

***CRYPHONECTRIA PARASITICA* (MURR.) BARR EN LOS CASTAÑARES ASTURIANOS**

Germán González Varela y Ana Jesús González Fernández

Laboratorio de Fitopatología, Servicio Regional de Investigación y Desarrollo Agroalimentario (S.E.R.I.D.A.). Ctra. de Oviedo s/n. 33300-VILLAVICIOSA (Asturias, España). Correo electrónico: ggonzalez@serida.org

Resumen

La enfermedad conocida como cancro del castaño, producida por el hongo *Cryphonectria parasitica*, tiene una alta incidencia sobre los castaños del Principado de Asturias. Durante el periodo 2005-2007 se realizó un muestreo en el que se detectaron síntomas de la enfermedad en las masas de castaño de 69 de los 78 concejos en que se divide el territorio asturiano y con el que se obtuvieron 649 aislamientos del hongo que, junto con los cedidos de anteriores prospecciones, forman una colección de casi 800 aislamientos. En esta colección se identificaron tres grupos de compatibilidad vegetativa, de los cuales uno era mayoritario agrupando a más del 96% de los aislamientos. Para estudiar una posible alternativa química al tratamiento de la enfermedad se realizó un ensayo de eficacia in vitro con cinco productos fitosanitarios, de los cuales el epoxiconazol (12,5%), fue el que mostró una mayor eficacia en el control del hongo. Por último, se ha utilizado la técnica RAPD con una serie de cepas para conocer su potencial como herramienta en el estudio de la epidemiología del hongo.

Palabras clave: *Cancro, Prospección, Epidemiología, RAPD*

INTRODUCCIÓN

En Asturias, la superficie forestal dedicada a castaño (*Castanea sativa*) ocupa alrededor de 60.000 ha, que se encuentran distribuidas de forma muy variable en los 78 concejos que conforman el Principado, desde 1 ha en el concejo de Ribadedeva a 5.000 ha en el de Tineo (ANÓNIMO, 2004).

El agente causal de la enfermedad conocida como cancro del castaño es el hongo ascomicete *Cryphonectria parasitica*. La enfermedad se describió por primera vez en EE.UU. en 1904; 35 años más tarde se citó en Italia, desde donde se extendió a toda Europa. En España se encontró en la década de los 40 en Galicia y en el País Vasco. En la literatura se recogen ya desde el

año 1982 datos de la presencia de cancro en Asturias y a partir de los años 1999-2000 del gran avance que la enfermedad había experimentado en la región (VALDEZATE et al., 2001).

En los árboles afectados los síntomas de la enfermedad son fácilmente reconocibles con presencia de ramas y hojas secas, coloraciones rojizas, depresión y grietas longitudinales de la corteza, pústulas anaranjadas, proliferación de brotes epicórnicos por debajo del cancro y el cancro propiamente dicho.

La forma en que se dispersa la enfermedad puede ser a través de los conidios, resultado de la reproducción asexual, o de las ascosporas, consecuencia de la reproducción sexual. Los primeros se ayudan de insectos, aves, mamíferos, caracoles y la lluvia, mientras que las últi-

mas son diseminadas fundamentalmente por el viento. El hombre también contribuye a la dispersión de la enfermedad al transportar plantas y madera infectadas.

Un aspecto a reseñar es que el hongo puede verse infectado por un virus de ARN de doble cadena responsable de que las cepas presenten micelio blanquecino, crecimiento más lento, baja conidiación y baja virulencia, por lo que se las denomina cepas hipovirulentas.

Cuando dos cepas del hongo pueden intercambiar material al entrar en contacto sus hifas (anastomosis hifal) se dice que son del mismo grupo de compatibilidad vegetativa (GCV). En el caso de *C. parasitica*, las poblaciones del hongo en Europa presentan una baja variabilidad en cuanto a GCV se refiere, lo que facilitaría la utilización de estrategias de lucha biológica.

Los métodos de control que pueden ser aplicados para combatir la enfermedad son: medidas culturales, búsqueda de híbridos resistentes, tratamientos químicos y lucha biológica utilizando las mencionadas cepas hipovirulentas.

