron las mismas que en el caso anterior, la única variación fue el número de ciclos que fue de 22 en vez de 30.

Los productos obtenidos en las reacciones de PCR se sometieron a electroforesis en gel de agarosa al 2%, a continuación se tiñeron en bromuro de etidio y se visualizaron con un transiluminador de luz UV. Se realizó una estimación del tamaño de los productos de PCR por comparación con un marcador de peso molecular de 100 pb (Molecular Weight

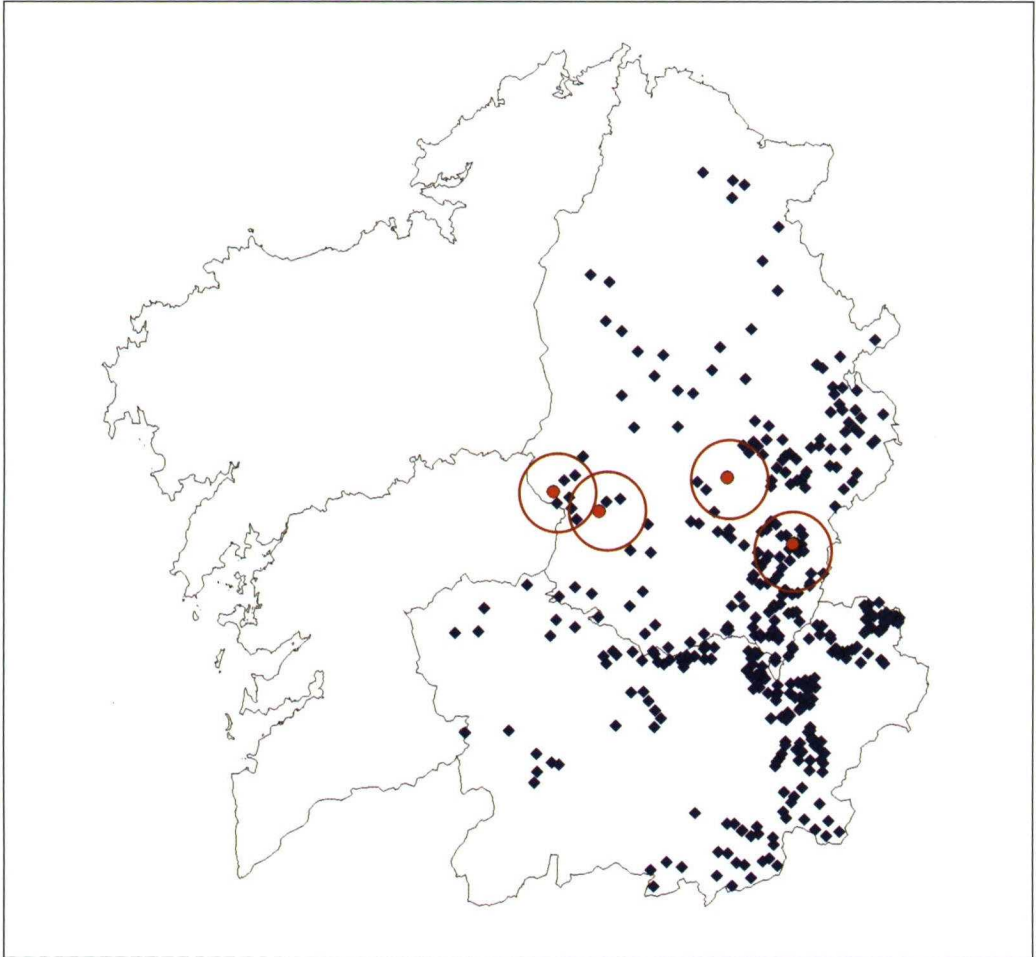


Figura 3. Distribución de los aislados virulentos e hipovirulentos de *Cryphonectria parasitica* detectados en el muestreo de Galicia. Los aislados hipovirulentos se indican en rojo.

