

# Caracterización de la población de *Cryphonectria parasitica* y detección de cepas hipovirulentas en 3 subpoblaciones de Cataluña

G. HOMS\*, J. RODRÍGUEZ\*, D. RIGLING\*\*, C. COLINAS\*\*\*

\* Centre Tecnològic Forestal de Catalunya, Pujada del Seminari s/n, 25280- Solsona.

\*\* Swiss Federal Research Institute for Forest Snow and Landscape, CH-8903 Birmensdorf, Suiza.

\*\*\* Departament de Producció Vegetal i Ciència Forestal, Universitat de Lleida, Avda. Rovira Roure 177, 25198-Lleida.

## RESUMEN

La enfermedad del chancro del castaño, causada por el hongo *Cryphonectria parasitica*, ataca seriamente los castaños del norte de la Península Ibérica. La hipovirulencia es una atenuación de la virulencia del patógeno causada por la infección del hongo por un hipovirus, de forma que los castaños afectados pueden seguir creciendo. La diseminación del hipovirus está directamente relacionada con la variedad de grupos de compatibilidad vegetativa (GCV) de la población del hongo. Con el objetivo de cuantificar los GCV presentes, hemos realizado un muestreo uniforme aleatorio de 3 subpoblaciones de Cataluña. Hemos complementado este muestreo con una búsqueda dirigida para detectar la presencia de cepas hipovirulentas.

Hemos hallado 10 GCV. Un 71% de los aislamientos corresponden a un GCV, lo que favorecería un futuro control biológico de la enfermedad. La subpoblación de Prades, más aislada, presenta una menor diversidad de GCV, mientras que las poblaciones de la Garrotxa y la Selva, contiguas entre sí y a las francesas, muestran mayor diversidad y similitud con las del país vecino. Entre 270 aislamientos hemos detectado una sola cepa hipovirulenta, portadora de un subtipo del hipovirus distinto al encontrado en Navarra. La situación actual de baja diversidad de GCV se presenta como la idónea para la aplicación del control biológico de la enfermedad.

**P. C.:** *Cryphonectria parasitica*, chancro, castaño, hipovirulencia

## SUMMARY

Chestnut blight, a disease caused by the fungus *Cryphonectria parasitica*, has seriously damaged chestnut stands in the northern Iberian Peninsula. Hypovirulence is a decrease in the virulence of the pathogenic fungus resulting from a hypovirus infection of the fungus, which allows the affected chestnut trees to continue to grow. The spread of the hypovirus is directly related to the number of vegetative compatibility groups (VCG) present in the fungal population.

In order to quantify the VCG present, we performed a uniform random sampling of 3 subpopulations of chestnut in Catalonia, Spain. This sampling was complemented with a directed search to detect hypovirulent strains of the pathogen.

We detected 10 VCG, with 71% of the isolates belonging to a single VCG, which will favor future biologic control of the disease. The subpopulation of Prades, the most geographically remote of the 3 sites, exhibited the least VCG diversity, while the subpopulations of La Garrotxa and La Selva, contiguous with each other and also with French populations, displayed greater VCG diversity, similar to those of the neighboring country. Among 270 isolates, only 1 hypovirulent fungal strain was detected, carrying a hypovirus subtype different from the subtype found in Navarra. The current situation of low VCG diversity is ideal for successful application of biological control of the disease.

**K. W.:** *Cryphonectria parasitica*, canker, chestnut, hypovirulence

## INTRODUCCIÓN

La enfermedad del chancro del castaño, causada por el hongo ascomicete *Cryphonectria parasitica* (Murril) Barr, originario de Asia, lleva afectando los castaños europeos desde mediados de siglo (Milgroom *et al.* 1996; Heiniger y Rigling 1994; Griffin 1986). Actualmente *C. parasitica* ataca seriamente los castaños del norte de la Península Ibérica. Las enfermedades del Chancro y la Tinta han ocasionado la disminución de la producción del castaño en calidad y cantidad tanto de madera como de fruto (Fdz. de Ana Magán *et al.* 1993). En Cataluña, la enfermedad se ha extendido por todo tipo de castaños causando mortalidades importantes.

