

UNIVERSIDAD DE LEÓN
ESCUELA SUPERIOR Y TÉCNICA DE INGENIERÍA AGRARIA
Departamento de Ingeniería y Ciencias Agrarias

Tesis Doctoral

El chancro del castaño en el Principado de Asturias. Incidencia, epidemiología y control.

Germán González Varela

León, 2009

AGRADECIMIENTOS

Me gustaría expresar mi agradecimiento a todas las personas que han contribuido, de una u otra forma, en la elaboración de esta tesis.

A la Dra. Ana J. González, directora de esta tesis, su confianza, apoyo y dedicación la han hecho posible.

Al Gerente del SERIDA y al Jefe del Dpto. de Investigación por apoyar la realización del presente trabajo.

Al INIA, por la financiación de la beca.

A la Caja Rural de Asturias, por el primer año de beca y los tres siguientes de financiación para realizar el trabajo en chancro.

Al Programa Forestal del SERIDA, por la cesión de 111 cepas. Al Laboratorio de Sanidad Vegetal del Principado de Asturias por la cesión de 25 cepas. A Isabel Fernández por facilitarnos dos muestras de castaño.

A Luisa y Marcos por ayudarme en muchos momentos duros de trabajo, y Ana María, la última en llegar, gracias por el buen ambiente de trabajo.

A Marcos Miñarro por su ayuda en el tratamiento de los datos.

Al resto de compañeros que me he encontrado en el SERIDA y que me han ayudado en algunos aspectos del trabajo, me han aconsejado o simplemente me han acompañado.

A Michael y Shari Milgroom, me hicisteis sentir uno de los vuestros.

A los míos: Carmina y Luís, qué suerte encontrarme con vosotros; Carmen, siempre estás ahí; mis padres, sin vosotros nada habría sido posible.

INDICE

1.- INTRODUCCIÓN.

1.1.- El género <i>Castanea</i> .	3
1.2.- Principales plagas y enfermedades del castaño.	5
1.3.- La enfermedad del chancro del castaño. Síntomas.	6
1.4.- El hongo: <i>Cryphonectria parasitica</i> .	9
1.5.- Control de la enfermedad del chancro.	14
1.6.- Caracterización fenotípica, genotípica y patogénica.	18
1.7.- Planteamiento y objetivos.	21

2.- MATERIAL Y MÉTODOS.

2.1.- Cepas.	25
2.2.- Medios de cultivo.	26
2.3.- Iniciadores.	27
2.4.- Materias activas utilizadas en los ensayos de fitosanitarios.	28
2.5.- Invernadero.	29
2.6.- Plantas de castaño.	30
2.7.- Muestreo.	30
2.8.- Aislamiento e identificación.	32
2.9.- Cultivos mono/conidiales.	33
2.10.- Métodos de extracción de ADN.	34
2.11.- Determinación de los grupos de compatibilidad vegetativa.	35
2.12.- Determinación de los idiomorfos <i>MAT-1</i> y <i>MAT-2</i> .	37
2.13.- Caracterización morfológica.	38
2.14.- Ensayo de virulencia.	39
2.15.- Determinación de la actividad del enzima lacasa.	40
2.16.- Amplificación de secuencias arbitrarias (RAPD).	41
2.17.- Microsatélites (SSR).	43
2.18.- Ensayo <i>in vitro</i> de productos fitosanitarios.	45
2.19.- Ensayo <i>in vivo</i> de productos fitosanitarios.	46
2.20.- Conservación y mantenimiento de cepas.	48

3.- RESULTADOS.	
3.1.- Situación actual del chancro del castaño en Asturias.	51
3.2.- Diversidad de <i>C. parasitica</i> : grupos de compatibilidad vegetativa.	58
3.3.- Presencia de los idiomorfos MAT.	63
3.4.- Caracterización morfológica.	66
3.5.- Ensayo de virulencia.	72
3.6.- Actividad del enzima lacasa.	76
3.7.- Amplificación de secuencias arbitrarias (RAPD).	79
3.8.- Microsatélites (SSR).	84
3.9.- Ensayo <i>in vitro</i> de productos fitosanitarios.	89
3.10.- Ensayo <i>in vivo</i> de productos fitosanitarios.	91
 4.- DISCUSIÓN.	 97
 5.- CONCLUSIONES.	 109
 6.- BIBLIOGRAFÍA.	 115

1.- INTRODUCCIÓN

1.1.- El género *Castanea*.

El género *Castanea*, perteneciente al orden *Fagales*, familia *Fagaceae*, subfamilia *Castaneoideae* y comprende trece especies distribuidas en las regiones templadas del **hemisferio norte** (Cobos, 1989) entre las que destacamos *Castanea dentata* (Marshall) Borkh, o castaño americano, *Castanea sativa* Mill., o castaño europeo, *Castanea mollissima* Blume, o castaño chino y *Castanea crenata* Siebold y Succ., o castaño japonés (Figura 1).



Figura 1: Distribución mundial de las principales especies del género *Castanea* (adaptado de Elorrieta, 1949). En América del Norte destaca *C. dentata*. En Europa *C. sativa* y en Asia *C. mollissima* (China) y *C. crenata* (Japón).

En **España** (Figura 2), el castaño se encuentra principalmente en la zona baja del litoral cantábrico, en las Comunidades Autónomas de Galicia, Principado de Asturias y País Vasco. También lo encontramos en Navarra, occidente de Castilla-León, Extremadura, Andalucía, Cataluña (Cobos, 1989) y en las laderas más húmedas de las Islas Canarias occidentales (Gómez, 2004). En cuanto a la altitud, se pueden encontrar castaños desde el nivel del mar hasta 1.500 m. En lo referente al suelo, el castaño prefiere los suelos silíceos, silíceo-arcillosos, aunque tolera los calizos descalcificados (Cobos, 1989).

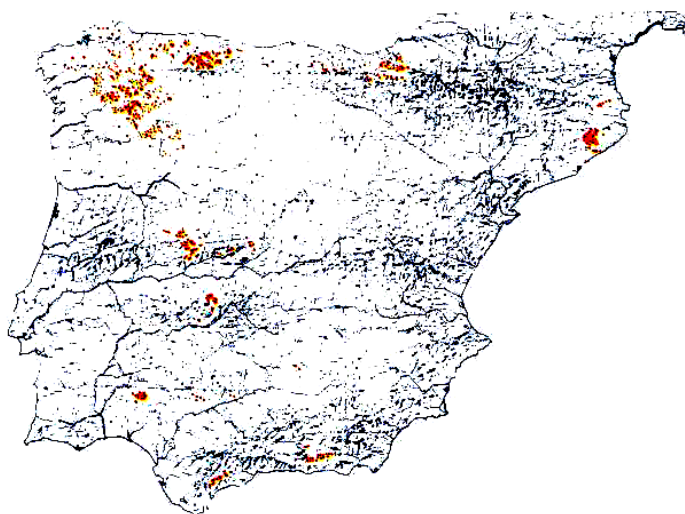


Figura 2: Distribución del castaño en el territorio peninsular español (Tomado de Cobos, 1989).

El castaño es una frondosa muy apreciada en el **Principado de Asturias** por su importancia paisajística y socio-económica. Los datos referentes a la superficie forestal dedicada a castaño en el Principado de Asturias varían mucho según las fuentes consultadas, desde 59.822 ha (Anónimo, 2003a) hasta 119.740 ha (Díaz *et al.*, 2009). Se encuentra distribuido de forma muy variable en los 78 concejos que conforman el Principado (Figura 3), desde 1 ha en el concejo de Ribadedeva a 5.168 ha en el de Tineo (Anónimo, 2003b). La producción de madera de castaño ha ido disminuyendo, desde 102.097 m³ el año 1999 hasta 43.029 m³ el año 2006 (Anónimo, 2008).



Figura 3: Distribución del castaño en Asturias. Masas con presencia dominante (tono oscuro) y masas con presencia subordinada a otras especies (tono claro). (Tomado de Manuel *et al.*, 2003).

La distribución de los castaños en la provincia es muy heterogénea debido a su origen fundamentalmente antrópico. Así, encontramos castaños formando masas de extensión variable, o bien como individuos aislados. Esta última es la forma más común en algunos concejos, generalmente en linderos de fincas, como árboles aislados en los bordes de las carreteras y como árboles singulares en parques y jardines. En cuanto a su aprovechamiento, encontramos masas destinadas a la producción maderera y también pequeños sotos para recoger fruto, en algunos casos asociados a praderas de aprovechamiento ganadero.

1.2.- Principales plagas y enfermedades del castaño.

El castaño puede ver mermadas sus producciones de madera o fruto por plagas y enfermedades.

Las **plagas** que le afectan, en su mayoría, son insectos que causan daño a los frutos, al follaje y a la madera y su incidencia varía en función de la climatología y las condiciones de la zona. Las especies de lepidópteros *Pammene fasciana*, *Cydia splendana* y *Cydia fagiglandana*, y el curculionido *Balaninus elephas*, centran su acción en las castañas y los daños que producen son más llamativos en las zonas en las que el castaño se dedica a la producción de fruto. Además, los lepidópteros *Lymantria dispar* y *Zeuzera pyrina*, pueden afectar al follaje y la madera, respectivamente. *Lymantria dispar* produce defoliaciones más o menos intensas y *Zeuzera pyrina* practica galerías que pueden ser la causa de roturas en las ramas o tallos jóvenes, estas lesiones pueden servir posteriormente de vía de entrada para otro tipo de patógenos (Mansilla *et al.*, 1999; Gómez, 2004).

Las principales **enfermedades** que afectan al castaño son la tinta y el chancro (Cobos, 1989; Anagnostakis, 1995). La primera es una enfermedad de raíz causada por el hongo *Phytophthora cambivora* (Petri) Buissman y/o *Phytophthora cinnamoni* Rands. La segunda es una enfermedad que afecta a los troncos y ramas y cuyo agente causal es el hongo *Cryphonectria parasitica* (Murrill) M.E. Barr. El castaño también puede verse afectado por otras enfermedades entre las que destacamos la antracnosis o socarrina, que afecta a las hojas y está causada por el hongo *Mycosphaerella maculiformis* (Person) Schroet, o las podredumbres radicales ocasionadas por el

hongo *Armillaria mellea* (Vahl.) Kummer (Cobos, 1989; Mansilla *et al.*, 1999; García-Benavides y Monte, 2005).

1.3.- La enfermedad del chancro del castaño. Síntomas.

Como ya se ha comentado, el agente causal de la enfermedad del chancro es el hongo *Cryphonectria parasitica* (Murrill) M.E. Barr (Basionimos: *Diaporthe parasitica* Murrill, *Valsonectria parasitica* (Murrill) Rehm, *Endothia parasitica* (Murrill) P.J. Anderson & H.W. Anderson, y de *Endothia gyrosa* var. *parasitica* (Murrill) Clinton. Anamorfo: *Endotiella parasitica* Roane).

Su origen parece ser asiático (Fairchild, 1913; Shear y Stevens, 1913; 1916 cf. Gryzenhout *et al.*, 2009) y fue introducido a principios del siglo XX en los **Estados Unidos de América (EE.UU.)** con la importación de castaños asiáticos (Metcalf y Collins, 1909, cf. Anagnostakis, 2001). El hongo afectó muy seriamente al castaño americano y se convirtió en una devastadora enfermedad que desplazó a su huésped de su hábitat natural. Así, de ser una especie dominante, el castaño americano ha pasado a formar parte del sotobosque, en el que sobrevive gracias a la capacidad que tiene la especie de brotar de las raíces; los rebrotes vuelven a ser infectados por la enfermedad y casi nunca alcanzan la madurez (Anagnostakis, 2001).

En **Europa**, los primeros árboles infectados se observaron en 1938 en Italia (Biraghi, 1946, cf. Heiniger y Rigling, 1994). En este caso, el hongo ha podido tener dos rutas de introducción, desde Asia con la importación de castaños asiáticos, o bien con la importación de híbridos de castaño desde Estados Unidos (Heiniger y Rigling, 1994). La enfermedad está extendida desde Portugal hasta Turquía (Robin y Heiniger, 2001) pero, a diferencia de la situación en América del Norte, aquí los bosques están menos dañados y se cree que puede ser debido a dos causas, la primera es que el castaño europeo parece ser ligeramente menos sensible a la enfermedad que el americano y la segunda puede ser la presencia natural de un virus que parasita al hongo y reduce su virulencia (Gryzenhout *et al.*, 2009).

En la actualidad (Figura 4), la enfermedad se ha detectado en muchas de las áreas de distribución de las distintas especies de castaño por todo el hemisferio norte (Gryzenhout *et al.*, 2009).



Figura 4: Diferentes puntos donde se ha localizado el hongo *C. parasitica* a lo largo del hemisferio norte (Adaptado de Gryzenhout *et al.*, 2009).

En **España**, *C. parasitica* se detecta por primera vez en 1947 en Galdácano (Vizcaya), en una parcela de experimentación de castaños orientales, donde se vio que afectaba a algunos ejemplares aislados de castaño japonés y a un solo ejemplar de castaño común. Con anterioridad ya se había detectado la presencia de otras especies pertenecientes a lo que entonces se denominaba género *Endothia* (Elorrieta, 1949). Posteriormente, en 1972, se detectó sobre castaños híbridos en una parcela experimental en Bembibre (Vigo) y en 1978 se encontró la enfermedad sobre *Castanea sativa* en la localidad de Bembibre (Comarca del Bierzo, León). A partir de esas fechas se constata que la enfermedad presenta un alto nivel de infección en Navarra, País Vasco y Cataluña, importante en León y Asturias y se inicia con fuerza en Galicia (Ana-Magán, 1984).

En **Asturias**, además de la cita anterior, los primeros datos encontrados de la enfermedad son de 1982 (Figura 5), citándose cinco concejos infectados (Valdezate *et al.*, 2001). Esto coincide con lo descrito por Molina (1984) que localiza un ataque muy generalizado en las masas situadas en el alto Nalón. También Menéndez en 1984 hace referencia a los ataques del hongo en las masas de castaño asturianas.



Los **síntomas** que presentan los árboles afectados por chancro son la presencia de ramas (Figura 8a) y hojas secas (Figura 8b), que hacen fácilmente reconocibles los árboles afectados y que son consecuencia del estrangulamiento producido por uno o varios chancros situados por debajo. Las hojas secas no se desprenden en otoño y permanecen en la planta durante un tiempo más o menos prolongado. En la corteza de los árboles, además del chancro, se pueden observar coloraciones rojizas (Figuras 8c y 8f), hinchamientos y grietas longitudinales (Figura 8d), depresiones (Figura 8e), y pústulas anaranjadas (Figura 8g). En el interior de la corteza se puede observar el crecimiento del micelio en abanicos (Figura 8h). Por debajo del chancro se produce la proliferación de brotes epicórnico (Figura 8e), que son un intento de supervivencia de la planta como respuesta al estrangulamiento producido.

1.4.- El hongo: *Cryphonectria parasitica*.

El ciclo de vida (Figura 9) aparece descrito en los trabajos publicados por Marra y Milgroom (2001) y por Gryzenhout *et al.* (2009) de los cuales se hace un breve resumen a continuación.

C. parasitica se encuentra, la mayor parte del tiempo, en un estado multicelular haploide (n) que corresponde al conjunto de hifas. A partir de estas hifas se pueden desarrollar dos tipos de cuerpos de fructificación: conidióforos (fase asexual) y peritecios (fase sexual).

De los conidióforos (picnidios) se desprenden los conidios en forma de cirros, que se pueden dispersar por acción de la lluvia, los insectos, los pájaros y los mamíferos. Además, debido a que pueden sobrevivir en el suelo, también pueden ser arrastrados por el viento junto con partículas de polvo. Los conidios liberados llegan a un nuevo árbol, o a otra parte del mismo y, si se dan las condiciones necesarias para su desarrollo, causan una nueva infección. Funcionarían como órganos de propagación vegetativa dentro del ciclo de la reproducción asexual.

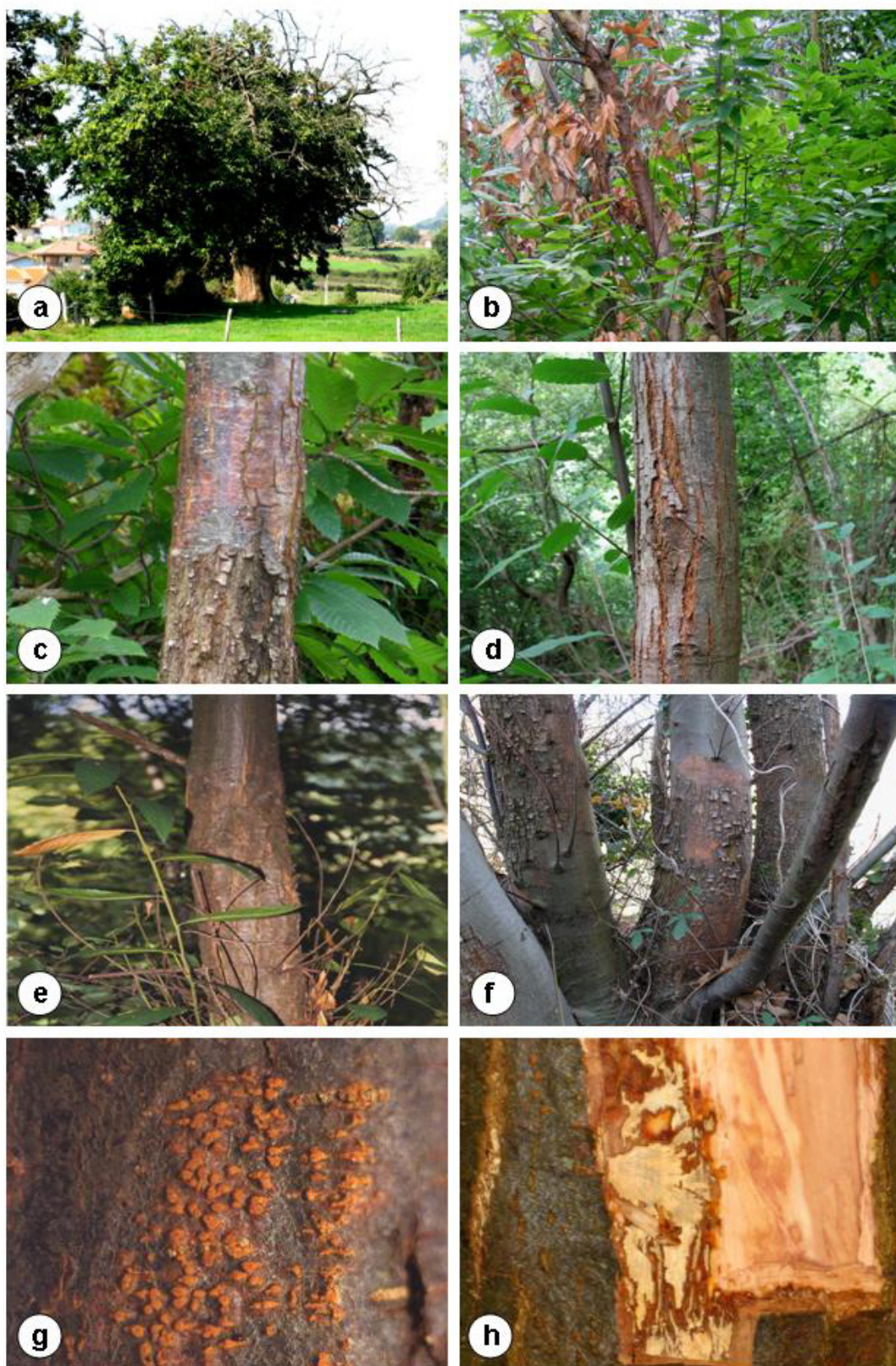


Figura 8: Síntomas de la enfermedad. a) Árbol con ramas secas. b) Hojas secas. c) Chancro en el que se observan coloraciones rojizas de la corteza. d) Engrosamiento y grietas longitudinales en la corteza. e) Chancro deprimido y proliferación de brotes epicórnico por debajo. f) Pies de una cepa infectados por la enfermedad. g) Pústulas anaranjadas en el exterior de la corteza. h) Micelio característico de *C. parasitica* en el interior de la corteza.

En el ciclo de reproducción sexual un conidio (n) actuaría como gameto masculino al fusionarse con una hifa receptiva (n), que sería la estructura reproductiva femenina, y formarían un dicarionte ($n+n$). Dentro del peritecio en desarrollo, este dicarionte sufre una serie de divisiones nucleares sincronizadas que dan lugar a un grupo, generalmente bastante numeroso, de hifas dicarioticas ($n+n$). Después de un proceso de cariogamia, estas hifas (ascas iniciales) se encuentran en una breve fase diploide ($2n$). Cada uno de estos núcleos diploides sufre una meiosis, a la que sigue una mitosis que da como resultado ocho ascosporas (n) por cada asca madura.

Estas ascosporas, forzadas a salir por el cuello del peritecio que sobresale de la superficie del chancro, son arrastradas por el viento y, al depositarse sobre un nuevo huésped, serán capaces de causar una nueva infección cuando se den las condiciones necesarias. Se completa así el ciclo de reproducción sexual del hongo.

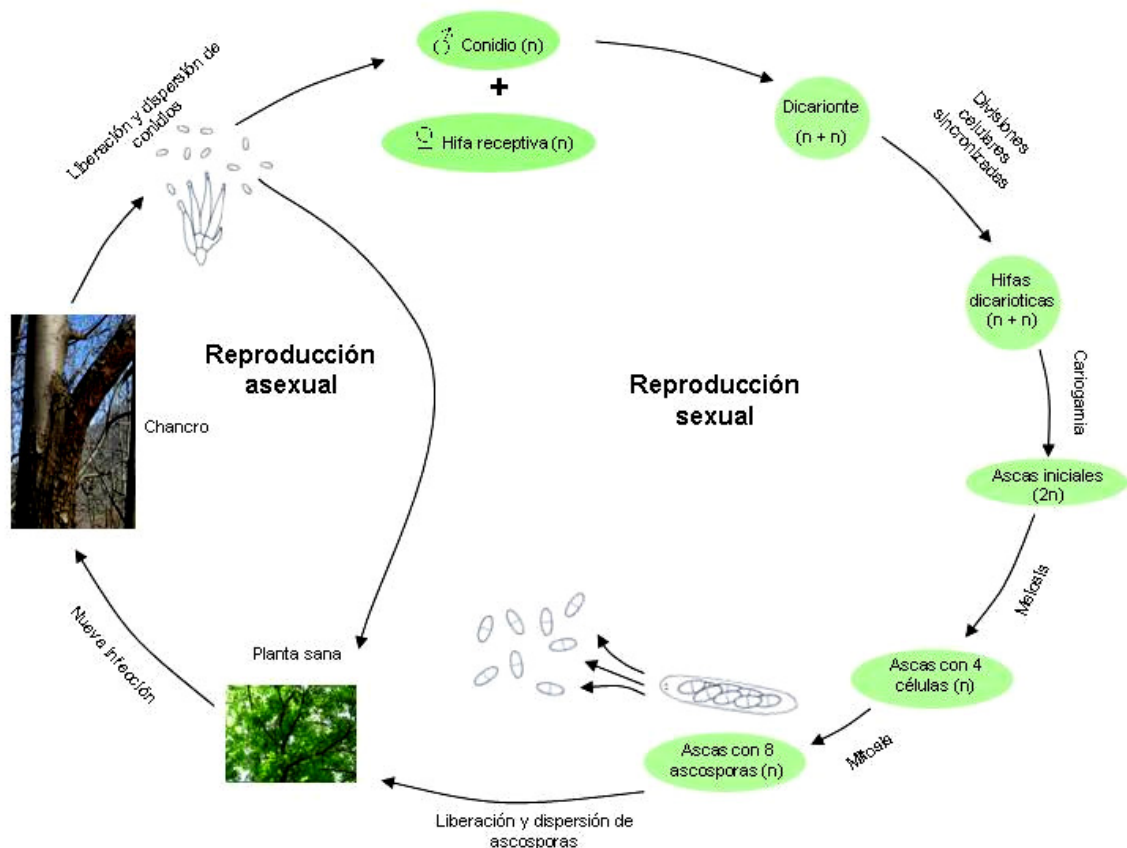


Figura 9: Ciclo de vida de *C. parasitica* (Los dibujos de los conidióforos, conidios, ascas y ascosporas se han tomado de Gryzenhout *et al.*, 2009).

El hongo, para poder infectar una planta, necesita tener una vía de entrada en la corteza ya sean heridas producidas por animales, roturas mecánicas, etc.

La fase asexual de los hongos ascomicetos filamentosos conlleva dos procesos muy relacionados que son el crecimiento y la fusión de hifas. El crecimiento de una hifa se produce por la extensión de su extremo y la ramificación. Durante este crecimiento las fusiones entre hifas se están llevando a cabo continuamente, proceso conocido como anastomosis, y da lugar a una red de hifas conectadas o micelio que es lo que forma un individuo (Glass *et al.*, 2000).

A veces, la anastomosis se puede llevar a cabo entre hifas de individuos diferentes, de manera que núcleos genéticamente diferentes pueden coexistir en un citoplasma común y formar lo que se conoce como un heterocarionte. Esto tiene beneficios potenciales, como el intercambio genético (ciclo parasexual) o la cooperación ante esfuerzos fisiológicos (Glass *et al.*, 2000). Sin embargo, hay un mecanismo genético que restringe la formación de heterocariontes, de manera que si los individuos difieren en uno o más loci de incompatibilidad vegetativa (vic, vegetative incompatibility), también llamados het loci (heterokaryon incompatibility) las células fusionadas se compartimentalizan y se produce la muerte por un proceso lítico (Glass *et al.*, 2000). A este fenómeno se le llama **incompatibilidad vegetativa** y es un proceso análogo al que se produce en la respuesta de hipersensibilidad en plantas (Glass *et al.*, 2000, Cortesi *et al.*, 2001). La incompatibilidad vegetativa les sirve a los hongos, entre otras cosas, para reducir el riesgo de transmisión de elementos citoplasmáticos infecciosos. Sin embargo, la barrera que supone este proceso no tiene una efectividad total y hay evidencias de transmisión, con baja frecuencia, de elementos genéticos entre individuos incompatibles (Friesse *et al.*, 1992, Cortesi *et al.*, 2001). Se dice que dos hongos pertenecen al mismo **grupo de compatibilidad vegetativa** (GCV) cuando al entrelazar sus hifas se produce la anastomosis hifal.

Las poblaciones de *C. parasitica*, al igual que sucede con otras especies de patógenos de plantas, presentan una marcada diferencia en cuanto a la diversidad y a la estructura en diferentes localizaciones (Sotirovski *et al.*, 2004). En concreto, la variación referida a los GCV tiene un gran interés debido a que se ha asociado con el

éxito de la transmisión del virus que, como se ha comentado anteriormente, reduce la virulencia del hongo (Anagnostakis *et al.*, 1986).

La reproducción sexual juega un papel muy importante en el ciclo de vida de los hongos, afectando tanto a su evolución como a la genética de poblaciones (Kronstad and Staben, 1997). La reproducción sexual está relacionada con los GCV debido a que la recombinación entre los genes de incompatibilidad vegetativa aumenta la diversidad de GCV (Sotirovski *et al.*, 2004). En muchos hongos, filamentosos y no filamentosos, el apareamiento específico y el desarrollo sexual están controlados por un sistema de regulación genético. El tipo sexual o *mating type* se puede definir como un fenotipo de compatibilidad sexual determinado genéticamente. Además, en términos de heteroalelismo o autoesterilidad, se puede definir el tipo sexual como un proceso en el que cada gameto debe venir de padres pertenecientes a tipos diferentes. En estos sistemas podemos encontrar implicado desde un único locus con dos alelos, hasta varios loci con muchas combinaciones de alelos. En los hongos homotálicos cada cepa es autofértil, de tal manera que en la reproducción pueden estar implicados dos núcleos idénticos. El término pseudohomotálico hace referencia a sistemas en los que las cepas son autofértiles, pero en los cuales los núcleos que se fusionan no son idénticos (Kronstad y Staben, 1997).

Todos los hongos ascomicetes heterotálicos, tienen un sistema de apareamiento o *mating system* en el que está implicado un único locus (*MAT*) con dos alelos (*MAT1-1* y *MAT1-2*), de tal forma que se limita la reproducción sexual a los cruces entre cepas que portan alelos opuestos (Kronstad y Staben, 1997). El sistema de apareamiento de *C. parasitica* tiene una característica que lo hace diferente de otros ascomicetos, pues es uno de los pocos hongos que muestra los dos sistemas de acoplamiento: autofertilidad (selfing) y autoesterilidad (outcrossing), de tal forma que aproximadamente el 25% de los peritecios en cada población son resultado de la autofertilidad (Milgroom *et al.*, 1993).

El sistema de apareamiento está implicado además en la fusión inicial de los talos (plasmogamia) y la subsiguiente fusión nuclear (cariogamia), y en otros procesos que no tienen que ver con el acoplamiento, tales como el dimorfismo sexual, dimorfismo de las ascosporas y, de alguna forma, en la incompatibilidad vegetativa

(Kronstad y Staben, 1997). En el proceso de acoplamiento de los hongos filamentosos hay evidencias de la producción de feromonas específicas. Así, por ejemplo, en *Neurospora crassa*, se ha visto que los gametos de un tipo sexual (masculinos) producen feromonas a las que los individuos del tipo sexual opuesto (hembras) responden orientando el crecimiento hacia la producción de hifas receptivas al acoplamiento (Kronstad y Staben, 1997).

El término idiomorfo se ha acuñado porque los alelos *MAT1-1* y *MAT1-2* tienen una longitud y secuencias de nucleótidos muy diferenciadas y codifican genes diferentes. El alelo *MAT1-1* codifica tres genes *MAT1-1-1*, *MAT1-1-2* y el *MAT1-1-3*. El alelo *MAT1-2* codifica un único gen, *MAT1-2-1* (McGuire *et al.*, 2001).

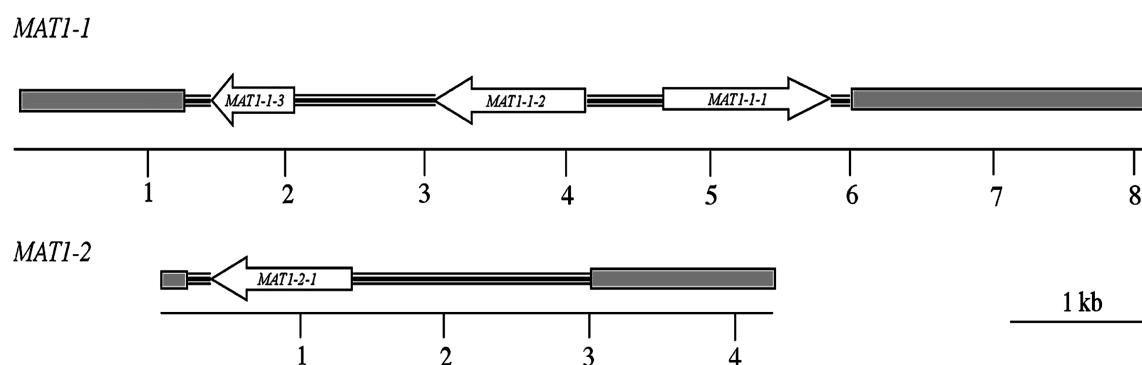


Figura 10: Organización del idiomorfo y regiones flanqueantes del locus *MAT* de *C. parasitica*. Las flechas representan ORFs dentro del idiomorfo e indican la dirección de la transcripción. Los tramos de tres líneas indican regiones no codificantes dentro del idiomorfo. Los tramos grises indican las secuencias de las regiones flanqueantes (Tomado de McGuire *et al.*, 2004).

En este trabajo se va a usar la nomenclatura propuesta por Turgeon y Yoder (2000), seguida también por otros autores (Marra y Milgroom, 2001, McGuire *et al.*, 2001) quienes sustituyen las designaciones formales *MAT1-1* y *MAT1-2* por *MAT-1* y *MAT-2*, respectivamente.

1.5.- Control de la enfermedad del chancro.

Después de la aparición de la enfermedad en EE.UU. se siguieron diferentes estrategias para su control. En un primer intento para prevenir su dispersión se podó el material infectado, se aplicaron diferentes productos fungicidas y se realizó la tala rasa de bosques enteros. Sin embargo, a pesar del esfuerzo realizado, no fue posible evitar ni

su dispersión, ni que se vieses afectados grandes árboles ni extensas áreas (Merkell, 1906; Newhouse, 1990 cf. Gryzenhout *et al.*, 2009).