En este trabajo se plantea disponer de una colección de cepas del hongo representativa del Principado de Asturias y conocer su variabilidad, aspecto fundamental para afrontar un programa de lucha biológica. Por otro lado, se estudia la posibilidad de disponer de una alternativa química eficaz contra la enfermedad y se emplean técnicas moleculares, concretamente RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) para la caracterización genética del hongo.

MATERIAL Y MÉTODOS

Muestreo

Se realizó en el periodo comprendido entre 2005-2007. La metodología seguida consistió en localizar masas de castaño, anotando el aspecto general de las mismas. Localizado un árbol sintomático se anotaron sus coordenadas utilizando un GPS. Se tomó una muestra de corteza por árbol y se guardó en una bolsa sellada hasta su procesamiento. Las siguientes muestras se tomaron en árboles situados al menos a 10 m de distancia del anterior, para evitar, en lo posible, obtener aislamientos homotáticos. El número de

muestras por masa dependió del grado de afectación y tamaño de la misma, pero nunca superó las diez muestras. En algunos casos se tomó muestra de castaños localizados en linderos de fincas, siguiendo el mismo criterio de que hubiera, al menos, 10 m de distancia entre ellos.

Análisis de las muestras

Se utilizó un sacabocados estéril con el que se tomaron trozos de corteza de 5 mm de diámetro, se limpiaron con alcohol, y se colocaron en placas de cultivo que contenían el medio agar de patata dextrosa (APD) (GAMS et al., 1980). Se incubaron a 25°C en oscuridad durante cinco días, repicando un trozo de micelio a otra placa de APD e incubándose en las mismas condiciones.

Cultivos monospóricos

Se realizaron diluciones seriadas a partir del micelio del hongo, de las que se tomaron 50 µl de suspensión que se sembraron en placas con APD utilizando asa de Drigalski. Se seleccionaron las colonias obtenidas de las placas correspondientes a la dilución más alta en la que se obtuvo crecimiento.

Determinación de los grupos de compatibilidad vegetativa

Se siguió el método barrera/fusión (Colinas, comunicación personal). Se sembró el hongo, utilizando palillos estériles, en placas de APD enriquecido con 50 mg.l⁻¹ de verde de bromocresol. Los aislamientos pertenecientes a cada concejo se enfrentaron entre sí, al menos cuatro veces, de tal forma que se obtuvieron los GCV presentes en cada concejo. Para obtener los GCV presentes en el Principado de Asturias se enfrentaron todos los GCV presentes en los concejos entre sí.

Sensibilidad in vitro de *C. parasitica* a fungicidas

Se probaron cinco productos fitosanitarios cuyas materias activas eran captan (85%), epoxiconazol (12,5%), azoxistrobin (25%), las mezclas de carbendazima (20%) y flutriafol (9,4%), y de flusilazol (0,5%) y carbendazima (1%). Se utilizaron ocho aislamientos de *C. parasitica*, seis de procedencia asturiana (LPPAF-1, LPPAF-14,1, LPPAF-23, LPPAF-150, LPPAF-

140, LPPAF-147), y dos de colección (ATCC-52571 y CCP-52). Las dosis ensayadas siguieron una progresión geométrica de 1 a 1.024 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, referidas siempre a la materia activa. Se siguió el método descrito por GONZÁLEZ-VARELA Y GONZÁLEZ (2007).

Técnica RAPD

Se llevaron a cabo las mezclas de reacción en 25 μl de volumen final conteniendo Taq polimerasa y tampón de reacción (DyNAzyme, Finnzymes, Espoo, Finlandia), dNTPs (Bioline, Londres, Reino Unido), iniciador (Tabla 1; Roche Diagnostics, Barcelona, España), agua bi-destilada estéril, y ADN molde. Como marcador de peso molecular se utilizó el Bio Marker[®]-EXT de 50-2000 pb (Bio-Ventures, Inc., Murfreesboro, EE.UU.). Las condiciones de la reacción de amplificación fueron las mismas en todos los casos y consistieron en una desnaturalización a 94°C / 4 min, seguida de 35 ciclos de amplificación (94°C / 30 s, 35°C / 1 min y 72°C / 2 min) y una elongación a 72°C / 5 min. Todas las amplificaciones se llevaron a cabo, al menos dos veces, en los termocicladores PTC100[™] y PTC200[™] (MJ Research, Massachusetts, EE.UU.).