Marker XIV, Roche Diagnostics), mediante el programa ID manager (TDI, Madrid).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados demostraron la amplia distribución del cancro en Lugo y Ourense, detectándose la enfermedad en 78 de los 102 ayuntamientos inspeccionados (Figura 3). La zona más oriental de ambas provincias, limítrofe con León, resultó más afectada, concretamente los ayuntamientos de As

Nogais, Cervantes, Folgoso do Caurel, Navia de Suarna, Quiroga y Ribas de Sil en Lugo y O Barco de Valdeorras, O Bolo, Rubiá y Viana do Bolo en Ourense.

Se obtuvieron 610 aislados de *C. parasitica*, 248 de Lugo y 362 de Ourense. En cultivo, la mayoría de estos aislados formaron colonias de color inicialmente blanco, que finalmente adquirieron una tonalidad naranja y produjeron gran cantidad de picnidios, siendo considerados virulentos (Figura 4A) (GARBELOTTO *et al.*, 1992). Veinticinco aisla-



Figura 4. Morfología de *Cryphonectria parasitica* en medio PDA. A: aislado virulento. B: aislado hipovirulento.

dos presentaron colonias de color blanco que no formaron picnidios, y se clasificaron en un primer momento como hipovirulentos (Figura 4B).

La hipovirulencia se confirmó en cuatro aislados a través de la extracción de una molécula de ARNbc con peso molecular de aproximadamente 12,7 kb, tamaño que coincide con el de la especie CHV1 de *Cryphonectria hypovirus* (SHAPIRA *et al.*, 1991). Los cuatro aislados hipovirulentos se encontraron en muestras recogidas en la provincia de Lugo (Figura 3) y pertenecieron al grupo caracterizado inicialmente como hipovirulento por la morfología de sus colonias.

La amplificación de la región ORF A del ARNbc de las cuatro cepas hipovirulentas mediante RT-PCR produjo un fragmento de 1400 pb (Figura 5). Cuando se comparó la secuencia de este fragmento con las depositadas en el GenBank, resultó que el hipovirus de las cuatro cepas se correspondía con la especie CHV1. Se compararon también las secuencias de los cuatro hipovirus entre sí, observándose que eran idénticas, lo que indicaba que las cuatro cepas hipovirulentas de la provincia de Lugo compartían el mismo hipovirus. La secuenciación y análisis de un

fragmento interno de la región ORF A del hipovirus demostró que pertenecía al subtipo E, o español, del CHV1 (CHV1-E) (Figura 6). Este subtipo se detectó por primera, y única vez hasta este trabajo, en Navarra (ALLEMANN *et al.*, 1999) y es la primera vez que se encuentra en Galicia.

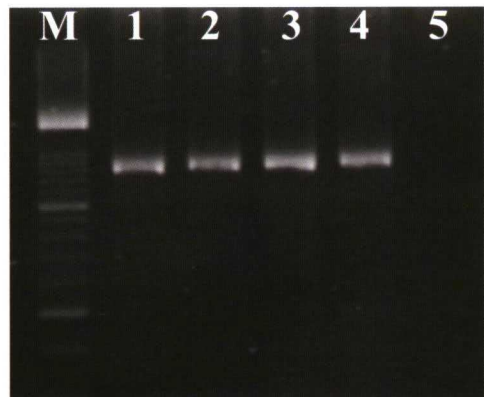


Figura 5. Caracterización molecular de *Cryphonectria hypovirus*. Electroforesis en gel de agarosa al 2% mostrando el resultado de PCR. Calles 1 a 4: fragmento de 1400 pb correspondiente a la amplificación de la región ORF A del hipovirus. Calle 5: control negativo. M: marcador de peso molecular de 100 en 100 pb.