A lo largo de los años se han realizado algunas pruebas de **control químico** de la enfermedad con diferentes productos fungicidas, aplicados siguiendo distintas estrategias. Todos estos productos mostraron un mayor o menor éxito en el control de la enfermedad pero, o bien han resultado ser poco efectivos para un tratamiento a largo plazo, o bien su aplicación resultaba ser poco práctica (Jaynes y Van Alfen, 1977; Anagnostakis, 1982, Canciani *et al.*, 1995; Aksoy y Serdar, 2004). Por otro lado, la tendencia actual es a reducir los tratamientos fitosanitarios y mucho más tratándose de bosques; en este sentido la Comunidad Económica Europea ha reducido la lista de materias activas autorizadas.

La escasa eficacia del control químico ha hecho que los esfuerzos se dirigieran hacia otros métodos o estrategias de control. Así, la búsqueda de **híbridos de castaño** resistentes se basa en los altos niveles de resistencia que las especies asiáticas, *C. crenata* y en especial *C. mollissima*, presentan frente a la enfermedad. Estas especies se incluyen en programas de retrocruzamiento con las especies *C. dentata* en EE.UU. y *C. sativa* en Europa, en los que la progenie resultante es sometida a pruebas de patogenicidad. Además, con el fin de reducir el tiempo necesario para realizar este trabajo e incrementar la eficiencia al seleccionar el material, se están utilizando marcadores moleculares. Aún así, resulta ser un proceso lento y, aunque a menudo se encuentran dentro de las progenies individuos con algún nivel de resistencia, no presentan otras cualidades, como la morfología deseada y, principalmente, el vigor necesario para asegurar su supervivencia en el bosque (Gryzenhout *et al.*, 2009).

Por estas razones la alternativa más atractiva al control de la enfermedad viene determinada por el fenómeno de la hipovirulencia, descubierto en el año 1951 cuando se observaron chancros de morfología diferente sobre unos árboles que parecían estar recuperándose (Biraghi, 1951 cf. Hillman y Suzuki, 2004). De este tipo de chancros, Grente aisló unas cepas del hongo atípicas (Grente, 1965 cf. Anagnostakis, 1995), que tenían color blanco, baja esporulación y crecimiento más lento que las aisladas de los chancros de árboles muertos (Hillman y Suzuki, 2004). A la espontánea cicatrización de los chancros causada por este tipo de cepas se le denominó **hipovirulencia** y a las

cepas que la causaban cepas hipovirulentas. En 1975 se comprobó serológicamente que las cepas hipovirulentas del hongo contenían un ARN de doble cadena (dsARN) que no aparecía en las cepas virulentas (Moffitt y Lister, 1975) y, más tarde, esto se corroboró por métodos moleculares (Day *et al.*, 1977).

Las siguientes observaciones abrieron el campo de la utilización de este hecho en la lucha biológica contra la enfermedad (Anagnostakis y Day, 1979):

- Las características de las cepas hipovirulentas se podían transmitir a las cepas virulentas del hongo (conversión).
- Si esta transmisión se producía en un árbol afectado, el chancro detenía su desarrollo y el tejido cicatrizaba.
- Este chancro podría servir, a su vez, como fuente de inóculo hipovirulento (autosostenibilidad).

Más adelante, se vio que estos dsARN eran virus que se encontraban en el citoplasma parasitando al hongo y fueron clasificados por Hillman *et al.* en 1995 dentro de la familia *Hypoviridae* (Hilman y Suzuki, 2004).

Del análisis de diferentes aislados de *C. parasitica* provenientes de Europa, EE.UU. y Asia, se han podido aislar hasta cuatro hipovirus, denominados como CHV-1 a 4, siguiendo el orden cronológico de la caracterización completa de su secuencia y la determinación de que representan especies individuales. En la figura 11 se presenta un esquema de la organización genómica de estas cuatro especies.

El CHV-1 se ha asociado a la hipovirulencia en Europa e influye en diferentes aspectos del hongo, además de la ya mencionada menor virulencia. Así, las cepas infectadas por este virus ven afectada su morfología y presentan una coloración blanquecina y una reducida esporulación (Milgroom y Cortesi, 2004). También se ven reducidas la acumulación de oxalato y la producción del enzima lacasa (Rigling *et al.*, 1989).

El CHV-2 aparece de forma natural en EE.UU. y también se ha encontrado en algunos aislamientos de China. Las cepas portadoras de este virus difieren de las anteriores en que tienen una coloración marrón, un micelio más fino y de crecimiento

más lento, y se muestran muy débiles al inocularlas sobre ramas de castaño (Hillman y Suzuki, 2004).

Los virus CHV-3 y CHV-4 se encontraron solamente en EE.UU. Las cepas portadoras del CHV-3 también tienen características diferenciales, como la presencia de márgenes lobulados y no presentan reducción en la pigmentación, en la esporulación, ni en la actividad del enzima lacasa (Hillman y Suzuki, 2004). Las cepas que portan el CHV-4 presentan características semejantes a las virulentas, e incluso en varios trabajos se recoge que este virus no afecta a la virulencia del hongo (Enebak *et al.*, 1994, Liu *et al.*, 2002).

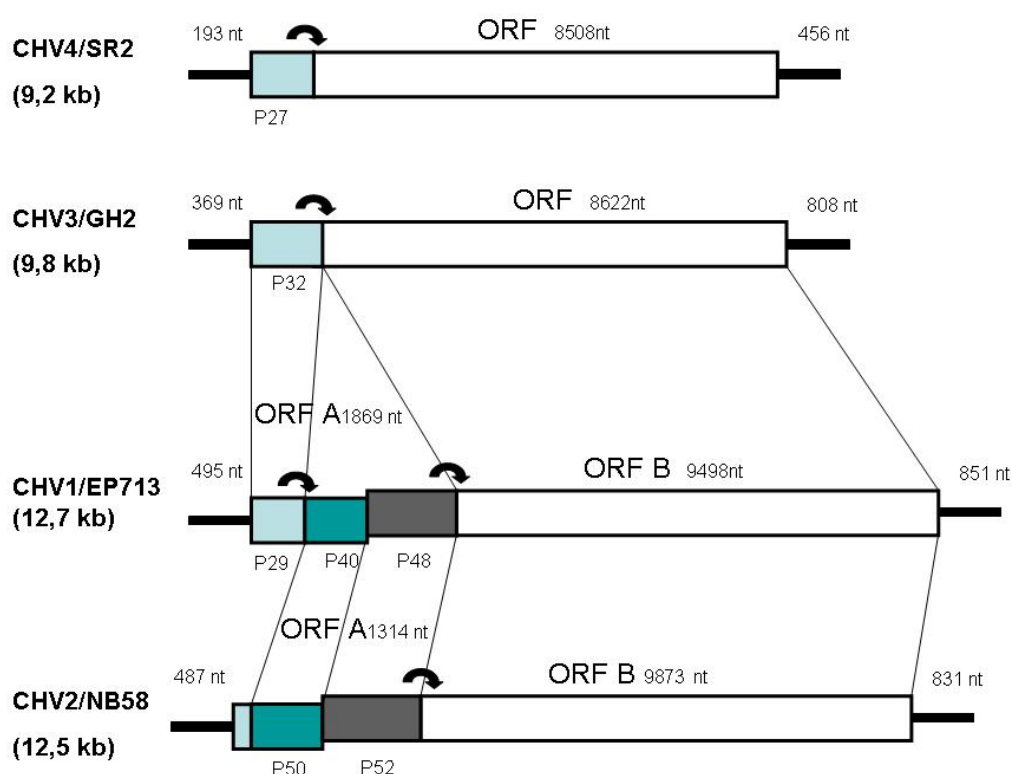


Figura 11: Diagrama esquemático de la organización genómica de las cuatro especies de la familia Hypoviridae. En la zona central se representa la región codificante y se destacan las diferencias en el ORF A. nt = nucleótidos (Adaptado de Hillman y Suzuki, 2004).

La transferencia de los virus, de una cepa infectada a otra libre, puede ser horizontal mediante anastomosis hifal, o vertical, a través de los conidios (Nuss, 1996). En Europa, la hipovirulencia ha resultado ser un método de control sostenible (Anagnostakis, 1995) debido principalmente a la dispersión natural del virus y, en

algunas zonas, también por el tratamiento realizado a los chancros con cepas hipovirulentas. Sin embargo, en EE.UU. no ha tenido tanto éxito como medio de biocontrol, puesto que el virus no se ha dispersado tan fácilmente debido a la barrera que supone la incompatibilidad vegetativa, ya que el número de GCV presentes en EE.UU. es mayor que en Europa (Nuss, 1992),

La síntesis de copias de ARN del virus CHV-1 supondría una solución a los problemas de dispersión del hongo, ya que estas copias se pueden transmitir, además, a través de las ascosporas. Los ensayos de campo, sin embargo, han mostrado que, aunque estos virus son capaces de sobrevivir en el campo, no compiten bien con las cepas virulentas del hongo (Anagnostakis, 1998).

Hay que tener en cuenta, también, que una correcta gestión del bosque y unas buenas prácticas silvícolas son necesarias para asegurar el éxito, a largo plazo, de cualquier medida de control (Griffin, 1986). Prácticas como el aclareo y poda del material infectado, así como su posterior retirada, reducen la cantidad de inóculo y favorecen el crecimiento de los árboles supervivientes. Si, además, se dejan en el campo los árboles con chancros hipovirulentos, se incrementarán los niveles de inóculo de este tipo de cepas (Turchetti, 1982).

1.6.- Caracterización fenotípica, genotípica y patogénica.

Como se ha mencionado anteriormente, se han descrito **diferentes fenotipos** de las cepas de *C. parasitica*, en algunos casos asociados a la presencia de los hipovirus (Robin *et al.*, 2000; Gómez, 2004), por lo que el estudio de las características del hongo es relevante no sólo de cara a su identificación sino también a la selección de posibles cepas hipovirulentas.

En cuanto a la caracterización genotípica, en los últimos años se ha venido produciendo un aumento del número de **técnicas moleculares** empleadas, tanto en la identificación de hongos fitopatógenos, como en la diferenciación inter e intraespecie. Estas técnicas ofrecen resultados fiables y, generalmente, más rápidos que las pruebas basadas en características morfológicas, y constituyen un apoyo a las técnicas clásicas de identificación. Entre las técnicas más utilizadas para identificar hongos se encuentra

el estudio de genes ribosomales. Los genes ribosomales de eucariotas están organizados en repeticiones en tándem, cada una de las cuales incluye las secuencias de los genes 18S, 5,8S y 28S y dos regiones intergénicas ITS1 e ITS2 (Internal Transcribed Spacers). Entre cada una de las repeticiones se encuentra un espaciador intergénico (IGS, Intergenic Spacer). La secuencia de los genes ribosomales está muy conservada en toda la escala evolutiva, mientras que las regiones ITS y el IGS, por su parte, han evolucionado de manera más rápida. El estudio de unas y otras secuencias permite que se puedan utilizar en clasificación y, ocasionalmente, en tipificación (White *et al.*, 1990). En recientes trabajos aparecen datos filogenéticos que incluyen todos los taxones conocidos de la familia *Cryphonectriaceae* (Gryzenhout *et al.*, 2009).

Además, hay numerosos marcadores moleculares que facilitan la tipificación o el genotipado de las poblaciones de patógenos. La técnica RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) consiste en la amplificación arbitraria de secuencias de ADN polimórficas de las que se desconoce su función (Williams *et al.*, 1990). En esta técnica se emplea un único oligonucleótido con secuencias arbitrarias (Welsh y McClelland, 1990), y en su diseño se siguen los criterios referentes a su composición y longitud. Así, el contenido guanina y citosina (G+C) ha de ser, como mínimo, del 40% y la longitud de, al menos, nueve bases, para que se puedan generar niveles detectables de productos de amplificación (Williams *et al.*, 1990). El perfil de bandas resultante se utiliza como base para la tipificación de las cepas y constituye un RAPD-tipo (Williams *et al.*, 1990). Esta técnica ha sido empleada para caracterizar y estimar la diversidad genética de distintas poblaciones de *C. parasitica* (Wronski *et al.*, 1997, Yan *et al.*, 2007).

Los SSR (Simple Sequence Repeats), también conocidos como microsatélites, son loci que poseen una alta tasa de mutación (polimórficos) y se encuentran en zonas no codificantes del ADN nuclear. Son repeticiones de uno a seis nucleótidos que se repiten en tándem. En el estudio de poblaciones, este tipo de marcador molecular permite obtener el genotipo de cada individuo para cada locus analizado (genotipado). Esta técnica se ha usado en recientes trabajos para caracterizar morfológicamente diferentes poblaciones de *C. parasitica* (Davis *et al.*, 2005, Breuillin *et al.*, 2006).

Por último, medir la **virulencia de los patógenos** forestales sobre sus huéspedes es más complicado que hacerlo en aquellos que afectan a plantas anuales o herbáceas, no sólo por razones de espacio, sino también por el tiempo necesario para su desarrollo. Debido a esto, se han desarrollado diferentes métodos alternativos, que en el caso de *C. parasitica* consisten en la inoculación de ramas de castaño en parada vegetativa (Jaynes y Elliston, 1980), el ensayo sobre corteza de castaño (Lee *et al.*, 1992) y la inoculación sobre otros huéspedes tales como manzana de la variedad golden (Fulbright, 1984).

En el estudio de este hongo se han desarrollado también métodos indirectos para comparar la virulencia de los aislamientos, como es la medida de la actividad extracelular del enzima lacasa (Chung *et al.*, 2008), ya que las cepas hipovirulentas del hongo (infectadas por el CHV-1), tienen disminuida la síntesis de este enzima debido a la no acumulación del mRNA del enzima (Thurston, 1994).

El enzima lacasa se describió por primera vez en los exudados de la especie arbórea *Rhus vernicifera* (Yoshida, 1883 cf. Thurston, 1994). Posteriormente, se encontró que también era producido por diferentes especies de hongos, bacterias e insectos (Dean y Erikson, 1994). Este enzima es una polifenol oxidasa y pertenece al grupo de enzimas llamado “large blue copper proteins” (Thurston, 1994). En los hongos, este enzima parece estar implicado en diferentes procesos fisiológicos que se pueden agrupar en tres principales procesos biológicos:

- Metabolismo de la lignina, como parte del proceso de degradación de tejidos.
- Morfogénesis, como por ejemplo en la formación de determinados pigmentos, en la formación de los rizomorfos y en el desarrollo del cuerpo de fructificación.
- Reacciones de defensa, que se pueden considerar como un mecanismo de protección frente a los procesos oxidativos y de detoxificación de los compuestos fenólicos perjudiciales que se producen dentro del huésped (Chung, *et al.*, 2008).

El interés de este enzima, en el caso del chancro, radica, pues, en que puede ser útil como método para identificar cepas del hongo infectadas por CHV-1.

1.7.- Planteamiento y Objetivos.

Debido a la importancia socio-económica del castaño en Asturias y a la gravedad de la enfermedad y a su rápida extensión en nuestros castaños, se planteó abrir una línea de investigación sobre la enfermedad con vistas a conocer la situación actual y poder realizar actuaciones para mejorarla.

El trabajo se planteó en base a los siguientes objetivos:

1.- Determinar la situación actual de la enfermedad en los castaños del Principado de Asturias y establecer una colección de trabajo, con cepas del hongo *Cryphonectria parasitica*, representativa de la realidad asturiana.

2.- Conocer la variabilidad del hongo referida a los grupos de compatibilidad vegetativa, ya que es el primer condicionante de la propagación de la hipovirulencia, y el potencial incremento de esa variabilidad, que se podría producir debido a la recombinación genética causada por la reproducción sexual, determinando la presencia de los genes *MAT*.

3.- Caracterizar morfológicamente los aislamientos de dicha colección de trabajo, como primer paso en la detección de cepas hipovirulentas del hongo complementándolo con una caracterización patogénica de los aislamientos de la colección de trabajo.

4.- Aplicar técnicas moleculares al estudio de los aislamientos de la colección.

5.- Estudiar la eficacia de una posible alternativa química para el control de la enfermedad con el objetivo de ser aplicada en situaciones puntuales tales como la producción de planta en viveros o el tratamiento de árboles singulares.

Estos objetivos, planteados en el marco temporal de duración de una tesis doctoral, abren un campo de trabajo en el que el objetivo último sería, además de aumentar el conocimiento de la enfermedad, poder realizar tratamientos que mejoren la situación de los bosques de castaño asturianos.

2.- MATERIALES Y MÉTODOS

2.1.- Cepas.

En este trabajo se han utilizado 778 aislamientos del hongo:

- 610, correspondientes a 69 concejos, obtenidos en el presente trabajo, que se codificaron como LFPAH-nº cepa (Laboratorio de Fitopatología Principado de Asturias Hongos).
- 25, correspondientes a nueve concejos, cedidos por el Laboratorio de Sanidad Vegetal del Principado de Asturias.
- 111, correspondientes al concejo de Aller, cedidos por el Programa Forestal del SERIDA.

En la Figura 12, se muestra la distribución, por concejos, de las cepas cedidas que se han utilizado en este trabajo.

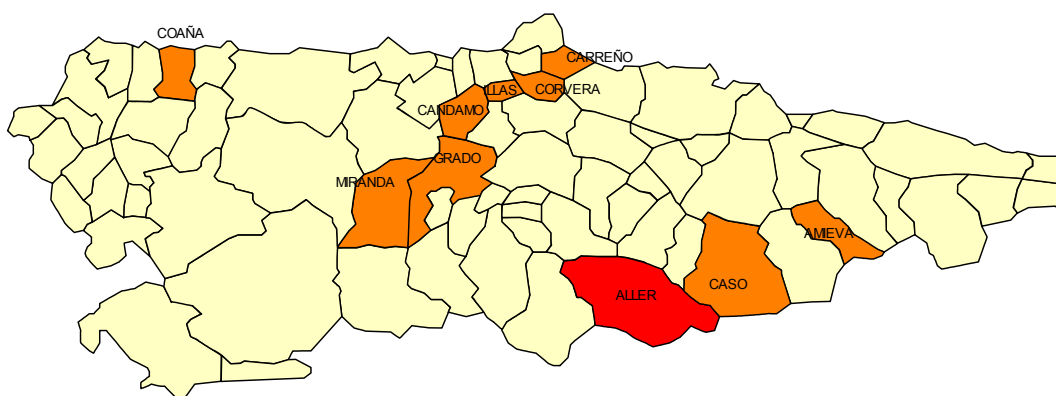


Figura 12: Concejos asturianos de los que se tienen cepas obtenidas en trabajos anteriores. En naranja, concejos de los que se conservaban cepas del hongo cedidas por Sanidad Vegetal (Valdezate *et al.*, 2001); en rojo, concejo de Aller, muestreado por González (2004).

Como Cepas control se han utilizado:

- Cuatro cepas de *C. parasitica* de origen americano (ATCC52571, CCP19, CCP47 y CCP52), cedidas por el Laboratorio de Sanidad Vegetal del Principado de Asturias.
- 64 aislamientos que forman los grupos de compatibilidad vegetativa tipo europeos (Cortesi y Milgroom, 1988), cedidos por los Drs. Cortesi y Milgroom.

- Cepas de referencia pertenecientes a la familia *Cryphonectriaceae* (Tabla 1), adquiridas en dos colecciones de cultivo europeas (CABI Bioscience, Reino Unido y Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS), Países Bajos).

Tabla 1: Aislamientos de la familia *Cryphonectriaceae* adquiridos durante la realización del presente trabajo.

ESPECIE	BASIONIMO	COLECCIÓN	Código
<i>Cryphonectria gyrosa</i> (Berk & Broome) Sacc.		CABI	¹ IMI 281618
<i>Chrysosporthe cubensis</i> (Bruner) Gryzenhout & Wingfield	<i>Cryphonectria cubensis</i>	CBS	¹ CBS101281 ^{1,2} CBS505.63
<i>Cryphonectria nitschkei</i> (G.H. Otth) M.E.Barr		CBS	¹ CBS109776
<i>Cryphonectria radicalis</i> M.E.Barr		CBS	¹ CBS112917
<i>Cryphonectria macrospora</i> (Kobayashi & Kaz. Itô) M.E.Barr		CBS	¹ CBS109764
<i>Cryphonectria parasitica</i> (Murrill) M.E.Barr		CBS	¹ CBS114.13

¹Cepas utilizadas para el ensayo de RAPD.

²Adquirida como *Cryphonectria havanensis*.

2.2.- Medios de cultivo.

- Agar de patata dextrosa, **APD** (Gams *et al.*, 1998): Se cocieron durante 20 minutos 200g de patatas peladas, el caldo de cocción se filtró a través de una tela de muselina, y se añadió agua destilada hasta completar un litro. A este caldo se le añadieron 20 g de glucosa y 16 g de agar. Se esterilizó en autoclave (20 min. a 120°C) y se dispensó en placas de petri estériles a razón de 15 ml por placa, en una cabina de flujo laminar.
- Caldo de patata dextrosa, **CPD**: Se siguió el mismo procedimiento descrito para el APD, pero en este caso no se añadió agar.
- Agar de patata dextrosa acidificado, **APDa**: Se preparó añadiendo al APD estéril 2 ml/l de ácido láctico.

- Agar de patata dextrosa enriquecido con metionina y biotina, **APDmb** (Anagnostakis, 1984): APD al que se añadió antes del autoclavado 0,1 g/l de metionina y 0,001 g/l de biotina.
- Agar de patata dextrosa y verde de bromocresol, **APDbr** (Powell, 1995): APDmb al que se añadió antes del autoclavado 0,05 g/l de verde de bromocresol.
- **Medio de Bavendamm** con modificaciones (Ju *et al.*, 2002): Se prepararon y esterilizaron por separado (20 minutos a 120°C): 200 ml de ácido tánico al 0,7%, pH 4,5 y 800 ml de extracto de malta al 1,5% con agar al 2%. Se mezclaron en condiciones de asepsia, en cabina de flujo laminar, y se dispensaron 15 ml en cada placa de petri.

Todos los medios se conservaron a una temperatura de 4°C hasta su uso.

2.3.- Iniciadores.

En diferentes apartados de este trabajo se han utilizado los iniciadores que se recogen en la Tabla 2, suministrados por Roche (Roche Diagnostics S.L., España).

Tabla 2: Descripción de los iniciadores utilizados en este trabajo.

INICIADOR	SECUENCIA: 5'→ 3'	REFERENCIA
S ^(a)	TCA CGA TGC A	Williams <i>et al.</i> , 1990
A ^(a)	AGC AGC GCC TCA	Miyata <i>et al.</i> , 1995
OPB-6 ^(a)	TGC TCT GCC C	Lin <i>et al.</i> , 1996
OPS-19 ^(a)	GAG TCA GCA G	Laconcha <i>et al.</i> , 1998
ERIC-2 ^(a)	AAG TAA GTG ACT GGG GTG AGC G	Versalovic <i>et al.</i> , 1991
SER-6 ^(a)	GAA ACA GCG G	Anónimo, 2005
SER-8 ^(a)	GGA GCC CAC	Anónimo, 2005
SER-14 ^(a)	GCC GTC TAC G	Anónimo, 2005
SER-17 ^(a)	GGC ATC GGC C	Anónimo, 2005
SER-21 ^(a)	GTG AGC GTC	Anónimo, 2005
OPR-01 ^(a)	TGC GGG TCC T	Gwo-Fang <i>et al.</i> , 1995
OPA-04 ^(a)	AAT CGG GCT G	Gwo-Fang <i>et al.</i> , 1995
OPB-10 ^(a)	CTG CTG GGA C	Gwo-Fang <i>et al.</i> , 1995
M1-GS1n ^(b)	GATGACAACGACGTCAAGAATCAGAGTG	McGuire <i>et al.</i> , 2004

Continuación Tabla 2.

INICIADOR	SECUENCIA: 5' → 3'	REFERENCIA
M1-GS3-rev ^(b)	CAGATGTCAACGGCCTTCAGGCCAGGA	McGuire <i>et al.</i> , 2004
M2-GS3 ^(b)	TTCAACCTGTCCAAGACTGTAGCCTTCG	McGuire <i>et al.</i> , 2004
gs1-d-I ^(b)	CTCCCGATGGATTGGGGAAGATAATGGGC	McGuire <i>et al.</i> , 2004
I07-650 (Fw) ^(c)	⁽¹⁾ CATGCGAGAAATGCAGGAGTGTG	Davis <i>et al.</i> , 2005
I07-650 (Rv) ^(c)	GGGCTCCAGGATATCGAAGACATT	Davis <i>et al.</i> , 2005
CPE1(Fw) ^(c)	⁽¹⁾ GTCTCACCACACATCGCAAG	Breuillin <i>et al.</i> , 2006
CPE1(Rv) ^(c)	TCATCAGCAGAAAAGAAGACG	Breuillin <i>et al.</i> , 2006
CPE3(Fw) ^(c)	⁽¹⁾ CAACTCGTCACCCACCTTG	Breuillin <i>et al.</i> , 2006
CPE3(Rv) ^(c)	ATAGGCATTCTCCGCTCTTG	Breuillin <i>et al.</i> , 2006
CPE4(Fw) ^(c)	⁽¹⁾ ACCTGAACCGACCTGGCTTTG	Breuillin <i>et al.</i> , 2006
CPE4(Rv) ^(c)	CCTTGTTGTGGTGGTGGAG	Breuillin <i>et al.</i> , 2006
CPE5(Fw) ^(c)	⁽¹⁾ TGTCAACAACGGTCAACACC	Breuillin <i>et al.</i> , 2006
CPE5(Rv) ^(c)	CGGAGAGGAGAACTCTGAGAC	Breuillin <i>et al.</i> , 2006
CPE8(Fw) ^(c)	⁽¹⁾ GCGAGCAAGCGTGATTCC	Breuillin <i>et al.</i> , 2006
CPE8(Rv) ^(c)	GCTCGTCCTGGTCCTCCT	Breuillin <i>et al.</i> , 2006
CPG3(Fw) ^(c)	⁽¹⁾ CGTAAGGCAGAGGCAGAGAC	Breuillin <i>et al.</i> , 2006
CPG3(Rv) ^(c)	TCCCTATGCCAAGACACTC	Breuillin <i>et al.</i> , 2006
CPG4(Fw) ^(c)	⁽¹⁾ ATGCTCCGAAGTTTGTAC	Breuillin <i>et al.</i> , 2006
CPG4(Rv) ^(c)	CAACCGCAATCTGTTTCCTC	Breuillin <i>et al.</i> , 2006
CPG6(Fw) ^(c)	⁽¹⁾ ATCATCAGCAGCAATGGTA	Kubisiak <i>et al.</i> , 2007
CPG6(Rv) ^(c)	TCCGGGCATTACGAMAT	Kubisiak <i>et al.</i> , 2007
CPG7(Fw) ^(c)	⁽¹⁾ GGGCATGACAACTGAGAAGG	Kubisiak <i>et al.</i> , 2007
CPG7(Rv) ^(c)	⁽²⁾ GCTGTCGTCTCTCGATCAC	Kubisiak <i>et al.</i> , 2007
CPG14(Fw) ^(c)	⁽¹⁾ TTCTGAAGGTGGTTGTGGTG	Kubisiak <i>et al.</i> , 2007
CPG14(Rv) ^(c)	GGTCCGAACCATCAAAAGAC	Kubisiak <i>et al.</i> , 2007
CpSI006(Fw) ^(c)	⁽¹⁾ ATGTCGAGTTTACCCGATGG	Kubisiak <i>et al.</i> , 2007
CpSI006(Rv) ^(c)	⁽²⁾ GAGATGTGTGGAATGCAACG	Kubisiak <i>et al.</i> , 2007
CpSI009(Fw) ^(c)	⁽¹⁾ ATCATCCATCCTGTCCGAGT	Kubisiak <i>et al.</i> , 2007
CpSI009(Rv) ^(c)	⁽²⁾ TGGGGTTGGCATAATCTTCT	Kubisiak <i>et al.</i> , 2007
CpSI032(Fw) ^(c)	⁽¹⁾ GCCAGCACTTGTTACGACAG	Kubisiak <i>et al.</i> , 2007
CpSI032(Rv) ^(c)	⁽²⁾ CGGAGCAGACATCAGGTTCT	Kubisiak <i>et al.</i> , 2007
CpSI054(Fw) ^(c)	⁽¹⁾ CTTGATAAACGAGGGCCAAG	Kubisiak <i>et al.</i> , 2007
CpSI054(Rv) ^(c)	⁽²⁾ GAAGGTGACGTTTTGCCAGT	Kubisiak <i>et al.</i> , 2007
CpSI072(Fw) ^(c)	⁽¹⁾ CTACGACCGAGAGTTGAGG	Kubisiak <i>et al.</i> , 2007
CpSI072(Rv) ^(c)	⁽²⁾ GTCATCCCAGTACAGCAGCA	Kubisiak <i>et al.</i> , 2007

^(a) Iniciadores utilizados para la aplicación de la técnica RAPD.

^(b) Iniciadores utilizados para la amplificación de los idiomorfos MAT-1 y MAT-2.

^(c) Iniciadores utilizados para la aplicación de la técnica SSR. En este caso el nombre se corresponde con el locus amplificado.

⁽¹⁾ Iniciadores que llevan la secuencia M-13.

⁽²⁾ Iniciadores que llevan la secuencia Pig-tail.

2.4.- Materias activas utilizadas en los ensayos de fitosanitarios.

En los ensayos realizados *in vitro* e *in vivo* se utilizaron los productos fitosanitarios que aparecen recogidos en la Tabla 3.

Tabla 3: Materias activas utilizadas en los ensayos de productos fitosanitarios.

MATERIA ACTIVA	NOMBRE COMERCIAL	DISTRIBUIDOR
Carbendazima (20%) + Flutriafol (9,4%) p/v SC	Impact-R	Agrodan, Madrid
Captan (85%) WP	Agrocapt 85	Industrial Química Key, Lérida
Epoxiconazol (12,5%) p/v SC	Lovit	Basf Española, Barcelona
Azoxystrobin (25%) SC	Quadris	Zeneca Agro, Madrid
Ofurace (6%) + Folpet (32%) + Cimoxanilo (3%) WP	Caltan P	Zeneca Agro, Madrid
Flusilazol (0,5%) + Carbendazima (1%) p/v SE	Escudo	DuPont Ibérica, Barcelona
⁽¹⁾ Carbendazima (50%) p/v SC	Bavistin FL	Basf Española, Barcelona

⁽¹⁾Materia activa usada solamente en el ensayo in vivo

2.5.- Invernadero.

Para realizar el ensayo *in vivo* se acondicionó un invernadero en el que se alojaron las plantas de castaño en contenedores. Para ello se utilizó la estructura tubular de uno de los invernaderos tipo mini-capilla de los que dispone el SERIDA, cuyas medidas son 40 m de largo, 4 m de ancho y 3 m de altura cenital. Para la cubierta se utilizó malla anti-pulgón (densidad: 134 g/m², luz: 375 micras) y en el suelo se colocó una malla anti-hierba (densidad: 150 g/cm²). Se instaló un sistema de riego localizado con dos sectores y goteros autocompensantes (Netafím 8 l/h) con dos piquetas (Figura 13).



Figura 13: Ensayo de fitosanitarios *in vivo*. a) Disposición de las macetas dentro del invernadero. b) Detalle de las piquetas del sistema de riego.

2.6. Plantas de castaño.

Para la realización del ensayo de fitosanitarios *in vivo*, se utilizaron 126 plantas de castaño de dos años de edad y 112 plantas de un año de edad, cedidas por el Programa Forestal del SERIDA.

Estas plantas se transplantaron a contenedores de siete litros de volumen. El sustrato utilizado fue turba rubia (Turba rubia media + 25% de fibra de coco), a la que se añadió un abono de liberación lenta (Osmocote Exact 12/14 meses) siguiendo las dosis propuestas por el fabricante.

2.7.- Muestreo.

El muestreo se llevó a cabo entre los años 2005-2007 y, debido a la distribución de los castaños en Asturias, se utilizó como unidad de muestreo el concejo, a pesar de ser un término administrativo.