Para cada una de las cepas en estudio se realizaron tres extracciones de ADN. Las cepas utilizadas fueron 24 aislamientos asturianos de *C. parasitica*, LPPAF-203 a 206 (Ribadesella), LPPAF-228, LPPAF-229, LPPAF-270, LPPAF-353 (Cabrales), LPPAF-190 a 193 (San Martín del Rey Aurelio), LPPAF-265, LPPAF-217, LPPAF-218, LPPAF-221 (Quirós), LPPAF-159 a 161, LPPAF-185 (Tineo), LPPAF-391, LPPAF-392.1, LPPAF-393.1, LPPAF-394 (Cangas del Narcea). Como organismo control fuera de grupo se utilizó una cepa de *Exserohilum turcicum* de procedencia asturiana.

Para visualizar los resultados de las amplificaciones se usaron geles de agarosa al 1%. Se utiliza-

ron dos modelos de fuentes de electroforesis, MODEL 1000/500, POWER SUPPLY y POWER-PAC BASIC (BIO-RAD, EE.UU.). Las bandas del gel se visualizaron, previa tinción en una solución de bromuro de etidio (200 $\mu\text{l}\cdot\text{l}^{-1}$) y se fotografiaron alternativamente con una cámara Polaroid CU-5 (Polaroid, Reino Unido) y con un digitalizador de imágenes (Vilber Lourmat, Francia).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se muestrearon los 78 concejos que forman el Principado de Asturias y se consiguió aislar el hongo en 69 de ellos que representan más del 95% de la superficie dedicada a castaño (Figura 1). Esto supone que se ha incrementado en once el número de concejos afectados por la enfermedad con respecto al último muestreo realizado en el año 2000 (VALDEZATE *et al.*, 2001). En los concejos de Castropol y San Tirso de Abres no se detectó ningún árbol con síntomas, lugares en los que VALDEZATE *et al.* sí lo habían detectado (GONZÁLEZ-VARELA Y GONZÁLEZ, 2006a).

Los 649 aislamientos del hongo, junto con los cedidos de anteriores prospecciones, forman una colección de casi 800 aislamientos, de los que se realizaron los cultivos monospóricos, de tal forma que al abordar los experimentos nos aseguramos trabajar con clones y no con poblaciones.

La morfología de los aislamientos de la colección resultó ser muy variable en cuanto a color, textura y velocidad de crecimiento. Algunos de ellos responden a las características descritas para las cepas hipovirulentas del hongo, es decir, baja conidiación, coloración blanquecina y crecimiento lento, aunque está pendiente la confirmación de su carácter hipovirulento.

En cuanto a la variabilidad del hongo, se encontraron tres GCV diferentes (PA-I, PA-II y PA-III). El PA-I está presente en 64 concejos y

DENOMINACIÓN	REFERENCIA	DENOMINACIÓN	REFERENCIA
A	MIYATA <i>et al.</i> , 1995	F	ANÓNIMO, 2005
B	WILLIAMS <i>et al.</i> , 1990	G	ANÓNIMO, 2005
C	LACONCHA <i>et al.</i> , 1998	H	ANÓNIMO, 2005
D	VERSALOVIC <i>et al.</i> , 1991	I	GWO-FANG <i>et al.</i> , 1995
E	ANÓNIMO, 2005	J	GWO-FANG <i>et al.</i> , 1995