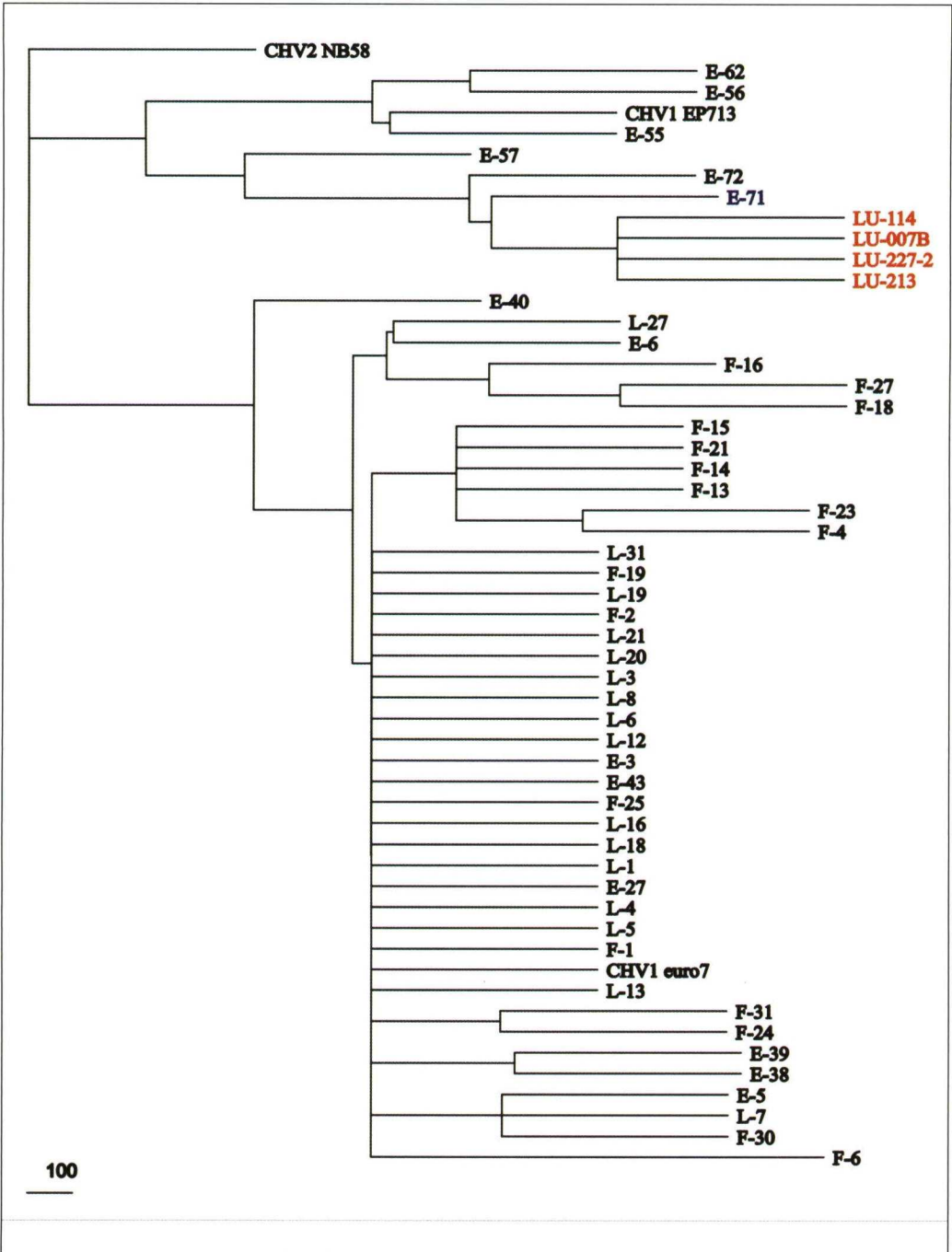


Figura 6. Dendrograma construido a partir de la secuenciación parcial de la región ORF A del *Cryphonectria hypovirus* 1 (CHV-1). En rojo se marcan los cuatro aislados hipovirulentos procedentes de la provincia de Lugo. En azul se marca el aislado E-71 procedente de Navarra y perteneciente al subtipo E o español.

En España, se han realizado muy pocos estudios sobre la estructura de las poblaciones y la presencia de cepas hipovirulentas de *C. parasitica*, pero los pocos publicados sugieren que ha habido múltiples introducciones de la hipovirulencia en nuestro país. Además del subtipo CHV1-E, se ha caracterizado el subtipo CHV1-I (subtipo italiano) en Cataluña (HOMS *et al.*, 2002) y el CHV1-F1 (uno de los dos subtipos franceses) en la provincia de León (MONTENEGRO *et al.*, 2008).