Para cubrir los 78 concejos, que forman el Principado de Asturias, se diseñaron una serie de rutas, cada una de las cuales tenía una serie de puntos de muestreo que correspondían con: masas de castaño de aprovechamiento forestal (Figura 14a), rodales de castaños asociados a praderas (Figura 14b), árboles aislados en los bordes de las carreteras (Figura 14c), grupos de árboles que forman linderos de fincas (Figura 14d) o bordes de caminos (Figura 14e), árboles que forman sotos de castaño para el aprovechamiento del fruto (Figura 14f) y árboles singulares situados en zonas urbanas (Figura 14g). Todos los aislamientos pertenecientes a un mismo punto de muestreo se agruparon para formar una subpoblación y posteriormente todas las subpoblaciones de un mismo concejo se agruparon para formar una población.

En cada punto de muestreo se anotó el aspecto general; sano, cuando no se encontró ningún chancro; afectado, cuando se encontró al menos un chancro; muy afectado, cuando se observaron varios chancros. A los puntos de muestreo se les asignó el nombre del pueblo más cercano y, cuando fue posible, se anotaron sus coordenadas usando un GPS (Meridian Gold, Magellan, EE.UU.). Además, la información de campo se completó con una amplia colección de fotografías.

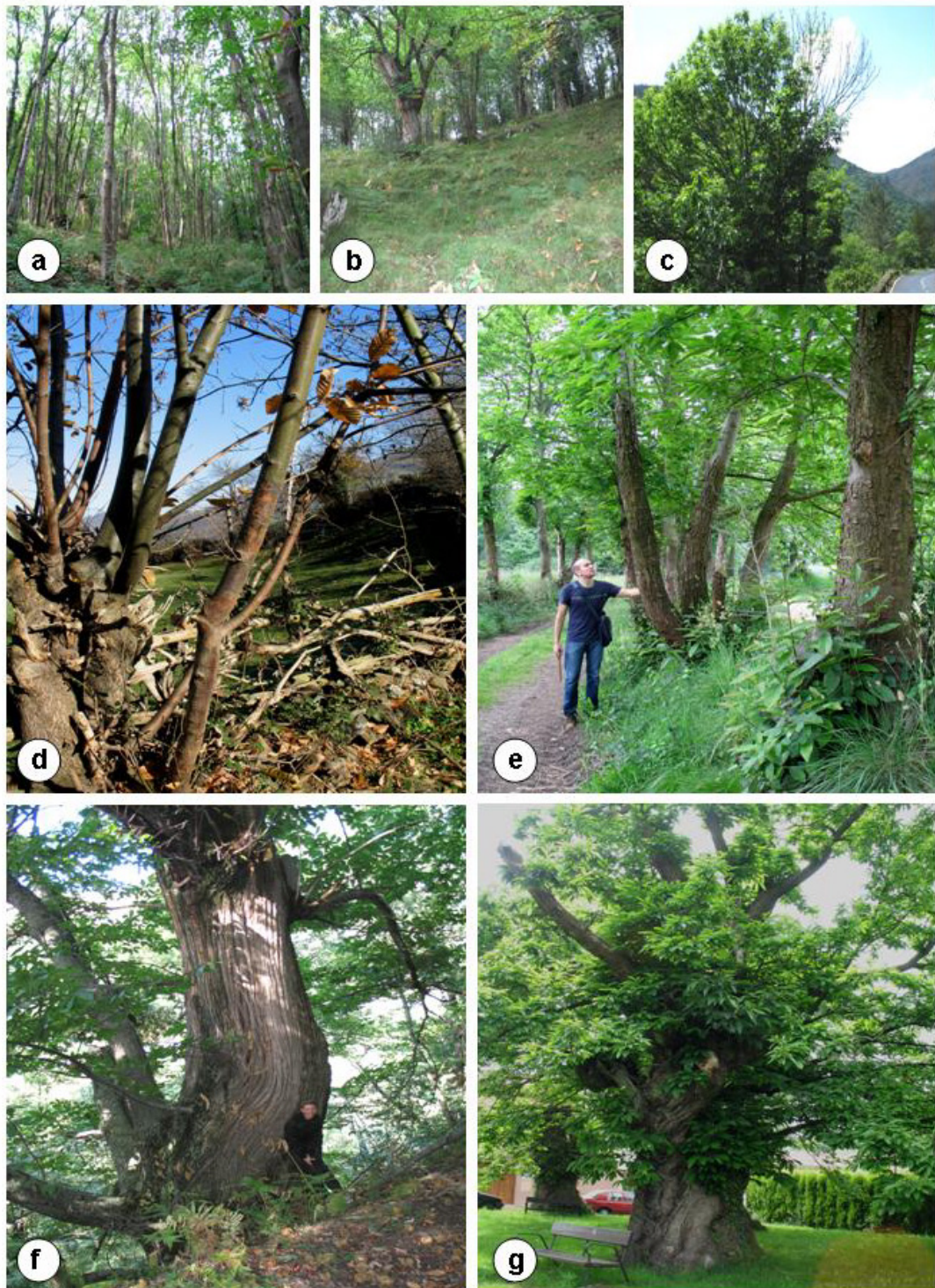


Figura 14: Castaños en el Principado de Asturias. a) Aspecto de una típica masa de castaño de aprovechamiento forestal. b) Rodal de castaños asociado a praderas. c) Árbol aislado al borde de una carretera. d) Árboles que forman parte de los linderos de fincas. e) Árboles en los bordes de caminos. f) Árbol centenario en un soto de castaños para aprovechamiento de fruto. g) Árbol singular en un parque asturiano.

En cada punto de muestreo, se localizó un castaño que presentase los síntomas típicos de la enfermedad, es decir, coloraciones rojizas y grietas longitudinales en la corteza, pústulas naranja-amarillentas en el exterior de la corteza y el chancro propiamente dicho. Con ayuda de un pequeño hacha, desinfectada con hipoclorito sódico al 10%, se recogió un trozo de corteza del borde de la lesión de aproximadamente cinco centímetros de lado. Se tomó una sola muestra por chancro y árbol para evitar en lo posible el muestreo de clones (Milgroom *et al.*, 1993; Milgroom y Lipari, 1995). Las muestras se guardaron en una bolsa de plástico debidamente codificada.

Para tomar las muestras se tuvo en cuenta que el micelio de *C. parasitica* forma, por debajo de la corteza de los árboles infectados, unos abanicos característicos que no se conocen para otras especies y que facilitan su identificación (Gryzenhout, *et al.*, 2009).

Las siguientes muestras tomadas en un mismo punto de muestreo se tomaron a una distancia de, al menos, diez metros de la anterior para evitar obtener en lo posible aislamientos homotáticos. (Robin *et al.*, 2000, Homs *et al.*, 2001). El número de muestras recogidas en cada punto de muestreo varió en función del grado de afectación (datos no mostrados) y nunca superaron las diez muestras. Las muestras se mantuvieron a temperatura ambiente hasta su procesamiento en el laboratorio.

Además, con el fin de detectar cepas hipovirulentas del hongo se tomaron muestras de árboles que presentaban los síntomas que se han descrito como producidos por este tipo de cepas, es decir lesiones superficiales de la corteza.

2.8.- Aislamiento e identificación.

Las muestras se procesaron en el plazo de 24 a 48 horas tras su recogida. Para ello, con ayuda de un sacabocados estéril se obtuvieron discos de cinco milímetros de diámetro a partir de los trozos de corteza recogidos. Los discos se limpiaron con alcohol y se colocaron con la corteza hacia arriba (Anagnostakis, 1988) en placas que contenían medio APDa (Figura 15). Se utilizaron dos discos de corteza por cada muestra y se

incubaron en una estufa (B-6520 Heraeus, S.A., España) a una temperatura de 25°C y oscuridad.

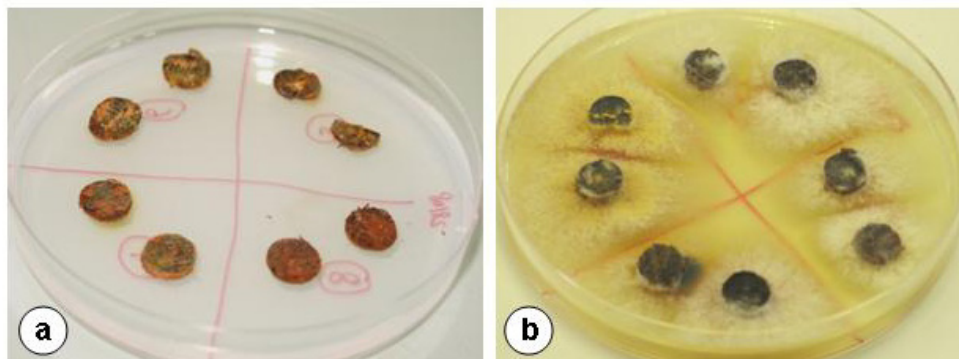


Figura 15: Aislamiento del hongo. a) Placa de APDa; en cada sector se colocaron dos discos de corteza para cada una de las muestras. b) Crecimiento del micelio del hongo después del período de incubación.

El micelio del hongo obtenido se repicó a otra placa de APDa usando una aguja estéril y se incubó en las mismas condiciones. Este repicado se realizó al azar con el micelio que crecía de los dos discos sembrados por cada muestra, excepto cuando se observó la existencia de diferencias en el micelio de cada uno de ellos. En estos casos, se procedió a repicar los dos tipos codificándolos como n° muestra.1 y n° muestra.2. Estos cultivos se conservaron a 4 °C hasta que se realizaron los cultivos mono/conidiales.

2.9.- Cultivos mono/conidiales.

Se realizaron mediante diluciones seriadas, tomándose una porción de micelio del hongo con un palillo estéril, que se introdujo en un vial de microcentrífuga de 2 ml de volumen al que se añadió 1 ml de agua destilada estéril y, con la ayuda del palillo, se disgregó el micelio. Partiendo de este vial, se realizaron diluciones seriadas hasta llegar a 10^{-7} . De las cuatro últimas diluciones (10^{-4} a 10^{-7}), se sembraron 50 μ l en sábana en una placa de APD usando un asa de Drigalsky estéril y se incubó en oscuridad a 25° C.

De las placas en las que se observó una unidad formadora de colonia del hongo, o dos suficientemente separadas, se eligió una al azar y se pasó a una placa de APDmb. Se incubó cinco días en las condiciones mencionadas anteriormente y se mantuvo a 4°C para su conservación.

2.10.- Métodos de extracción de ADN.

Se ensayaron tres métodos de lisis diferentes para seleccionar el que nos permitiese conseguir una cantidad suficiente de ADN y que fuese rápido y económico, dado el gran volumen de extracciones a realizar.

- Lisis por choque térmico (Lecomte *et al.*, 2000). Se sembró el hongo en una placa de APD y se incubó a 25°C y oscuridad hasta que el micelio cubriese toda la superficie de la placa. Se raspó el micelio con una espátula estéril y se resuspendió en 50 µl de agua bidestilada en un vial de microcentrífuga. Se calentó al baño maría a 95°C durante 10 min. y se enfrió rápidamente sumergiéndolo en hielo/etanol. El lisado se mantuvo a -20°C hasta su utilización.
- Lisis ayudada de micropistilos. Se sembró el hongo en 500 µl de CPD y se incubó a 25°C durante tres días (Cenis, 1992), después de los cuales se eliminó el caldo y se lavó el sedimento con tampón TE (Tris ClH 10mM, EDTA 1mM). Se añadieron 300 µl del tampón de lisis (Liu *et al.*, 2000), con modificaciones: 400mM Tris-HCl, pH: 8,0; 60mM EDTA, pH: 8,0; 150mM NaCl; 1 % SDS; 50 µl/ml de proteinasa K (20 mg/ml). La mezcla se sometió a rotura mecánica con un micropistilo movido por un motor eléctrico. Se añadieron 150 µl de acetato sódico 3M y se dejó durante 10 min. a -20°C. Se centrifugó a 14.000 rpm durante 2 min., y se transfirió el sobrenadante a otro vial de 1,5 ml. Se añadieron 450 µl de fenol equilibrado y estabilizado y otros 450 µl de cloroformo-isoamilalcohol (24:1) y se agitó. Se centrifugó a 14.000 rpm durante 5 min. y se recuperó el sobrenadante a otro vial. Este paso se repitió tantas veces como fue necesario para conseguir un sobrenadante limpio haciendo el último paso solamente con la mezcla de cloroformo-isoamilalcohol. Se recuperó el sobrenadante y se añadieron 5 µl de RNAsa (Roche Diagnostics S.L., España) incubando a 37°C durante 15 - 30 min. Se añadieron 125 µl de acetato amónico 7,5M y 800 µl de etanol absoluto frío a -20°C y se dejó toda la noche a -20°C, tras lo cual se centrifugó a 14.000 rpm durante 15 min. y se recogió el sedimento que se lavó con 100 µl de Etanol frío (-20°C) al 70 %, se centrifugó a 14.000 rpm durante 5 min., se eliminó el sobrenadante y se dejó secar en estufa a 37°C

(15-30 min.). Se disolvió en 20 µl de TE y se mantuvo a -20°C hasta su utilización.

- Lisis con bolas de vidrio. Se sembró el hongo utilizando una aguja estéril, en una placa de APD sobre la que se había colocado un disco de papel celofán estéril (Cassago *et al.*, 2002) y se incubó durante cinco días a 25°C y oscuridad. Usando un palillo estéril se tomó una cantidad de micelio correspondiente a un cuadrado de aproximadamente tres centímetros de lado y se depositó en un vial de microcentrífuga de 2 ml. Se añadieron 350 µl de la solución de lisis descrita en el método anterior y se mantuvo durante 30 min. a temperatura ambiente. Se añadió una bola de vidrio estéril ($\varnothing = 3\text{mm}$) y un volumen de 100 µl de Glass Beads (Glass Beads Acid-washed $\leq 106\text{ }\mu\text{m}$, SIGMA-ALDRICH Inc., EE.UU.). Se realizó tres veces consecutivas un proceso de agitación, en un molino Restsch MM2000 (Restsch, Alemania) durante 15 min. a máxima potencia, y reposo, en hielo durante 15 min. Luego, se añadieron 150 µl de acetato sódico 3M y se dejó durante 10 min. a una temperatura de -20°C. A partir de aquí se realizaron las extracciones con fenol/cloroformo de la misma forma que en el método anterior.

Para comprobar el éxito de la extracción, se sometió a electroforesis 1 µl del ADN obtenido, en un gel de agarosa (Agarosa D-1 Low EEO, Pronadisa, Laboratorios Conda, España) al 0,8%, con tampón TBE 1X (89mM Tris, 89 mM Acido Bórico, 2 mM EDTA; pH: 8,2). Las bandas del gel se visualizaron, previa tinción en una solución de bromuro de etidio (200 µl/litro) y se fotografiaron alternativamente con una cámara Polaroid CU-5 (Polaroid, Reino Unido) y con un digitalizador de imágenes (Vilber Lourmat, Francia).

2.11.- Determinación de los grupos de compatibilidad vegetativa.

Se siguió el método de barrera/fusión (Anónimo, 1997). Dos cepas del hongo se sembraron por picadura, con una separación de aproximadamente dos milímetros, utilizando palillos estériles. Se mantuvieron en un incubador (Precision 818; Precision Scientific Inc., EE.UU.) siete días en oscuridad y siete días en iluminación (fotoperiodo 16 h luz / 8 h oscuridad) a una temperatura de 25°C. Después del periodo de incubación,

las placas se examinaron para anotar la presencia o no de una barrera de conidios en cada enfrentamiento. Se realizaron hasta un máximo de ocho enfrentamientos en cada placa de APDbr.

Análogamente a lo descrito por Cortesi *et al.* (1996) y según la definición de subpoblación y población, que se hizo en el apartado 2.7 de este capítulo, se obtuvieron primero los GCV de cada una de las subpoblaciones enfrentando todos los aislamientos pertenecientes a cada una de ellas y se tomó como representante un aislamiento de cada GCV. Para conocer los GCV de cada población (o concejo) se enfrentaron los GCV de todas las subpoblaciones de un concejo; se tomó como representante un aislamiento de cada GCV. Por último se enfrentaron los GCV de todas las poblaciones entre sí y se obtuvo el número de GCV de la Comunidad Autónoma. El ensayo se repitió al menos 4 veces para todos los enfrentamientos.

Una vez conocidos los GCV asturianos se realizó el mismo procedimiento enfrentándolos con los 64 GCV de referencia europeos.

La diversidad de los GCV se estimó usando la riqueza, uniformidad y diversidad de cada concejo o población (Sotirovski *et al.*, 2004). La riqueza (S) fue el número de GCV encontrados en cada concejo. El máximo número posible de genotipos, es decir GCV, se calculó como:

$$g_{\max} = 2^n$$

siendo n el número de loci segregantes (Cortesi y Milgroom, 1998).

El Índice de Shannon se calculó mediante la fórmula:

$$H' = - \sum_{i=1}^S p_i \ln p_i$$

donde $p_i = \frac{n_i}{N}$; n_i = cepas perteneciente a cada GCV; N = cepas totales en cada concejo.

La diversidad genotípica se calculó mediante la fórmula:

$$\hat{G} = 1 / \sum_{i=1}^S p_i^2 \text{ (Sotirovski et al., 2004).}$$

La uniformidad se calculó mediante la fórmula:

$$E_5 = (\hat{G} - 1) / (e^{H'} - 1) \text{ (Sotirovski et al., 2004)}$$

2.12.- Determinación de los idiomorfos *MAT-1* y *MAT-2*.

Se utilizó una subcolección de 301 aislamientos del hongo. Para elegirlos se tuvo en cuenta, en primer lugar, el criterio geográfico, de tal manera que se tomó, cuando fue posible, el mismo número de aislamientos, elegidos al azar, de cada concejo asturiano en el que se detectó la enfermedad. Además, se tuvo en cuenta la variabilidad del hongo referida a los GCV, de tal manera que se incluyeron, también al azar, representantes de todos los GCV encontrados.

Se realizó mediante amplificación por PCR siguiendo el método descrito por McGuire *et al.* (2004). La mezcla de reacción, de 25 µl de volumen final, tenía: 200 µM dNTPs (Bioline, Reino Unido); 0,2 µM de los dos iniciadores (M1-GS1n y M1-GS3-rev para *MAT-1* y M2-GS3 y gs1-d- para *MAT-2*); 0,5 U ADN polimerasa (DyNAzyme™ II DNA polymerase, Finnzymes Oy, Finlandia); tampón suministrado por dicha casa comercial; 1 µl de ADN; agua bidestilada estéril hasta completar el volumen.

El ADN del hongo se extrajo siguiendo el método de lisis con bolas de vidrio, descrito en el apartado 2.10 de este capítulo.

Las amplificaciones se llevaron a cabo en un termociclador G-Storm (Gene Technologies Ltd, Reino Unido) y las condiciones de la amplificación se recogen en la Tabla 4.

Tabla 4: Condiciones utilizadas para la amplificación de los idiomorfos *MAT-1* y *MAT-2*.

TEMPERATURA	TIEMPO	CICLOS
95°C	30 segundos	30
66°C	1 minuto	
72°C	3 minutos	
72°C	3 minutos	1

Se realizó una electroforesis en tampón TBE con 20 µl del amplificado en un gel de agarosa al 1%. Las bandas del gel se visualizaron en las condiciones descritas en el apartado 2.10. de este capítulo. Como marcador de peso molecular se utilizó el Bio Marker®-EXT de 50-2000 pb (Bio-Ventures Inc., EE.UU.). Los resultados se analizaron mediante una prueba χ^2 .

2.13.- Caracterización morfológica.

Los aislamientos de la colección se sembraron en el medio APDmb y se mantuvieron siete días en oscuridad y otros siete días en iluminación (fotoperiodo 16 h luz / 8 h oscuridad) a 25°C en un incubador (Precision 818, Precision Scientific Inc, EE.UU.). Transcurrido el tiempo de incubación, se tomaron datos de las características que, como se ha comentado en la introducción, pueden verse afectadas por la presencia de los distintos virus que pueden parasitar al hongo. Así, en cuanto al micelio aéreo se consideraron: densidad (alta, media, baja, sin micelio aéreo); distribución (uniforme, no uniforme); aspecto (algodonoso, no algodonoso, radial, no radial). En cuanto al crecimiento del hongo se consideraron: borde de crecimiento (grandes escotaduras, pequeñas escotaduras, sin escotaduras); tipo de crecimiento (en oleadas, no oleadas). Los tipos resultantes se subdividieron en subtipos teniendo en cuenta el color (blanco, amarillo, naranja) que presentaba cada placa tanto por la parte superior como por la inferior y la formación de pústulas (alta, media, baja) (Tabla 5).

Tabla 5: Características utilizadas para caracterizar morfológicamente la colección del hongo.

CARACTERÍSTICA		CLASIFICACIÓN
TIPOS	Densidad de micelio aéreo	Alta, media, baja, sin micelio aéreo
	Distribución del micelio	Uniforme, no uniforme
	Aspecto del micelio	Algodonoso, no algodonoso, radial, no radial
	Borde de crecimiento	Grandes escotaduras, pequeñas escotaduras, sin escotaduras
	Tipo de crecimiento	En oleadas, no oleadas
SUBTIPOS	Color de la placa	Superior Blanco, amarillo, naranja
		Inferior Blanco, amarillo, naranja
	Formación de pústulas Alta, media, baja	

2.14.- Ensayo de virulencia.

Se realizó siguiendo el método descrito por Lee (Lee *et al.*, 1992). Se tomaron ramas sanas de castaño de 3-5 cm de diámetro y 50-60 cm de longitud, procedentes de renuevos sanos de una masa de castaño que había sido talada el año anterior. Se recolectaron todas el mismo día y en el mismo bosque para evitar en lo posible variaciones ajenas a la inoculación. Las ramas se limpiaron con etanol, y se almacenaron a 4°C con la parte inferior sumergida en agua y la superior sellada con film de laboratorio para evitar su desecación. Se utilizaron en los siete días siguientes a su recogida.

Cada una de las ramas se dividió en trozos más pequeños de aproximadamente 9 cm de longitud, que se abrieron por la mitad y, con ayuda de unas pinzas, se separó la corteza de la madera. Se colocaron sobre papel de filtro húmedo en placas de petri de vidrio (9 cm de diámetro y 2,1 cm de alto) para formar una cámara húmeda (Figura 16a).

Con ayuda de un sacabocados estéril se obtuvieron pastillas de 5 mm de diámetro a partir de placas de medio APD con el hongo en crecimiento activo. Estas pastillas se colocaron de tal forma que el micelio del hongo estuviera en contacto con el interior de la corteza y exterior de la madera (Figura 16b). Como control se usaron las cepas hipovirulentas ATCC52571, CCP19, CCP47 y CCP52.

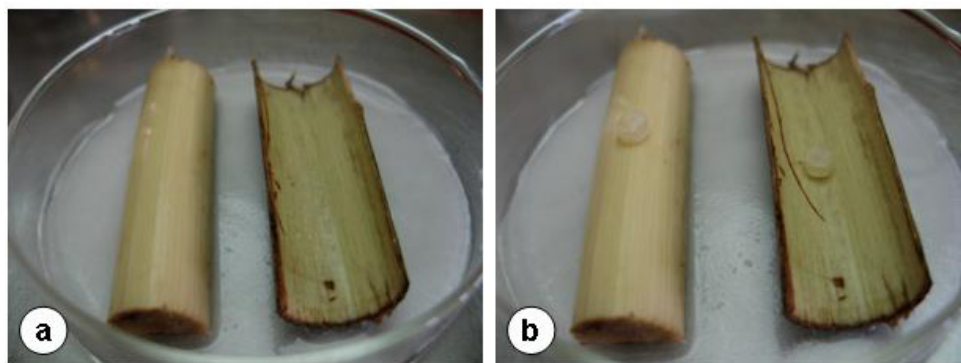


Figura 16: Ensayo de virulencia. a) Trozos de madera y corteza en la cámara húmeda. b) Inoculación con la pastilla de APD conteniendo el micelio del hongo, sobre ambos trozos.

Las placas se incubaron en oscuridad a 25°C durante cuatro días, transcurridos los cuales, el área de la lesión se calculó como área de una elipse:

$$S_{les} = \pi \times a \times b$$

donde, S_{les} = área de la lesión producida; a = semieje mayor; b = semieje menor.

Se consideraron como posibles hipovirulentas las cepas que causaron una lesión, tanto en madera como en corteza, menor que la media de las cepas hipovirulentas control, con un margen de ensayo del 10%.

Posteriormente, se incubaron en iluminación (fotoperiodo 16 h luz / 8 h oscuridad) y después de dos semanas, se anotó la formación de pústulas de cada cepa, según una escala de valores predeterminada (alta, media, baja).

2.15.- Determinación de la actividad del enzima lacasa.

Mediante el **ensayo de Bavendamm** se mide la gradación en el color que se produce al crecer el hongo sobre placas de medio que contienen ácido tánico; La coloración del medio indicaría actividad fenol oxidasa (Rigling *et al.*, 1989).

Este ensayo se realizó a una subcolección de 471 aislamientos del hongo, en los que se incluyeron los potenciales hipovirulentos seleccionados en el ensayo madera-corteza, y además aislamientos pertenecientes a todos los subtipos propuestos en la caracterización morfológica, incidiendo especialmente en aquellos cuyas características morfológicas podrían corresponder con las descritas para las cepas hipovirulentas del hongo. Como control se utilizó la cepa hipovirulenta ATCC52571.

Se sembró el hongo en placas de cultivo que contenían el medio de Bavendamm, utilizando palillos estériles, y se incubó en oscuridad durante cinco días a 30°C. El indicador de la actividad del enzima será el color que presenta este medio en la zona de crecimiento activo del hongo, después de la incubación. A cada cepa ensayada se le asignó un valor positivo o negativo en función del grado de coloración del medio respecto a los controles. El valor negativo (-) se le asignó a los aislamientos que

presentaron un color igual o inferior a la cepa hipovirulenta control. El valor (+) se le asignó a los aislamientos que mostraron un color superior a dicho valor.

Además, se midió la absorbancia siguiendo el método descrito por Suzuki y Nuss (2002), con modificaciones. Para ello se extrajo, con ayuda de un sacabocados desinfectado, un disco de medio de 5 mm de diámetro y se introdujo en un vial de microcentrífuga al que se añadió 1 ml. de agua bidestilada estéril. Se fundió el medio al baño maría, se agitó y se cargaron 200 µl en un pocillo de una placa microtiter (Nunc MaxiSorp, fondo plano, Nunc GmbH & Co. KG, Alemania). En cada placa se incluyó un testigo negativo (cepa hipovirulenta control). Para la lectura de los resultados se utilizó un espectrofotómetro (Model 3550 Microplate Reader, BIO-RAD, EE.UU.) y las mediciones se realizaron a una longitud de onda de 405 nm. Los ensayos se realizaron por duplicado.

Los valores obtenidos para el testigo negativo se analizaron utilizando la prueba t para muestras pareadas. Mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov, se comprobó si dichos valores se ajustaban a una distribución normal y puesto que el 95% de los valores de una distribución normal están comprendidos en el intervalo $(\bar{X} - 1,96 \cdot dt; \bar{X} + 1,96 \cdot dt)$, se tomaron como negativos (hipovirulentos) los aislamientos cuyas medias quedaban dentro de este intervalo.

2.16.- Amplificación de secuencias arbitrarias (RAPD).

Se realizó sobre una subcolección de 24 aislamientos, seleccionados según un criterio geográfico, pertenecientes a seis concejos, del oriente, centro y occidente de Asturias. El número de cepas por concejo fue de cuatro, teniendo en cuenta que fueran representativas de los grupos de compatibilidad vegetativa existentes en cada uno de ellos.

Como especie fuera de grupo se utilizó una cepa de *Exserohilum turcicum*, aislada de una muestra de maíz del concejo de Valdés.

Para comprobar la repetibilidad del método, se realizaron, a cada una de las cepas en estudio, tres extracciones de ADN en tres momentos diferentes con las que se compararon los perfiles de bandas obtenidos en, al menos, dos ensayos de RAPD para cada una de las tres extracciones de ADN.

Para optimizar la cantidad de ADN molde a emplear en la reacción de amplificación se ensayaron tres diluciones diferentes de este ADN molde, diluyéndose a la mitad, a la quinta parte y a la décima parte en agua bidestilada estéril.

Se emplearon 13 iniciadores (Tabla 2). Los experimentos de RAPD se realizaron en mezclas de 25 µl de reacción final conteniendo: 200 µM dNTPs (Bioline Ltd, Reino Unido); 1 µM iniciador (Roche Diagnostics S.L., España); 1 U ADN polimerasa (DyNAzyme™ II DNA polymerase, Finnzymes Oy, Finlandia); tampón proporcionado por dicha casa comercial; 1 µl de ADN; agua bidestilada estéril hasta completar el volumen.

Todas las amplificaciones se llevaron a cabo alternativamente en dos termocicladores PTC100™ y PTC200™ (MJ Research, EE.UU.) y las condiciones de la reacción de amplificación se recogen en la Tabla 6.

Tabla 6: Condiciones de amplificación utilizadas en la técnica RAPD.

TEMPERATURA	TIEMPO	CICLOS
94°C	4 minutos	1
94°C	30 segundos	35
35°C	1 minuto	
72°C	2 minutos	
72°C	5 minutos	1

Se sometieron a electroforesis 20 µl de amplificado, en un gel de agarosa al 1% con tampón TBE. Las bandas del gel se visualizaron en las condiciones descritas en el apartado 2.10 de este capítulo.

Cada muestra amplificada se definió basándose en la presencia/ausencia de bandas en posiciones particulares del gel, lo que definió el RAPD-tipo.

2.17.- Microsatélites (SSR).

Este trabajo se realizó en el Laboratorio del Profesor Michael G. Milgroom en el “Department of Plant Pathology and Plant-Microbe Biology”, de la Universidad de Cornell en Ithaca (Nueva York, EE.UU.).

Se analizó una subcolección de 189 aislamientos del hongo utilizando los 16 loci microsatélite que aparecen en la Tabla 3. Para establecer esta subcolección se tuvo en cuenta el criterio geográfico, de tal manera que hubo, al menos, un representante de todos los concejos infectados. Dentro de cada concejo, el criterio de selección fue la diversidad referida a los GCV y los idiomorfos *MAT*.

Se utilizó el método multiplex (PCR múltiple) con el que se usan diferentes marcadores fluorescentes para analizar loci donde se solape el tamaño de los alelos. De esta forma, los 16 loci se agruparon en tres set, de tal manera que se usó el mismo fluoróforo para marcar aquellos que tenían tamaños esperados muy diferentes (Tabla 7).

Se siguió el método descrito por Schuelke (2000), utilizado posteriormente por Kubisiak *et al.* (2007). Así se añadió al extremo 5' de cada uno de los iniciadores directos (Tabla 2) la secuencia universal M-13 (5'-CACGACGTTGTAAAACGAC-3'). Esta misma secuencia se usó para marcar cada uno de los cuatro marcadores fluorescentes usados: FAM, NED, VIC y PET (Applied Biosystems, EE.UU.). Además, en alguno de los iniciadores reversos (Tabla 2) se añadió en el extremo 5' una secuencia denominada PIG-tail (5'-GTTTCTT-3') (Brownstein *et al.*, 1996).

Los experimentos se realizaron en mezclas de 24 µl de reacción final, conteniendo: 0,5 U de ADN polimerasa (Takara EX TAQ™, Takara Bio Inc, Japón); tampón suministrado por dicha casa comercial; 200 µM de dNTP (Takara Bio Inc, Japón); 0,42 µM de marcador fluorescente; 0,042 µM del iniciador directo; 0,17 µM del iniciador reverso; 1 µl de ADN molde; agua bidestilada estéril hasta completar el volumen. Como ADN molde se utilizó una dilución 1:10.

Tabla 7: Descripción de los tres set multiplex utilizados.

Set 1			Set 2			Set 3		
Locus	⁽¹⁾ Tamaño	Tinte	Locus	⁽¹⁾ Tamaño	Tinte	Locus	⁽¹⁾ Tamaño	Tinte
CPE1	131-149	NED	CpSI006	160-164	NED	CPE8	107-122	NED
CpSI072	324-359	NED	CpSI032	437-477	NED	CpSI054	290-343	NED
I07-650	280-293	FAM	CPG4	188-208	FAM	CPE5	256-265	FAM
CpSI009	164-206	FAM	CPE3	176-194	VIC	CPG14	257-305	VIC
CPG6	263-289	VIC	CPE4	224-280	PET	CPG7	251-257	PET
CPG3	188-262	PET						

⁽¹⁾Tamaño expresado en pares de bases

Las condiciones de la reacción de amplificación fueron las mismas en todos los casos y se muestran en la Tabla 8. Todas las amplificaciones se llevaron a cabo en un termociclador PTC-100[®] (MJ Research, EE.UU.).