La hipovirulencia es una atenuación de la virulencia del patógeno causada por la infección del hongo por un hipovirus de RNA de doble cadena (Choi y Nuss 1992). Las cepas hipovirulentas producen chancros no letales, que quedan restringidos a la parte externa de la corteza y no destruyen el cámbium del castaño, que puede seguir creciendo con normalidad. El control biológico, basado en el fenómeno de la hipovirulencia, se presenta como la mejor herramienta de lucha contra esta enfermedad (Robin *et al.* 2000). Actualmente en Europa se ha detectado la presencia de 5 subtipos del hipovirus CHV1 (Allemann *et al.* 1999). Uno de ellos, el "Italiano", con una distribución mucho más amplia que los demás.

La dispersión del hipovirus tiene lugar verticalmente mediante conidios (aunque no mediante ascosporas) y horizontalmente por anastomosis hifal. La incompatibilidad vegetativa limita la anastomosis, por lo que restringe la transmisión del hipovirus. La probabilidad de transmisión es función del número de genes de incompatibilidad vegetativa diferentes entre las cepas que se anastomosan (Liu y Milgroom 1996). La diseminación del hipovirus estaría directamente

relacionada con la composición de grupos de compatibilidad vegetativa (GCV) de la población. Así, una de las causas del éxito de la hipovirulencia en Europa es la baja diversidad de GCV (Bissigger *et al.* 1996).

El objetivo de este trabajo es estudiar la estructura de GCV de la población del hongo y de tipos del hipovirus en los castañares de Cataluña como base para un futuro control biológico de la enfermedad.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### Localización de las parcelas

Muestreamos 3 subpoblaciones de castaño de Cataluña, dos en la zona norte: los castaños del Parque Natural de la Zona Volcánica de la Garrotxa (PNZVG) en la comarca de la Garrotxa y los de la comarca de la Selva, y una subpoblación al sur, situada en la sierra de Prades en la comarca de la Conca de Barberà.

Seleccionamos los puntos de muestreo de manera aleatoria uniforme superponiendo los mapas de vegetación a una red interpolada entre los puntos de la Red Europea de Seguimiento de Daños en los Bosques (RESDB) (Montoya 1998). Muestreamos en los nodos de esta red en los que, según los mapas de vegetación, había presencia de castaños. Usamos una red de 4x4 ó de 2x2 km en función de la abundancia y extensión de los castañares. Ubicamos las parcelas en el campo con GPS.

### Zonas de muestreo

-Selva: comarca de gran vocación forestal y elevada presencia de castaño. En base a los mapas de vegetación del Segundo Inventario Forestal Nacional 1/250.000 (ICONA 1993) y con una red de 4x4 km seleccionamos 9 puntos de muestreo.

-Prades (Conca de Barberà): zona catalogada como “Espacio de Interés Natural” con presencia de castañares de fruto y castaños naturalizados. En base a los mapas de distribución del castaño de Casals (1992) y con una red de 2x2 km seleccionamos 6 puntos de muestreo.

- PNZVG (Garrotxa): Parque Natural con presencia de pequeños rodales aislados de castaño y algunas plantaciones. En base al mapa de vegetación del PNZVG y con una red de 2x2 km seleccionamos 5 puntos de muestreo.

### Toma de muestras

En cada punto tomamos muestras de corteza de 10 chancros: 2 de los 2 árboles enfermos más próximos al punto de muestreo, y otros 2 de los 2 árboles enfermos más próximos a cada uno de 4 puntos situados a 10 m del punto primero en dirección N, S, E, y W.

Tomamos una sola muestra por chancro y por árbol o por conjunto de rebrotes de una sola cepa, para evitar tomar más de una muestra de un mismo talo (Milgroom y Lipari 1995). De cada chancro extrajimos una muestra de corteza de 2x3 cm (Cortesi *et al.* 1996). Obtuvimos un total de 160 muestras.

Con el objeto de detectar todas las posibles cepas hipovirulentas tomamos muestras de corteza de árboles con chancros cicatrizados o en proceso de cicatrización, tanto si estaban en los puntos de muestreo como si estaban en sus inmediaciones o en el camino de acceso. De cada uno de estos chancros cicatrizados tomamos 5 muestras, 4 del perímetro (a 0°, 90°, 180° y 270°) y una del centro (Robin *et al.* 2000).