Tabla 1. Iniciadores utilizados en el trabajo

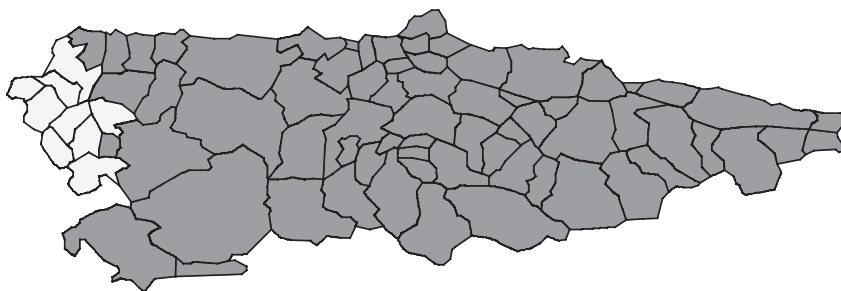


Figura 1. Mapa del Principado de Asturias en el que se muestran en color naranja los concejos en los que se ha conseguido aislar *C. parasitica*

agrupó a más del 96% de los aislamientos. El PA-II apareció en 10 concejos y agrupó a más del 3% de los aislamientos. Por último el PA-III se encontró en 2 concejos y representó casi el 0,03% de los aislamientos. Calculado el índice de diversidad de Shannon se obtuvo un valor de $H' = 0,1583$, lo que refleja una baja diversidad. Estos resultados coinciden con lo descrito en la bibliografía en otras zonas geográficas de Europa. Quedan por realizar los ensayos con las cepas de referencia para identificar a qué grupo europeo corresponden estos tres tipos encontrados en el Principado de Asturias.

Respecto a la búsqueda de una terapia química, encontramos que los cinco fungicidas utilizados presentaron una efectividad in vitro muy diferente. Por una parte el azoxistrobin (25%) no pudo inhibir el crecimiento de ninguna de las cepas a ninguna de las concentraciones ensayadas. El captan (85%) presentó una respuesta variable dependiendo de la concentración y aislamiento; produjo la inhibición total del crecimiento para el aislamiento *LPPAF-140* a 128 $\mu\text{g}/\text{ml}$, de *LPPAF-1*, *LPPAF-14,1*, *LPPAF-23* y *LPPAF-150* a 512 $\mu\text{g}/\text{ml}$ y de *LPPAF-147*, *ATCC-52571* y *CCP-52* a 1.024 $\mu\text{g}/\text{ml}$ y se mostró como fungistático en todas las concentraciones y para todas las cepas ensayadas. La mezcla de carbendazima (20%) y flutriafol (9,4%) inhibió el crecimiento del hongo desde la más baja concentración ensayada (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) y mostró efecto fungicida a esta concentración sólo para la cepa *LPPAF-14,1*, para las cepas *LPPAF-150*, *ATCC-52571* y *CCP-52* a concentraciones superiores a 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$, y superiores a 4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ para las cepas *LPPAF-1*, *LPPAF-23*,

LPPAF-140 y *LPPAF-147*. La mezcla de flusilazol (0,5%) y carbendazima (1%) causó la inhibición de todas las cepas a 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$, pero sólo se comportó como fungicida a concentraciones mayores de 4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ para las cepas *LPPAF-1*, *LPPAF-150*, *CCP-52*, siendo necesarias concentraciones mayores de 8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ para conseguir este efecto en las cepas *LPPAF-14,1*, *LPPAF-23*, *LPPAF-140*, *LPPAF-147* y *ATCC-52571*. El más eficaz fue el epoxiconazol (12,5%) que consiguió inhibir el crecimiento de todas las cepas en estudio a 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$, actuando además como fungicida. Estos resultados sugieren que el epoxiconazol (12,5%) podría ser una alternativa de tratamiento a estudiar in vivo.

Por último, en el estudio de marcadores moleculares RAPD, se encontró que con nueve de los diez iniciadores ensayados todos los aislamientos de *C. parasitica* mostraron un idéntico perfil, para cada uno de ellos y diferente de la cepa fuera de grupo utilizada. Lo que se podría explicar o bien por una alta homogeneidad de las cepas en estudio o bien porque los iniciadores o la técnica no fueran los más adecuados para conocer la variabilidad intraespecie.