Se comprobó la amplificación cargando 5µl del producto con 1µl de densificante en un gel de agarosa al 1% (Ultra Pure AquaPur[™] ES, National Diagnostics, EE.UU.), al que se añadieron 5µl de bromuro de etidio (EtBr) por cada 100 ml de gel. Se utilizó una fuente de electroforesis EC-105 (EC Apparatus Corporation, EE.UU.). Las bandas del gel se visualizaron y se fotografiaron con un digitalizador de imágenes.

Tabla 8: Condiciones de amplificación utilizadas en la técnica SSR.

TEMPERATURA	TIEMPO	CICLOS
95°C	2 minutos	1
95°C	30 segundos	35
55°C	30 segundos	
72°C	30 segundos	
72°C	5 minutos	1

El análisis de los resultados mediante electroforesis capilar se realizó en el “Life Sciences Core Laboratories Center” del “Institute for Biotechnology and Life Science

Technologies” de la Universidad de Cornell. Se utilizó un patrón interno de tamaño (GeneScan™-500Liz™ Size Standard, Applied Biosystems, Reino Unido). Para el análisis de los datos se utilizó el programa GeneMapper v3.0 (Applied Biosystems, EE.UU.).

2.18.- Ensayo *in vitro* de productos fitosanitarios.

Se seleccionaron seis aislamientos asturianos de *C. parasitica* de diferente procedencia y como controles se usaron dos cepas de colección, ATCC-52571 y CCP-52.

Los productos fitosanitarios ensayados que se recogen en la Tabla 4, se incorporaron al medio APD en la cantidad necesaria para conseguir las dosis de ensayo. Las concentraciones ensayadas siguieron una progresión geométrica de 1 a 1.024 µg/ml, referidas a la materia activa de cada producto.

El inóculo consistió en discos de 5 mm de diámetro, obtenidos mediante un sacabocados desinfectado de la zona de crecimiento activo del hongo de una placa de APD. Se colocaron en el centro de cada una de las placas de ensayo boca abajo, de manera que el micelio del hongo quedara en contacto con el medio. Como control se sembraron discos con el hongo en placas de APD sin producto incorporado. Se hicieron, al menos, tres repeticiones para cada una de las concentraciones ensayadas.

Después de cinco días de incubación en oscuridad a 25°C, de las placas en las que el hongo no había crecido se tomaron de nuevo los discos de inóculo y se situaron en placas con APD sin producto, situándolos, en este caso, boca arriba para facilitar el posible crecimiento del hongo. Cuando, tras la incubación, se observó crecimiento del hongo, se consideró que el producto tenía un efecto fungistático, puesto que sólo inhibía el crecimiento del hongo en su presencia. Por el contrario, cuando al resembrar el hongo, este no creció, se consideró que el producto tenía un efecto fungicida.

2.19.- Ensayo *in vivo* de productos fitosanitarios.

Se utilizaron las dos materias activas que resultaron ser más eficaces en el ensayo *in vitro*, que fueron el Epoxiconazol (12,5%) y la mezcla de Carbendazima (20%) + Flutriafol (9,4%), incluyéndose, además, la Carbendazima (50%) para ver su efecto respecto a la mezcla ensayada.

La cepa utilizada en el ensayo fue la LFP AH-187. Como inóculo se utilizaron discos de medio APD de 5 mm de diámetro, obtenidos con ayuda de un sacabocados desinfectado de la zona de crecimiento activo del hongo.

Con un bisturí estéril se practicó una herida en la corteza y se introdujo la cuarta parte de un disco de inóculo. La herida se cerró con film de laboratorio para evitar la desecación (Figura 17).

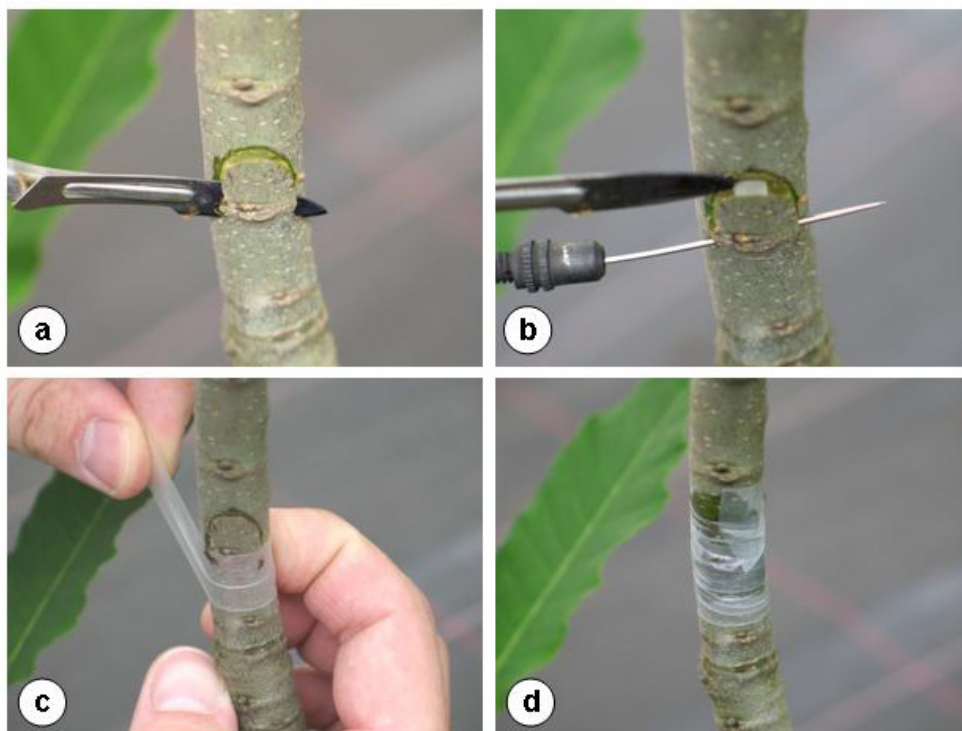


Figura 17: Inoculación de las plantas de castaño. a) Herida practicada en la corteza con un bisturí estéril. b) Introducción del inóculo. c) y d) Sellado de la herida con film de laboratorio.

La unidad de ensayo estuvo formada por diez plantas inoculadas, dos testigos inoculados y dos testigos sin inocular. Para cada uno de los productos utilizados se realizaron tres tipos de tratamientos (T-1, T-2 y T-3). El T-1 fue un tratamiento

preventivo, aplicado por pulverización nueve días antes de la inoculación. El T-2 fue un tratamiento curativo, aplicado por pulverización 21 días después de la inoculación. El T-3 fue un tratamiento curativo localizado, aplicado con un rodillo sobre la lesión 21 días después de la inoculación.

Durante el primer año de ensayo, se evaluaron dos parámetros:

- Eficacia de las tres materias activas ensayadas.
- Influencia de la forma de aplicación del tratamiento en el resultado.

Los tratamientos, a excepción del preventivo, se realizaron en tres ocasiones con un intervalo de 21 días. Para los tratamientos de pulverización (Figura 18a) se utilizaron las dosis máximas de producto indicadas por el fabricante y se usó un volumen de un litro de caldo para cada grupo de plantas. Las plantas testigo, tanto las inoculadas como las no inoculadas, se embolsaron (Figura 18b) para evitar que el producto les pudiese llegar por deriva. Para la aplicación directa sobre la lesión, se empapó el rodillo en una solución del producto, preparada también con la dosis máxima indicada por el fabricante.



Figura 18: Ensayo *in vivo* de fitosanitarios. a) Aplicación por pulverización. b) Testigos embolsados.

Cinco meses después de la aplicación del último tratamiento se tomaron los siguientes datos:

- Extensión de la lesión (cm).
- Formación de pústulas, que se evaluó con una escala de 0 a 5, donde 0 era sin pústulas y 5 cuando las pústulas cubrían toda la lesión.
- Formación de grietas, que se evaluó con una escala de 0 a 5, donde 0 era sin grietas y 5 cuando las grietas eran tan profundas que se levantaba la corteza.
- Aspecto general, capacidad de rebrote y presencia de hojas secas.

En los ensayos realizados en el segundo y tercer año se utilizaron 112 plantas de dos años de edad, que se inocularon de la misma forma descrita anteriormente y con la misma cepa del hongo. Teniendo en cuenta los resultados obtenidos durante el primer año, no se realizaron tratamientos preventivos. Así, transcurridos 21 días desde la inoculación de estas nuevas plantas, se realizaron dos tipos de tratamientos (T-4 y T-5). El T-4 fue un tratamiento curativo, aplicado por pulverización 21 días después de la inoculación. El T-5 fue un tratamiento curativo localizado, aplicado con rodillo sobre la lesión 21 días después de la inoculación. Los tratamientos comenzaron al final de la primavera, y se realizaron también en tres ocasiones, con un intervalo de 21 días. Al final del tercer año se tomaron los mismos datos que en el primer año del ensayo, y se evaluaron los mismos parámetros, que eran la eficacia de las tres materias activas ensayadas y la influencia de la forma de aplicación del tratamiento en el resultado.

En el análisis de los resultados, se utilizó un ANOVA de dos vías, para la extensión de la lesión, y un análisis Kruskal-Wallis, para los datos de formación de grietas y de pústulas.

2.20.- Conservación y mantenimiento de cepas.

La conservación y mantenimiento de las cepas se realizó en placas de medio APDa a 4°C, re-sembrándolas cada cuatro meses.

Además se liofilizaron 70 cepas del hongo.

3.- RESULTADOS

3.1.- Situación actual del chancro del castaño en Asturias.

De las observaciones realizadas durante la prospección se puede destacar que, en general, existe una falta de tratamientos selvícolas en las masas de castaño y es una imagen habitual encontrar los rebrotes infectados después de la tala (Figura 19a).

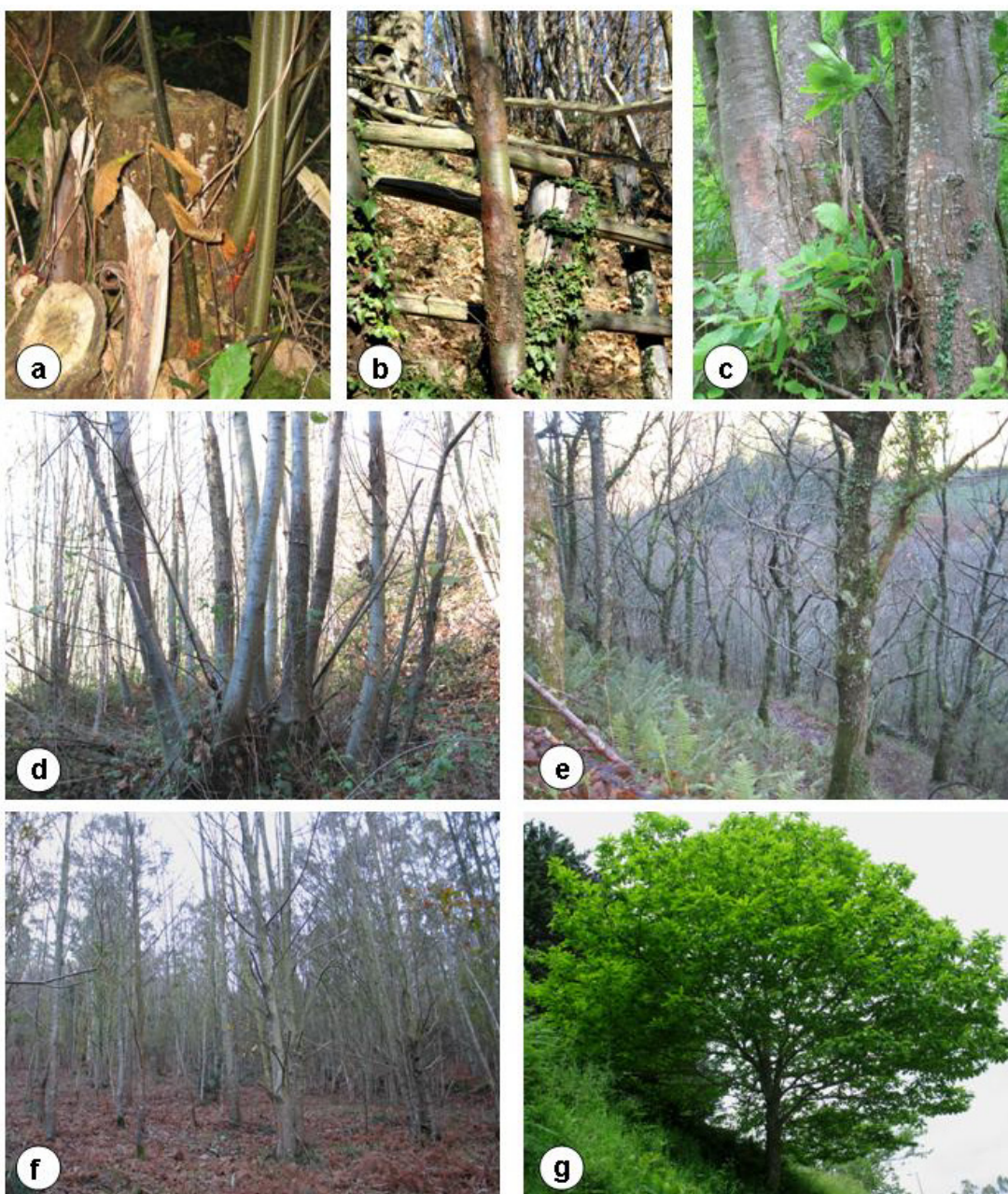


Figura 19: Situación de los castaños en los diferentes puntos muestreados. a) Rebrote infectado tras la tala de un pie de castaño. b) Chancros causados por heridas al realizar el mantenimiento de los linderos. c) Fustes de una misma cepa infectados en la base d) Fustes infectados a una altura de 1,5 – 2 m del suelo. e) Aspecto de una masa envejecida del occidente asturiano. f) Masa de castaño asintomática. g) Árbol asintomático para aprovechamiento de fruto.

También se ha visto, que los castaños que se encuentran en los linderos de fincas presentan un alto grado de afectación, probablemente, debido a las heridas producidas en las labores de mantenimiento de los mismos (Figura 19b). En las masas de aprovechamiento maderero es bastante habitual encontrar chancros a distintas alturas en todos los pies de una misma cepa (Figura 19c y 19d). Por otro lado, aunque no muy frecuentemente, se han encontrado masas (Figura 19e y 19f) y ejemplares aislados (Figura 19g), en los que no se detectaron síntomas de la enfermedad.

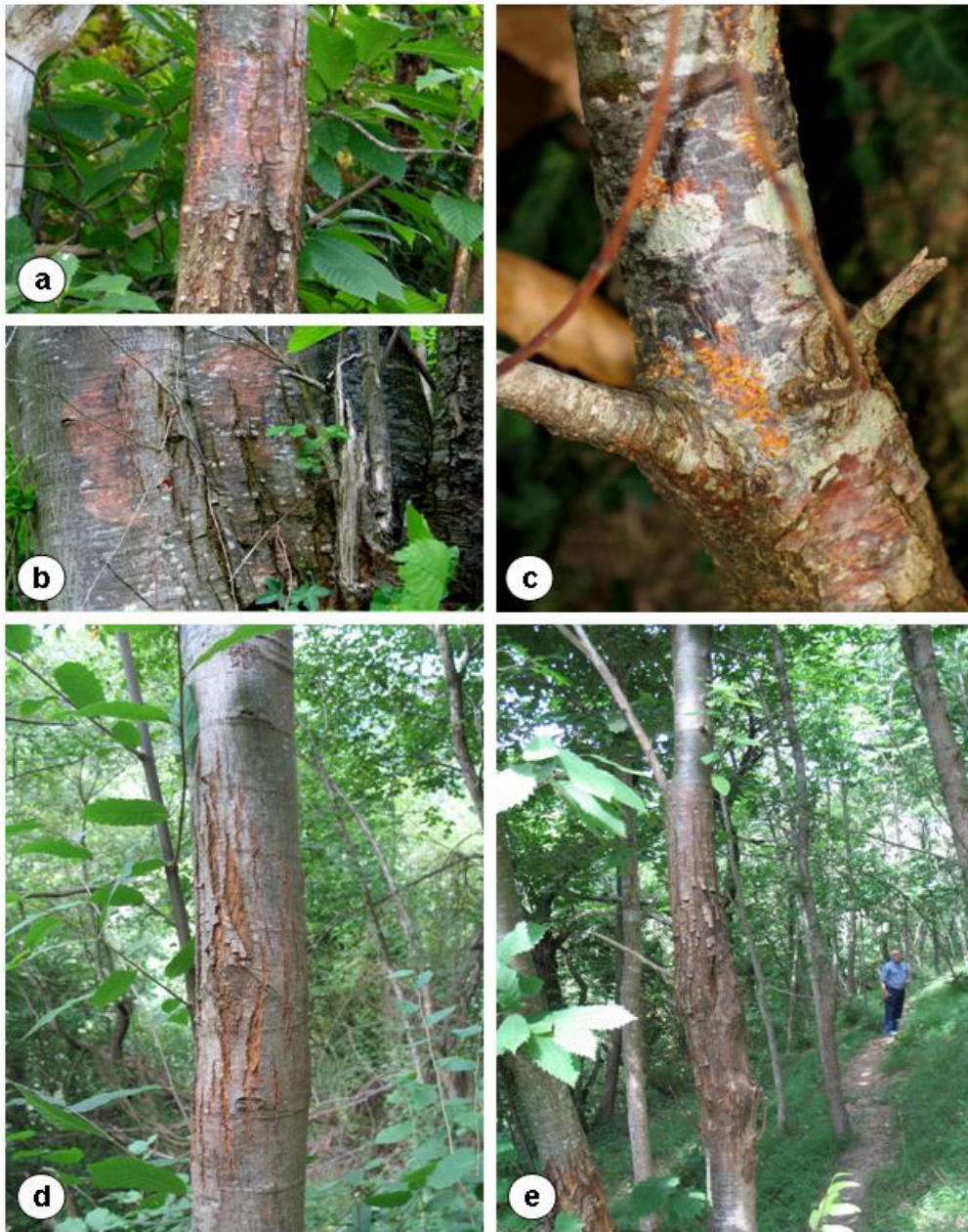


Figura 20: Síntomas característicos de la enfermedad. a) y b) Coloraciones rojizas en la corteza. c) Pústulas anaranjadas que se forman en el exterior de la corteza. d) Detalle del hinchamiento y las grietas longitudinales en la corteza. e) Aspecto general de un tronco con chancro.

En nueve concejos (Amieva, Candamo, Castropol, Grandas de Salime, Illas, San Martín de Oscos, San Tirso de Abres, Vegadeo y Villanueva de Oscos) no se observaron árboles con síntomas de la enfermedad (Figura 20), ni heridas superficiales (Figura 21) por lo que no se tomó ninguna muestra, a pesar de visitar 22 puntos de muestreo. Sin embargo, los concejos de Amieva, Candamo, e Illas se han considerado infectados al disponer de cepas aisladas en dichos concejos procedentes de muestreos anteriores.

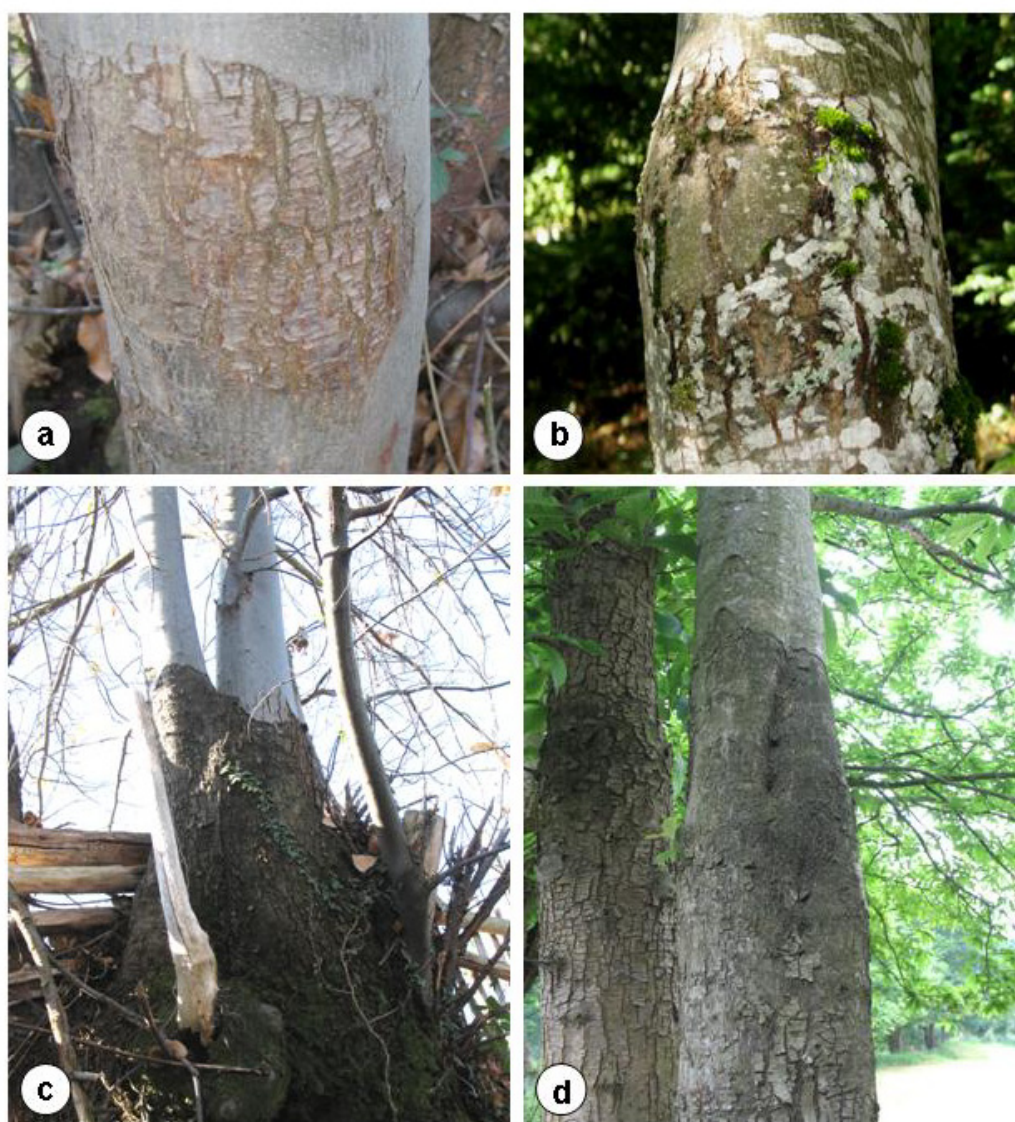


Figura 21: Aspecto de distintos tipos de heridas superficiales sobre árboles de castaño. a) Grietas en la corteza de extensión limitada en el tronco. b) Herida con grietas localizadas en la superficie, mientras que la corteza inferior presenta mejor aspecto. c) Agrietamiento superficial de la corteza localizado en la base del tronco. d) Agrietamiento superficial de la corteza generalizado.

En otros tres concejos (Illano, Santa Eulalia de Oscos y Taramundi), se prospectaron ocho puntos de muestreo y sólo se encontraron árboles con heridas superficiales no coincidentes con las típicas descritas para la enfermedad, de las que se tomó muestra pero no se aisló el hongo.

En nueve concejos (Allande, Gijón, Ibias, Llanera, Quirós, Somiedo, Tapia de Casariego, Teverga y Villaviciosa) se encontraron tanto masas sanas de castaño, como masas afectadas por la enfermedad.

Masas muy afectadas se han encontrado en los concejos de Allande, Cangas del Narcea y Somiedo en la zona occidental; Avilés, Belmonte, Bimenes, Cabranes, Carreño, Cudillero, Lena, Mieres, Nava, Piloña, Quirós, Ribera de Arriba y Sobrescobio, en la zona central; Cangas de Onís, Caso, Llanes, Onís, Parres, Peñamellera Alta, Peñamellera Baja, y Ponga, en la zona oriental.

Debido al gran número de muestras que nos cedieron del concejo de Aller y a lo reciente de su recogida (2004), no se tomaron muestras en este concejo.

Todas las muestras positivas presentaban en el interior de la corteza los abanicos de micelio característicos del hongo (Figura 22).

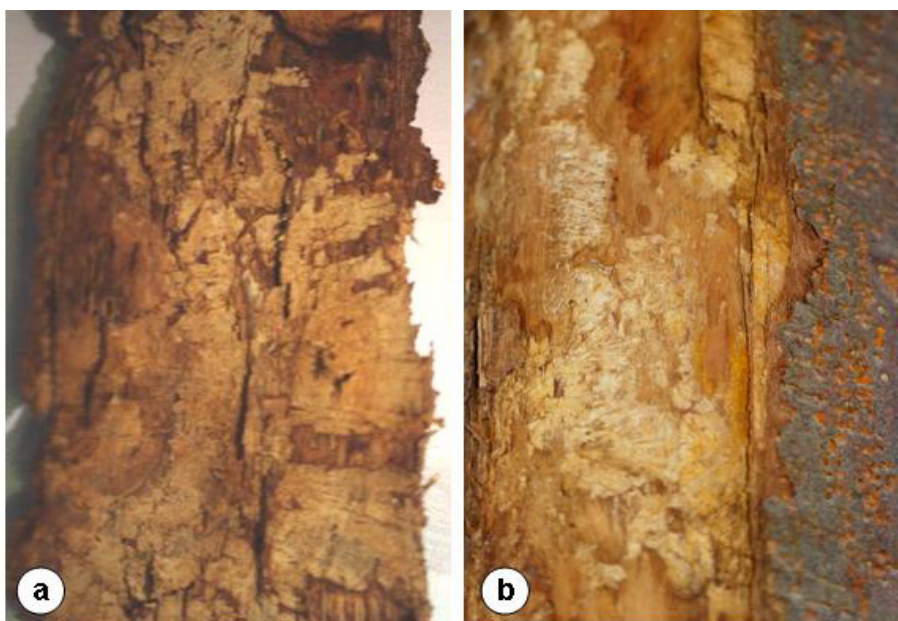


Figura 22: Micelio característico de *C. parasitica*. a) Abanicos de micelio en el interior de la corteza. b) Abanicos de micelio sobre la madera.

En la Figura 23 se muestra el mapa de Asturias, por concejos, en el que aparecen en color naranja los 69 concejos en los que se detectó la enfermedad en esta prospección o de los que se tienen aislamientos procedentes de prospecciones anteriores. La superficie de castaño de estos concejos supone más del 95% de la superficie de castaño en la provincia (Anónimo, 2003b).



Figura 23: Distribución por concejos de la enfermedad en el Principado de Asturias.

En total se prospectaron 216 puntos de muestreo repartidos por todo el territorio asturiano, en los que se tomaron 835 muestras de las que 618 (74,01%) fueron positivas. Al realizar los cultivos mono/conidiales (Figura 24) de estos 618 aislamientos, 24 de ellos mostraron dos tipos de colonias diferentes. Esto, unido a las cepas cedidas, nos ha permitido tener una colección de 778 aislamientos mono/conidiales del hongo de procedencia asturiana (Tabla 9).

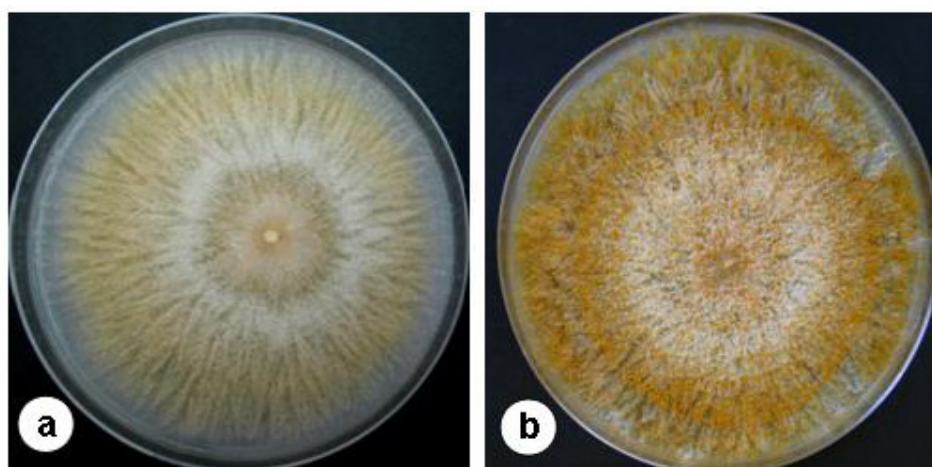


Figura 24: Aspecto de un cultivo mono/conidial del hongo. a) Después de siete días de incubación a 25°C y oscuridad. b) Después de siete días en iluminación.

Tabla 9: Aislamientos de *C. parasitica* de la colección del SERIDA.

Concejo	Puntos de Muestreo	Muestras			Cesiones	Total Colección
		Recogidas	+	-		
Allande	3	17	9	8	-	9
Aller	-	-	-	-	111 ^(b)	111
Amieva	3	-	-	-	6 ^(c)	6
Avilés	1	4	4	-	-	4
Belmonte	4	10	10	-	3 ^(c)	13
Bimenes	2	12	12	-	-	12
Boal	5	10	10	-	-	10
Cabrales	2	9	4	5	-	4
Cabranes	2	13	9	4	-	9
Candamo	2	-	-	-	6 ^(c)	6
Cangas de Onís	3	21	17	4	-	19 ^(a)
Cangas del Narcea	4	21	16	5	-	18 ^(a)
Caravia	2	4	4	-	-	4
Carreño	4	16	11	5	2 ^(c)	13
Caso	3	16	15	1	2 ^(c)	17
Castrillón	2	8	5	3	-	5
Castropol	2	-	-	-	-	-
Coaña	2	3	1	2	2 ^(c)	3
Colunga	1	5	4	1	-	4
Corvera	1	2	1	1	1 ^(c)	2
Cudillero	2	10	7	3	-	7
Degaña	3	12	2	10	-	2
El Franco	1	2	2	-	-	2
Gijón	5	21	13	8	-	14 ^(a)
Gozón	4	13	10	3	-	10
Grado	4	17	15	2	1 ^(c)	17 ^(a)
Grandas de Salime	3	-	-	-	-	-
Ibias	5	13	4	9	-	4
Illano	2	3	-	3	-	-
Illas	2	-	-	-	2 ^(c)	2
Langreo	3	14	9	5	-	9
Las Regueras	2	11	7	4	-	7
Laviana	2	18	12	6	-	12
Lena	7	37	35	2	-	35
Llanera	3	8	2	6	-	2
Llanes	4	18	15	3	-	16 ^(a)
Mieres	4	20	18	2	-	22 ^(a)
Morcín	5	21	17	4	-	17
Muros del Nalón	2	9	8	1	-	8
Nava	2	10	6	4	-	7 ^(a)
Navia	1	3	2	1	-	2
Noreña	1	3	3	-	-	4 ^(a)
Onís	2	10	9	1	-	9
Oviedo	2	13	11	2	-	11
Parres	4	19	16	3	-	16
Peñamellera Alta	4	22	19	3	-	19
Peñamellera Baja	3	12	10	2	-	11 ^(a)
Pesoz	2	2	2	-	-	2
Piloña	5	24	15	9	-	17 ^(a)
Ponga	5	22	21	1	-	24 ^(a)
Pravia	2	11	8	3	-	8
Proaza	2	12	10	2	-	10
Quirós	4	15	7	8	-	7
Ribadedeva	1	4	4	-	-	5 ^(a)
Ribadesella	1	4	4	-	-	4
Ribera de Arriba	3	19	18	1	-	18
Riosa	3	10	10	-	-	10
Salas	3	10	6	4	-	6
San Martín de Oscos	2	-	-	-	-	-
San Martín del Rey Aurelio	4	16	13	3	-	14 ^(a)
San Tirso de Abres	3	-	-	-	-	-
Santa Eulalia de Oscos	2	7	-	7	-	-
Santo Adriano	1	5	4	1	-	4
Sariego	2	10	3	7	-	4 ^(a)
Siero	5	21	19	2	-	20 ^(a)
Sobrescobio	4	18	17	1	-	17
Somiedo	3	14	13	1	-	13
Soto del Barco	2	11	7	4	-	7

Continuación Tabla 9.