### Aislamiento de *C. parasítica*

De cada muestra tomamos 5 piezas de 2x2 mm del frente de avance del hongo, desinfectándolas 10 seg. en peróxido de hidrógeno (110 vol.) y aclarándolas posteriormente en agua destilada estéril 30 seg. Después colocamos las piezas en placas de Petri (100x15mm) con 10 ml de agar-agua al 2% y las incubamos a 20-25°C con luz natural (Anagnostakis *et al.*, 1986). Al cabo de 2 o 3 días, cuando el micelio había crecido unos milímetros alrededor de la pieza, transferimos un cubo de agar con micelio adyacente a una de las piezas, seleccionada aleatoriamente, a placas Petri con 10 ml de PDA, y las incubamos de nuevo en las mismas condiciones. Una vez crecidos los cultivos los mantuvimos a 4°C y en oscuridad.

### Prueba de Compatibilidad Vegetativa (CV)

Las pruebas de CV se hicieron de acuerdo con el método de Bissegger *et al.* (1997).

Determinamos el GCV de los aislamientos de acuerdo con la respuesta de barrera/fusión: las parejas se consideraron incompatibles cuando había una barrera visible entre las colonias resultantes (Anagnostakis 1986).

Siguiendo la metodología de Robin *et al.* (2000) ensayamos primero la compatibilidad vegetativa de los aislamientos de cada parcela entre sí en todas las combinaciones, y mantuvimos un aislamiento de cada GCV como muestra. Repetimos la operación entre las muestras de las 3 subpoblaciones y después entre las del conjunto del estudio. Finalmente ensayamos la compatibilidad entre una muestra de cada GCV detectado en este estudio y cada una de las 31 Muestras Europeas originalmente encontradas en campo (Cortesi *et al.* 1998, Cortesi y Milgroom 1998).

### Detección de aislamientos hipovirulentos.

Para identificar las cepas hipovirulentas utilizamos el criterio morfológico según descrito por Bissegger *et al.* (1997).

En las cepas con fenotipo blanco, aislamos y caracterizamos el dsRNA según la metodología descrita por Allemann *et al.* (1999).

## RESULTADOS

La morfología de las colonias de todos los aislamientos de los puntos de muestreo coincide con la de cepas virulentas en cuanto a la pigmentación naranja o rojiza del micelio y abundante producción de picnidios.

En estos 20 puntos de muestreo encontramos un total de 10 GCV (Tabla 1). El grupo A, coincidente con el grupo EU-2 (Cortesi *et al.* 1998), está presente en todos los puntos de muestreo, y es el único grupo en 7 de ellos (Tabla 2). En ningún punto hay más de tres GCV. Las subpoblaciones más diversas son La Garrotxa y La Selva en el norte de Cataluña con 6 y 5 GCV respectivamente y la menos diversa Prades con sólo 3 GCV.

Tabla 1. Número de aislamientos de cada GCV en cada subpoblación de *Cryphonectria parasitica*.

Subpoblación	GCV										Nº aislam.	Nº GCV
	A (EU2)	B	C	E	F (EU5)	G	H	K (EU12)	W	Y		
Prades	43	6	3								52	3
La Garrotxa	19			3	2	3	1		3		31	6
La Selva	52			11	2			11		1	77	5
<b>Total</b>	<b>114</b>	<b>6</b>	<b>3</b>	<b>14</b>	<b>4</b>	<b>3</b>	<b>1</b>	<b>11</b>	<b>3</b>	<b>1</b>	<b>160</b>	<b>10</b>

Tabla 2. GCV hallados en cada parcela

Subpoblación					
Garrotxa		Prades		Selva	
Puntos	GCV hallados	Puntos	GCV hallados	Puntos	GCV hallados
G1	A	P1	A	S1	A, E, K
G2	A, E, F	P2	A, B, C	S2	A, E, K
G3	A, G, H	P3	A	S3	A, F
G4	A, E	P4	A	S4	A
G5	A, E, W	P5	A	S5	A, E
		P6	A, B	S6	A, F, K
				S7	A, E
				S8	A
				S9	A, Y

De los 22 chancros cicatrizados encontrados y los 110 aislamientos resultantes, sólo 1 presentó fenotipo blanco por lo que se supuso infectado por el virus. Esto se confirmó al aislar su dsRNA. El análisis de los fragmentos de restricción de los productos de rPCR del dsRNA con *HinfI* y *BsuRI* reveló un patrón de bandas similar al del Subtipo "Italiano" de CHV1 (Allemann *et al.* 1999).

