

PATOGENICIDAD DE LOS TIPOS DE COMPATIBILIDAD VEGETATIVA DE *CRYPHONECTRIA PARASITICA* EN GALICIA

Dolores Montenegro Gregorio¹, Olga Aguiñ Casal¹, María Jesús Sainz Osés² y José Pedro Mansilla Vázquez^{1,2}

¹ Estación Fitopatológica do Areiro (Diputación Pontevedra). Subida la Robleda s/n. 36153-PONTEVEDRA (España). Correo electrónico: efa@efa-dip.org

² Departamento de Producción Vegetal. Universidad de Santiago de Compostela, Campus Universitario. 27002-LUGO (España)

Resumen

Cryphonectria parasitica posee un sistema de compatibilidad vegetativa que restringe la formación de heterocariones. Este sistema es importante de cara al éxito de programas de control biológico, debido a que la hipovirulencia en *C. parasitica* se transmite principalmente mediante anastomosis hifal. En Galicia se han establecido ocho tipos de compatibilidad vegetativa (vc) que presentan diferencias en su dispersión y abundancia. El objetivo de este trabajo fue determinar si los ocho tipos vc presentan además variación en su virulencia. Se llevó a cabo un test de patogenicidad *in vitro*, utilizando fragmentos de tronco de castaño recogidos en campo, a los que se les inoculó micelio de *C. parasitica* correspondiente a aislados de cada uno de los ocho grupos vc encontrados en Galicia. El grado de virulencia se estimó observando el tamaño del área necrótica inducida por el hongo, así como las características morfológicas del micelio en crecimiento. Se establecieron cinco niveles de severidad en función del estado de desarrollo del hongo. Todos los grupos dieron lugar a infección, aunque se apreciaron diferencias en la virulencia. El tipo vc H fue el menos virulento, con un índice de enfermedad del 40%, y los tipos A, D y F los más virulentos con un 100%.

Palabras clave: *Castanea sativa*, Cancro, Virulencia, CHV

INTRODUCCIÓN

El cancro, una de las enfermedades más graves que afectan a los castaños de Galicia, está causado por el ascomiceto *Cryphonectria parasitica*. Atendiendo a su patogenicidad *C. parasitica* presenta dos fenotipos diferentes: virulento e hipovirulento, este último provocado por la infección de *C. parasitica* por un virus de ARNbc denominado *Cryphonectria hypovirus* (CHV).

Los hongos filamentosos presentan un sistema de incompatibilidad vegetativa que restringe

la formación de heterocariones. Este mecanismo genético es un fenómeno muy común y constituye un sistema de reconocimiento que permite al individuo diferenciar sus propias células de las de otros individuos. Cuando dos individuos poseen alelos idénticos en los loci que regulan el sistema se dice que son compatibles y que pertenecen al mismo grupo de compatibilidad vegetativa (vc). La clasificación de los aislados en tipos vc es muy útil para estudiar la diversidad genética de las poblaciones y en algunos trabajos se ha visto que el tipo vc está

relacionado con el nivel de virulencia (LESLIE, 1996; AHN et al., 1997).

En *C. parasitica* el sistema de incompatibilidad vegetativa adquiere especial importancia, debido a que el CHV puede ser transmitido mediante anastomosis hifal, resultando en la conversión de la cepa receptora al fenotipo hipovirulento. El grado de transmisión está inversamente relacionado con el número de genes responsables de la compatibilidad vegetativa, o genes vic, diferentes que presentan las cepas que anastomosan (LIU et al., 1996).

La variabilidad poblacional de *C. parasitica* se ha estudiado de forma extensa en Europa (GARBELOTTO et al., 1992; PENNISI et al., 1992; CORTESI et al., 1996; HEINIGER et al., 1998; GOUVEIA et al., 2001; ADAMCKOVÁ y JUHASOVÁ, 2003), estableciéndose hasta el momento 74 grupos de compatibilidad diferentes, aunque el número aumenta a medida que se van describiendo más poblaciones (ROBIN et al., 2000; TRESTIC et al., 2001). En Galicia se han establecido ocho tipos vc nombrados de la A a la H (AGUÍN et al., 2005) que presentan diferencias en su dispersión y abundancia. El grupo más extendido es el A, predominante en la provincias de Lugo y Ourense, y los menos abundantes son el F, G y H, representados por un único aislado cada uno.