Concejo	Puntos de Muestreo	Muestras			Cesiones	Total Colección
		Recogidas	+	-		
Tapia de Casariego	2	10	1	9	-	1
Taramundi	2	5	-	5	-	-
Teverga	3	15	13	2	-	13
Tineo	2	19	4	15	-	4
Valdés	4	10	5	5	-	5
Vegadeo	2	-	-	-	-	-
Villanueva de Oscos	3	-	-	-	-	-
Villaviciosa	6	25	24	1	-	24
Villayón	1	1	1	-	-	1
Yernes y Tameza	2	5	5	-	-	6 ^(a)
Total	216	835	618	217	136	778

^(a) Concejos en los que alguna muestra presentó dos tipos de colonias.

^(b) Aislamientos proporcionadas por el Área Forestal del SERIDA.

^(c) Aislamientos cedidos por el Laboratorio de Sanidad Vegetal del Principado de Asturias.

3.2.- Diversidad de *C. parasitica*: grupos de compatibilidad vegetativa.

El primer aspecto a destacar es que el método barrera-fusión, utilizado para detectar la compatibilidad entre aislamientos, permitió asignar grupo a la mayor parte de las cepas con claridad (Figura 25), aunque en algunos casos, la presencia de barreras débiles, hizo necesarias varias repeticiones para confirmar la incompatibilidad.

En cuanto a los resultados obtenidos, el número de GCV resultó ser muy bajo puesto que sólo se encontraron tres GCV. El grupo que se denominó PA-I fue el mayoritario y agrupó al 94,60% de los 778 aislamientos asturianos del hongo. Los otros dos grupos, denominados PA-II y PA-III, tuvieron una menor presencia y agruparon al 5,14% y 0,26% de los aislamientos, respectivamente.

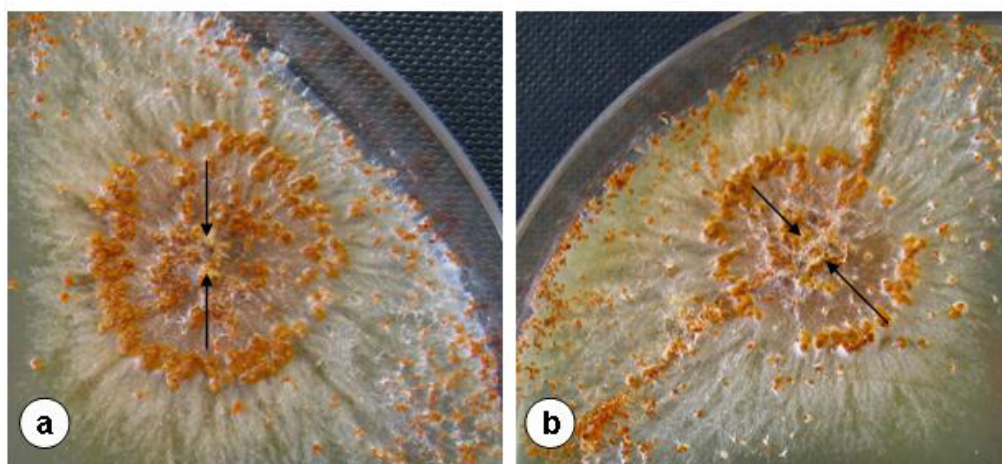


Figura 25: Método barrera/fusión. Las flechas indican los puntos de siembra. a) Reacción de compatibilidad en la que los micelios de las cepas enfrentadas crecen entrelazados. b) Reacción de incompatibilidad en la que se observa la barrera que se forma al enfrentar dos cepas pertenecientes a dos GCV distintos.

Al comparar los GCV asturianos con los 64 GCV Europeos (Cortesi y Milgroom, 1988) se encontró una clara correspondencia entre el PA-I y el EU-1, y el PA-III y el EU-3. Sin embargo, al hacer los enfrentamientos correspondientes a los aislamientos pertenecientes al PA-II, se mostraron compatibles con dos GCV europeos, el EU-11 y el EU-13 (Figura 26).

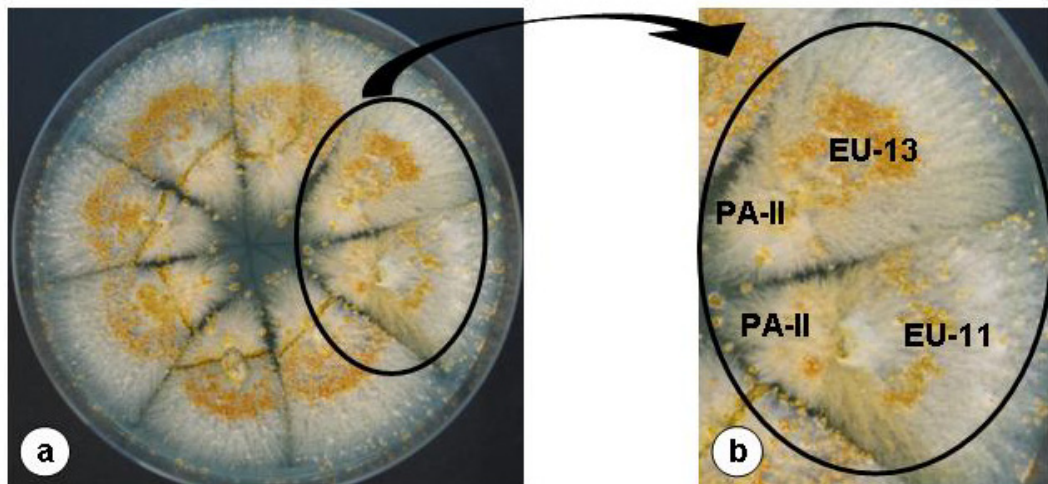


Figura 26: Ensayo de compatibilidad del PA-II con los GCV Europeos. a) Se observan las reacciones de incompatibilidad y compatibilidad (dentro de la línea), del PA-II (sembrado en la parte interior de la placa) con diferentes GCV Europeos (sembrados en la parte exterior de la placa). b) Detalle de la zona de la placa correspondiente al enfrentamiento del PA-II con el EU-11 y EU-13.

Para comprobar que no había habido ningún error al recuperar los GCV Europeos, se enfrentaron entre sí el EU-11 y el EU-13. El resultado de este enfrentamiento fue una reacción de incompatibilidad débil (Figura 27a). Esto sería debido a que estos dos GCV comparten todos los loci de incompatibilidad vegetativa excepto uno (Cortesi y Milgroom, 1988). Teniendo como referencia este resultado, se volvió a enfrentar el PA-II con ambos, EU-11 y el EU-13, y se observó que en algunas ocasiones se produjo una reacción de incompatibilidad con el EU-11 que nunca se produjo con el EU-13 (Figura 27b), por lo que se consideró que el PA-II se correspondería con el EU-13.

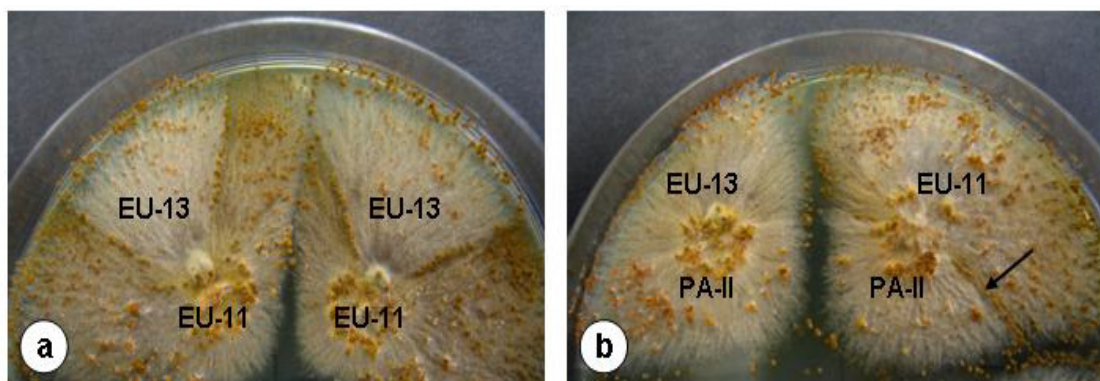


Figura 27: a) Ensayos de incompatibilidad entre el EU-11 y el EU-13. b) Ensayos de compatibilidad entre PA-II y EU-11 y EU-13; la flecha marca la reacción de incompatibilidad débil.

Por concejos, el EU-1 se encontró en los 69 afectados, siendo en 55 de ellos el único GCV presente. Por lo tanto para estos concejos, y refiriéndonos a los GCV, podemos decir que en ellos no hay diversidad y el valor de la riqueza (S) para cada concejo es: $S = 1$.

El EU-13 apareció, junto con el EU-1, en los doce concejos siguientes: Aller, Cabranes, Cangas de Onís, Caso, Laviana, Onís, Peñamellera Baja, Ponga, San Martín del Rey Aurelio, Siero, Boal y Cangas del Narcea, y en este caso la riqueza toma el valor de $S = 2$ para cada uno de ellos. Todos estos concejos se localizan, a excepción de los dos últimos, en la zona centro-sur-oriental de la provincia.

El EU-3, apareció en el concejo de Morcín junto con el EU-1, y en el de Sobrescobio junto con el EU-1 y el EU-13, lo que nos da unos valores de riqueza de $S = 2$ y $S = 3$, respectivamente. La distribución por concejos de estos grupos se muestra en la Figura 28.

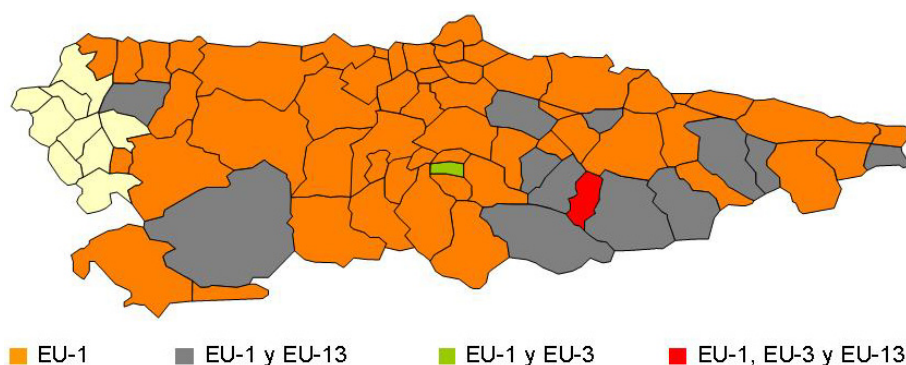


Figura 28: Distribución por concejos de los distintos GCV del hongo.

El número de GCV esperado ($g_{\max}$) se calculó basándose en el número de loci polimórficos de incompatibilidad y asumiendo la recombinación de todos ellos. Este número tomó el valor de $g_{\max} = 16$ para 13 de los 14 concejos asturianos con más de un GCV y el valor de $g_{\max} = 2$ para el concejo de Morcín. Al comparar estos valores con los obtenidos para la riqueza, resulta que el valor de $g_{\max}$ fue mucho mayor en todos los casos, con la excepción del concejo de Morcín en el que ambos valores coinciden.

En los 55 concejos con un solo GCV el índice de diversidad de Shannon (H') toma el valor $H' = 0$. En los 14 concejos restantes los valores obtenidos para este índice oscilaron desde $H' = 0,18$ en el concejo de Aller, hasta $H' = 0,75$ en el de Sobrescobio.

Otro índice utilizado para medir la diversidad en cuanto a GCV fue la diversidad genotípica ($\hat{G}$) que, para los 14 concejos con más de un GCV, varió de $\hat{G} = 1,09$ para el concejo de Aller, a $\hat{G} = 1,80$ en los concejos de Ponga y Onís.

Para estimar la uniformidad se usó el índice (E_5), cuyos valores oscilaron desde $E_5 = 0,47$ en el concejo de Aller, hasta $E_5 = 0,89$ en los concejos de Ponga y Onís.

Los valores de todos estos parámetros aparecen recogidos en la Tabla 10.

Tabla 10: Diversidad de los GCV estimada por concejos. Comparación de la riqueza, uniformidad y diversidad en los concejos con más de un GCV.

Concejo	N ^(a)	Riqueza		GCV ^(d)			H' ^(e)	$\hat{G}$ ^(f)	E_5 ^(g)
		S ^(b)	$g_{\max}$ ^(c)	EU-1	EU-III	EU-XIII			
Aller	111	2	16	106 (95,49%)		5	0,18	1,09	0,47
Boal	10	2	16	8 (80,00%)		2	0,50	1,47	0,72
Cabranes	9	2	16	8 (88,89%)		1	0,35	1,25	0,59
Cangas de Onís	19	2	16	18 (94,74%)		1	0,21	1,11	0,48
Cangas del Narcea	18	2	16	15 (83,33%)		3	0,45	1,38	0,68
Caso	17	2	16	13 (76,47%)		4	0,54	1,56	0,77
Laviana	12	2	16	10 (83,33%)		2	0,45	1,38	0,68
Morcin	17	2	2	16 (94,12%)	1		0,22	1,12	0,49
Onís	9	2	16	6 (66,67%)		3	0,64	1,80	0,89
Peñamellera Baja	11	2	16	8 (72,73%)		3	0,58	1,66	0,82
Ponga	24	2	16	16 (66,67%)		8	0,64	1,80	0,89
San Martín del Rey Aurelio	14	2	16	11 (78,57%)		3	0,52	1,51	0,75
Siero	20	2	16	19 (95,00%)		1	0,20	1,10	0,48
Sobrescobio	17	3	16	12 (70,59%)	1	4	0,75	1,79	0,71

^(a) Número de aislamientos en cada concejo. ^(b) Riqueza observada. ^(c) Máximo número de genotipos. ^(d) Número de aislamientos que pertenecen a cada GCV (% de aislamientos que pertenecen al EU-1). ^(e) Índice de Shannon.

^(f) Diversidad Genotípica. ^(g) Uniformidad.

En la Figura 29, en la que se muestran gráficamente los valores obtenidos para estos índices, se puede observar como en 55 concejos no existe ninguna variabilidad en cuanto a GCV se refiere, presentando unos valores de: $H' = 0$, $\hat{G} = 1$ y $E_5 = 0$; además, todos los aislamientos de estas poblaciones pertenecen al GCV EU-1. Sólo en 14 concejos aparece variabilidad.

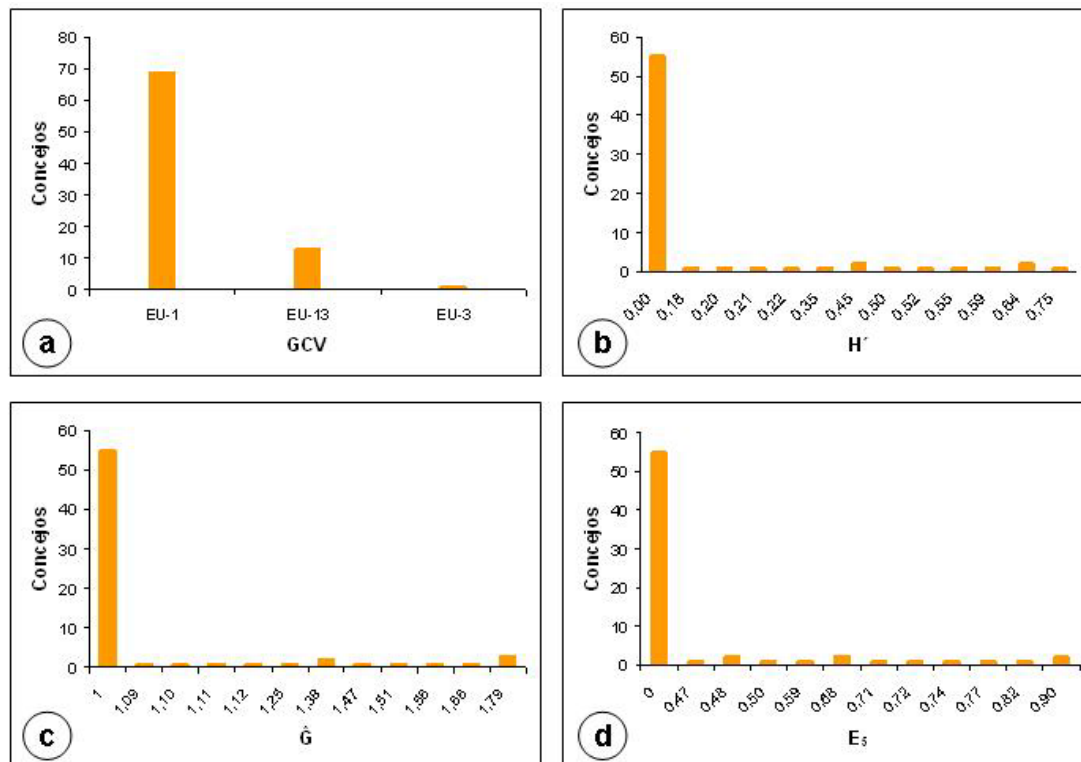


Figura 29: Resultado de los diferentes indicadores de la diversidad usados con los aislamientos de la colección de trabajo. a) Número de conejos en los que esta presente cada grupo. b) Índice de diversidad de Shannon por conejos c) Diversidad genotípica en los conejos. d) Uniformidad del patógeno por conejos.

3.3.- Presencia de los idiomorfos *MAT*.

De los 301 aislamientos seleccionados, 218 (72,43%) mostraron la banda de 1.649 pares de bases (pb) correspondiente al idiomorfo *MAT*-1 y 81 (26,91%) mostraron la banda de 594 pb correspondiente al *MAT*-2 (Figura 30a). También se encontraron dos aislamientos (0,66%) que amplificaron las dos bandas (Figura 30b), este resultado se comprobó en diferentes amplificaciones por PCR, por lo que se trataría de un heterocarionte para el tipo sexual (McGuire *et al.*, 2004).

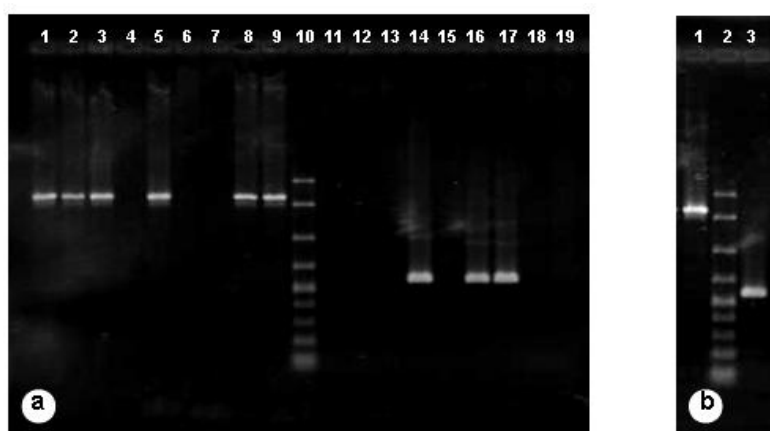


Figura 30: Resultado de la amplificación de los idiomorfos *MAT*-1 y *MAT*-2. a) Calles 1 a 9: amplificación del *MAT*-1 (1.649 pb). Calle 10: marcador de peso molecular. Calles 11 a 19: amplificación del *MAT*-2 (594 pb). b) Amplificación del heterocarionte. Calle 1: amplificación del *MAT*-1. Calle 2: marcador de peso molecular. Calle 3: amplificación del *MAT*-2.

Si relacionamos el tipo sexual con los GCV (Figura 31) encontramos que, de los 218 aislamientos que amplificaron para el idiomorfo *MAT*-1, 206 pertenecen al GCV EU-1, 11 al EU-13 y uno al EU-3. De los 81 aislamientos que mostraron el *MAT*-2, 77 pertenecen al GCV EU-1, tres al EU-13 y uno al EU-3. Los dos heterocariontes encontrados pertenecen al EU-1.

Por conejos (Tabla 11), el idiomorfo *MAT*-1 está presente en 66 de los 69 conejos en los que se ha detectado la enfermedad, en 24 de ellos como único, y en los 42 restantes junto con el *MAT*-2. Este último aparece como único idiomorfo en tres conejos (Figura 32). En el conejo de Aller, aunque sólo se ha encontrado el *MAT*-1, se considera que están presentes los dos debido a la presencia de un heterocarionte, que, por tanto, portaría también la banda correspondiente al *MAT*-2.

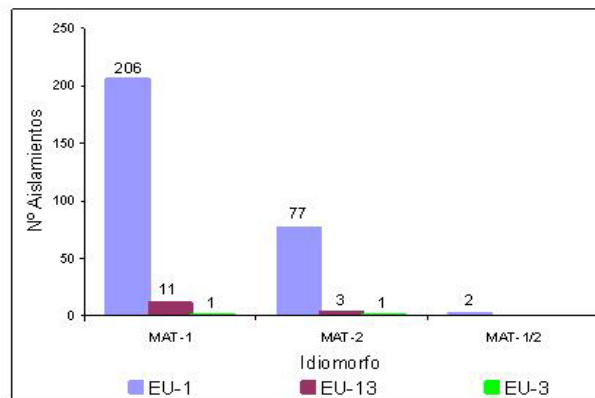


Figura 31: Relación entre los grupos de compatibilidad vegetativa y el tipo sexual.

Al comparar la presencia de los idiormos *MAT* con los GCV, resulta que de los 27 concejos que tienen solamente uno de los dos idiormos, 25 tienen también un único GCV, el EU-1. Los dos restantes son el concejo de San Martín del Rey Aurelio que tiene dos GCV, EU-1 y EU-13, y el concejo de Sobrescobio que tiene los tres GCV encontrados, EU-1, EU-3 y EU-13.

Si consideramos la región en su conjunto, la proporción de idiormos difiere significativamente de la relación 1:1 ($\chi^2 = 62,77$; gl=1; $P < 0,001$), y siguió una distribución 3:1 ($\chi^2 = 0,69$; gl=1; $P = 0,404$), situación que se aproxima a la que presentan las poblaciones clonales.

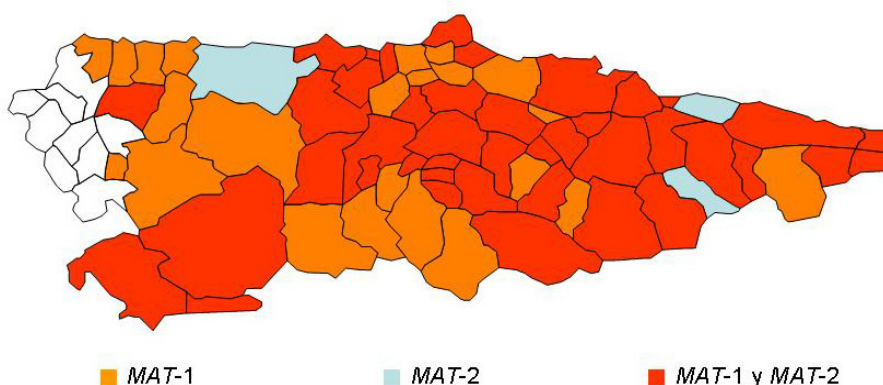


Figura 32: Distribución de los idiormos por concejos. En naranja, concejos en los que sólo se han detectado aislamientos portadores del MAT-1. En azul, concejos en los que solo se han detectado aislamientos portadores del MAT-2. En rojo, concejos en los que se han detectado aislamientos portadores de ambos.

Tabla 11: Resultados, por concejos, de los GCV y de los idiomorfos *MAT-1* y *MAT-2*.

Concejo	Idiomorfo			GCV			Concejo	Idiomorfo			GCV		
	<i>MAT-1</i>	<i>MAT-2</i>	<i>MAT-1/2</i>	EU-1	EU-13	EU-3		<i>MAT-1</i>	<i>MAT-2</i>	<i>MAT-1/2</i>	EU-1	EU-13	EU-3
Allande	■			■			Muros del Nalón	■	■		■		
Aller	■	□	■	■	■		Nava	■	■		■		
Amieva		■		■			Navia	■			■		
Avilés	■			■			Noreña	■			■		
Belmonte	■	■		■			Onís	■	■		■	■	
Bimenes	■	■		■			Oviedo	■	■		■		
Boal	■	■		■	■		Parres	■	■		■		
Cabrales	■			■			Peñamellera	■	■		■		
Cabranes	■	■		■	■		Alta	■	■		■		
Candamo	■			■			Peñamellera	■	■	■	■	■	
Cangas de	■	■		■	■		Baja	■	■		■		
Onís	■	■		■	■		Pesoz	■			■		
Cangas del	■	■		■	■		Piloña	■	■		■		
Narcea	■	■		■			Ponga	■	■		■	■	
Caravia	■	■		■			Pravia	■	■		■		
Carreño	■	■		■			Proaza	■			■		
Caso	■	■		■	■		Quirós	■			■		
Castrillón	■			■			Ribadedeva	■	■		■		
Coaña	■			■			Ribadesella		■		■		
Colunga	■	■		■			Ribera de Arriba	■	■		■		
Corvera	■			■			Riosa	■	■		■		
Cudillero	■	■		■			Salas	■	■		■		
Degaña	■	■		■			San Martín del				■	■	
El Franco	■			■			Rey Aurelio	■			■		
Gijón	■			■			Santo Adriano	■	■		■		
Gozón	■	■		■			Sariego	■			■		
Grado	■	■		■			Siero	■	■		■	■	
Ibias	■	■		■			Sobrescobio	■			■	■	■
Illas	■			■			Somiedo	■			■		
Langreo	■	■		■			Soto del Barco	■	■		■		
Las	■	■		■			Tapia de				■		
Regueras	■	■		■			Casariego	■			■		
Laviana	■	■		■	■		Teverga	■			■		
Lena	■			■			Tineo	■			■		
Llanera	■	■		■			Valdés		■		■		
Llanes	■	■		■			Villaviciosa	■	■		■		
Mieres	■	■		■			Villayón	■			■		
Morcín	■	■		■		■	Yernes y	■	■		■		
							Tameza	■	■		■		

□ Se considera que hay los dos tipos de idiomorfos porque se ha encontrado el heterocarionte.

3.4.- Caracterización morfológica.

Teniendo en cuenta las características morfológicas: densidad, distribución y aspecto del micelio, borde y tipo de crecimiento, se han podido establecer 15 tipos diferentes en los 778 aislamientos de la colección (Tabla 12). El aspecto de estos 15 tipos diferentes se muestra en la Figura 33.

Tabla 12: Características de los tipos morfológicos de la colección LFPAH.

		TIPOS														
		I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII	XIII	XIV	XV
DENSIDAD DEL MICELIO	ALTA				■			■		■	■		■		■	■
	MEDIA	■	■	■										■		
	BAJA						■		■							
	SIN MICELIO AEREO					■						■				
BORDE DE CRECIMIENTO	GRANDES															
	ESCOTADURAS			■	■					■					■	
	PEQUEÑAS		■													■
	ESCOTADURAS															
DISTRIBUCIÓN DEL MICELIO	SIN ESCOTADURAS	■				■	■	■	■		■	■	■	■		
	UNIFORME	■	■	■	■		■	■	■	■	■	■	■			
TIPO DE CRECIMIENTO	NO UNIFORME					■								■	■	■
	EN OLEADAS												■			
ASPECTO DEL MICELIO	NO OLEADAS	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■		■	■	■
	ALGODONOSO				■			■	■		■					
	NO ALGODONOSO	■	■	■		■	■			■		■	■	■	■	■
	RADIAL							■								
ASPECTO DEL MICELIO	NO RADIAL	■	■	■	■	■	■		■	■	■	■	■	■	■	■

Como podemos ver en la Figura 34, el tipo más común fue el tipo I, que agrupó a 610 de los 778 aislamientos de la colección, lo que representa el 78,41%, frente al tipo XV representado por tres aislamientos, que suponen el 0,39%. El resto de tipos agruparon entre el 4,88% del tipo II y el 0,51% del tipo XI.

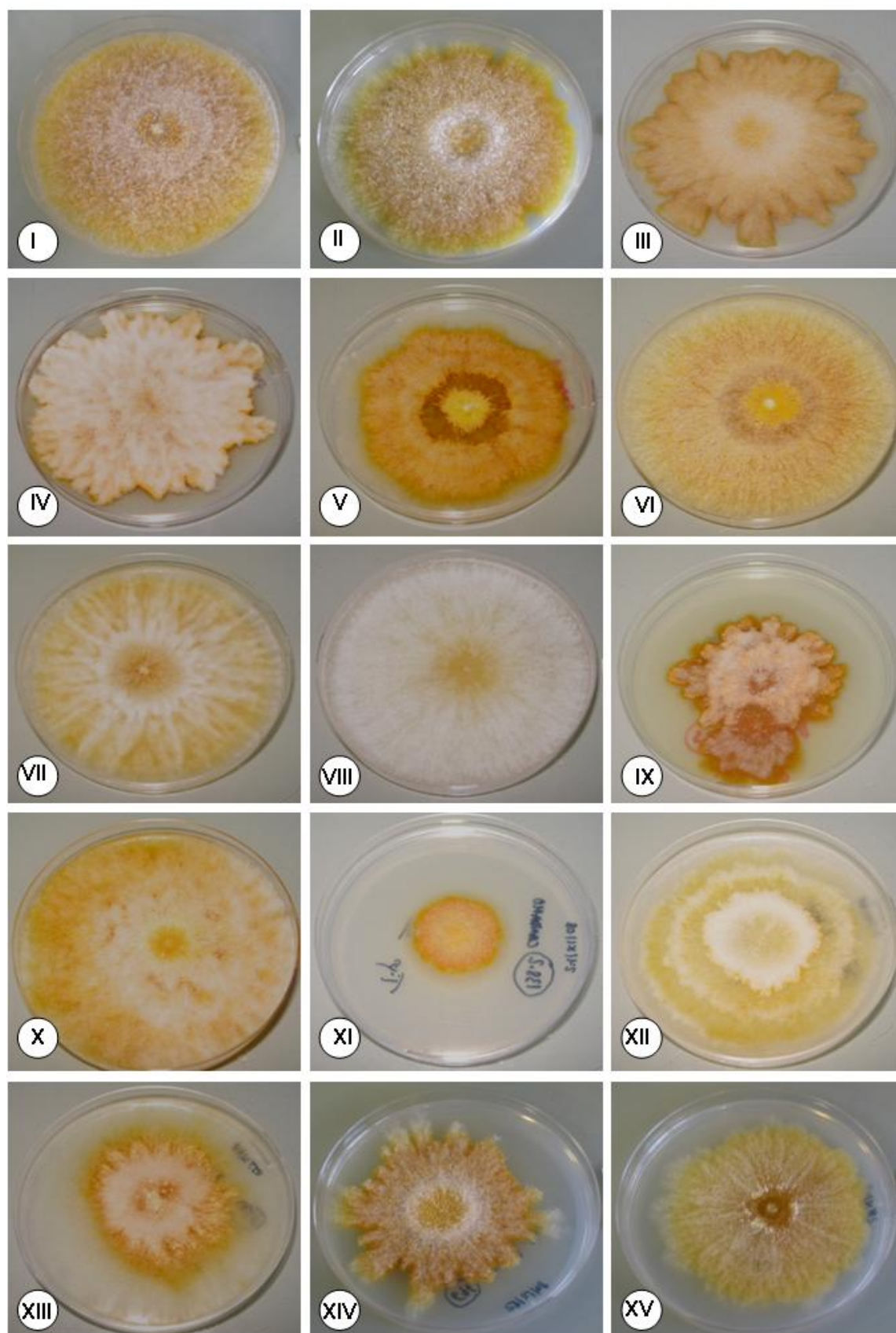


Figura 33: Aspecto de los 15 tipos en los que se agrupan los aislamientos de la colección y cuyas características aparecen recogidas en la Tabla 12.

