

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

O. AGUÍN, M. MATA, J. P. MANSILLA, A. B. MARTÍN, J. M. SIERRA

Se ha estudiado la distribución y diversidad de *Cryphonectria parasitica*, ascomiceto responsable del chancro, en masas de castaños de la Comunidad Autónoma de Castilla y León durante los años 2003 y 2004. Se recogieron 261 muestras de corteza de árboles sintomáticos, confirmándose la presencia de *C. parasitica* en el 91% de las muestras analizadas. Los caracteres morfológicos y la extracción del dsRNA no identificó ninguna cepa como hipovirulenta. A partir del estudio de 239 aislados de *C. parasitica*, se detectaron 8 tipos de compatibilidad vegetativa (vc). Tres fueron compatibles con las cepas europeas de referencia. El tipo vc 1 fue compatible con EU1, el tipo vc 2 con EU12 y el tipo vc 6 con EU28. La mayoría de los aislados se incluyeron en el tipo vc 1. En León se detectaron 4 tipos vc, en Zamora 6 y en Burgos 1. Se estableció una media de 3.6 tipos vc por provincia. El mayor índice de diversidad de Shannon se detectó en Zamora con un 1,42. La baja diversidad de los tipos vc de *C. parasitica* encontrados en Castilla y León facilitará la implantación de un programa de control biológico.

O. AGUÍN, M. MATA, J. P. MANSILLA. Estación Fitopatológica "Do Areeiro". Excma. Diputación Provincial. Subida a la Robleda s/n. 36153 Pontevedra. www.efa-dip.org
A. B. MARTÍN, J. M. SIERRA. Centro de Sanidad Forestal de Calabazanos. Consejería de Medio Ambiente. Junta de Castilla y León. Polígono Industrial de Villamuriel, s/n. Villamuriel de Cerrato, 34190 Palencia. sanidad.forestal@jcy1.es

Palabras clave: *Castanea sativa*, Castilla y León, chancro, diversidad genética.

INTRODUCCIÓN

Cryphonectria (*Endothia*) *parasitica* (Murrill) Barr, identificado en 1906 como *Diaporthe parasitica* (Murrill), es un ascomiceto responsable de la enfermedad denominada chancro del castaño. Este hongo, de origen asiático, fue introducido en Europa, concretamente en Génova (Italia), en 1938 (BIRAGHI, 1946). La enfermedad se extendió rápidamente ocasionando una gran destrucción de los castaños europeos (*Castanea sativa* Mill); en 1967 la mayoría de las áreas cultivadas con castaños estaban afectadas (ALLEMANN *et al.*, 1999).

En España, Rodríguez Sardiña identificó en 1940 a *Endothiella gyrosa* Sacc. como causante de una sintomatología similar al chancro en una plantación de castaños asiáticos (*Castanea crenata* Sieb. et Zucc.) en Corgoma de Valdeorras (Galicia). Pero la primera vez que se hace referencia a *Endothia parasitica* como responsable del chancro del castaño es en Vizcaya en 1947 (ELORRIETA, 1949). En la actualidad, *C. parasitica* afecta gravemente a los sotos del norte de la Península Ibérica (HOMS *et al.*, 2002).

Cryphonectria parasitica está encuadrado en la lista A2 de la EPPO (European Plant Protection Organization) como patógeno de



Figura 1. Vista aérea de castaños en Castropetre (León).

cuarentena y recogido en la legislación española en el Anexo II, Parte A, Sección II, letra c) del Real Decreto 58/2005, de 21 de enero, por el que se adoptan medidas de protección contra la introducción y difusión en el territorio nacional y de la Comunidad Europea de organismos nocivos para los vegetales o productos vegetales, así como para la exportación y tránsito hacia países terceros.

La gravedad de los daños que *C. parasitica* causa en los castaños 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, que son menos patógenas y pueden transmitir su efecto a las cepas normales virulentas, provocando la cicatrización espontánea de los chancros (GRENTE, 1965).

La hipovirulencia consiste en una atenuación de la virulencia provocada por la infección de *C. parasitica* con un hipovirus que

posee un ARN de doble cadena (dsRNA). El virus se transmite por anastomosis hifales, produciendo la conversión de la cepa virulenta en hipovirulenta (ANAGNOSTAKIS, 1977; CHOI y NUSS, 1992). Hasta hace poco tiempo, la diferenciación entre cepas hipovirulentas y virulentas se basaba únicamente en características morfológicas de los aislados, como: ausencia de cuerpos de fructificación y coloración, crecimiento y textura del micelio, lo que llevaba en algunos casos a resultados confusos. En los últimos años, se han desarrollado técnicas de biología molecular que permiten la determinación rápida y fiable de las cepas hipovirulentas (VALDEZATE *et al.*, 2001).