Tradicionalmente para determinar la virulencia de un aislado de *C. parasitica* se observan sus características morfológicas en cultivo y se realiza una extracción de ARNbc. Adicionalmente LEE et al. (1992) propusieron una técnica basada en la inoculación *in vitro* de *C. parasitica* sobre fragmentos de castaño, que permite determinar de una forma sencilla la virulencia y establecer las diferencias existentes entre aisla-

dos. El objetivo de este trabajo fue determinar si el grado de virulencia en *C. parasitica* está relacionado con el tipo de compatibilidad vegetativa, comparando la patogenicidad de los 8 tipos vc establecidos en Galicia.

MATERIAL Y MÉTODOS

Aislados de *C. parasitica*

Para los ensayos de patogenicidad se usaron: aislados virulentos de *C. parasitica* correspondientes a los 8 grupos vc establecidos en Galicia a partir de muestras recogidas durante los años 2003-2005, dos aislados hipovirulentos procedentes del mismo muestreo y un aislado hipovirulento de origen italiano cedido por el Dr. Cortesi (Figura 1). El aislamiento del patógeno se realizó a partir de fragmentos de corteza obtenidos en el campo que se desinfectaron superficialmente, se sembraron en medio nutritivo PDA suplementado con biotina y metionina (PDAMB), se incubaron a 24°C en oscuridad y se reaislaron en medio PDA.

La determinación de la virulencia de los aislados de *C. parasitica* se basó en primer lugar en los criterios morfológicos descritos por ELLISTON (1985), y también en el color de las colonias, presencia o ausencia de picnidios, y textura y grado de crecimiento en el medio de cultivo. La presencia del CHV se confirmó mediante la extracción del dsRNA utilizando el protocolo descrito por MORRIS et al. (1983). La compatibilidad vegetativa se determinó mediante el método de barrera/fusión en medio de cultivo PDAg descrito por POWELL en 1995, que facilita la visualización de la barrera formada entre aislados incompatibles,

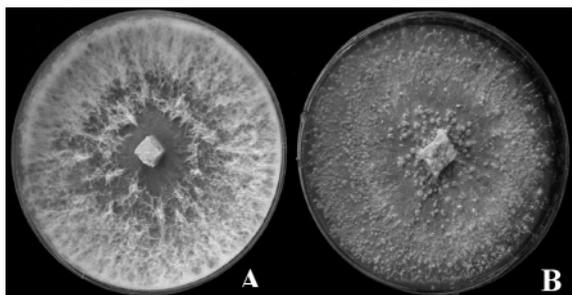


Figura 1. Aislados de *Cryphonectria parasitica* en medio PDA. A: aislado hipovirulento. B: aislado virulento

dando lugar a resultados claros y consistentes (CORTESI *et al.*, 1996).

Patogenicidad de los tipos de compatibilidad vegetativa

La patogenicidad de los tipos de compatibilidad vegetativa y de los aislados hipovirulentos se determinó mediante el método propuesto por LEE *et al.* (1992) con algunas modificaciones. La evaluación consistió en un test *in vitro* sobre fragmentos de tronco recogidos en campo.

En enero de 2005 se recogieron ramas de *Castanea sativa* a partir de las cuales se prepararon fragmentos sin corteza de aproximadamente 15 cm de longitud x 5 cm de diámetro, que se colocaron de forma individual en cajas de plástico sobre papel de filtro humedecido. Con un sacabocados se realizaron agujeros de aproximadamente 6 mm en el centro del tronco. Las inoculaciones se llevaron a cabo colocando un trozo del micelio correspondiente a cada aislado en el interior del mismo. Se establecieron 12 tratamientos con 5 repeticiones cada uno, considerando cada fragmento de *C. sativa* como una repetición. Los tratamientos consistieron en: un control (en el hueco de la pieza de castaño se inoculó un fragmento de 6 mm de diámetro del medio de cultivo PDA), y la inoculación de forma independiente de los 8 tipos vc establecidos vc A - vc H, los dos aislados hipovirulentos obtenidos en el muestreo y el aislado hipovirulento de procedencia italiana. Las cajas se colocaron en cámara de cultivo en oscuridad a una temperatura de $22 \pm 1^\circ\text{C}$ y con una humedad relativa de 80-85%.

Después de la inoculación se examinó diariamente el estado de los fragmentos de castaño hasta un total de 42 días, midiendo la zona en la que aparecían micelio y/o cuerpos de fructificación de *C. parasitica* y observando la aparición de necrosis.