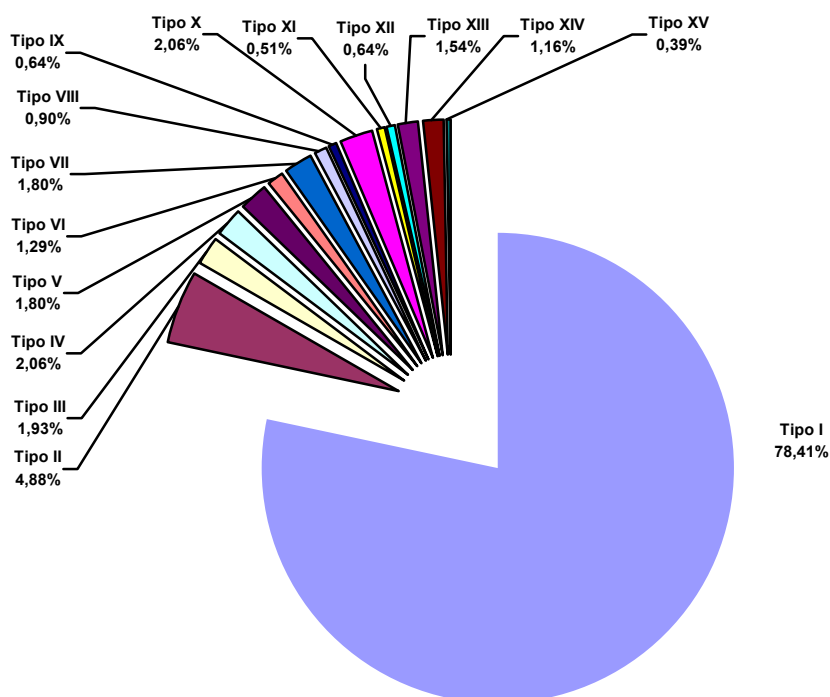


Figura 34: Frecuencia en la que aparecen los distintos tipos morfológicos encontrados en la colección de trabajo.

Teniendo en cuenta el criterio geográfico podemos decir que el tipo I se encontró en casi todos los concejos en los que se detectó la enfermedad, con la excepción de los concejos de Tapia de Casariego, en el que sólo aparece el tipo II, y Villayón, en el que solo aparece el tipo XIV. El tipo II, que aparece en 24 concejos distribuidos por el territorio asturiano, sería el segundo tipo más abundante. El resto de tipos se encuentran en un número variable de concejos, desde los dos del tipo XI a los doce del tipo X.

En la Figura 35 se muestra, por concejos, la distribución de estos 15 tipos morfológicos. Podemos resaltar que los tipos IV, VI, y XI se localizan en la zona central de la provincia, y que los tipos III, V y VII se localizan fundamentalmente en la zona sur-oriental de la provincia.

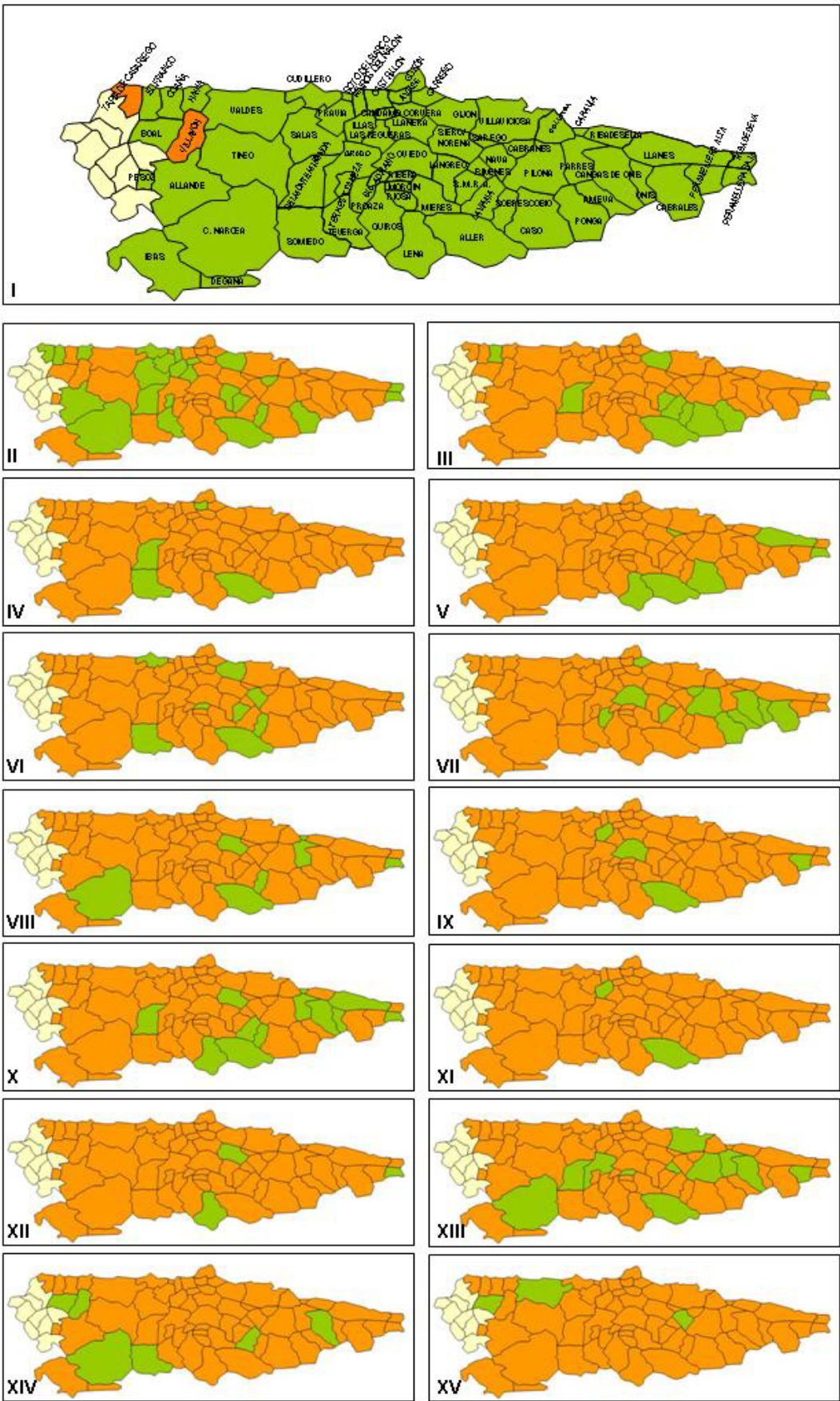


Figura 35: Distribución por concejos de los 15 tipos encontrados en la caracterización morfológica.

Si incluimos las características de color, tanto inferior como superior de la placa y la formación de pústulas, se obtienen los 84 subtipos diferentes que aparecen recogidos en la Tabla 13. El más común fue el subtipo 1.1 con 280 (35,99%) aislamientos, seguido del subtipo 1.4 con 137 (17,61%) aislamientos, por el contrario hay 46 subtipos con un sólo representante.

Tabla 13: Características que presentaban cada uno de los 84 subtipos en que se agrupan los aislamientos de la colección.

Tipo	Subtipo	Color						Formación de pústulas			Nº
		Inferior			Superior						
		Blanco	Amarillo	Naranja	Blanco	Amarillo	Naranja	Alta	Media	Baja	
I	1.1			■			■	■			280
	1.2			■		■		■			58
	1.3			■		■			■		3
	1.4			■	■			■			137
	1.5			■	■				■		3
	1.6			■	■					■	1
	1.7		■				■	■			16
	1.8		■				■		■		1
	1.9		■			■		■			69
	1.10		■			■			■		2
	1.11		■		■			■			25
	1.12		■		■				■		8
	1.13		■		■					■	2
	1.14	■				■			■		1
	1.15	■			■					■	1
	1.16	■				■		■			1
	1.17			■			■		■		1
	1.18			■		■				■	1
II	2.1			■	■			■			3
	2.2			■		■		■			2
	2.3			■			■	■			33
III	3.1			■	■			■			4
	3.2			■	■				■		1
	3.3			■		■		■			2
	3.4			■			■	■			7
	3.5			■			■		■		1
IV	4.1			■	■			■			4
	4.2			■	■				■		5
	4.3			■	■					■	2
	4.4			■		■			■		1
	4.5			■			■	■			3
	4.6			■			■		■		1
V	5.1			■			■	■			10
	5.2			■			■		■		1
	5.3			■			■			■	1
	5.4			■		■			■		1
	5.5			■	■					■	1
VI	6.1			■		■		■			3
	6.2		■		■			■			1
	6.3		■			■		■			3
	6.4			■			■	■			2
	6.5			■			■			■	1
VII	7.1		■		■			■			1
	7.2		■				■	■			1
	7.3			■	■			■			2

Continuación Tabla 13.

Tipo	Subtipo	Color						Formación de pústulas			Nº
		Inferior			Superior			Alta	Media	Baja	
		Blanco	Amarillo	Naranja	Blanco	Amarillo	Naranja				
VIII	7.4			■	■				■		1
	7.5		■		■				■		2
	7.6	■			■			■			1
	7.7		■			■		■			1
	7.8	■			■					■	3
	7.9		■		■					■	1
	7.10			■			■	■			1
	8.1	■			■					■	4
	8.2		■			■		■			2
	8.3		■			■			■		1
IX	9.1			■			■	■			3
	9.2			■			■			■	1
	9.3			■		■		■			1
X	10.1		■			■		■			4
	10.2			■	■			■			1
	10.3			■	■					■	1
	10.4			■		■		■			1
	10.5			■			■	■			9
XI	11.1			■			■			■	1
	11.2			■			■	■			1
	11.3			■		■			■		1
	11.4	■			■					■	1
XII	12.1		■		■			■			1
	12.2		■			■			■		1
	12.3	■			■				■		1
	12.4	■				■				■	1
	12.5	■			■					■	1
XIII	13.1		■			■			■		1
	13.2			■	■					■	1
	13.3			■		■		■			2
	13.4			■		■			■		3
	13.5			■			■	■			3
	13.6			■			■			■	1
	13.7			■			■		■		1
XIV	14.1			■			■	■			7
	14.2			■		■			■		2
XV	15.1		■			■		■			1
	15.2			■		■				■	1
	15.3			■	■					■	1

3.5.- Ensayo de virulencia.

Este ensayo resultó ser de fácil realización, una vez conseguido un buen material vegetal de partida. En la Figura 36 podemos ver las lesiones producidas tanto en oscuridad (a) como bajo iluminación (b).

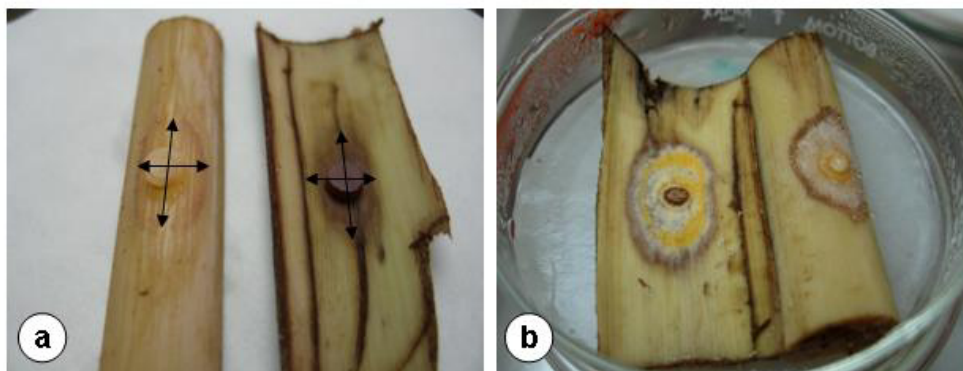


Figura 36: Lesiones producidas en la madera y la corteza. a) Después de cuatro días de incubación. Se representan los diámetros perpendiculares. b) Aspecto del micelio del hongo después de la incubación en oscuridad y unos días en iluminación.

En este ensayo se tomó como referencia el valor medio de la superficie de la lesión producida por las cuatro cepas hipovirulentas control (ATCC52571, CCP19, CCP47 y CCP52), que fue de $1,29 \text{ cm}^2$ sobre la madera y de $1,55 \text{ cm}^2$ sobre la corteza. Estos valores se incrementaron un 10% para tener en cuenta el margen de variación debido al ensayo, considerándose como posibles hipovirulentas aquellas cepas que mostraron lesiones con una superficie menor tanto en madera como en corteza. Este criterio lo cumplieron 168 cepas, lo que supone el 21,59% del total.

Respecto a la formación de pústulas, después de dos semanas en iluminación (fotoperiodo 16 h luz / 8 h oscuridad) se establecieron las tres categorías (alta, media y baja) que se muestran en la Figura 37. En este caso, 192 cepas presentaron un grado medio y bajo, lo que representaría un 24,68% del total.

Si combinamos ambos criterios, podemos decir que 52 cepas, o sea un 6,68% del total, se podrían considerar como portadoras de las características propias de las cepas hipovirulentas. En la Tabla 14 se describen estas cepas.

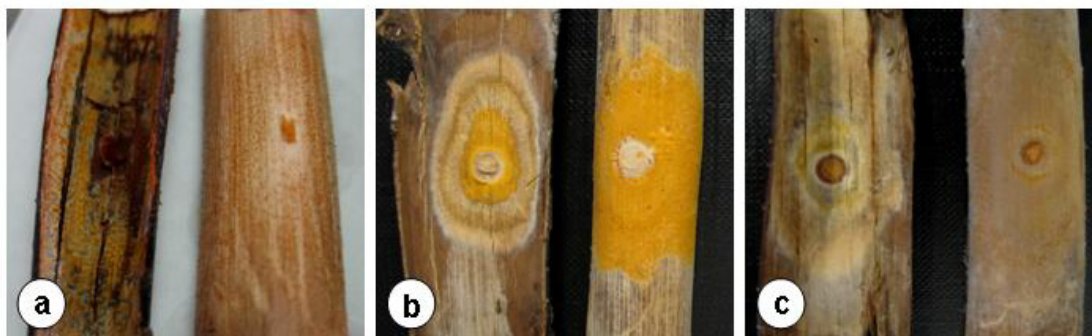


Figura 37. Formación de pústulas después de dos semanas en iluminación. a) Alta (valor 2). b) Media (valor 1). c) Baja (valor 0).

Si relacionamos estos resultados con los tipos encontrados en el ensayo de caracterización morfológica, vemos que 43 de estas 52 cepas pertenecen al Tipo I. Los Tipos II, X y XIII agruparon a dos cepas cada uno, y los tipos VI, VIII y XII a una cepa cada uno (Tabla 14).

Es de destacar, que solo la concordancia con cepas pertenecientes a los subtipos 8.1 y 12.5, que presentaban un color blanco tanto en la parte superior como inferior de la placa y un grado de formación de pústulas bajo, confirmaría la relación entre las características morfológicas descritas para las cepas hipovirulentas y la menor virulencia en el ensayo madera-corteza.

Por otro lado, hay cepas pertenecientes a otros subtipos que presentan algunas de las características descritas para las hipovirulentas, y que han presentado una virulencia muy baja en este ensayo. El subtipo 1.4 presenta un color blanco en la parte superior de la placa y naranja en el inferior además de un grado de formación de pústulas alto. El subtipo 1.16 presenta un color blanco en la parte inferior, amarillo en la superior y un grado de formación de pústulas alto. El subtipo 1.11 que presenta un color inferior amarillo, superior blanco y formación de pústulas alto. Los subtipos 1.9 y 10.1 que presentan color amarillo en la parte superior e inferior y formación de pústulas alto.

Por último, hay correspondencias entre cepas que pertenecen a los subtipos: 1.1, 1.2, 1.7, 1.17, 2.3, 6.1, 10.5, 13.3, 13.7., cuyas características no se corresponderían con las descritas para las cepas hipovirulentas.

Tabla 14: Resultados del ensayo de virulencia madera-corteza. Se muestran sólo las cepas que presentan valores por debajo de la media de los controles con los dos criterios utilizados.

Nº	Ensayo madera-corteza								Caracterización Morfológica	
	1er Criterio						2º Criterio			
	Madera ^(a)			Corteza ^(b)			Pústulas ^(c)			
	a (mm)	b (mm)	Sup. (cm)	c (mm)	d (mm)	Sup. (cm)	1ª Sem.	2ª Sem.	Subtipo	Tipo
LFAH-330	10	8	0,63	8	8	0,50	1	1	1.1	I
LFAH-337	12	11	1,04	9	9	0,64	1	1	1.1	I
LFAH-339	14	12	1,32	16	13	1,63	1	1	1.1	I
LFAH-340	13	8	0,82	8	8	0,50	1	1	1.1	I
LFAH-369	14	10	1,09	12	9	0,85	1	1	1.1	I
LFAH-377	16	11	1,38	11	10	0,86	1	1	1.1	I
LFAH-463	10	8	0,63	13	11	1,12	1	1	1.1	I
LFAH-522	16	11	1,38	12	11	1,04	1	1	1.1	I
LFAH-534	11	8	0,69	10	9	0,71	1	1	1.1	I
LFAH-561	11	10	0,86	12	10	0,94	1	1	1.1	I
LFAH-562	14	9	0,99	9	8	0,56	1	1	1.1	I
LFAH-566	15	9	1,06	18	10	1,41	1	1	1.1	I
LFAH-660	10	9	0,71	10	8	0,63	1	1	1.1	I
LFAH-669	14	9	0,99	8	8	0,50	1	1	1.1	I
LFAH-682	16	11	1,38	13	8	0,82	1	1	1.1	I
LFAH-704	13	7	0,71	8	7	0,44	1	1	1.1	I
LFAH-705	14	9	0,99	10	10	0,78	1	1	1.1	I
LFAH-713	14	10	1,09	11	10	0,86	0	1	1.1	I
LFAH-504	15	9	1,06	11	10	0,86	1	1	1.2	I
LFAH-600	11	10	0,86	8	8	0,50	1	1	1.2	I
LFAH-658	13	8	0,82	8	8	0,50	1	1	1.2	I
LFAH-127	11	8	0,69	10	10	0,78	1	1	1.4	I
LFAH-205	16	10	1,26	9	8	0,56	1	1	1.4	I
LFAH-280	14	7	0,77	8	8	0,50	1	1	1.4	I
LFAH-309	16	10	1,26	15	9	1,06	1	1	1.4	I
LFAH-313	15	10	1,18	9	8	0,56	0	0	1.4	I
LFAH-315	11	9	0,78	10	9	0,71	1	1	1.4	I
LFAH-320	13	9	0,92	8	8	0,50	1	1	1.4	I
LFAH-387	12	9	0,85	14	12	1,32	1	1	1.4	I
LFAH-507	15	10	1,18	20	9	1,41	1	1	1.4	I
LFAH-124	12	12	1,13	8	8	0,50	1	1	1.7	I
LFAH-557	16	11	1,38	11	8	0,69	1	1	1.7	I
LFAH-725	12	9	0,84	14	8	0,88	1	1	1.7	I
LFAH-185	14	9	0,98	16	13	1,63	1	1	1.9	I
LFAH-574	10	9	0,71	15	12	1,41	1	1	1.9	I
LFAH-575	11	9	0,78	10	9	0,71	1	1	1.9	I
LFAH-578	15	11	1,29	11	10	0,86	1	1	1.9	I
LFAH-702	15	10	1,18	8	8	0,50	1	1	1.9	I
LFAH-152	18	10	1,41	11	17	1,47	1	1	1.11	I
LFAH-167	13	7	0,71	14	8	0,88	1	1	1.11	I
LFAH-464	16	10	1,26	11	9	0,78	1	1	1.11	I
LFAH-746	13	10	1,02	7	7	0,38	0	0	1.16	I
LFAH-749	16	9	1,13	9	8	0,56	1	1	1.17	I
LFAH-661	10	7	0,55	8	8	0,50	1	1	2.3	II
LFAH-703	16	9	1,13	7	7	0,38	1	1	2.3	II

Continuación Tabla 14.

N°	Ensayo madera-corteza								Caracterización Morfológica	
	1er Criterio						2º Criterio			
	Madera ^(a)			Corteza ^(b)			Pústulas ^(c)			
	a (mm)	b (mm)	Sup. (cm)	c (mm)	d (mm)	Sup. (cm)	1ª Sem.	2ª Sem.	Subtipo	Tipo
LFAH-662	13	9	0,92	12	8	0,75	1	1	6.1	VI
LFAH-314	12	9	0,85	8	8	0,50	0	0	8.1	VIII
LFAH-543	14	9	0,99	15	10	1,18	1	1	10.1	X
LFAH-542	14	10	1,09	16	10	1,26	1	1	10.5	X
LFAH-354	11	7	0,60	9	8	0,56	1	1	12.5	XII
LFAH-279	12	10	0,94	8	8	0,50	1	1	13.3	XIII
LFAH-530.2	14	9	0,99	13	10	1,02	1	1	13.7	XIII

^(a) Medidas de los dos diámetros perpendiculares (a y b) y superficie de la lesión sobre la madera.

^(b) Medidas de los dos diámetros perpendiculares (c y d) y superficie de la lesión sobre la corteza.

^(c) Formación de pústulas; 1 = medio y 0 = bajo.

De estas 52 cepas sólo nueve (LFAH-463, 507, 522, 530.2, 562, 566, 574, 660 y 746) se correspondieron con posibles chancros hipovirulentos en las anotaciones de campo.

3.6.- Actividad del enzima lacasa.

Tomando como criterio el color del medio de cultivo tras el crecimiento del hongo (Figura 38), de las 471 cepas ensayadas, 34 (7,22%) resultaron tener una tonalidad menor o igual a la presentada por la cepa control hipovirulenta (ATCC-52571) (Tabla 15).

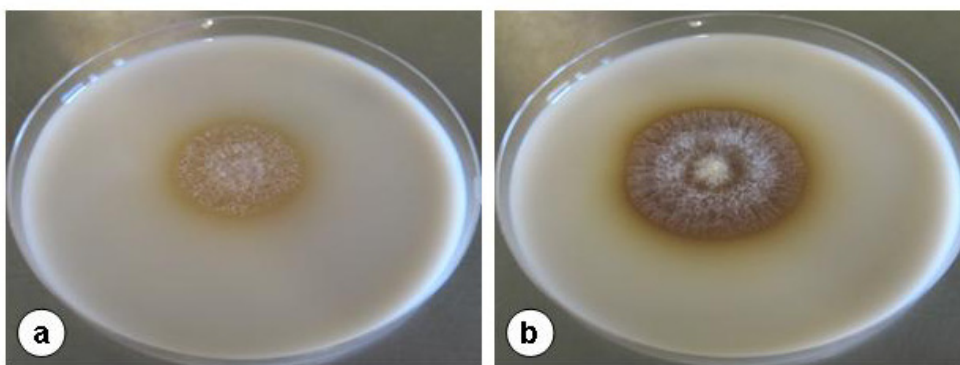


Figura 38: Test de Bavendamm con el que se observa el cambio de color del medio en la zona de crecimiento activo del hongo. a) Cepa control hipovirulenta (ATCC-52571). b) Cepa virulenta.

Al analizar los valores de absorbancia a 405 nm obtenidos para los testigos negativos de todas las placas, no hubo diferencias significativas entre las series (Prueba t; $t = -1,13$; $gl = 12$; $P = 0,28$), por lo que se utilizó como representativo el valor medio de cada par de datos. Además, se comprobó que dichos valores se ajustaban a una distribución normal (Kolmogorov-Smirnov: $Z = 0,44$; $N=13$; $P > 0,99$). El valor de la media de los testigos negativos fue $\bar{X} = 0,22$, y la desviación típica $dt = 0,04$, por lo que el intervalo en el que se incluirían el 95% de las muestras resultó $(0,13; 0,30)$. En la Tabla 15, podemos ver que 60 cepas tuvieron valores de absorbancia inferiores a este valor.

Al relacionar los datos obtenidos con los dos criterios empleados para evaluar la actividad del enzima lacasa, hemos encontrado resultados coincidentes en 29 aislamientos. Sin embargo, se encontraron otras 26 cepas que podrían ser hipovirulentas según solamente uno de los criterios (Tabla 15).

Si combinamos estos resultados con los de la caracterización morfológica, se observa que las 34 cepas que podrían ser hipovirulentas según los resultados obtenidos con el medio Bavendamm, se repartieron en 26 de los 84 subtipos morfológicos

encontrados. De igual forma, las 60 cepas, que podrían ser hipovirulentas según los resultados obtenidos mediante la lectura de la absorbancia a 405 nm, se repartieron en 33 de los subtipos morfológicos (Tabla 15).

Tabla 15: Resultados obtenidos con los dos criterios utilizados para evaluar la actividad del enzima lacasa.

Nº de cepa	Subtipo ^(a)	Bavendamm ^(b)	Espectrofotómetro (95%) ^(c)	Nº de cepa	Subtipo ^(a)	Bavendamm ^(b)	Espectrofotómetro (95%) ^(c)
LFPAH 379	1.1		■	LFPAH 623	6.4	■	■
LFPAH 584	1.2	■		LFPAH 142	7.1	■	■
LFPAH 7	1.5		■	LFPAH 555	7.3	■	■
LFPAH 124	1.7		■	LFPAH 353	7.4		■
LFPAH 331	1.7	■	■	LFPAH 747	7.6		■
LFPAH 116	1.9		■	LFPAH 536	7.8		■
LFPAH 228	1.9		■	LFPAH 554	7.8		■
LFPAH 368	1.9	■	■	LFPAH 358	8.3	■	
LFPAH 399	1.9		■	LFPAH 180	10.1	■	■
LFPAH 573	1.9		■	LFPAH 545	10.1		■
LFPAH 574	1.9		■	LFPAH 201	10.4	■	■
LFPAH 575	1.9		■	LFPAH 359	10.5	■	■
LFPAH 577	1.9		■	LFPAH 542	10.5	■	
LFPAH 602	1.9		■	LFPAH 745	10.5		■
LFPAH 607	1.9		■	LFPAH 776	10.5	■	■
LFPAH 615	1.9		■	LFPAH 784	10.5	■	■
LFPAH 94	1.11		■	LFPAH 71.1	11.2	■	■
LFPAH 100	1.11		■	LFPAH 138.2	11.3	■	
LFPAH 129.1	1.11		■	LFPAH 305	12.1		■
LFPAH 202	1.11		■	LFPAH 326	12.3	■	■
LFPAH 312	1.11		■	LFPAH 328	12.4	■	■
LFPAH 149	1.12		■	LFPAH 354	12.5	■	■
LFPAH 552	1.14	■	■	LFPAH 391	13.4	■	■
LFPAH 746	1.16	■	■	LFPAH 530.2	13.7		■
LFPAH 676	2.2	■		LFPAH 692	14.1	■	■
LFPAH 250	2.3	■	■	LFPAH 694	14.1	■	■
LFPAH 258	2.3	■	■	LFPAH 696	14.1	■	■
LFPAH 450	3.3	■	■	LFPAH 767	14.1	■	■
LFPAH 39	3.4	■	■	LFPAH 772	14.1	■	■
LFPAH 29	4.2		■	LFPAH 538	14.2	■	■
LFPAH 81	4.5		■	LFPAH 683	14.2		■
LFPAH 778	4.6		■	LFPAH 756	15.1	■	■
LFPAH 176	5.5	■	■				

(a) Subtipos resultantes de la caracterización morfológica. (b) Cepas que podrían ser hipovirulentas según los resultados con el medio Bavendamm. (c) Cepas que podrían ser hipovirulentas según los resultados con el espectrofotómetro.

Según las anotaciones de campo, las cepas LFPAH-530.2, 555, 574, 615, 683, 745, 746 y 747, corresponderían a chancros con aspecto coincidente con el descrito para los hipovirulentos.

Al comparar los resultados de este ensayo, con los del ensayo madera-corteza, vemos que dos cepas, LFPAH-746 y 354, han podido ser consideradas como

hipovirulentas según todos los criterios estudiados. Otras cuatro cepas, LFPAH-124, 574, 575 y 530.2, han resultado hipovirulentas según los resultados de virulencia en madera-corteza y la absorbancia, y una cepa, LFPAH-542, ha resultado hipovirulenta según la virulencia en madera-corteza y el Bavendamm (Tabla 16).

Tabla 16: Comparación de los resultados obtenidos con el ensayo de virulencia madera-corteza y la actividad del enzima lacasa.

CEPA	Subtipo	Ensayo madera-corteza	Actividad del enzima lacasa	
			Medio	Absorbancia
			Bavendamm	(405nm)
LFPAH-124	1.7	■		■
LFPAH-354	12.5	■	■	■
LFPAH-530.2	13.7	■		■
LFPAH-542	10.5	■	■	
LFPAH-574	1.9	■		■
LFPAH-575	1.9	■		■
LFPAH-746	1.16	■	■	■

- Cepa considerada hipovirulenta para cada uno de los ensayos de virulencia.

3.7.- Amplificación de secuencias arbitrarias (RAPD).

Para realizar esta técnica se ensayó el producto obtenido por el método de lisis por choque térmico, pero no se obtuvo amplificación por lo que se utilizó el ADN obtenido por el método que denominamos lisis ayudada por micropistilos.

En cuanto a la optimización del método realizada, no se observó variación en las amplificaciones obtenidas al usar las tres diluciones del ADN total ensayadas (1:2, 1:5 y 1:10) por lo que se optó por trabajar con el ADN sin diluir, para evitar contaminaciones por la manipulación y también porque era menos laborioso.

La técnica resultó repetible en las amplificaciones realizadas y, en cuanto a la reproducibilidad, no se obtuvieron diferencias en el resultado de las amplificaciones al utilizar el ADN de tres extracciones distintas, ni al utilizar termocicladores diferentes en distintos laboratorios, ni con operadores diferentes.

Los iniciadores SER-6, OPR-01, SER-8 (Figura 39a) y OPB-10 (Figura 39b), mostraron un único perfil para las cepas de *C. parasitica* ensayadas y diferente del de la cepa fuera de grupo.

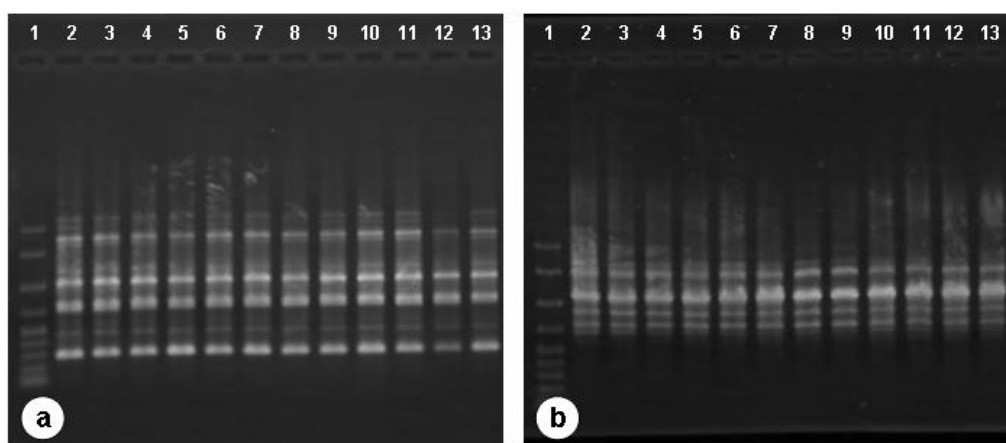


Figura 39: Resultado de la amplificación RAPD en cepas asturianas de *C. parasitica*. a) Perfil de bandas con el iniciador SER-8: Calle 1: Marcador de peso molecular. Calles 2 a 13: LFAH-203, 204, 205, 206, 391, 392.1, 393.1, 394, 270, 353, 228, 229. b) Perfil de bandas con el iniciador OPB-10: Calle 1: Marcador de peso molecular. Calles 2 a 13: LFAH-203, 204, 205, 206, 391, 392.1, 393.1., 394, 270, 353, 228, 229.

Con el iniciador SER-21 se obtuvieron tres perfiles diferentes, totalmente repetibles y reproducibles, por lo que se consideraron tres RAPD-tipo distintos (R-A1, R-A2 y R-A3). El R-A1 agrupó a 21 de las 24 cepas ensayadas (Figura 40a, Calles 2 a 11; Figura 40b, Calles 3 a 13). El R-A2 agrupó a tres de las cepas ensayadas (Figura 41a, Calles 12 y 13; Figura 41b, Calle 2). El R-A3 correspondió con la cepa fuera de grupo.

Dos de las cepas agrupadas por el R-A2 pertenecen al concejo de San Martín del Rey Aurelio (LFAH-190 y LFAH-192) y la otra al concejo de Ribadesella (LFAH-203). Es de destacar que aún perteneciendo a concejos diferentes y relativamente alejados, ambas pertenecen al mismo grupo de compatibilidad vegetativa, el que denominamos EU-13.