Se ha podido demostrar 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 (MILGRO-

OM *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). 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 (Fig. 1). Estas 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.

Desde el 2000, se han llevado a cabo regularmente muestreos de material sintomático en masas de castaño de las provincias castellano leonesas (León, Zamora, Burgos, Avila, Salamanca), que han permitido constatar un aumento en la presencia de *C. parasitica* en las provincias de León, Zamora y Burgos (HERNÁNDEZ, comunic. personal). La provincia de León, que cuenta con mayor número de sotos, es la que se encuentra más dañada por la acción de este hongo.

El castaño se cultiva principalmente para la producción de fruto, por lo que las labores de poda, injertado, gradeos y otras, resultan el principal agente difusor de la enfermedad del chancro. La mayor parte de las masas afectadas son de propiedad privada, lo cual hace muy difícil un control para la correcta

realización de labores culturales. No obstante algunas masas cultivadas para la producción de madera en monte bajo, como es el caso de pequeños castañares residuales al norte de la provincia de Burgos, también se han visto colonizadas por este patógeno.

A pesar de esta situación hasta el momento no se había realizado ningún estudio sobre las poblaciones de *Cryphonectria parasitica* en esta región, por eso el objetivo de este trabajo fue conocer la distribución del chancro en castaños de Castilla y León, detectar cepas hipovirulentas, y determinar los grupos de compatibilidad vegetativa, como paso previo al establecimiento de un programa de control biológico.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. Localización y muestreo de *Cryphonectria parasitica*

En León se inspeccionaron 111 localidades en las que vegetaban masas adultas de *C. sativa* y 68 de reciente repoblación, recogándose 211 muestras de corteza con síntomas de la 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 en el soto o castañar seleccionado, se buscaron árboles con características externas de la enfermedad como: hinch-



Figura 2. Árbol afectado por *Cryphonectria parasitica*.



Figura 3. Hendiduras y grietas longitudinales características del chancro del castaño.



Figura 4. Micelio de *Cryphonectria parasitica* situado debajo de la corteza.

miento de corteza, hendiduras longitudinales, presencia de cuerpos de fructificación, etc. (Figs. 2, 3 y 4).

2. Recogida de material vegetal

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 hasta su remisión a laboratorio.

La zona dañada se cubrió con una capa de "mastic" cicatrizante con acción fungicida. Todo el instrumental empleado se desinfectó con hipoclorito sódico al 50% antes de tomar una nueva muestra. Cada punto de muestreo quedó localizado mediante coordenadas UTM.

3. Aislamiento de *Cryphonectria parasitica*

En el laboratorio, cada muestra de corteza se troceó en pequeños fragmentos (3 x 2 cm), que se sometieron, en condiciones

asépticas, a una desinfección superficial mediante un tratamiento en primer lugar con hipoclorito sódico al 50% y después con agua destilada estéril, ambos pasos en agitación durante 30 segundos.

Posteriormente los fragmentos se lavaron en dos soluciones, de etanol y de hipoclorito sódico al 50% respectivamente, y se sembraron en placas Petri con medio PDA (Patata Dextrosa Agar, Difco) suplementado con metionina (100 mg/L) y biotina (1 mg/L) (PDA_{mb}). Las placas se mantuvieron en estufa de cultivo en oscuridad a 24±1°C. Después de 4-5 días de incubación, se transfirió un fragmento del micelio crecido a una nueva placa de medio de cultivo PDA y se incubó en las mismas condiciones.

4. Identificación de cepas de *Cryphonectria parasitica* virulentas e hipovirulentas

La identificación de la virulencia de los aislados de *C. parasitica* se basó en primer lugar en los criterios morfológicos descritos por GARBELOTTO *et al.* (1992): color de las colonias, presencia o ausencia de picnidios, textura y grado de crecimiento en el medio de cultivo.

Para detectar aislados hipovirulentos, se realizó la extracción del dsRNA del hipovirus. 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, 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 (MORRIS y DODDS, 1979). 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 densimetría 1-D Manager (TDI, Madrid).

