

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

Dolores Montenegro Gregorio¹; Olga Aguin Casal¹; María Jesús Sainz Osés.² y José Pedro Mansilla Vázquez^{1,2}

¹Estación Fitopatológica do Areiro (Diputación Pontevedra), Subida la Robleda s/n. 36153 Pontevedra. efa@efa-dip.org

²Departamento de Producción Vegetal, Universidad de Santiago de Compostela, Campus Universitario, 27002 Lugo.

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 incidencia 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 40% de incidencia, y el tipo vc C, con un 90% de incidencia, el más virulento.

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 dsRNA 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 ambos poseen alelos idénticos en los *loci* que regulan el sistema se dice que los individuos 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.

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 vic diferentes que presentan las cepas que anastomosan (LIU *et al.*, 1996).

La variabilidad poblacional de *C. parasitica* se ha estudiado de forma extensiva en Europa (GARBELOTTO *et al.*, 1992; PENNISI *et al.*, 1992; CORTESI *et al.*, 1996;

HEINIGER *et al.*, 1998; GOUVEIA *et al.*, 2001; ADAMCIKOVÁ 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. Así, el grupo más extendido es el A, predominante en la provincias de Lugo y Ourense, mientras que los menos abundantes son el F, G y H, representados por un único aislado cada uno. El objetivo de este trabajo fue determinar si además los ocho tipos vc determinados en Galicia presentan variación en su virulencia.

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 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), color de las colonias, presencia o ausencia de picnidios, 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, 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 ± 1 °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 incidencia 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 y 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

Patogenicidad de los tipos de compatibilidad vegetativa

Tras las inoculaciones el tamaño del área afectada mostró variaciones entre los tratamientos efectuados. En general el área afectada por las cepas virulentas fue mayor que la provocada por los aislados hipovirulentos. En el tratamiento control no se observó ningún crecimiento fúngico. En la figura 2 se muestran los resultados de la patogenicidad sobre madera de castaño de los aislados utilizados a lo largo de la incubación.

Todos los aislados virulentos produjeron síntomas sobre los fragmentos de castaño. Éstos comenzaron a manifestarse a los 10 días de la inoculación 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 aunque en ningún caso se produjo necrosis de los fragmentos.

El tipo vc H fue el menos virulento alcanzando un máximo de incidencia a los 42 días del 40%. Este grupo es muy poco abundante en Galicia, estando representado por tan solo un aislado localizado en la provincia de Pontevedra. El tipo C presentó el máximo de incidencia del ensayo alcanzando un 90% (figuras 3A y 3B, respectivamente). Este grupo, que presenta una distribución más amplia que el H, 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. Además del C otros tipos vc presentaron

una patogenicidad elevada, así el tipo A alcanzó un índice de enfermedad del 80%. Este tipo es el más extendido en Galicia, concretamente en las provincias de Lugo y Ourense. Los tipos E y F mostraron la misma patogenicidad que el A, 80%, si bien no poseen una representación tan amplia. El tipo E se localiza en la provincia de Pontevedra y el tipo F en el norte de Ourense.

Los aislados hipovirulentos mostraron menor patogenicidad 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. Así, 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. El índice de enfermedad no superó en ambos casos el 5% y la formación de picnidios fue escasa (figura 4B). Por el contrario la cepa Hp1 de origen italiano, mostró una patogenicidad mayor. Esta cepa provocó síntomas visibles a los 10 días, que fueron aumentando hasta alcanzar un índice de enfermedad a los 41 días del 45%, similar al del tipo vc H. Entre los síntomas visibles se incluía la formación de picnidios (figura 4A).

Los resultados muestran que la técnica desarrollada por LEE *et al.* (1992) es práctica y útil para establecer la patogenicidad de *C. parasitica in vitro*, ya que los síntomas producidos permiten realizar en pocos días una primera clasificación de la virulencia de los aislados y determinar el grado de patogenicidad. Al tratarse *C. parasitica* de un hongo de cuarentena resulta adecuado disponer de un método *in vitro* para testar la virulencia, ya que los ensayos de inoculación *in vivo* requieren de unas medidas de control estrictas para evitar la dispersión accidental del patógeno.

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.
- 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.
- 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. En: *2º International Symposium on chestnut*. Bordeaux. France.
- 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.

- 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.; MANGNANO, 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.
- TOWNSEND, 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.

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.

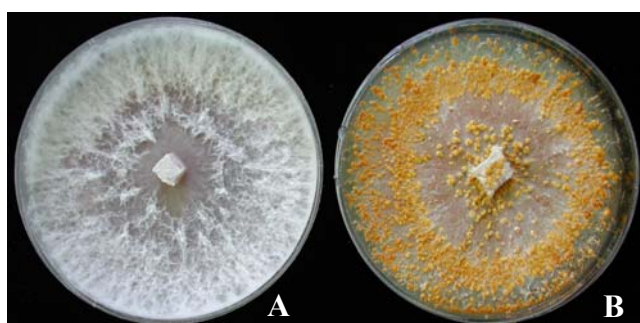


Figura 1. Aislados de *Cryphonectria parasitica* en medio PDA. A: aislado hipovirulento. B: aislado virulento.

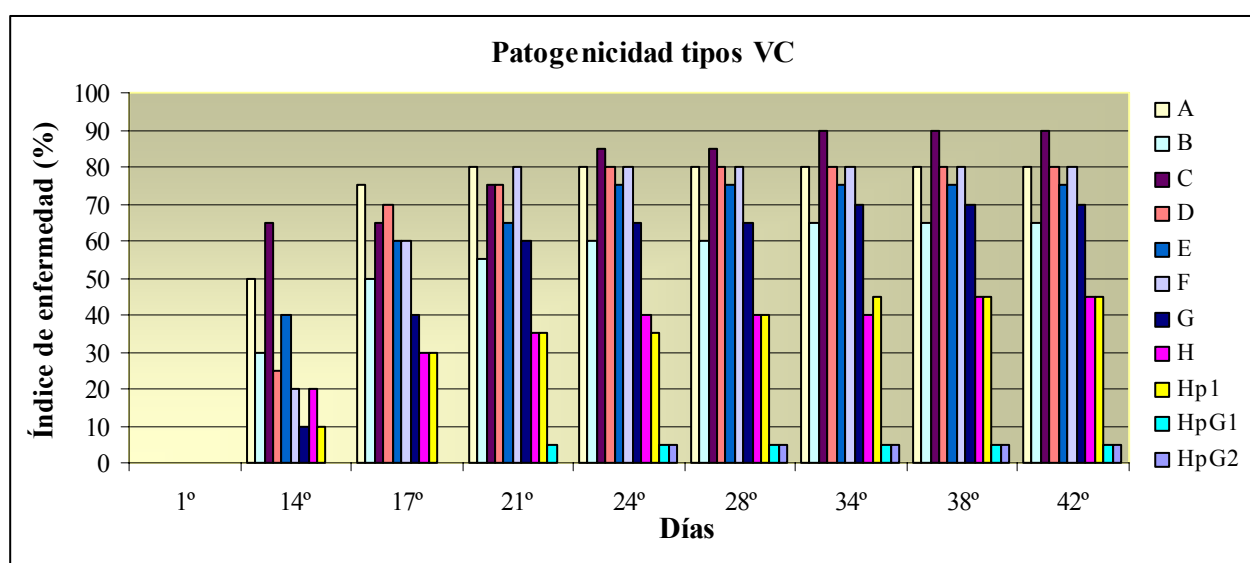


Figura 2. Patogenicidad de los tipos vc de *Cryphonectria parasitica* sobre madera de castaño.



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.