Este aislamiento hipovirulento pertenece al GCV EU-2.

Los 5 aislamientos de 19 de los 22 chancros cicatrizados muestreados pertenecían al mismo GCV. En los 3 restantes encontramos 2 GCV.

## DISCUSIÓN

Los resultados muestran que EU-2 es el GCV más común (71%), siendo el único que se encuentra en las 3 subpoblaciones, en concordancia con lo observado en un estudio preliminar en Prades (Colinas *et al.* 1998) y en los países del oeste de Europa (Heiniger *et al.* 1998).

De las 3 subpoblaciones estudiadas es la de Prades la que tiene una menor diversidad con 3 GCV frente a los 6 de la Garrotxa y los 5 de la Selva. Prades, además, tiene dos GCV, el B y el C, que no aparecen en las otras dos subpoblaciones. Esto puede ser debido al mayor aislamiento de la población de castaños de Prades, frente a las masas de la Garrotxa y la Selva, próximas a los Pirineos y casi contiguas a las francesas de Rosellón, donde también está presente el GCV EU-5 y el GCV EU-2 es dominante (Robin *et al.* 2000).

La proporción de cepas hipovirulentas aisladas (<1%) ha sido muy baja en comparación con porcentajes superiores al 50% en zonas de Francia donde se ha aplicado el control biológico (Robin *et al.* 2000). Esta escasísima proporción de cepas hipovirulentas aisladas sugiere que el chancro aun está en fase de expansión en Cataluña y continuará causando daños importantes en el futuro próximo.

La cepa hipovirulenta aislada es especialmente interesante por ser su hipovirus de un subtipo distinto al de la otra cepa aislada en España (Mönkemyer 1992). Esta última pertenece a un subtipo poco frecuente. En cambio, el subtipo "Italiano" de CHV1 parece tener mayor capacidad de dispersión que los otros subtipos encontrados en Europa (Allemann *et al.* 1999). El patrón de bandas del hipovirus encontrado en este trabajo, con dos enzimas de restricción, coincide con el del subtipo "Italiano", pero sería preciso comparar también los patrones de bandas obtenidos con más enzimas. De confirmarse la pertenencia del dsRNA observado en este estudio a este subtipo, será una gran oportunidad para estudiar las primeras fases de su dispersión puesto que aún es muy escaso.

La baja diversidad de GCV (entre 1 y 3 por parcela) y la dominancia de un sólo GCV (EU-2) auguran buenas perspectivas a un programa de control biológico puesto que el hipovirus encontrará facilidades para dispersarse por una población relativamente homogénea del hongo. Estas buenas condiciones se mantendrán mientras no aumente la diversidad de GCV debido a la entrada de nuevas cepas de *C. parasitica* portadoras de nuevos alelos en los loci *vic* (Cortesi y Milgroom 2000) que aumentarían el número de GCV por reproducción sexual. Por ello sería muy importante restringir la entrada de material vegetal que pueda ser portador de inóculo en las tres zonas descritas, y sobre todo, en la más aislada de la Sierra de Prades.

## AGRADECIMIENTOS

Agradecemos la financiación aportada por I.N.I.A.-C.I.C.Y.T. (Proyecto N° F096-033-C3-3) y el Consell Comarcal de Conca de Barberá, así como las becas concedidas por COST Action G4 y Centre Tecnològic Forestal de Catalunya. La amable invitación del Swiss Federal Institute for Forest, Snow and Landscape Research a C.C. hizo posible desarrollar parte de este trabajo en sus instalaciones. La ayuda del PNZVG facilitó en gran medida la toma de muestras.