Los 610 aislados obtenidos se agruparon en nueve tipos vc (Cuadro 2). Cuatro de ellos correspondieron a las cepas vc europeas de referencia EU1, EU9, EU66 y EU72, si bien todas ellas representadas por muy pocos aislados. Los otros cinco tipos no fueron compatibles con ninguna de las 74 cepas europeas de referencia consideradas en la actualidad; dos de ellos, E1 y E2, ya habían sido encontrados en Galicia, y en particular en Lugo y Ourense, por MONTENEGRO *et al.* (2008), quienes también establecen en la provincia de León otros dos tipos vc no descritos previamente, E3 y E4, que en el presente trabajo no se han detectado. Los tres tipos vc restantes, denominados E5, E6 y E7,

son también nuevos tipos vc europeos. Los tipos vc E1, E2 y E5, por este orden, fueron los más abundantes tanto en Lugo como en Ourense. En Lugo, el 52% de los aislados fueron del tipo E1 y el 42% del E2; en Ourense, sólo el tipo E1 incluyó el 68% de los aislados.

La diversidad de las poblaciones de *C. parasitica* en las dos provincias gallegas fue muy baja (Cuadro 2), como era esperable dado que sólo se encontraron 7 tipos vc en cada provincia y, de ellos, 1 o 2 dominantes. Los valores del índice de Shannon no superaron el valor de 1, resultado que coincide con los descritos para otras poblaciones del hongo en distintos países europeos (ROBIN *et al.*, 2000; SOTIROVSKI *et al.*, 2004). Esta baja diversidad de las poblaciones europeas de *C. parasitica* contrasta con la de poblaciones americanas (ANAGNOSTAKIS y KRANZ, 1987) y, sobre todo, con las asiáticas, en las que se ha llegado a constatar 125 tipos vc diferentes en 143 aislados (LIU y MILGROOM, 2007). En general, se acepta que la mayor diversidad está relacionada con una presencia de la enfermedad muy prolongada en el tiempo en una determinada área.

Cuadro 2. Diversidad de los tipos de compatibilidad vegetativa (vc) detectados en Galicia.

Tipos VC	Poblaciones	
	Lugo	Ourense
EU1	1	0
EU9	0	2
EU66	1	5
EU72	1	0
E1	130	246
E2	104	66
E5	10	36
E6	0	6
E7	1	1
N^a	248	362
S^b	7	7
S/N	0,019	0,028
H^c	0,97	0,92

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

^b Nº de vc encontrados en cada población.

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

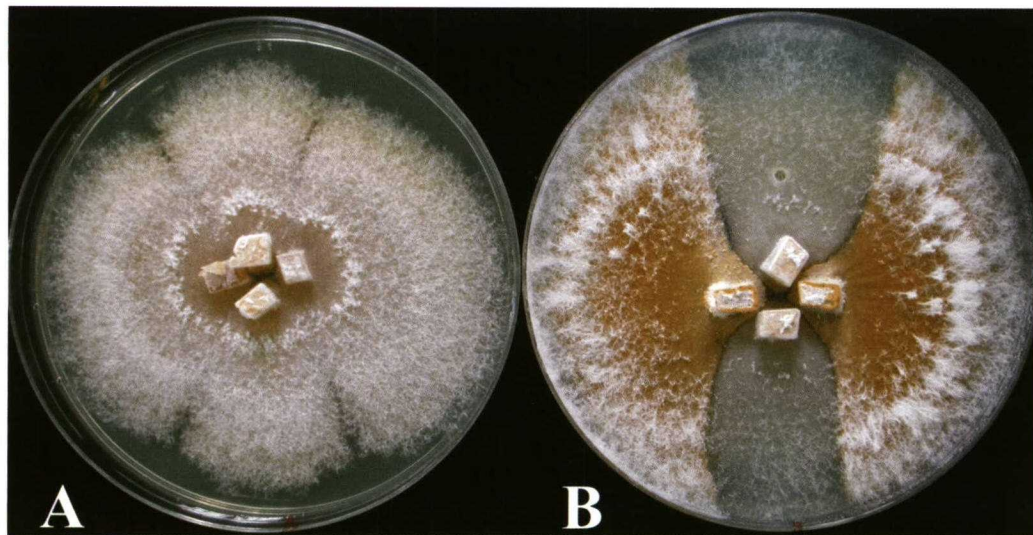


Figura 7. Compatibilidad vegetativa de un aislado hipovirulento con aislados de dos tipos de compatibilidad vc de *Cryphonectria parasitica*. A: confrontación con conversión. B: confrontación sin conversión.