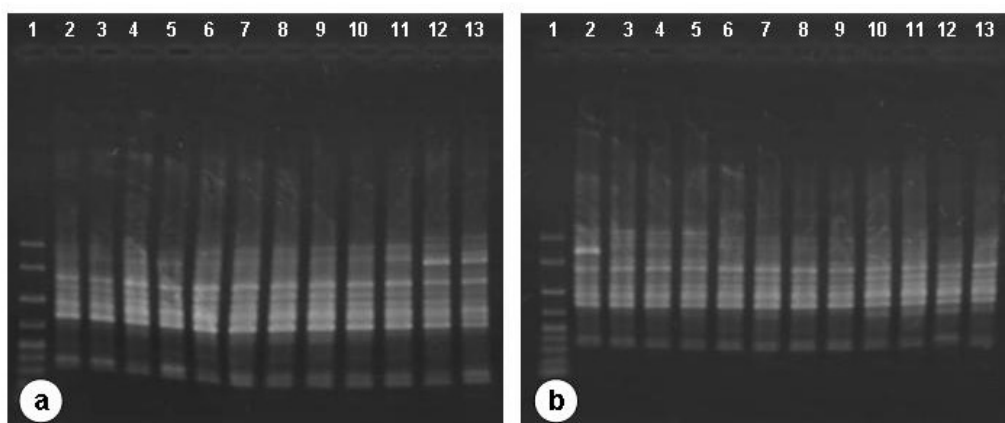


Figura 40: Resultado de la amplificación RAPD en cepas asturianas de *C. parasitica*. Perfil de bandas con el iniciador SER-21. a) Calle 1: Marcador de peso molecular. Calles 2-13: LFAH-221, 218, 217, 265, 161, 160, 159, 185, 193, 191, 190, 192. b) Calle 1: Marcador de peso molecular. Calles 2-13: LFAH-203, 204, 205, 206, 391, 392.1, 393.1, 394, 270, 353, 228, 229.

Con el iniciador SER-14 se han encontrado cinco perfiles diferentes que, igual que en el caso anterior, fueron totalmente repetibles y reproducibles. En este caso se asignaron cinco RAPD-tipo (R-B1 a R-B5). El R-B1 agrupó a 14 de las 24 cepas ensayadas (Figura 41a, Calles 6 a 9 y Calles 12 y 13; Figura 41b, Calles 2 a 7 y Calles 9 y 10). El R-B2 agrupó a dos cepas (Figura 41a, Calles 10 y 11). El R-B3 agrupó a cuatro cepas (Figura 41a, Calles 2 a 5). El R-B4 agrupó a dos cepas (Figura 41b, Calles 11 y 12). El R-B5 correspondió a la cepa fuera de grupo (Figura 41b, Calle 8).

Las cuatro cepas pertenecientes al R-B3 (LFPAH-203, LFPAH-204, LFPAH-205 y LFPAH-206) provenían del concejo de Ribadesella.

Las dos cepas pertenecientes al R-B4 (LFPAH-190 y LFPAH-192) provenían del concejo de San Martín del Rey Aurelio y correspondían al grupo de compatibilidad vegetativa PA-II. Otras dos cepas de este mismo concejo (LFPAH-191 y LFPAH-193), que pertenecían a un grupo de compatibilidad vegetativa distinto, el PA-I, presentaron un perfil diferente y se agruparon en el R-B1.

También se vieron diferencias entre las cepas del concejo de Cabrales. Dos de ellas (LFPAH-270 y LFPAH-353) se agruparon en el R-B1 y las dos restantes (LFPAH-228 y LFPAH-229) en el R-B2. Este hecho resulta destacable ya que en los ensayos de compatibilidad ambos habían mostrado una zona de contacto más marcada pero sin llegar a producir barreras.

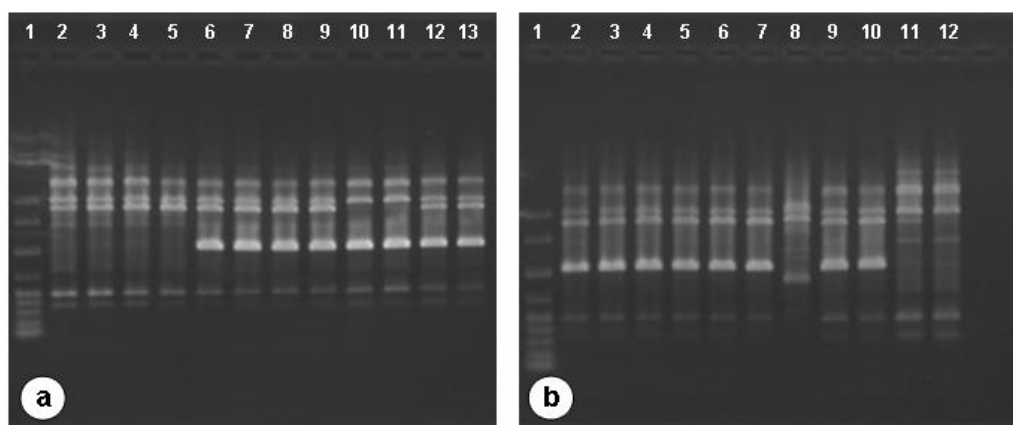


Figura 41: Resultado de la amplificación RAPD en cepas asturianas de *C. parasitica*. Perfil de bandas con el iniciador SER-14. a) Calle 1: marcador de peso molecular. Calles 2-13: LFPAH-203, 204, 205, 206, 391, 392, 393, 394, 270, 353, 228, 229. b) Calle 1: marcador de peso molecular. Calles 2-13: LFPAH-221, 218, 217, 265, 161, 160, *E. turcicum*, 193, 191, 190, 192.

Con los iniciadores OPA-04, SER-17, S, OPB-6, A, OPS-19 y ERIC-2, los perfiles RAPD no fueron consistentes ni fáciles de interpretar por lo que se descartó la utilización de estos iniciadores.

Estos resultados animan a ampliar el estudio a un mayor número de cepas de la colección del SERIDA.

Puesto que la técnica parecía tener un buen potencial para diferenciar, se aplicó también a diferentes especies pertenecientes a la familia *Cryphonectriaceae* (Tabla 1), utilizando dos de los iniciadores que mostraron un perfil idéntico para todas las cepas de *C. parasitica* asturianas ensayadas. Así, con el iniciador OPB-10 se obtuvieron seis RAPD-tipo distintos (R-C1 a R-C6). El R-C1 agrupa a los aislamientos de *C. parasitica* de origen asturiano (Figura 42, Calles 9 a 16). El R-C2 agrupa al aislamiento europeo de *C. parasitica* y a la especie *C. gyrosa* (Figura 42, Calles 6 y 8). El R-C3 agrupa a los aislamientos de *C. parasitica* de origen americano (Figura 42, Calles 17 a 20). El R-C4 agrupa las cepas de *C. cubensis* y *C. havanensis* (Figura 42, Calles 2 y 7). El R-C5 agrupa a las cepas de *C. nitschkei* y *C. macrospora* (Figura 42, Calles 3 y 5). El R-C6 se corresponde con la cepa de *C. radicalis* (Figura 42, Calle 4).

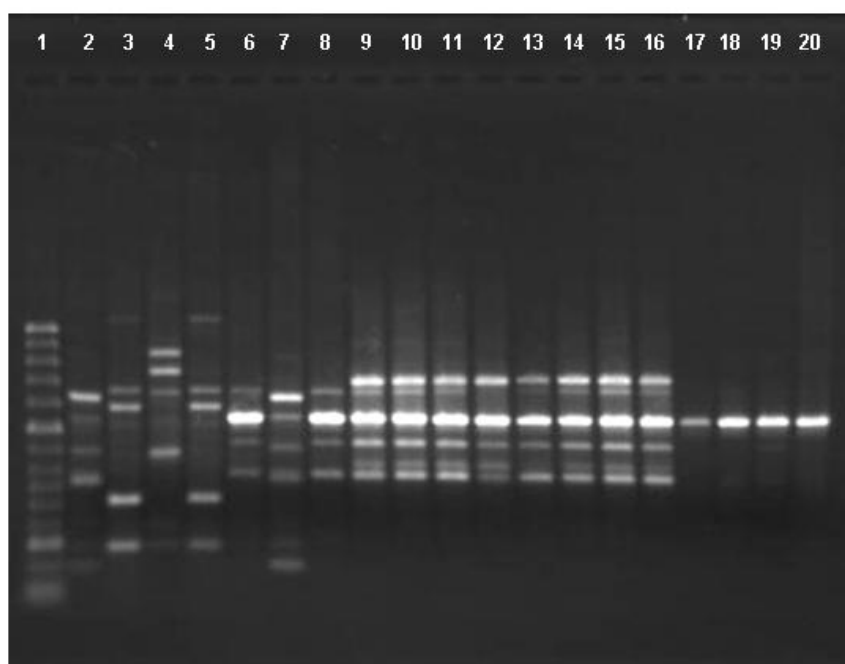


Figura 42: Resultado de la amplificación RAPD en cepas pertenecientes a diferentes especies de la familia *Cryphonectriaceae*. Perfil de bandas con el iniciador OPB-10. Calle 1: marcador de peso molecular. Calle 2: *C. cubensis*. Calle 3: *C. nitschkei*. Calle 4: *C. radicalis*. Calle 5: *C. macrospora*. Calle 6: *C. gyrosa*. Calle 7: *C. havanensis*. Calle 8: *C. parasitica* de origen europeo. Calles 9 a 16: Aislamientos asturianos de *C. parasitica*. Calles 17 a 20: Cepas de *C. parasitica* de origen americano.

Los tipos R-C1 y R-C2, que engloban a las especies de *C. parasitica* asturianas y europea, son muy similares y se diferencian solamente en una banda. Cabe destacar que el R-C4 agrupó dos cepas de especies diferentes, que en la actualidad se corresponden con la misma especie que recibe el nombre de *Chrysosporthe cubensis*.

Con el iniciador SER-8 se han obtenido cinco RAPD-tipo (R-D1 a R-D5). El R-D1 agrupa a las cepas de *C. parasitica* de origen asturiano, europeo y americano, además de la cepa de *C. gyrosa* (Figura 43, Calles 8 a 20 y Calle 6). El R-D2 agrupa a las cepas de *C. nitschkei* y *C. macrospora* (Figura 43, Calles 3 y 5). El R-D3 coincide con la cepa de *C. cubensis* (Figura 43, Calle 2). El R-D4 se corresponde con la cepa de *C. havanensis* (Figura 43, Calle 7). El R-D5 con la de *C. radicalis* (Figura 43, Calle 4).

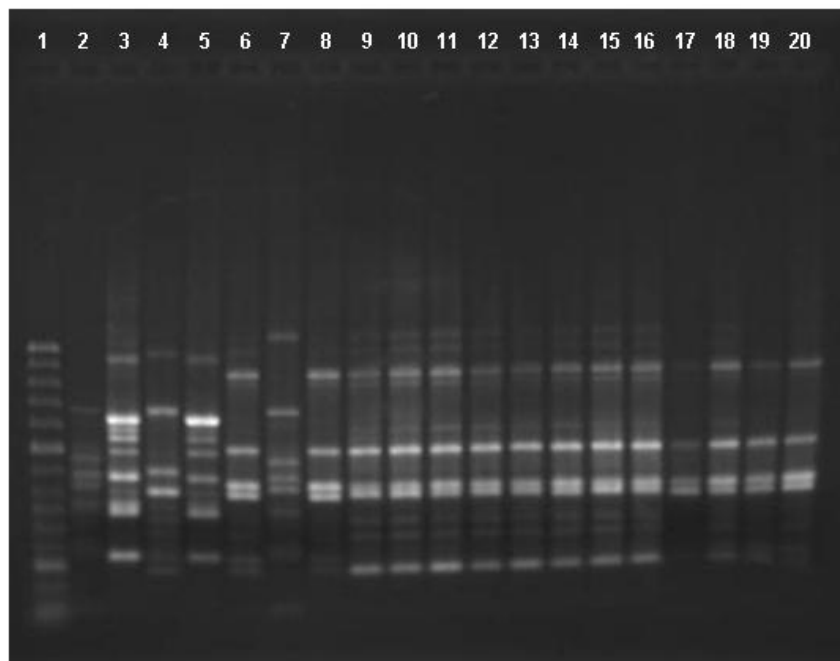


Figura 43: Resultado de la amplificación RAPD en cepas pertenecientes a diferentes especies de la familia *Cryphonectriaceae*. Perfil de bandas con el iniciador SER-8. Calle 1: marcador de peso molecular. Calle 2: *C. cubensis*. Calle 3: *C. nitschkei*. Calle 4: *C. radicalis*. Calle 5: *C. macrospora*. Calle 6: *C. gyrosa*. Calle 7: *C. havanensis*. Calle 8: *C. parasitica* de origen europeo. Calles 9 a 16: Aislamientos asturianos de *C. parasitica*. Calles 17 a 20: Cepas de *C. parasitica* de origen americano.

Los tipos R-D3 y R-D4 son muy similares diferenciándose sólo en una banda y agrupan a las dos cepas que ahora pertenecen a la especie *Chr. cubensis* y que con el anterior iniciador aparecían agrupadas en el mismo RAPD-tipo.

Por tanto, la técnica RAPD ha sido útil para diferenciar especies de la familia *Cryphonectriaceae* y ha permitido agrupar cepas de distintos orígenes, por lo que se va a seguir aplicando a una serie mayor de cepas pertenecientes a esta familia para corroborar estos resultados.

3.8.- Microsatélites (Simple Sequence Repeats, SSR).

De los 16 loci analizados, siete (CPG6, CPE4, CpSI006, CpSI0032, CpSI054, CPE5, CPG7) resultaron ser monomórficos y nueve polimórficos, cinco con dos alelos (CPE1, CPG3, I07-650, CpSI009, CPE3), tres con tres alelos (CpSI072, CPE8, CPG4) y uno con cuatro alelos (CPG4) (Tabla 17).

Tabla 17: Alelos encontrados para cada loci.

		loci															
		CPE1	CPG6	CPG3	CPE4	CpSI006	CpSI032	CpSI072	I07-650	CpSI009	CPG4	CPE3	CPE8	CpSI054	CPE5	CPG14	CPG7
Alelos	nº	2	1	2	1	1	1	3	2	2	4	2	3	1	1	3	1
	Tamaño ^(a)	167 (1) ^(b)	263 (3)	235 (4)	250 (6)	165 (7)	464 (8)	348 (9)	312 (12)	185 (14)	225 (16)	211 (20)	132 (22)	310 (25)	278 (26)	292 (27)	253 (30)
		131 (2)		253 (5)				337 (10)	315 (13)	167 (15)	208 (17)	213 (21)	135 (23)			281 (28)	
								340 (11)			228 (18)		150 (24)			269 (29)	
											222 (19)						

^(a) Valor de cada alelo en pares de bases.

^(b) Número de orden que se ha asignado a cada alelo para hacer la matriz presencia/ausencia (Tabla 18).

Los 16 loci microsatélites utilizados amplificaron correctamente en las condiciones descritas en material y métodos, excepto el locus CPE4 que no consiguió amplificar, a pesar de repetirse el ensayo cuatro veces, en cuatro cepas: LFPAH-214, LFPAH-379, LFPAH-343 y LFPAH-470, por lo que se desestimó su utilización.

Los ensayos con las cepas que mostraron alelos distintos, también se repitieron para confirmar esas diferencias.

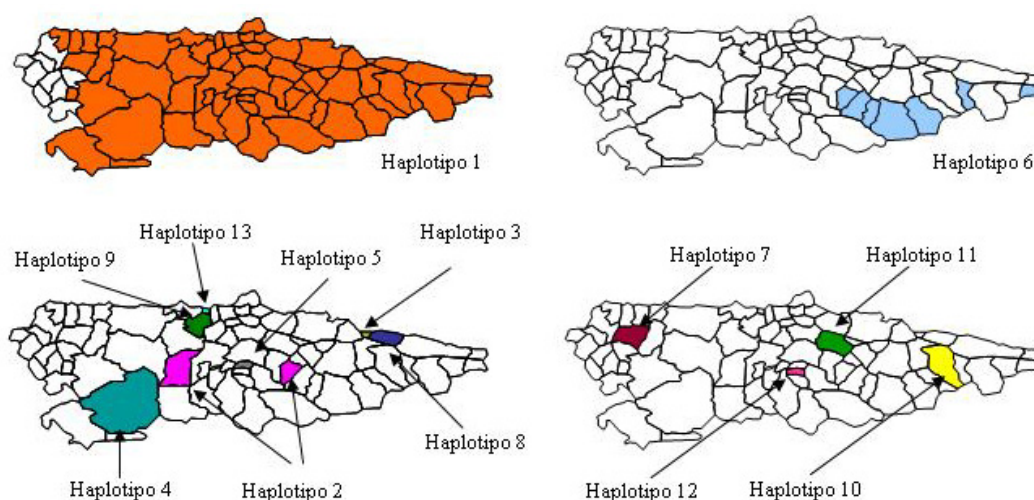
De forma similar a lo descrito por Milgroom *et al.*, 1992 y McGuire *et al.*, 2005, para cada muestra se determinó la presencia (1) o ausencia (0) de los 30 alelos. Se consideraron loci independientes y se trataron como caracteres binarios. De esta forma se detectaron 13 haplotipos diferentes (Tabla 18).

Tabla 18: Haplotipos encontrados según la matriz de presencia / ausencia.

Haplotipo	Genotipo según la presencia/ausencia ^(a)						n ^{o(b)}
1	10110	11110	01010	10001	01001	11001	166
2	10110	11110	01010	10001	00101	11001	2
3	10110	11110	01010	00011	01001	11001	1
4	10110	11110	01010	00101	01001	11001	1
5	10110	11110	00110	10001	01001	11001	1
6	10110	11101	01001	10001	01001	10101	9
7	10110	11101	01001	01000	11001	10101	2
8	10110	11110	01010	10001	01001	10011	1
9	10110	11110	01010	10001	01001	10101	1
10	10110	11100	11001	10001	01001	10101	1
11	10110	11101	01010	10001	01001	10101	1
12	01101	11110	01010	10001	01001	10101	1
13	10110	11110	01010	10001	00011	11001	2

^(a) El orden de los 30 alelos sigue el que se describe en la Tabla 17. ^(b) Número de aislamientos que pertenecen a cada haplotipo.

De estos 13 haplotipos, el más común fue el haplotipo 1 que agrupó a 166 aislamientos (87,83%) y se encontró en todas las masas afectadas (Figura 44). El haplotipo 6 agrupó nueve aislamientos (4,75%) y se localizó en la zona sur-oriental. El resto de haplotipos se encuentran repartidos por todo el territorio asturiano, agrupando los haplotipos 2, 7 y 13 dos aislamientos cada uno (1,06%) y los haplotipos 3, 4, 5, 8, 9, 10, 11 y 12 un aislamiento cada uno (0,53%).

**Figura 44: Distribución geográfica de los distintos haplotipos encontrados.**

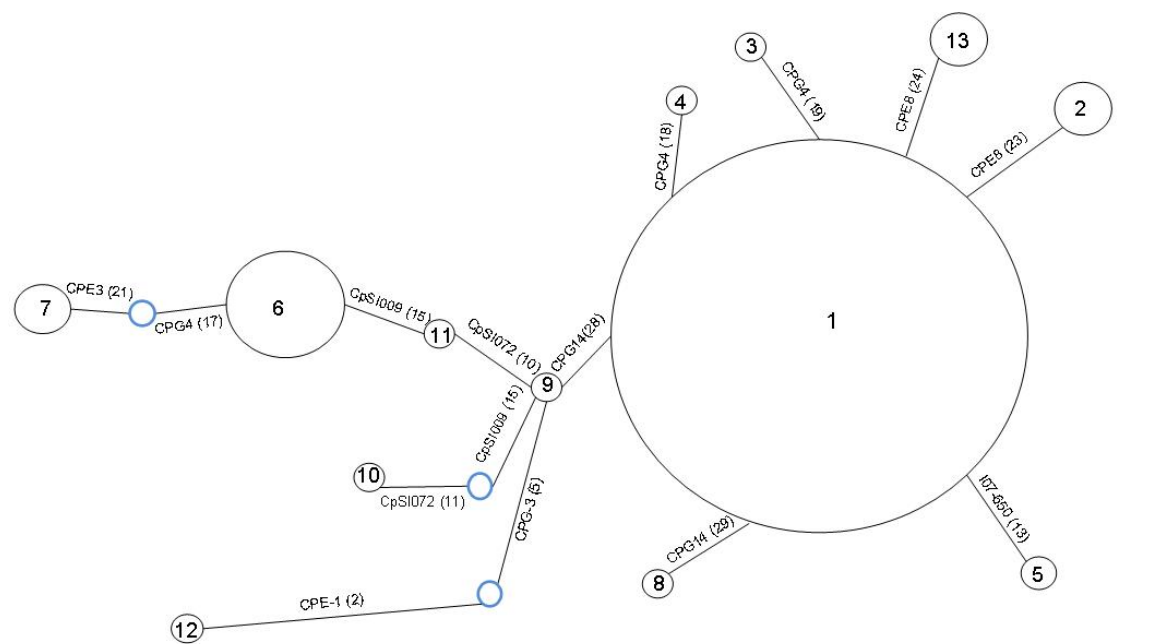
Si relacionamos los haplotipos con los idiomorfos *MAT* vemos que dentro de las cepas pertenecientes al haplotipo 1, la proporción de idiomorfos *MAT* fue 2:1, de tal manera que 109 (65,66%) correspondieron al *MAT*-1 y 56 (33,74%) al *MAT*-2. También pertenece a este haplotipo el heterocarionte estudiado. Para el haplotipo 2, esta proporción fue 1:1, con una cepa perteneciente al *MAT*-1 y otra perteneciente al *MAT*-2. Todas las cepas de los haplotipos 6, 10 y 13 pertenecieron al *MAT*-1 y las de los haplotipos 3, 4, 5, 7, 8, 9, 11 y 12 al *MAT*-2 (Tabla 19).

Al combinar los haplotipos con los GCV, se encontró una clara relación, de tal forma que ningún haplotipo se encuentra en dos GCV distintos. El GCV EU-1 agrupó a los haplotipos 1, 2, 3, 4, 5, 8, 9 y 13. El GCV EU-13 agrupó a los haplotipos 6, 7, 10 y 11. El GCV EU-3 se correspondió con el haplotipo 12 (Tabla 19).

Tabla 19: Relación entre los haplotipos, idiomorfos *MAT* y GCV.

		Haplotipos												
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
Loci ^(a)	CPE1	167	*(b)	*	*	*	*	*	*	*	*	*	131	*
	CPG6	263	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
	CPG3	235	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	253	*
	CPE4	250	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
	CpSI006	165	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
	CpSI032	464	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
	CpSI072	348	*	*	*	*	337	337	*	*	340	337	*	*
	I07-650	312	*	*	*	315	*	*	*	*	*	*	*	*
	CpSI009	185	*	*	*	*	167	167	*	*	167	*	*	*
	CPG4	225	*	222	228	*	*	208	*	*	*	*	*	*
	CPE3	211	*	*	*	*	*	213	*	*	*	*	*	*
	CPE8	132	135	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	150
	CpSI054	310	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
	CPE5	278	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
	CPG14	292	*	*	*	*	281	281	269	281	281	281	281	*
	CPG7	253	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
Idiomorfos ^(c)	MAT-1	109	1				9				1			2
	MAT-2	56	1	1	1	1		2	1	1		1	1	
	MAT-1/2	1												
GCV ^(d)	EU-1	166	2	1	1	1			1	1				2
	EU-13						9	2			1	1		
	EU-3												1	

(a) Valor de cada alelo en pares de bases. (b) * Mismo valor en pares de bases que el haplotipo 1 para cada locus. (c) Número de cepas de cada uno de los idiomorfos *MAT* que pertenecen a cada haplotipo. (d) Número de cepas de cada GCV que pertenecen a cada haplotipo.



de este en un solo locus (haplotipos 2, 3, 4, 5, 8, 9 y 13). El GCV EU-13 agrupó al haplotipo 6 y a todos los haplotipos que se diferencian de este en un solo locus (haplotipos 7, 10 y 11). El GCV EU-3 correspondió con el haplotipo 12.

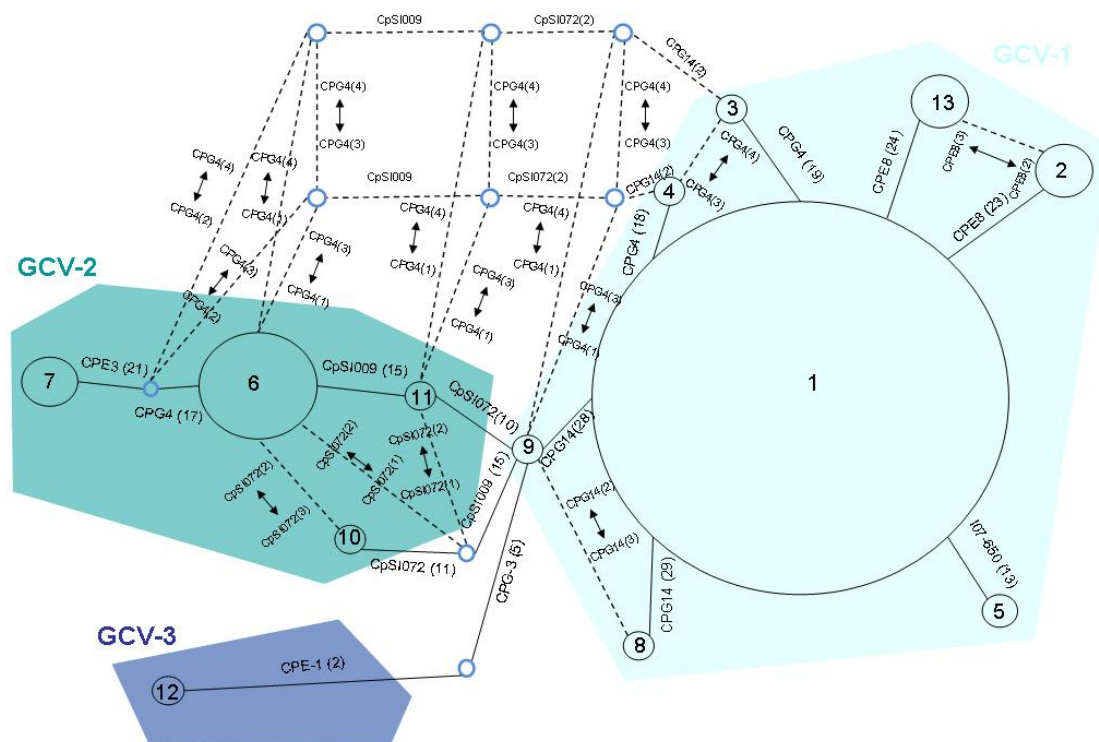


Figura 46: Relación entre los haplotipos del hongo *C. parasitica* y los GCV. Las líneas discontinuas serían cambios hipotéticos que no se han encontrado y ayudan a remarcar el carácter tridimensional de este tipo de representación. Las tres áreas sombreadas agrupan los haplotipos que pertenecen a cada GCV.

La combinación de estos resultados avalaría el carácter clonal de la población de *C. parasitica* en Asturias, y podría sugerir que ha habido tres introducciones diferentes del patógeno, una que se correspondería con el haplotipo 1, otra con el haplotipo 6 y por último, la del haplotipo 12, de las que, probablemente por mutaciones, se habrían generado el resto de haplotipos.

3.9.- Ensayo *in vitro* de productos fitosanitarios.

En el ensayo *in vitro* realizado se ha encontrado una gran diferencia de eficacia entre las diferentes materias activas probadas, así el Azoxistrobin (25%) y la mezcla de Ofurace (6%) + Folpet (32%) + Cimoxanilo (3%), no consiguieron inhibir el crecimiento del hongo a ninguna de las concentraciones ensayadas.

El efecto de los cuatro productos restantes varió considerablemente (Tabla 20). Con el Captan (85%) el crecimiento del hongo fue escaso, pero solo fue capaz de producir la inhibición total del crecimiento de la cepa LFPAH-140 cuando alcanzó la concentración de 128 µg/ml, de las cepas LFPAH-1, LFPAH-14.1, LFPAH-23 y LFPAH-150 a la concentración de 512 µg/ml, y de las cepas LFPAH-147, ATCC-52571 y CCP-52 a la concentración de 1.024 µg/ml. Además, mostró una actividad fungistática a todas las concentraciones ensayadas.

El Epoxiconazol (12,5%), por el contrario, inhibió totalmente el crecimiento de las ocho cepas ensayadas a la concentración de 1 µg/ml, y mostró un efecto fungicida para todas ellas ya desde esa concentración.

La mezcla de Carbendazima (20%) + Flutriafol (9,4%) produjo la inhibición total del crecimiento para las ocho cepas ensayadas a la concentración de 1 µg/ml y se mostró como fungicida para la cepa LFPAH-14.1 a esta concentración, mientras que lo fue a 2 µg/ml para las cepas LFPAH-150, ATCC-52571 y CCP-52 y a 4 µg/ml para las cepas LFPAH-1, LFPAH-23, LFPAH-140 y LFPAH-147. Por debajo de estas concentraciones se comportó como fungistática.

La mezcla de Flusilazol (0,5%) + Carbendazima (1%) inhibió el crecimiento de todas las cepas ensayadas a la concentración de 1 µg/ml. Se mostró como fungicida a partir de la concentración de 4 µg/ml para las cepas LFPAH-1, LFPAH-150 y CCP-52 y de 8 µg/ml para las cepas LFPAH-14.1, LFPAH-23, LFPAH-140, LFPAH-147 y ATCC-52571. Por debajo de estas concentraciones se comportó como fungistática.

Tabla 20: Resultado del ensayo *in vitro* de fitosanitarios. Se representan las concentraciones a las que se inhibió el crecimiento para cada una de las cepas ensayadas con las materias activas indicadas.

		CEPAS	CONCENTRACIONES DE ENSAYO (µg/ml)											
			1	2	4	8	16	32	64	128	256	512	1024	
MATERIAS ACTIVAS	EPOXICONAZOL 12,5%	LFP AH-1	■ ¹	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	
		LFP AH-14.1	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	
		LFP AH-23	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	
		LFP AH-140	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	
		LFP AH-147	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	
		LFP AH-150	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	
		ATCC-52571	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	
		CCP-52	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	
	CARBENDAZIMA 20% + FLUTRIAFOL 9,4%	LFP AH-1	□ ²	□	■	■	■	■	■	■	■	■	■	
		LFP AH-14.1	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	
		LFP AH-23	□	□	■	■	■	■	■	■	■	■	■	
		LFP AH-140	□	□	■	■	■	■	■	■	■	■	■	
		LFP AH-147	□	□	■	■	■	■	■	■	■	■	■	
		LFP AH-150	□	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	
		ATCC-52571	□	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	
		CCP-52	□	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	
	FLUSILAZOL 0,5% + CARBENDAZIMA 1%	LFP AH-1	□	□	■	■	■	■	■	■	■	■	■	
		LFP AH-14.1	□	□	□	■	■	■	■	■	■	■	■	
		LFP AH-23	□	□	□	■	■	■	■	■	■	■	■	
		LFP AH-140	□	□	□	■	■	■	■	■	■	■	■	
		LFP AH-147	□	□	□	■	■	■	■	■	■	■	■	
		LFP AH-150	□	□	■	■	■	■	■	■	■	■	■	
		ATCC-52571	□	□	□	■	■	■	■	■	■	■	■	
		CCP-52	□	□	■	■	■	■	■	■	■	■	■	
	CAPTAN 85%	LFP AH-1											□	□
		LFP AH-14.1											□	□
		LFP AH-23											□	□
		LFP AH-140									□	□	□	□
		LFP AH-147												□
		LFP AH-150											□	□
		ATCC-52571												□
		CCP-52												□

(■¹) Actividad fungicida. (□²) Actividad fungistática.

Por tanto, podemos concluir que tres de los productos ensayados, Epoxiconazol (12,5%), la mezcla de Carbendazima (20%) + Flutriafol (9,4%) y la mezcla de Flusilazol (0,5%) + Carbendazima (1%), han sido eficaces en el control *in vitro* del hongo, sin embargo por su actuación fungicida en todas las concentraciones, existe una mayor eficacia en el caso del Epoxiconazol (12,5%).

3.10.- Ensayo *in vivo* de productos fitosanitarios.

Durante el primer año, las observaciones realizadas a las 126 plantas de castaño ya mostraron diferencias en el aspecto de los chancros inoculados. En la Figura 47 podemos ver el aspecto del chancro tratado de forma curativa y localizada respecto al testigo (47c y 47b).