5. Estudio de la compatibilidad vegetativa

El estudio de la compatibilidad vegetativa de los aislados de *C. parasitica*, obtenidos en las tres provincias muestreadas, 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 (CORTESI *et al.*, 1996, 1998). Se utilizaron 239 aislados, 191 procedentes de León, 28 de Burgos y 20 de Zamora. Los aislados de *C. parasitica* obtenidos en cada provincia se enfrentaron entre sí en todas las combinaciones posibles, y un aislado de cada tipo de compatibilidad vegetativa (vc) resultante se conservó como representante 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

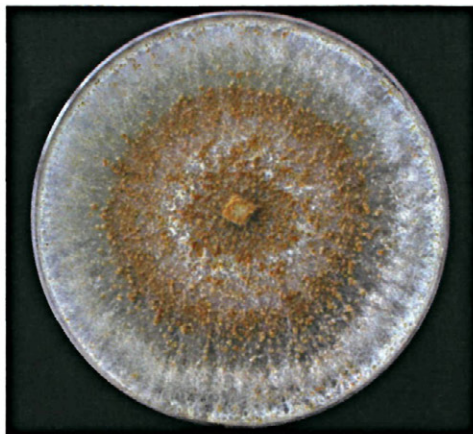


Figura 5. Aislado virulento de *Cryphonectria parasitica* en el medio de cultivo PDA.

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 $24\pm 1^\circ\text{C}$ en oscuridad.

Para la interpretación de los resultados, dos aislamientos se consideraron compatibles cuando los micelios enfrentados 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.

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; CORTESI *et al.*, 1996; ROBIN *et al.*, 2000).

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

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. Distribución de *Cryphonectria parasitica*

Los resultados del muestreo realizado para evaluar la presencia y la distribución de

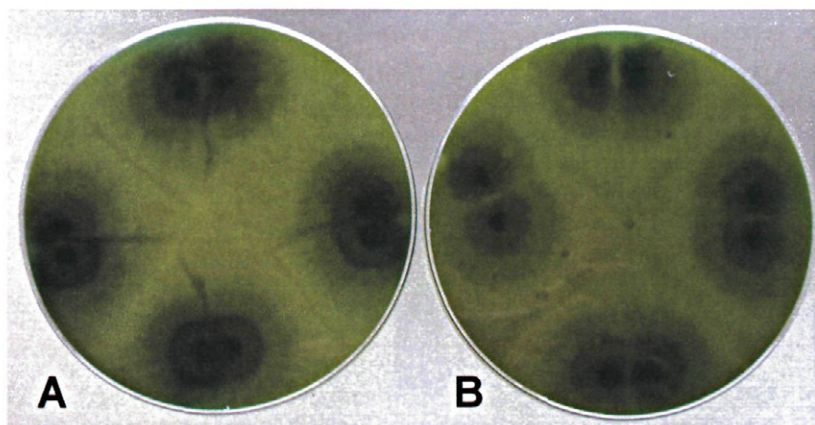


Figura 6. Confrontación incompatible (A) y compatible (B) de aislados de *Cryphonectria parasitica* en el medio de cultivo PDAg.

C. parasitica en Castilla y León se presentan en el Cuadro 1.

Durante el año 2003 se inspeccionaron un total de 121 puntos recogiendo material sintomático de chancro en 261 árboles. Posteriormente, en el laboratorio se obtuvo un aislado de *C. parasitica* en el 91% de las muestras de corteza analizadas (Fig. 6).

En Castilla y León, la presencia de chancro se ve, por el momento, limitada a las provincias ya citadas de León, Zamora y Burgos. En León, solamente los ayuntamientos de la parte sur de la Sierra de la Cabrera, donde el castaño forma pequeños sotos, permanece libre de chancro. En el resto de municipios, *C. parasitica* se encuentra presente en porcentajes que varían del 5% al casi 100% de los ejemplares afectados. Los chancros aparecen tanto en fustes como en ramas, siendo más frecuente su desarrollo a partir de las labores efectuadas para su formación y pro-

ducción de fruto comercializable. La expansión de la enfermedad en la parte occidental leonesa es actualmente muy rápida, sobre todo en los últimos años, lo que le ha llevado a colonizar incluso las zonas más alejadas de los principales focos infectivos.