Considerando los resultados de MONTENEGRO *et al.* (2008) y los del presente trabajo, es destacable la gran diferencia en la estructura de las poblaciones de *C. parasitica* entre dos áreas geográficas limítrofes y pequeñas: las provincias de Lugo y Ourense, en las que predominan los tipos vc E1 y E2, y la provincia de León, en la que el tipo vc europeo de referencia EU1 es el más abundante. También es importante cara a desarrollar programas de control biológico del cancro, la baja incidencia de cepas hipovirulentas en ambas áreas, ya que sólo se han encontrado cuatro en este trabajo en Lugo y 15 en León por MONTENEGRO *et al.* (2008), a pesar de sumar entre ambos estudios más de mil aislados.

En cualquier caso, para aplicar con éxito técnicas de control biológico basadas en la introducción de cepas hipovirulentas, es conveniente que estas cepas pertenezcan al mismo tipo vc que las virulentas que se pretenden controlar y que las poblaciones virulentas presenten principalmente reproducción asexual (ANAGNOSTAKIS, 1977, 1988). Ambas características se cumplen

en las poblaciones de *C. parasitica* de Lugo y Ourense. Los cuatro aislados hipovirulentos pertenecieron dos al tipo vc E1, un tercero al E2 y el cuarto al E5 (Figura 7), por lo que sería viable controlar la mayor parte de los cancores de ambas provincias. Este control se vería adicionalmente favorecido por la reproducción preferentemente asexual de las poblaciones del patógeno, ya que el tipo MAT-1 correspondió al 81% de los aislados de Ourense y al 86% de los de Lugo (incluyendo las cepas hipovirulentas). Para que la reproducción sexual juegue un papel importante en las poblaciones de *C. parasitica*, la proporción de individuos MAT-1 y MAT-2 debería ser aproximadamente 1:1 (ANAGNOSTAKIS, 1988).

Los resultados obtenidos en la caracterización morfológica y molecular de las poblaciones de *C. parasitica* en Galicia nos permiten tener buenas perspectivas para la aplicación con éxito de un programa de biocontrol del cancro en nuestra comunidad, trabajos que en la actualidad ya se están desarrollando.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido financiado por la Xunta de Galicia y la Diputación Provincial de Pontevedra. Los autores queremos agradecer al Dr. Paolo Cortesi (Istituto di Patologia Vegetale, Università degli Studi di Milano, Italy), Dr. Michael Milgroom (Department of Plant Pathology, Cornell University, New York) y a la Dra. Cecile Robin (INRA Pathologie Vegetale, Villenave d'Ornon,

France) por facilitarnos las cepas de referencia europeas. Al Dr. Daniel Rigling (Swiss Federal Research Institute of Forest, Snow and Landscape, Birmensdorf, Suiza), por su ayuda en la identificación de hipovirus. A Dña. Susana Rodríguez y Dña. Carmela Menduiña, técnicos de la Estación Fitopatológica do Areeiro, por su trabajo en el procesamiento de muestras, y a D. Manuel Vilas por el tratamiento informático de los datos de campo.

ABSTRACT

AGUÍN, O., D. MONTENEGRO, M. J. SAINZ, M. HERMIDA, J. P. MANSILLA. 2008. Morphological and molecular characterization of the populations of *Cryphonectria parasitica* in chestnut-trees of Galicia. *Bol. San. Veg. Plagas*, **34**: 581-594.

Chestnut blight caused by *Cryphonectria parasitica* is a fungal disease widely spread in chestnut stands all over the world. At present, the only feasible perspectives for its control are based on the knowledge of the populations present in the affected stands and the use of hypovirulent strains. The biology of *C. parasitica* populations naturally occurring in chestnut stands in Lugo and Ourense provinces was then studied so as to determine the diversity of vegetative compatibility (vc) and mating types, as well as the occurrence of hypovirulent strains. A total of 610 isolates were obtained. Only 4 isolates, from Lugo province, showed the presence of ARNbc, characteristic of hypovirulent strains. Molecular characterization of hypovirus proved all hypovirulent strains belonged to *Cryphonectria hypovirus 1* (CHV1-E).