La evaluación se basó en una escala del 0 al 4 considerando el tamaño y el aspecto de la zona infectada, estableciéndose 5 niveles de severidad en función del estado de desarrollo de la enfermedad:

- 0: ningún síntoma, fragmento de castaño sano.
- 1: presencia de micelio y/o cuerpos de fructificación alrededor de la zona de inoculación.
- 2: presencia de micelio y/o cuerpos de fructificación en 1/3 del fragmento de castaño.

3: presencia de micelio y/o cuerpos de fructificación en 2/3 del fragmento de castaño.

4: toda la superficie del fragmento cubierta de micelio y/o cuerpos de fructificación

Se calculó el índice de enfermedad, en porcentaje, para cada tratamiento, según el método de TOWNSEND & HEUBERGER (1943):

$$I = \frac{\sum (c.f.)}{N.Z} \cdot 100$$

Siendo:

I: índice de enfermedad

f: frecuencia

c: valor numérico de la clase (0,1,2,3,4)

N: número total de fragmentos inoculados en cada tratamiento

Z: máximo valor numérico de los niveles de enfermedad

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la figura 2, se presenta la evolución de los niveles de severidad de los aislados virulentos e hipovirulentos sobre madera de castaño medidos cada tres días.

Todos los aislados virulentos produjeron síntomas de infección sobre los fragmentos de castaño. Éstos comenzaron a manifestarse a los 10 días del inicio del ensayo como un micelio blanco alrededor del punto de inoculación y fueron aumentando hasta que, en algunos casos, el micelio se extendió por toda la superficie de la muestra. El tamaño de la zona infectada tras las inoculaciones varió mucho entre tipos vc, aunque en todos los casos el hongo formó abundante micelio que cubrió el tejido. Con el tiempo el micelio adquirió una tonalidad amarillenta y empezaron a formarse los cuerpos de fructificación, visibles como pústulas amarillo anaranjadas. El grado de virulencia varió de unos aislados a otros, pero en ningún caso se produjo necrosis de los fragmentos.

Los tipos vc A, D y F fueron los más virulentos; solo 20 días después de ser inoculados, su micelio y/o cuerpos de fructificación se habían extendido por toda la superficie de los fragmentos, alcanzando el máximo nivel de severidad e índice de enfermedad. Muy virulentos fueron también los tipos C y E, ya que, aunque crecieron más lentamente sobre la madera de castaño, a los 42 días los

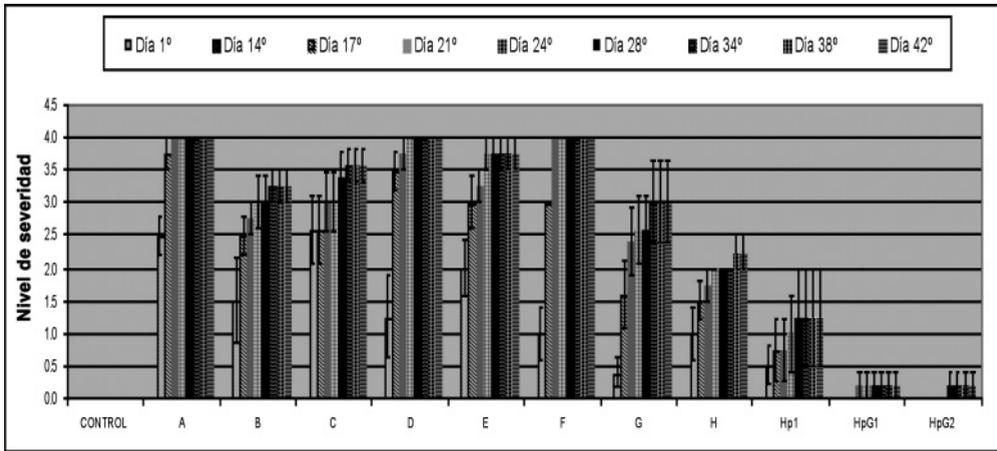


Figura 2. Patogenicidad de los tipos vc de *Cryphonectria parasitica* sobre madera de castaño (media +/- error estándar)

fragmentos mostraron niveles 3-4 de severidad e índices de enfermedad del 90% (figuras 3A y 3B). Menor virulencia se observó en los tipos vc B y G, que colonizaron la madera más lentamente que los anteriores, no superando el nivel 3 de severidad en la mayoría de los fragmentos.