En Zamora, si bien hasta hace escasamente cuatro años podíamos encontrarnos la enfermedad en un único foco, a día de hoy se puede encontrar puntualmente en muy diversas zonas de la provincia, debido principalmente al comercio de material vegetal infectado a partir del foco detectado inicialmente y de comarcas fronterizas gallegas y portuguesas. El total desconocimiento por parte de la población del ciclo infectivo del hongo, está suponiendo un grave problema a la hora de frenar la creciente difusión de esta patología.

El foco infectivo localizado en la provincia de Burgos, uno de los primeros sotos que se vió colonizado por la enfermedad a partir

Cuadro 1. Localidades visitadas, zonas inspeccionadas, muestras recogidas y porcentaje de aislamiento de *C. parasitica* en castaños de tres provincias de Castilla y León.

Provincia	Localidades visitadas	Zonas inspeccionadas	Muestras recogidas	<i>C. parasitica</i> (%)
León	37	111	211	90
Zamora	5	8	20	100
Burgos	2	2	30	93

de las masas cercanas de provincias vascas, resiste parcialmente tras muchos años de convivir con el hongo. Los buenos crecimientos de las varas provenientes de monte bajo que se vienen reservando para fustes de madera, son el principal condicionante a la hora de verse pronto y gravemente afectados por el chancro del castaño, ya que forma numerosas grietas en la corteza que suponen una sencilla vía de entrada para el hongo.

La incidencia de *C. parasitica* también ha sido estudiada en otras zonas del norte de España (VALDEZATE *et al.*, 2001; HOMS *et al.*, 2002) confirmando el alto nivel de presencia de esta enfermedad.

2. Diversidad de los tipos de compatibilidad vegetativa de *C. parasitica*

El análisis morfológico y la caracterización del ARN de doble cadena para la identificación de los aislados de *C. parasitica*, permitió clasificar todos los aislados obtenidos como virulentos. Las características más comunes fueron un crecimiento rápido en el medio de cultivo PDA, micelio de color anaranjado y abundantes picnidios.

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. El número de tipos vc detectados en cada provincia varió de 1 a 6 (Cuadro 2). Se determinaron cuatro tipos que únicamente estaban constituidos por un único aislado (tipos 4,5,6 y 7).

Las confrontaciones incompatibles mostraban una línea negra de diferente intensidad dependiendo de los aislados enfrentados pero que no seguía un criterio específico para su interpretación (Fig. 6a). En el caso de las confrontaciones compatibles se producía un crecimiento común de los micelios enfrentados sin observar ningún obstáculo a la fusión de las hifas (Fig. 6b).

Así, en la provincia de Zamora, a partir de los veinte aislados estudiados, se obtuvieron 6 tipos de compatibilidad vegetativa aunque la mayoría de los aislados (75%) se incluyeron en dos tipos.

En Burgos, los 28 aislados analizados se incluyeron en un solo tipo de compatibilidad, esta baja variabilidad puede entenderse porque las muestras recogidas pertenecían a 2 ubicaciones próximas. Por otro lado en León se establecieron 4 tipos para un total de 191 cepas pero el denominado tipo vc 1 incluía al 82% de los aislados (Cuadro 2).

De esta manera se determinaron 6 grupos en Zamora, 1 en Burgos y 4 en León. La compatibilidad entre los grupos de cada provincia indicó la presencia de un mismo tipo en las tres provincias, concretamente ZA1, BU1 y LE1, que se correspondía con el tipo vc 1 (80% de los aislados).

En el estudio de la compatibilidad vegetativa con las cepas de referencia europeas (EU1-EU64) se encontró que el tipo vc 1 era compatible con la cepa EU1 (genotipo 2212-22). El tipo vc 2, localizado únicamente en Zamora y representado por dos aislados, fue compatible con el tipo europeo EU12 (genotipo 1112-11) mientras que el tipo vc 6, ubicado también en la provincia de Zamora, fue compatible con EU28 (genotipo 2212-11).

Los tipos EU1 y EU12 se encuentran dentro de los más frecuentes en Europa y se ha publicado su presencia en diferentes países europeos: Macedonia, Grecia, Sicilia, España, Francia, Bosnia-Herzegovina, Italia, Suiza, Eslovaquia (TRESTIC *et al.*, 2001; CORTESI *et al.*, 1998; ADAMCIKOVÁ y JUHÁSOVÁ, 2003). El tipo EU28 es menos habitual y se ha detectado en Bosnia-Herzegovina en baja proporción (TRESTIC *et al.*, 2001).