The diversity of vegetative compatibility was very low. Nine vc types were found, five of them occurring in both provinces. Four types were compatible with known European testers and the others were unreported vc types named E1, E2, E5, E6 and E7. Dominant vc types in both populations were E1, E2 and E5, being detected in 97% of the isolates. Four hypovirulent strains were found: two compatible with vc type E1, one with E2 and other with E5. The study of mating types showed that idiomorph *MAT-1* was dominant in both populations.

Reproduction mainly asexual, together with the low diversity of vegetative compatibility types and the presence of hypovirulent strains compatible with dominant vc types, are factors favouring the application of a biological control program against chestnut blight in chestnut stands in Lugo and Ourense provinces.

Key words: chestnut blight disease, *Castanea sativa*, vegetative compatibility, hypovirulence, mating-types.

REFERENCIAS

- AGUÍN, O., MATA, M., MANSILLA, J. P. 2005a. Occurrence and diversity of vegetative compatibility types of *Cryphonectria parasitica* in Galicia (NW Spain). *Acta Hort*, **693**: 597-603.
- AGUÍN, O., MATA, M., MANSILLA, J. P., MARTÍN, A. B., SIERRA, J. M. 2005b. Distribución y diversidad de los tipos de compatibilidad vegetativa de *Cryphonectria parasitica* (Murrill) Barr en castaños de Castilla y León. *Bol. San. Veg. Plagas*, **31**: 287-297.
- 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. *Mol. Ecol.*, **8**: 843-854.
- ALTSCHUL, S. F., MADDEN, T. L., SCHÄFFER, A. A., ZHANG, J., ZHANG, Z., MILLER, W., LIPMAN, D. J. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.*, **25**: 3389-3402.