Hay que destacar que el tipo vc A, uno de los más virulentos, es el más extendido en Galicia, concretamente en las provincias de Lugo y Ourense. Sin embargo, los otros tipos vc virulentos no poseen una representación tan amplia.

El tipo vc C se localiza principalmente en el límite norte de la provincia de Ourense, aunque también está presente en el sur de Ourense y con menor número de aislados en las provincias de A Coruña y Lugo. El tipo E se localiza en la provincia de Pontevedra y el tipo F en el norte de Ourense. El tipo B se localiza en el norte de la provincia de A Coruña y noreste de Ourense y los tipos D y G en el sureste de Ourense.

El tipo vc H fue el menos virulento, alcanzando un máximo de enfermedad a los 42 días



Figura 3. Test de patogenicidad de los tipos vc H (A) y vc C (B) sobre madera de castaño. Aspecto del control y de los ensayos a los 41 días de inoculación.



Figura 4. Test de patogenicidad de los aislados hipovirulentos Hp1 (A) y HpG2 (B) sobre madera de castaño. Aspecto del control y de los ensayos a los 41 días de inoculación

del 40%, que se correspondió con un nivel de severidad de 2. Este grupo es muy poco abundante en Galicia, estando representado por tan solo un aislado localizado en la provincia de Pontevedra.

Los aislados hipovirulentos mostraron menor severidad que los tipos vc, y escasa o nula formación de cuerpos de fructificación. Entre aislados hipovirulentos también se apreciaron diferencias en función de su procedencia, probablemente relacionadas con el tipo de hipovirus que las infectan. Las cepas hipovirulentas obtenidas en el muestreo de Galicia, HpG1 y HpG2, mostraron una patogenicidad muy baja y no provocaron los primeros síntomas hasta pasados los 21 y 24 días, respectivamente. Ninguna de las dos alcanzó el nivel 1 de severidad al final del ensayo, determinando índices de enfermedad inferiores al 5%, y la formación de picnidios fue escasa (Figura 4B). Por el contrario la cepa Hp1, de origen italiano, mostró un patogenicidad mayor. Esta cepa provocó síntomas visibles a los 10 días, que fueron aumentando hasta alcanzar un nivel 1 de severidad y un índice de enfermedad a los 42 días del 45%, algo por debajo del tipo vc H. Entre los síntomas visibles se incluía la formación de picnidios (Figura 4A).

La diversidad genética de *C. parasitica* se ha estudiado en España (HOMS *et al.*, 2001; AGUÍN *et al.*, 2005) y de forma más extensa en el resto de Europa (GARBELOTTO *et al.*, 1992; CORTESI *et al.*, 1996; HEINIGER *et al.*, 1998). Sin embargo, los estudios encaminados a estudiar la virulencia de las cepas de este hongo son más limitados. Se han descrito diferentes métodos, tanto *in vivo* como *in vitro*, que han permitido detectar diferencias en la virulencia de aislados (ELLISTON, 1985; LEE *et al.*, 1992; DUNN Y BOLAND, 1993; MELZER *et al.*, 1997). Los test convencionales *in vivo* son más difíciles de llevar a cabo. Requieren de la utilización de ejemplares de tamaño similar y de períodos de incubación de entre dos y tres meses; además los resultados se ven afectados por diversos factores, como el genotipo de los árboles inoculados y las condiciones climáticas, que pueden afectar al grado de desarrollo del patógeno (LEE *et al.*, 1992). *Cryphonectria parasitica* es un hongo de cuarentena, por lo que resulta adecuado disponer de un método *in vitro*, como el que se describe en

el presente trabajo, para ensayar la virulencia, ya que los ensayos de inoculación *in vivo* requieren de unas medidas de control estrictas para evitar la dispersión accidental del patógeno.

En conclusión, la técnica desarrollada por LEE *et al.* (1992) es práctica y útil para establecer la patogenicidad de *C. parasitica in vitro*, ya que permite realizar en pocos días una primera clasificación de la virulencia de los aislados y determinar el nivel de patogenicidad.

Agradecimientos

Los autores agradecemos a Dña. Susana Rodríguez Varela, técnico de laboratorio de la Estación Fitopatológica do Areeiro, su excelente trabajo en la realización de este proyecto.