En las Figs. 7, 8 y 9 se representa la distribución de los 8 tipos de compatibilidad vegetativa de *C. parasitica* determinados en las provincias de Burgos, León y Zamora, respectivamente.

De los ocho grupos encontrados en este trabajo solo tres mostraron compatibilidad con las cepas de referencia europeas mientras que cinco fueron incompatibles con todas. Estos resultados pueden explicarse ya que, en un primer momento se creyó que el sistema de incompatibilidad vegetativa de *C. parasitica* estaba controlado por 6 loci de incompatibilidad vegetativa (vic), cada uno

Cuadro 2. Diversidad de los tipos de compatibilidad vegetativa (vc) de *Cryphonectria parasitica* en Castilla y 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 provincia (nº de aislados).

^b Nº de vc encontrados en cada provincia.

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

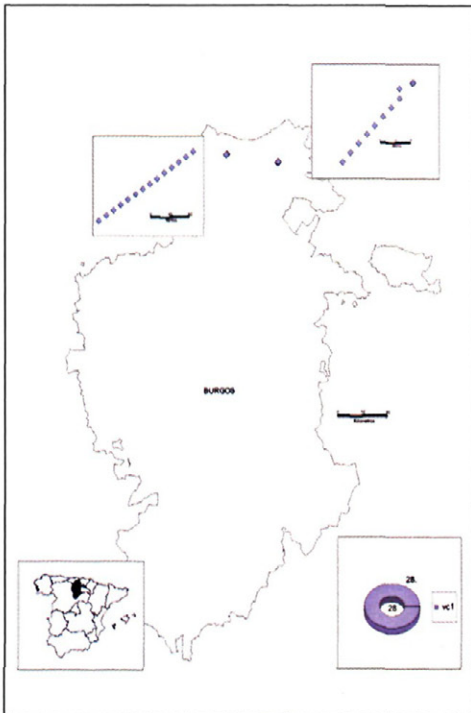


Figura 7. Distribución de los tipos de compatibilidad vegetativa (vc) de *Cryphonectria parasitica* en la provincia de Burgos.

de ellos con dos alelos. De esa manera con esos 6 loci vic eran posibles 64 genotipos ($2^6=64$), lo que daba lugar a los 64 tipos de compatibilidad vegetativa establecidos en Europa (CORTESE y MILGROOM, 1998), pero los estudios de compatibilidad realizados en distintas localizaciones europeas, similares al llevado a cabo en el presente trabajo, 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), de tal manera que en la actualidad los tipos de compatibilidad ya no son 64 sino que se han incluido 10 tipos vc más (ROBIN *et al.*, 2000).

En España, y más concretamente en Cataluña, TRESTIC *et al.* (2001) encuentran al tipo EU2 como el tipo dominante (71% de los aislados) aunque en menor proporción también detectaron los tipos EU1, EU12 y EU5.

El índice de diversidad de Shannon varió entre 0 y 1,42 (cuadro 2). En Burgos todos los aislados pertenecían al mismo tipo mientras que en León se ha observado una diversidad del 0,596 que coincide con lo determinado en otras zonas (PENNISI *et al.*, 1992). La diversidad detectada en este estudio es baja pero