En la figura 2 se muestran, a modo de ejemplo, los resultados obtenidos con los iniciadores E y F. Por el contrario, con el iniciador G, se pudieron diferenciar cinco perfiles que denominamos RAPD-tipo1 a 5. Los cuatro aislamientos correspondientes al concejo de Ribadesella (Figura 3) mostraron todos el RAPD-tipo1. En el concejo de San Martín del Rey Aurelio los aislamientos *LPPAF-190* y *LPPAF-192* mostraron el RAPD-tipo2 y los aislamientos *LPPAF-191* y *LPPAF-193* mostraron el RAPD-tipo3 que

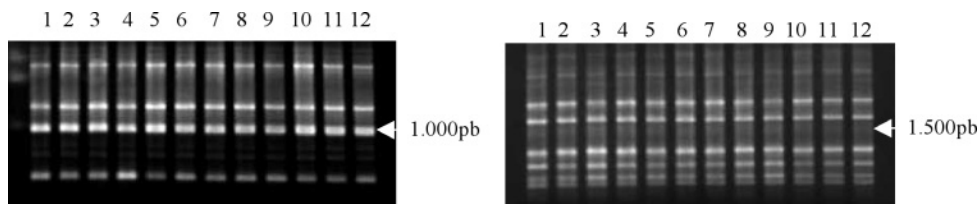


Figura 2. Fotografía de la izquierda resultado de la amplificación con el iniciador F. Fotografía de la derecha resultado de la amplificación con el iniciador E. Calle1: LPPAF-265. Calle2: LPPAF-217. Calle3: LPPAF-159. Calle4: LPPAF-160. Calle5: LPPAF-190. Calle6: LPPAF-191. Calle7: LPPAF-203. Calle8: LPPAF-204. Calle9: LPPAF-391. Calle10: LPPAF-394. Calle11: LPPAF-229. Calle12: LPPAF-270

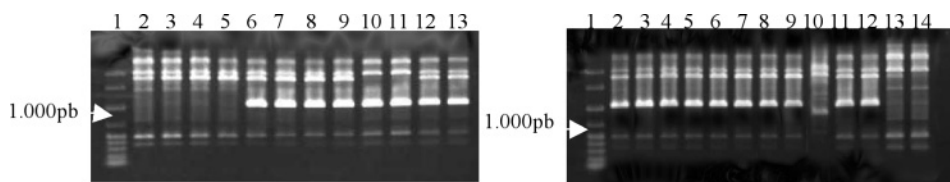


Figura 3. Fotografía izquierda resultado de la amplificación con el iniciador G. Calle1: Marcador. Calle2: LPPAF-203. Calle3: LPPAF-204. Calle4: LPPAF-205. Calle5: LPPAF-206. Calle6: LPPAF-391. Calle7: LPPAF-392,1. Calle8: LPPAF-393,1. Calle9: LPPAF-394. Calle10: LPPAF-228. Calle11: LPPAF-229. Calle12: LPPAF-270. Calle13: LPPAF-353. Fotografía derecha resultado de la amplificación con el iniciador G. Calle1: Marcador. Calle2: LPPAF-265. Calle3: LPPAF-217. Calle4: LPPAF-218. Calle5: LPPAF-221. Calle6: LPPAF-159. Calle7: LPPAF-160. Calle8: LPPAF-161. Calle9: LPPAF-185. Calle10: *E. turcicum*. Calle11: LPPAF-191. Calle12: LPPAF-193. Calle13: LPPAF-190. Calle14: LPPAF-192

coincidirían con los GCV presentes en el conejo. Los aislamientos LPPAF-228, LPPAF-229, pertenecientes al conejo de Cabrales, mostraron el RAPD-tipo4. El resto de las cepas en estudio fueron del RAPD-tipo3. La cepa de *E. turcicum* mostró el RAPD-tipo5 (GONZÁLEZ-VARELA Y GONZÁLEZ, 2006b).

La técnica RAPD ha sido repetible en los duplicados y reproducible en diferentes condiciones y, coincidiendo con lo apuntado por otros autores (WRONSKI *et al.*, 1997; YAN *et al.*, 2007), parece prometedora para su utilización como marcador molecular en *C. parasitica*. Se van a abordar trabajos encaminados a analizar las cepas de los diferentes GCV y procedencias mediante RAPD para evaluar su utilidad como herramienta molecular aplicada al estudio de la epidemiología del hongo.