BIBLIOGRAFÍA

- ADAMCÍKOVÁ, K. & JUHÁSOVÁ, G.; 2003. Diversity of subpopulation of *Cryphonectria parasitica* in Horná Nitra. *Folia Oecologica* 30(1): 149-155.
- AGUÍN, O.; MATA, M. & MANSILLA, J.P.; 2005. Occurrence and diversity of vegetative compatibility types of *Cryphonectria parasitica* in Galicia (NW Spain). *Acta Horticulturae* 693: 597-603.
- AHN, I.; CHUNG, H. & LEE, Y.; 1998. Vegetative compatibility groups and pathogenicity among isolates of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum*. *Plant Dis.* 82(2): 244-246.
- CORTESI, P.; MILGROOM, M. & BISIACH, M.; 1996. Distribution and diversity of vegetative compatibility types in subpopulations of *Cryphonectria parasitica* in Italy. *Mycol. Res.* 100: 1087-1093.
- DUNN, M.M. & BOLAND, G.J.; 1993. Hypovirulent isolates of *Cryphonectria parasitica* in southern Ontario. *Can. J. Plant Pathol.* 15: 245-252.
- ELLISTON, J.E.; 1985. Characteristics of dsRNA-free and dsRNA-containing strains of *Endothia parasitica* in relation to hypovirulence. *Phytopathology* 75(2): 151-158.
- GARBELOTTO, M.; FRIGIMELICA, G. & MUTTO-ACCORDI, S.; 1992. Vegetative compatibility

- and conversion to hypovirulence among isolates of *Cryphonectria parasitica* from northern Italy. *Eur. J. Forest Path.* 22: 337-348.
- GOUVEIA, M.E.; CARDOSO, P. & MONTEIRO, M.L.; 2001. Incidence of chestnut blight and diversity of vegetative compatible types of *Cryphonectria parasitica* in Trás-os-Montes (Portugal). *For. Snow Landsc. Res.* 76: 387-390.
- HEINIGER, U.; CORTESI, P.; ROBIN, C., COLINAS, C.; PERLEROU, C.; RIGLING, D.; SOTIROVSKI, K.; TRESTIC, M. & USCUPIC, M.; 1998. *Cryphonectria parasitica* vegetative compatibility groups in Europe. In: 2^o *International Symposium on chestnut*. Bordeaux. France.
- HOMS, G.; RODRÍGUEZ, J.; RIGLING, D. & COLINAS, C.; 2001. Caracterización de la población de *Cryphonectria parasitica* y detección de cepas hypovirulentas en 3 subpoblaciones de Cataluña. En: S.E.C.F.-Junta de Andalucía (eds.), *Actas del III Congreso Forestal Español. Montes para la sociedad del nuevo milenio IV*: 408-414. Coria Gráficas. Sevilla.
- 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.
- LESLIE, J.F.; 1996. Fungal vegetative compatibility- Promises and prospects. *Phytoparasitica* 24(1): 3-6.
- MELZER, M.S.; DUNN, M.; ZHOU, T. & BOLAND, G.J.; 1997. Assessment of hypovirulent isolates of *Cryphonectria parasitica* for potential in biological control of chestnut blight. *Can. J. Plant Pathol.* 19: 69-77.
- 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.
- PENNISI, A.M.; MANGANO, G. & GRASSO, S.; 1992. Compatibilità vegetativa di isolati di *Cryphonectria parasitica* (Murr.) Barr ottenuti da castagneti in Calabria. *Petria* 2(1): 1-10.
- POWELL, W.A.; 1995. Vegetative incompatibility and mycelial death of *Cryphonectria parasitica* detected with a pH indicator. *Mycologia* 87: 738-741.
- ROBIN, C.; ANZIANI, C. & CORTESI, P.; 2000. Relationship between biological control, incidence of hypovirulence and diversity of vegetative compatibility types of *Cryphonectria parasitica* in France. *Phytopathology* 90: 730-737.
- TOWSEND, G.R. & HEUBERGER, J.W.; 1943. Methods for estimating losses caused by diseases in fungicide experiments. *Plant Dis. Rep* 27: 340-343.
- TRESTIC, T.; USCUPIC, M., COLINAS, C., ROLLAND, G., GIRAUD, A. & ROBIN, C.; 2001. Vegetative compatibility type diversity of *Cryphonectria parasitica* populations in Bosnia-Herzegovina, Spain and France. *For. Snow Landsc. Res* 76: 391-396.