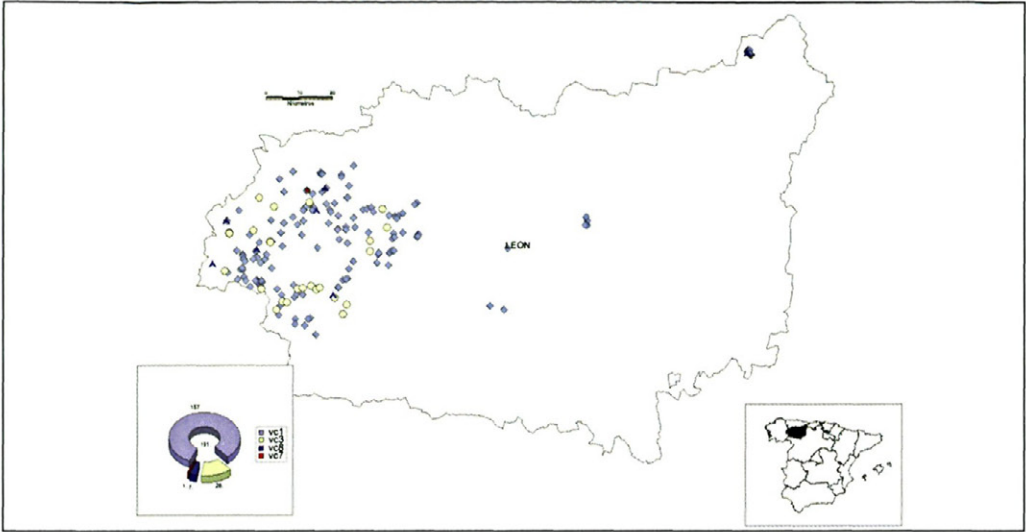


Figura 8. Distribución de los tipos de compatibilidad vegetativa (vc) de *Cryphonectria parasitica* en la provincia de León.

puede verse incrementada con el tiempo por la introducción de nuevos alelos vic y la consiguiente recombinación con los tipos ya existentes dando lugar a una mayor variabilidad, por eso es imprescindible llevar a cabo medi-

das preventivas que eviten la importación de castaños afectados procedentes de otras áreas.

Este primer trabajo sobre la distribución y diversidad de los tipos de compatibilidad vegetativa de las poblaciones de *C. parasiti-*

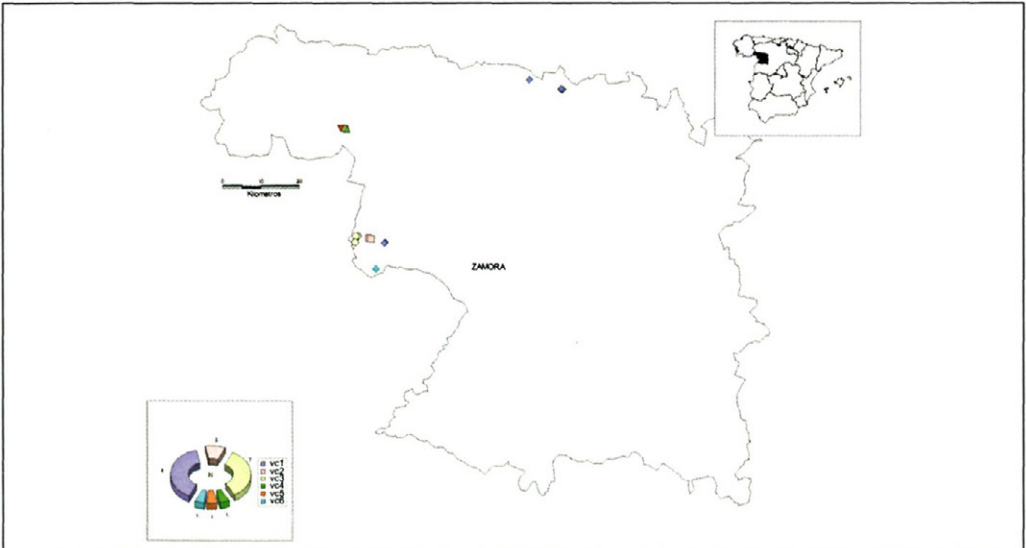


Figura 9. Distribución de los tipos de compatibilidad vegetativa (vc) de *Cryphonectria parasitica* en la provincia de Zamora.

ca en Castilla y León facilitará la puesta en marcha de un programa para el control biológico de esta enfermedad aunque se necesitan más investigaciones encaminadas a completar el estudio de compatibilidad con los nuevos tipos europeos incluidos en la colección, a la detección de cepas hipovirulentas compatibles con los tipos vc más extendidos o a la realización de pruebas de conversión para obtener la transmisión del hipovirus entre cepas no compatibles (CORTESI *et al.*, 1998).

AGRADECIMIENTOS

Queremos agradecer la aportación a este trabajo del Dr. P. Cortesi y del Dr. M. Milgroom por facilitarnos las cepas de referencia europeas y micelio hipovirulento para el estudio del dsRNA. A Dña. 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 tratamiento informático de los datos.

ABSTRACT

AGUÍN O., M. MATA, J. P. MANSILLA, A. B. MARTÍN, J. M. SIERRA. 2005. Distribution and diversity of types of compatibility vegetative of *Cryphonectria parasitica* in chestnut stands in Castilla-León. *Bol. San. Veg. Plagas*, **31**: 287-297.