## BIBLIOGRAFÍA

- ALLEMANN, C.; HOEGGER, P.; HEINIGER, U. & RIGLING, D.; (1999). Genetic variation of *Cryphonectria hypoviruses* (CHV1) in Europe, assessed using RFLP markers. *Molecular Ecology* 8: 843-854.
- ANAGNOSTAKIS, S. L.; HAU, B. & KRANZ, J.; (1986). Diversity of vegetative compatibility groups of *Cryphonectria parasitica* in Connecticut and Europe. *Plant Disease*, 70(6): 536-538.
- BISSEGGER, M.; RIGLING, D. & HEINIGER, U.; (1997). Population structure and disease development of *Cryphonectria parasitica* in European chestnut forests in the presence of natural hypovirulence. *Phytopathology* 87: 50-59.
- CASALS i MIRÓ, C.; (1992). Els castanyers de les muntanyes de Prades. Informe a la Diputació de Tarragona.
- CHOI, G. H. & NUSS, D. L.; (1992). Hypovirulence of chestnut blight fungus conferred by an infectious viral cDNA. *Science*. 257: 800-803.
- COLINAS, C. & USCUPIC, M.; (1998). *Cryphonectria parasitica* vegetative compatibility (v/c) groups in the (Murr.) Barr in northeast Spain. *Acta Hort.* 494: 495-500.
- CORTESI, P. & MILGROOM, M.G.; (1998). Effects of vegetative incompatibility in *Cryphonectria parasitica*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 64: 2988-2994.
- 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 (3): 383-390.
- 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(3): 167-176.
- FERNÁNDEZ DE ANA MAGÁN, F. J.; PUERTAS TRICAS, F.; MANSILLA VÁZQUEZ, J. P.; TRAVER, C.; PINTOS VARELA, C. & RODRÍGUEZ-FERNÁNDEZ, R. J.; (1993). Lucha integrada contra la enfermedad del "Chancro" del castaño. Proc. Congreso Forestal Español, Lourizan, Pontevedra, Spain, 1993. Silva and Vega (Eds). Potevedra. Vol. 3, pp 357-362.
- GRIFFIN, G. J.; (1986). Chestnut Blight and its control. *Horticultural reviews*, 8: 291-335.
- HEINIGER, U.; CORTESI, P.; COLINAS, C.; PERELOU, C.; RIGLING, D.; SOTIROVSKI, K.; TRESTIC, M. & USCUPIC, M.; (1998). Diversity of vegetative compatibility types of *Cryphonectria parasitica* in Europe. 2<sup>nd</sup> International Symposium on Chestnut ( Abstr.) G. Salesses, ed. Burdeos. Francia.
- HEINIGER, U. & RIGLING, D.; (1994). Ecological control of chestnut blight in Europe. *Ann. Rev. Phytopathology* 32: 581-599.
- ICONA; (1993). Segundo Inventario Forestal Nacional 1986-1995. Cataluña. Gerona. ICONA, MAPA
- LIU, Y. C. & MILGROOM, M.; C. (1996). 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.
- MILGROOM, M. G.; WANG, K.; ZHOU, S.; LIPARI, S. E. & KANEBO, S.; (1996). Intercontinental population structure of the chestnut blight fungus *Cryphonectria parasitica*. *Mycologia* 88, 176-190.
- MILGROOM, M. G. & LIPARI, S. E.; (1995). Population differentiation in the chestnut blight fungus, *Cryphonectria parasitica*, in eastern North America. *Phytopathology* 85: 155-160.
- MÖNKEMYER, R.; (1992). Die Gefährdung der Kastanie auf der Iberischen Halbinsel durch *Cryphonectria parasitica* (Murr.) Barr mit Versuchen zur Hypovirulenz des Rindenkrebserregers. Diplomarbeit des Forstwissenschaftlichen Fachbereiches der Georg - August - Universität. Göttingen.
- MONTOYA, R.; LÓPEZ, M.; SÁNCHEZ, G.; GONZÁLEZ, M. R. & JIMENEZ, R.; (1998). La red europea de seguimiento de daños en los bosques (Nivel1) España, 1987-1996. Publicaciones del O. A. Parques Nacionales. Ministerio de Medio Ambiente. Madrid.
- ROBIN, C.; ANZIANI, C. & CORTESI, P.; (2000). Relationship between biological control, incidence of hypovirulence, chestnut blight severity and the population structure of *Cryphonectria parasitica* in France. *Phytopathology* 90 (7): 730-737.