- ANAGNOSTAKIS, S. L. 1977. Vegetative incompatibility in *Endothia parasitica*. *Exp. Mycol.*, **1**: 306-316.
- ANAGNOSTAKIS, S. L. 1988. *Cryphonectria parasitica*: cause of chestnut blight. *Adv. Plant Pathol.*, **6**: 123-136.
- ANAGNOSTAKIS, S. L., KRANZ, J. 1987. Population dynamics of *Cryphonectria parasitica* in a mixed-hardwood forest in Connecticut. *Phytopathology*, **77**: 751-754.
- BRAGAÇA, H., SIMÕES, S., ONOFRE, N., TENREIRO, R., RIGLING, D. 2007. *Cryphonectria parasitica* in Portugal: diversity of vegetative compatibility types, mating types, and occurrence of hypovirulence. *For. Pathol.*, **37**: 391-402.
- CHEN, B., NUSS, D. L. 1999. Infectious cDNA clone of hypovirus CHV1-Euro7: a comparative virology approach to investigate virus-mediated hypovirulence of the chestnut blight fungus *Cryphonectria parasitica*. *J. Virol.*, **73**: 985-992.
- 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. Pathol.*, **28**: 167-176.
- DAY, P. R., DODDS, J. A., ELLISTON, J. E., JAYNES, R. A., ANAGNOSTAKIS, S. L. 1977. Double-stranded RNA in *Endothia parasitica*. *Phytopathology*, **67**: 1393-1396.
- EPPO. 2005. Diagnostics. *Cryphonectria parasitica*. *EPPO Bull.*, **35**: 271-273.
- EPPO. 2008. Distribution maps of quarantine pest for Europe: *Cryphonectria parasitica*. Available in <http://pqr.epo.org/datas/ENDOPA/ENDOPA.pdf> (último acceso 25 de junio 2008).
- FELSESTEIN, J. 1989. PHYLP-Phylogeny inference package (Version 3.2). *Cladistics*, **5**: 164-166.
- GARBELOTTI, M., FRIGIMELICA, G., MUTTO-ACCORDI, S. 1992. Vegetative compatibility and conversion to hypovirulence among isolates of *Cryphonectria parasitica* from northern Italy. *Eur. J. For. Pathol.*, **22**: 337-348.
- GOBBIN, D., HOEGGER, P. J., HEINIGER, U., RIGLING, D. 2003. Sequence variation and evolution of *Cryphonectria hypovirus 1* (CHV-1) in Europe. *Virus Res.*, **97**: 39-46.
- GRIMALDI, V., ASTUTO, G., GRANATA, G., SANTUCCIO, T. 1993. Detection of dsRNA in hypovirulent strains of *Cryphonectria parasitica* by polymerase chain reaction analysis. Proceedings of the International Congress on Chestnut, Spoleto (Italia), pp 587-590.
- HEINIGER, U., RIGLING, D. 1994. Biological control of chestnut blight in Europe. *Annu. Rev. Phytopathol.*, **32**: 581-589.
- HILLMAN, B. I., SUZUKI, N. 2004. Viruses of the chestnut blight fungus, *Cryphonectria parasitica*. *Adv. Virus Res.*, **63**: 423-472.
- HILLMAN, B. I., HALPERN, B. T., BROWN, M. P. 1994. A viral dsRNA element of the chestnut blight fungus with a distinct genetic organization. *Virology*, **201**: 241-250.
- HOEGGER, P. J., RIGLING, D., HOLDENRIEDER, O., HEINIGER, U. 2000. Genetic structure of newly established populations of *Cryphonectria parasitica*. *Mycol. Res.*, **104**: 1108-1116.
- HOMS, G., RODRÍGUEZ, J., RIGLING, D., COLINAS, C. 2002. Caracterización de la población de *Cryphonectria parasitica* y detección de cepas hipovirulentas en 3 subpoblaciones de Cataluña. En: Actas del III Congreso Forestal Español. Ed. Junta de Andalucía.
- LIU, Y. C., MILGROOM, M. G. 2007. High diversity of vegetative compatibility types in *Cryphonectria parasitica* in Japan and China. *Mycologia*, **99**: 279-284.
- MARRA, R. E. 1998. Selfing in the context of self-incompatibility: the mixed mating system of the fungus *Cryphonectria parasitica*. Ithaca, USA: Cornell University, Ph.D. Thesis.
- MARRA, R. E., MILGROOM, M. G. 1999. PCR amplification of the mating-type idiomorphs in *Cryphonectria parasitica*. *Mol. Ecol.*, **8**: 1947-1950.
- MILGROOM, M. G., CORTESI, P. 2004. Biological control of chestnut blight with hypovirulence: A critical analysis. *Annu. Rev. Phytopathol.*, **42**: 311-338.
- MINISTERIO DE MEDIO AMBIENTE. 2001. Tercer Inventario Forestal Nacional. 1997-2006. Galicia.
- MONTENEGRO, D., AGUÍN, O., SAINZ, M. J., HERMIDA, M., MANSILLA, J. P. 2008. Diversity of vegetative compatibility types, distribution of mating types and occurrence of hypovirulence of *Cryphonectria parasitica* in chestnut stands in NW Spain. *Forest Ecol. Manag.*, **256**: 973-980.
- MORRIS, T. J., DODDS, J. A., HILLMAN, B. I., JORDAN, R. L., LOMMEL, S. A., TAMAKI, S. J. 1983. Viral specific dsRNA: diagnostic value for plant virus disease identification. *Plant Mol. Biol. Rep.*, **1**: 27-30.
- PAGE, R. D. M. 1996. TREEVIEW: An application to display phylogenetic trees on personal computers. *Comput. Appl. Biosci.*, **12**: 357-358.
- 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.
- SHAPIRA, R., GHOI, G. H., NUSS, D. L. 1991. Virus-like genetic organization and expression strategy for a double-stranded RNA genetic element associated with biological control of chestnut blight. *EMBO J.*, **10**: 731-739.
- SOTIROVSKI, K., PAPAZOVA-ANAKIEVA, I., GRÜNWARD, N. J., MILGROOM, M. G. 2004. Low diversity of vegetative compatibility types and mating type of *Cryphonectria parasitica* in the Southern Balkans. *Plant Pathol.*, **53**: 325-333.
- THOMPSON, J. D., GIBSON, T. J., PLEWNIAK, F., JEANMOUGIN, F., HIGGINS, D. G. 1997. The Clustal X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.*, **25**: 4876-4882.

(Recepción: 8 julio 2008)

(Aceptación: 2 septiembre 2008)