The distribution and diversity of *Cryphonectria parasitica*, ascomycete responsible of chestnut blight, were studied in 2003 and 2004 in Castilla and León. 261 samples were collected and *Cryphonectria parasitica* was detected in 91% of the bark samples analysed. No hypovirulent fungal strains were identified by morphological characters and dsRNA extraction. Eight vegetative compatibility groups (vc) were detected among 239 isolates. Three vc types were compatible with European testers. Most isolates were included in type vc 1, which was compatible with the European tester EU1. The type vc 2 was compatible with EU12 and the type vc 6 with EU28. In León 4 vc types were determined, 6 in Zamora and 1 in Burgos. There was an average of 3.6 types found per province. The highest Shannon diversity index was detected in Zamora with a 1.42. The low diversity of *C. parasitica* vc types found in Castilla-León will facilitate the establishment of a biological control program.

Key words: *Castanea sativa*, Castilla and León, Chestnut blight, genetic diversity

REFERENCIAS

- ADAMČKOVÁ, K. y JUHÁSOVÁ, G. 2003. Diversity of subpopulation of *Cryphonectria parasitica* in Horná Nitra. *Folia oecologica*, **30**(1):149-155.
- ALLEMANN, C., HOEGGER, P., HEINIGER, U. y 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. 1977. Vegetative incompatibility in *Endothia parasitica*. *Experimental Mycology* **1**: 306-316.
- ANAGNOSTAKIS, S. L., HAU, B. y KRANZ, J. 1986. Diversity of vegetative compatibility groups of *Cryphonectria parasitica* in Connecticut and Europe. *Plant Disease*, **70**: 536-538.
- BIRAGHI, A. 1946. Il cancro del castagno causato da *Endothia parasitica*. *L'Italia Agric.*, **7**: 406.
- BISIACH, M., CORTESI, P., DE MARTINO, A. e INTROPIDO, M. 1995. Biological control of chestnut blight fungus *Cryphonectria parasitica*. Abstr. En: Proc. Int. Congress "Microbial Control Agents in Sustainable Agriculture. Saint Vincent (Aosta) pp 167.
- CHOI, G.H. y NUSS, D.L. 1992. Hypovirulence of Chestnut blight fungus conferred by an infections viral cDNA. *Science*, **257**: 800-803.
- CORTESI, P., MILGROOM, M. G. y 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. y HEINIGER, U. 1998. Comparison of vegetative compatibility types in Italian and Swiss subpopulations of *Cryphonectria parasitica*. *Eur. J. For. Path.*, **28**: 167-176.
- CORTESI, P. y MILGROOM, M. 1998. Genetics of vegetative incompatibility in *Cryphonectria parasitica*. *Applied and Environmental Microbiology*, **64**: 2988-2994.
- ELORRIETA, A. 1949. El castaño en España. IFIE. Madrid.
- GARBELOTTO, M., FRIGIMELICA, G. y 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.
- GRENTE, 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.
- GRENTE, J. y 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. y 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. y SALINERO, M. C. 2000. Plagas y enfermedades del castaño en Galicia. Ed. Xunta de Galicia. 93 páginas
- MILGROOM, M. G., WANG, K., ZHOU, Y. y KANEKO, S. 1996. Intercontinental population structure of the chestnut blight fungus *Cryphonectria parasitica*. *Mycologia*, **88**: 176-190.
- MORRIS, T. J. y DODDS, J. A. 1979. Isolation and analysis of double-stranded RNA from virus-infected plant and fungal tissue. *Phytopathology*, **69**:854-858.
- PENNISI, A.M.; MANGNANO, G. y 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. y 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.
- VALDEZATE, C., ALZUGARAY, R., LANDERAS E. y BRAÑA, M. 2001. Situación actual de *Cryphonectria parasitica* (Murril) Anderson, cancro cortical, en los castañares asturianos. *Bol. San. Veg. Plagas*, **27**: 401-410.
- TRESTIC, T.; USCUPLIC, M; COLINAS, C.; ROLLAND, G.; GIRAUD, A. y ROBIN, C. 2001. Vegetative compatibility type diversity of *Cryphonectria parasitica* populations in Bosnia-Herzegovina, Spain and France. *Forest Snow Landscape Research*, **76**:391-396.

(Recepción: 15 noviembre 2004)

(Aceptación: 15 febrero 2005)