Agradecimientos

D. Germán González Varela disfruta de una Beca predoctoral del Instituto Nacional de

Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (I.N.I.A.). Este trabajo ha sido financiado por el Gobierno del Principado de Asturias y la Caja Rural de Asturias. El Programa Forestal del SERIDA nos cedió 115 aislamientos del conejo de Aller y el Laboratorio de Sanidad Vegetal del Principado de Asturias 22 cepas de diversas procedencias.

BIBLIOGRAFÍA

- ANÓNIMO; 2004. <http://WWW.sadei.es/datos/cuadros%20tematicos/capitulo%20k/2/k28201A2000a.xls>
- ANÓNIMO; 2005. <http://www2.uni-jena.de/biologie/mikrobio/tipps/rapd.html>.
- GAMS, W.; VAN DER A H.A.; VAN DER PLAATS-NITERINK, A.J.; SAMSON, R.A. & STALPERS, J.A.; 1980. *CBS Course of Mycology*, 2ª Ed. Institute of the Royal Netherlands Academy of Sciences and Letters. Baarn.
- GONZÁLEZ-VARELA, G. Y GONZÁLEZ, A.J.; 2006a. Prospección de chancro del castaño

- en el Principado de Asturias. *En: XIII Congreso de la Sociedad Española de Fitopatología*. Murcia
- GONZÁLEZ-VARELA, G. Y GONZÁLEZ, A.J.; 2006b. Utilidad de la técnica RAPD en el estudio de aislamientos de *Cryphonectria parasitica* del Principado de Asturias. *En: XIII Congreso de la Sociedad Española de Fitopatología*. Murcia
- GONZÁLEZ-VARELA, G. & GONZÁLEZ, A.J.; 2007. In vitro sensitivity of *Cryphonectria parasitica* to six agrochemicals. *Australasian Plant Disease Notes* 2: 109-110.
- GWO-FANG Y.; CHIUNG-SHU, L. & CHANN-CHAO, C.; 1995. Differentiation of *Aspergillus parasiticus* from *Aspergillus sojae* by Random Amplification of Polymorphic DNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 61(6): 2384-2387.
- LACONCHA, I.; LÓPEZ-MOLINA, N.; REMENTERÍA, A.; AUDICANA, A.; PERALES, I. & GARAIZAR, J.; 1998. Phage typing combined with pulsed-field gel electrophoresis and random amplified polymorphic DNA increases discrimination in the epidemiological analysis of *Salmonella enteritidis* strains. *Int. J. Food Microbiol.* 40(1-2): 27-34.
- MIYATA, M.; AOKI, T.; ENGLISH, V.; YOSHIDA, T. & ENDO, M.; 1995. RAPD analysis of *Aeromonas salmonicida* and *Aeromonas hydrophila*. *J. Appl. Bacteriol.* 79(2): 181-185.
- VALDEZATE, C.; ALZUGARAY, R.; LANDERAS, E. Y BRAÑA, M.; 2001. Situación actual de *Cryphonectria parasitica* (Murril) Anderson, cancro cortical, en los castaños asturianos. *Bol. San. Veg.; Plagas.* 27: 401-410.
- VERSALOVIC, J.; KOENTH, T. & LUPSKI, J.; 1991. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nuc. Acids Res.* 19: 6823-6831.
- WILLIAMS, J.G.K.; KUBELIK, A.R.; LIVAK, K.J.; RAFALSKI, J.A. & TINGEY, S.V.; 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nuc. Acids Res.* 18(22): 6531-6535.
- WRONSKI, R.; KUDERA, U. & WILHELM, E.; 1997. Characterization of *Cryphonectria parasitica* strains by random amplified polymorphic DNA (RAPD) technique and conventional methods. *Eur. J. For. Path.* 27: 95-103.
- YAN, B.; LI, Z.; HUANG, H. & QIN, L.; 2007. Genetic diversity and population differentiation of chestnut blight fungus, *Cryphonectria parasitica*, in China as revealed by RAPD. *Biochemical Genetics.* 45(5/6): 487-506.