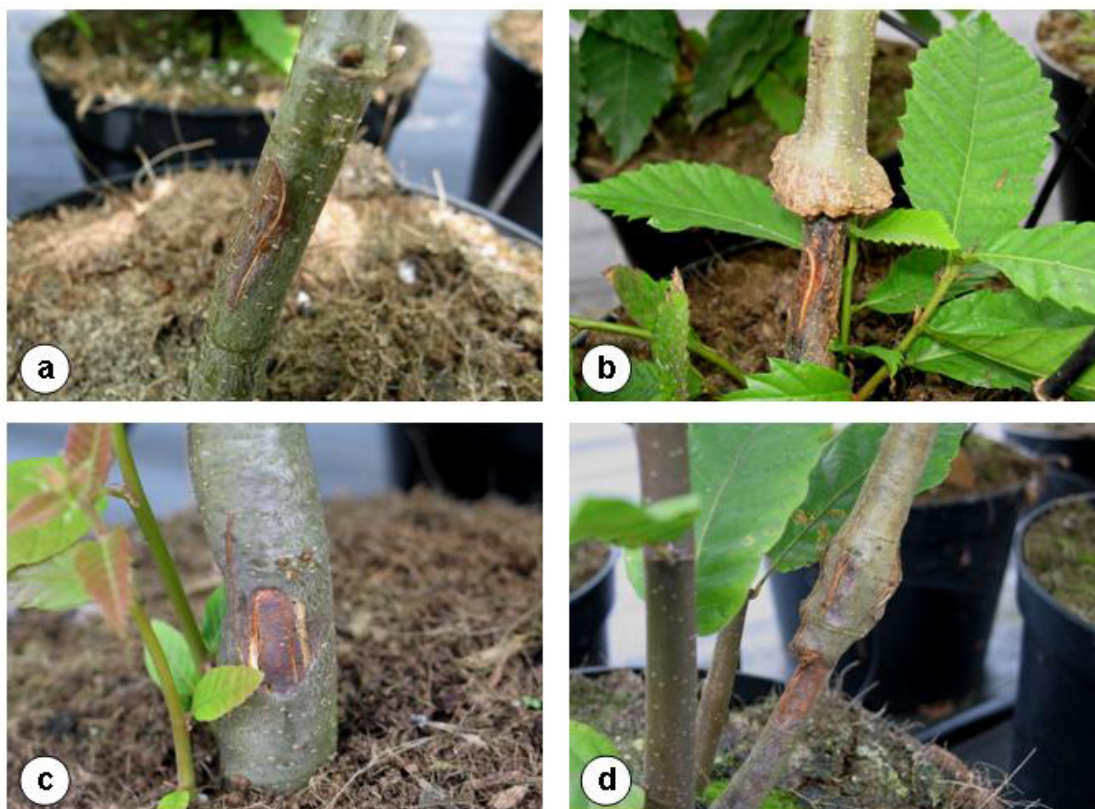


Figura 47: Diferencias observadas en los daños producidos por el hongo el primer año del ensayo K de productos fitosanitarios. a) Chancro en el momento de retirar el film de laboratorio. b) Chancro de uno de los testigos inoculados y no tratados. c) Chancro después del tratamiento curativo por contacto. d) Chancro después del tratamiento preventivo.

En cuanto al análisis de los datos, se obtuvieron diferencias significativas en la lesión producida (ANOVA; $F_{2, 97} = 4,14$; $P < 0,05$) entre el control y los tres tipos de tratamientos, preventivo (T1), curativo por pulverización (T2) y curativo por aplicación localizada (T3). Entre tratamientos, hubo diferencias significativas entre T1 y T3, mientras que no hubo diferencias significativas entre T1 y T2, ni entre T2 y T3 (Figura 48a).

También se obtuvieron diferencias significativas en la lesión producida (ANOVA; $F_{2,97} = 5,17$; $P < 0,001$) entre el control y los tres productos utilizados (Figura 48b). Entre productos, hubo diferencias significativas entre el Epoxiconazol (12,5%) y la mezcla de Carbendazima (20%) + Flutriafol (9,4%), mientras que no hubo diferencias significativas entre el Epoxiconazol (12,5%) y la Carbendazima (50%), ni entre la Carbendazima (50%) y la mezcla de Carbendazima (20%) + Flutriafol (9,4%) (Figura 48b).

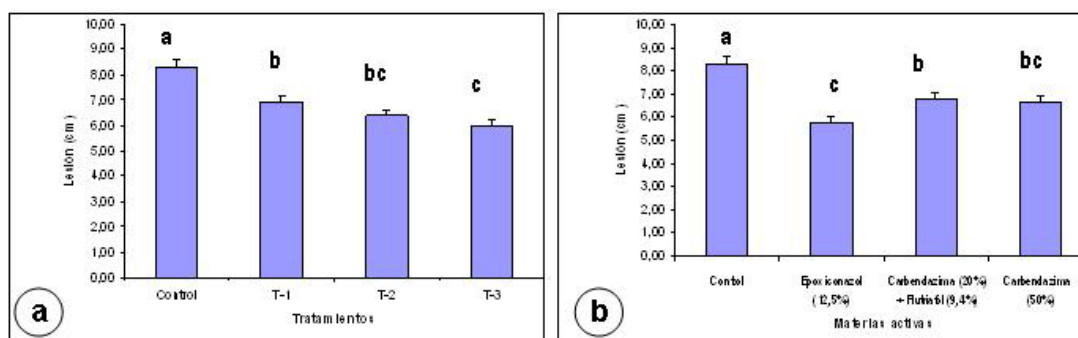


Figura 48: a) Relación entre la lesión y los tratamientos. b) Relación entre la lesión y los productos. Columnas con la misma letra no son significativamente diferentes.

En el caso de las grietas se obtuvieron diferencias significativas (KRUSKALL-WALLIS; $\chi^2 = 11,27$; $gl = 3$; $P < 0,05$) entre el control y el tratamiento T3 (curativo por aplicación localizada), mientras que no hubo diferencias significativas entre tratamientos (Figura 49a). Tampoco se obtuvieron diferencias significativas (KRUSKALL-WALLIS; $\chi^2 = 6,39$; $gl = 3$; $P = 0,094$) entre el control y los productos utilizados, ni entre productos (Figura 49b).

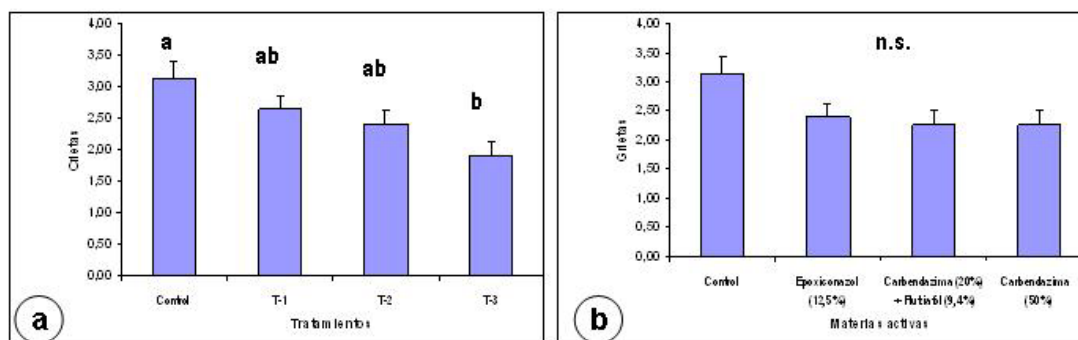


Figura 49: a) Relación entre las grietas y los tratamientos. b) Relación entre las grietas y los productos. Columnas con la misma letra no son significativamente diferentes. (n.s.) no significativo.

En cuanto a la formación de pústulas se obtuvieron diferencias significativas (KRUSKALL-WALLIS; $\chi^2 = 12,80$; gl = 3; $P < 0,01$) entre el control y el tratamiento T3 (curativo por aplicación localizada), mientras que no hubo diferencias significativas entre tratamientos (Figura 50a). También se obtuvieron diferencias significativas (KRUSKALL-WALLIS; $\chi^2 = 20,16$; gl = 3; $P < 0,001$) entre el control y el Epoxiconazol (12,5%) y entre el control y la Carbendazima (50%) (Figura 50b). Entre productos solo hubo diferencias significativas entre el Epoxiconazol (12,5%) y la mezcla de Carbendazima (20%) + Flutriafol (9,4%) (Figura 50b).

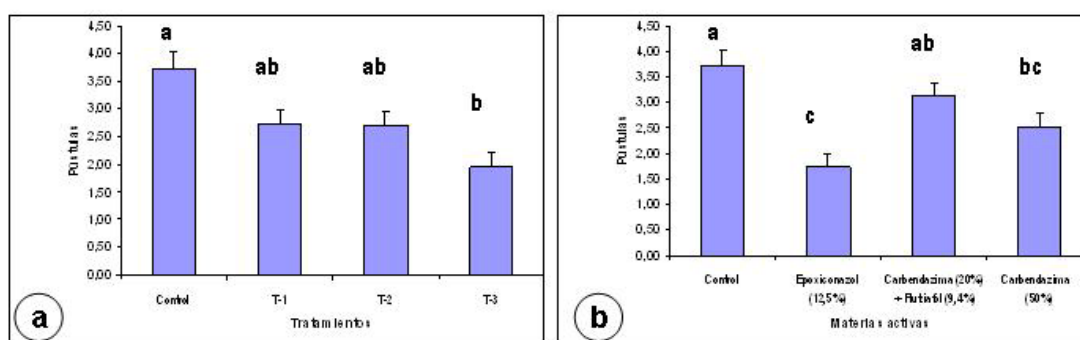


Figura 50: a) Relación entre la formación de pústulas y los tratamientos. b) Relación entre la formación de pústulas y los productos. Columnas con la misma letra no son significativamente diferentes.

Con los datos obtenidos durante los tres años de ensayo, se obtuvieron diferencias significativas en la lesión producida (KRUSKALL-WALLIS; $\chi^2 = 25,01$; gl = 2; $P < 0,001$) entre el control y los tratamientos, mientras que no hubo diferencias significativas entre tratamientos (Figura 51a). También se obtuvieron diferencias significativas en la formación de pústulas (KRUSKALL-WALLIS; $\chi^2 = 27,68$; gl = 3; $P < 0,001$) entre el control y los tres productos ensayados, mientras que no hubo diferencias significativas entre productos (Figura 51b).

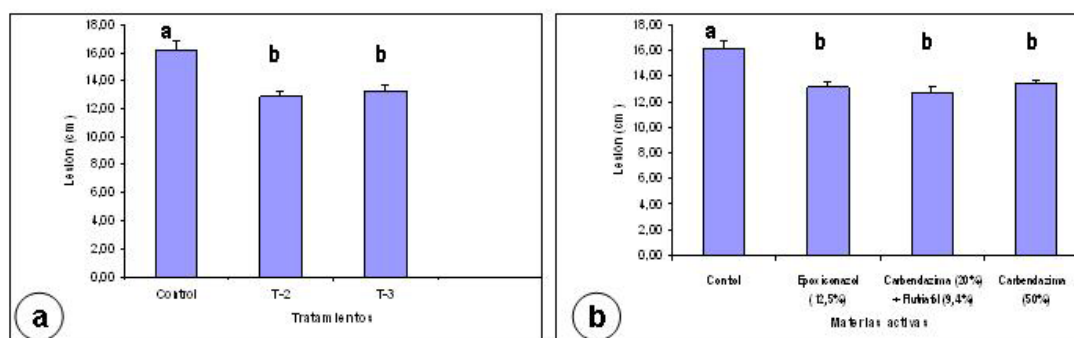


Figura 51: a) Relación entre la lesión y los tratamientos. b) Relación entre la lesión y los productos. Columnas con la misma letra no son significativamente diferentes.

En el caso de las grietas se obtuvieron diferencias significativas (KRUSKALL-WALLIS; $\chi^2 = 28,31$; gl = 2; $P < 0,001$) entre el control y los tratamientos, mientras que no hubo diferencias significativas entre tratamientos (Figura 52a). Se obtuvieron diferencias significativas (KRUSKALL-WALLIS; $\chi^2 = 18,13$; gl = 3; $P < 0,001$) entre el control y los tres productos ensayados, mientras que no hubo diferencias significativas entre productos (Figura 52b).

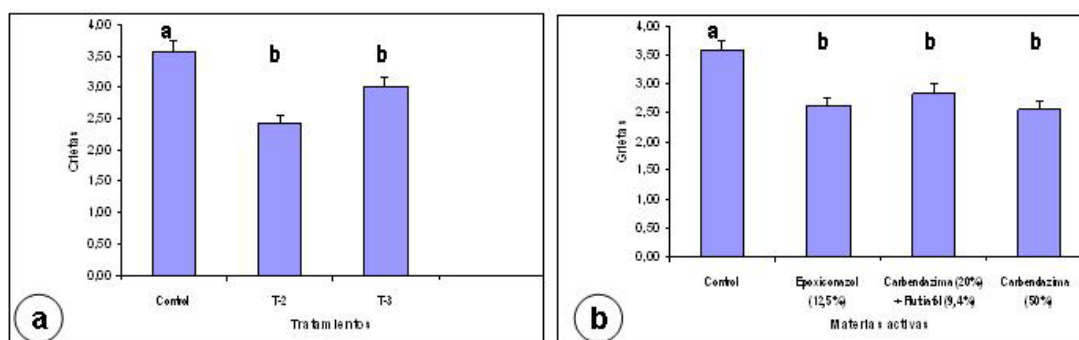


Figura 52: a) Relación entre la formación de grietas y los tratamientos. b) Relación entre la formación de grietas y los productos. Columnas con la misma letra no son significativamente diferentes.

En cuanto a la formación de pústulas se obtuvieron diferencias significativas (KRUSKALL-WALLIS; $\chi^2 = 23,53$; gl = 2; $P < 0,001$) entre el control y los tratamientos, y no hubo diferencias significativas entre tratamientos (Figura 53a). Se obtuvieron diferencias significativas (KRUSKALL-WALLIS; $\chi^2 = 23,56$; gl = 3; $P < 0,001$) entre el control y los tres productos ensayados, mientras que no hubo diferencias significativas entre productos (Figura 53b).

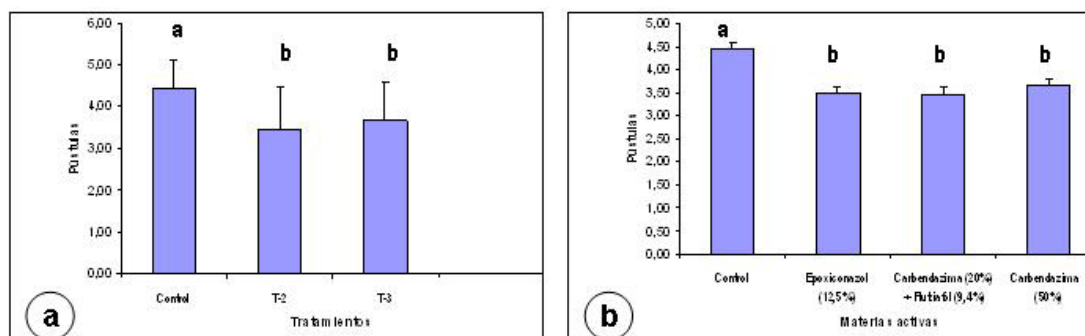


Figura 53: a) Relación entre la formación de pústulas y los tratamientos. b) Relación entre la formación de pústulas y los productos. Columnas con la misma letra no son significativamente diferentes.

Además, al final del tercer año se observaron diferencias en el porcentaje de rebrotes sanos, entre el control y los tipos de tratamientos y los distintos productos (Figura 54).



Figura 54: Aspecto de las plantas al final del tercer año del ensayo *in vivo* de fitosanitarios. a) Testigo con todos los rebrotes sanos. b) Árbol inoculado con todos los rebrotes afectados. c) y d) Árboles inoculados y tratados con los rebrotes sanos.

En la Figura 55, se representa el porcentaje de rebrotes sanos que se encontró en el control, en los tratamientos y en los productos.

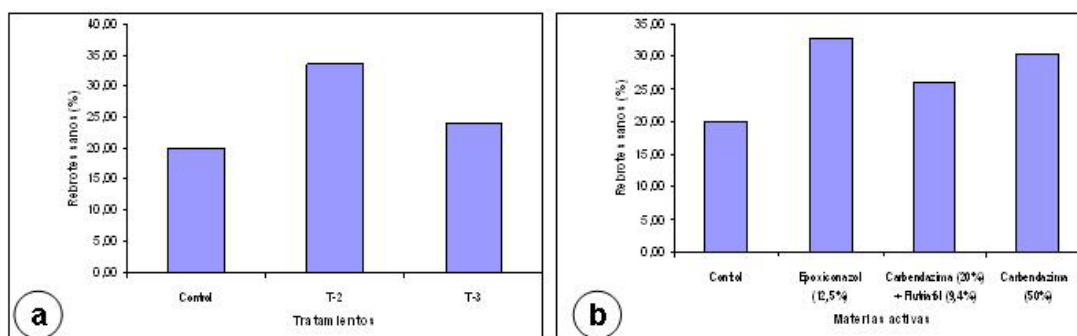


Figura 55: Porcentaje de rebrotes sanos. a) Resultados del control frente a los tratamientos. b) Resultados del control frente a las tres materias activas utilizadas.

Todo ello parece indicar que las diferencias entre las distintas materias utilizadas y los diferentes tipos de tratamientos, fueron disminuyendo con el tiempo a medida que avanzó el ensayo, y aunque ha habido diferencias significativas de los datos obtenidos con los tratamientos con respecto a los testigos, esto no ha impedido que la enfermedad esté presente y siga avanzando. En este sentido, entendemos que los beneficios de los posibles tratamientos no compensan los inconvenientes y gastos ocasionados por la aplicación de los mismos.

4.- DISCUSIÓN

Durante la prospección realizada se ha comprobado la falta de tratamientos selvícolas en la mayor parte de las masas de castaño asturianas, situación que ya señalaban Valdezate *et al.* en el año 2001 y que también se ha observado en otras comunidades autónomas cercanas como Castilla y León (Martín, 2003). Este estado de abandono favorecería la dispersión de la enfermedad, ya que la correcta gestión del bosque y unas buenas prácticas selvícolas, además de mantener un buen estado vegetativo de las masas, son necesarias para frenar el avance de la enfermedad independientemente del método de control utilizado (Griffin, 1986). Así, en Castilla y León, se empezó en 2003 una campaña de apeos fitosanitarios y podas como medida de contención en los lugares donde el grado de infección es aún medio o bajo (Martín, 2003).

Es de señalar que debido a la peculiar distribución del castaño en el Principado de Asturias, se utilizó como unidad de muestreo el concejo, a pesar de ser un término administrativo. Este planteamiento también fue seguido en anteriores trabajos realizados en la provincia (Muñoz y Cobos, 1990; Muñoz y Cobos, 1991; Valdezate *et al.*, 2001) y facilitó la organización de los resultados, de tal manera que todos los aislamientos, obtenidos en los distintos puntos de muestreo dentro un mismo concejo, formaron una población, de forma similar al procedimiento seguido también en otros países (Robin *et al.*, 2000).

Una consecuencia de este estado de abandono podría ser la rápida dispersión que la enfermedad está teniendo en los castañares asturianos. Esta situación queda reflejada con la detección de la enfermedad en 69 de los 78 concejos del Principado de Asturias, nueve más de los encontrados en el último muestreo realizado en la provincia en el año 2000 (Valdezate *et al.*, 2001). Se ha encontrado el patógeno en once concejos más que en ese muestreo, por el contrario no se ha detectado el hongo en dos concejos que en aquella ocasión sí se había detectado. Esto podría ser debido a que en algunos de estos concejos, los castaños están muy dispersos y aislados, un ejemplo lo tenemos en el concejo de Muros del Nalón, en el que se aisló el hongo en el muestreo del 89/90, no se aisló en 2000 (Valdezate *et al.*, 2001) y en esta ocasión ha vuelto a aislarse.

En algunos concejos (Allande, Gijón, Ibias, Llanera, Quirós, Somiedo, Tapia de Casariego, Teverga y Villaviciosa), aunque se encontraron masas que estaban afectadas,

también se observaron algunos puntos de muestreo sanos, situación que ya destacaban Valdezate *et al.* (2001) referida sólo al concejo de Teverga.

Los nueve concejos en los que de momento no se ha detectado la enfermedad quedan encuadrados en la zona occidental asturiana, en la que como ya apuntaban Valdezate *et al.* las masas de castaño no son tan abundantes y el tránsito de madera ha sido y es menos intenso que en el resto de la provincia.

La baja variabilidad encontrada, referida a los grupos de compatibilidad vegetativa, coincide con lo descrito por otros autores para zonas donde el patógeno lleva poco tiempo establecido, como en Portugal (Gouveia *et al.*, 2001), norte de los Alpes (Hoeger *et al.*, 2000) y Alemania (Robin y Heiniger, 2001). Esta situación es coincidente con la baja diversidad que presenta el hongo en Europa, que a su vez es menor que la que presenta en Norte América (Milgroom y Cortesi, 1999) y mucho menor que la encontrada en Asia, de donde es nativo el hongo, y donde se puede llegar a encontrar la situación de que cada aislamiento pertenece a un único GCV (Liu y Milgroom, 2007).

Los tres grupos de compatibilidad vegetativa encontrados se correspondieron con los grupos europeos: EU-1, EU-3 y EU-13. El EU-1 es el mayoritario y agrupó al 94,60% de los aislamientos, encontrándose en todos los concejos infectados, en 55 de ellos como único GCV y en 14 concejos en unos porcentajes que van desde el 66,67% al 95,49%. Este grupo es uno de los más distribuidos por Europa y se ha citado su presencia en Bosnia-Herzegovina, Francia (este), Hungría, Italia, Suiza, Austria, Alemania y Portugal (Robin y Heiniger, 2001; Robin *et al.*, 2009; Cortesi *et al.*, 1998). Por lo que se refiere a España, también se encontró como mayoritario en Castilla y León (Aguín *et al.*, 2005, Zamora *et al.*, 2008) y presente en Galicia (Aguín *et al.*, 2008; Montenegro *et al.*, 2008) y Cataluña (Trestic *et al.*, 2001).

El EU-13 agrupó al 5,14% de los aislamientos y se encontró en la zona sur oriental de la provincia, fundamentalmente en los concejos del alto Nalón, que fue donde se detectó la enfermedad por primera vez en Asturias. Además, también lo encontramos en el occidente asturiano en los concejos de Cangas del Narcea y Boal. Este grupo también ha sido citado en Italia (Cortesi *et al.*, 1998), Eslovaquia

(Adamčíková *et al.*, 2006), Hungría (Robin y Heiniger, 2001), Bosnia-Herzegovina (Trestic *et al.*, 2001) y en poblaciones del suroeste de Francia (Robin *et al.*, 2009).

Por último, el GCV minoritario, EU-3, está representado solamente por dos aislamientos (0,26%) pertenecientes a los concejos de Morcín y Sobrescobio. Este grupo se ha citado también en Italia (Cortesi *et al.*, 1998), suroeste de Francia (Robin *et al.*, 2000) y Bosnia-Herzegovina (Trestic *et al.*, 2001).

En todos los concejos el número de GCV observados (S) fue menor que el esperado ($g_{\max}$), excepto en el concejo de Morcín. Esto es debido a que en ellos aparecen el EU-1 y el EU-13, que se diferencian en cuatro genes de compatibilidad vegetativa; sin embargo, en Morcín se encuentran el EU-1 y el EU-3 que sólo se diferencian en un gen de compatibilidad vegetativa (Cortesi y Milgroom, 1988). Para los 55 concejos en los que sólo se encontró un GCV, el índice de diversidad de Shannon tomó el valor $H' = 0$, la diversidad genotípica $\hat{G} = 1$, y la uniformidad $E_5 = 0$. En los 14 concejos restantes, en los que aparecieron más de dos GCV, estos índices tomaron unos valores de $H' = 1,18 - 0,75$; $\hat{G} = 1,09 - 1,80$ y $E_5 = 0,47 - 0,89$. Los valores de estos índices reflejan la baja diversidad del patógeno en la comunidad asturiana, pero son difíciles de comparar con los obtenidos por otros autores, debido fundamentalmente a la diferente escala geográfica y al número de aislamientos tomados por cada muestra (Robin y Heiniger, 2001), aspectos que afectan claramente a la estimación de la diversidad (Grünwald *et al.*, 2003; Sotirovski *et al.*, 2004).

La zona que comprende los concejos cercanos al alto Nalón es donde se detectaron los primeros focos de la enfermedad en Asturias (Molina, 1984; Valdezate *et al.*, 2001), y podría haber sido el lugar de introducción del patógeno extendiéndose luego al resto de la Comunidad Autónoma.

Por lo que respecta a la diferente proporción en que encontramos estos tres GCV, puede ser debida a varias causas. Una primera hipótesis sería que los tres grupos se hubiesen introducido a la vez, y que el EU-1 se hubiese adaptado mejor a las condiciones ambientales asturianas, por lo que se habría distribuido con mayor rapidez. Una segunda hipótesis sería que hubiese habido diferentes introducciones en el tiempo, de tal manera que el primero en llegar habría sido el EU-1, que habría tenido más

tiempo para dispersarse, seguido del EU-13 y por último del EU-3. Esta segunda situación planteada, se ve apoyada por el hecho de que otros autores han descrito al EU-1 como uno de los GCV que primero se introdujeron en Europa (Robin *et al.*, 2009). Aunque se han realizado otros trabajos de prospección de la enfermedad en la provincia (Muñoz y Cobos, 1990; Valdezate *et al.*, 2001), esta es la primera vez que se conoce el número y distribución de los GCV por lo que no podemos saber cual de las dos hipótesis es la correcta y habría que seguir muestreando en el futuro para conocer la dinámica poblacional del hongo en la región y la evolución de estos grupos minoritarios.

Muy relacionada con esta baja variabilidad, en cuanto a los grupos de compatibilidad vegetativa, está la proporción de los idiomorfos *MAT-1* y *MAT-2* encontrada. En el Principado de Asturias se encontró una proporción 3:1 a favor del *MAT-1*, situación que se aleja significativamente de la relación 1:1 esperada de una población en la que está ocurriendo la reproducción sexual. Aunque en este trabajo se están considerando las poblaciones individualmente por concejos, para este apartado tiene más sentido tratar todos los aislamientos como una única población correspondiente al Principado de Asturias, ya que los 27 concejos en los que se ha encontrado uno de los idiomorfos solamente, se encuentran rodeados por concejos que tienen el opuesto, por lo que debido a su proximidad, podrían llegar a encontrarse en las masas de zonas limítrofes y, si se dieran las condiciones adecuadas, producirse la reproducción sexual.

El número de heterocariontes encontrados representa un porcentaje muy bajo, situación que también se ha descrito por otros autores (McGuire *et al.*, 2004). El hecho de que los heterocariontes pertenezcan a su vez al grupo de compatibilidad vegetativa EU-1, añadiría otra hipótesis para explicar la predominancia de este grupo sobre el resto (Robin *et al.*, 2000), ya que, no sólo pertenecería a este grupo la descendencia resultante de la reproducción asexual sino que, también sería del mismo grupo, la descendencia resultante de la reproducción sexual. Esto facilitaría, además, la dispersión de este grupo a mayor distancia, ya que las ascosporas resultantes de este tipo de reproducción pueden ser diseminadas a mayores distancias por el viento (Griffin, 1986).

El hecho de que el número de GCV observado sea en todos los casos, excepto en el concejo de Morcín, menor que el esperado, y que la proporción de los idiomorfos *MAT* no sea 1:1, podría indicar que la población asturiana del hongo no se está reproduciendo sexualmente, sino vegetativamente, por lo que estaríamos ante una población con un marcado carácter clonal.

Este carácter clonal se ve apoyado por los resultados que se han obtenido al aplicar la técnica SSR, que nos ha permitido agrupar los aislamientos ensayados en tres grupos. El primero es el formado por los aislamientos que pertenecen al haplotipo 1 (87,83%) junto con los que pertenecen a los haplotipos que se diferencian de este en un solo locus (haplotipos 2, 3, 4, 5, 8, 9 y 13). El segundo grupo sería el formado por los aislamientos pertenecientes al haplotipo 6 (4,75%) junto con los que pertenecen a los haplotipos que se diferencian en uno o dos loci (haplotipos 7, 10 y 11). Mientras que el tercer grupo sería el formado por el haplotipo 12.

Se ha visto una clara relación entre los haplotipos encontrados y los GCV, de tal manera que ningún haplotipo se encuentra en dos GCV distintos, correspondencia que ha quedado corroborada al realizar una red de haplotipos (Fitch, 1997; Posada y Grandall, 2001; McGuire *et al.*, 2005). Así, los aislamientos de los haplotipos 1, 2, 3, 4, 5, 8, 9 y 13, pertenecen todos al GCV EU-1, los aislamientos de los haplotipos 6, 7, 10 y 11 pertenecen todos al GCV EU-13 y el aislamiento del haplotipo 12 corresponde con el GCV EU-3.

La combinación de los resultados obtenidos para los grupos de compatibilidad vegetativa, los idiomorfos *MAT* y los microsatélites, viene a apoyar el carácter fundamentalmente clonal de la población asturiana del hongo *C. parasitica*. De tal manera que se encuentra un grupo, el EU-1, mayoritario y distribuido por todo el territorio asturiano, un segundo grupo, el EU-13, con un número de aislamientos mucho menor, localizado fundamental en la zona sur-oriental de la provincia, y un tercer grupo, EU-3, representado solamente por dos aislamientos, de dos concejos, localizados en la zona centro y sur de la provincia. Esta situación apoyaría la hipótesis de la existencia de tres introducciones diferentes del patógeno.

Con estas condiciones, podríamos considerar que la situación es la ideal para la propagación del hipovirus responsable de la hipovirulencia, ya que esta dispersión está directamente relacionada con la estructura de las poblaciones referida a los GCV. Esta situación se ha observado a nivel continental, ya que en Europa la dispersión es mucho mayor que en Norte América debido a que allí las poblaciones tienen, en general, un alto número de GCV (Anagnostakis, 1988). Además de este factor, en el éxito de la dispersión del hipovirus, también habría que tener en cuenta otros factores como la cantidad y efectividad del inóculo producido por las cepas hipovirulentas (Robin *et al.*, 2000).

Por lo que respecta a los marcadores moleculares utilizados, al aplicar la técnica RAPD, utilizando los iniciadores SER-21 y SER-14, se consiguieron diferenciar cepas del hongo asturianas de diferentes concejos, y también cepas asturianas pertenecientes a dos grupos de compatibilidad vegetativa, EU-1 y EU-13. Sin embargo sería necesario ampliar el número de cepas de estos grupos procedentes de otros lugares para confirmar esta relación.

Con los iniciadores SER-6, SER-8, OPR-01 y OPB-10, no se observaron diferencias entre las cepas de *C. parasitica* asturianas, mostrando un único RAPD-tipo que fue diferente del de la cepa fuera de grupo (*E. turcicum*). Esto hizo que se probaran dos de estos iniciadores OPB-10 y SER-8, con diferentes especies pertenecientes a la familia *Cryphonectriaceae*, para comprobar si correspondía a un perfil específico, es decir, propio de la especie *C. parasitica*, lo cual podría ser muy útil para ser empleado como marcador molecular interespecie que apoye la identificación de este patógeno.

Usando estos dos iniciadores, con uno se agruparon todas las cepas de *C. parasitica* ensayadas, las de origen asturiano, americano y la obtenida de la colección europea, de la cual no sabemos su origen y también la cepa de *C. gyrosa* de colección. Y con otro se han diferenciado las cepas asturianas de las americanas y de la de colección que ha vuelto a quedar agrupada con la cepa de *C. gyrosa*.

También se agrupan con ambos iniciadores, por un lado las cepas de *C. nitschkei* y *C. macrospora* y por otro las cepas de *C. cubensis* y *C. havanensis*. Estas últimas en la

actualidad han cambiado su nombre y han pasado a denominarse *Chrysoporthe cubensis*.

Por el contrario, con siete de los iniciadores, no se obtuvieron perfiles claros por lo que se descartó su uso posterior.

Estos resultados son alentadores pues parece que se podrían diferenciar cepas de *C. parasitica* mediante RAPD lo que permitiría su uso como marcador intraespecie en estudios de epidemiología molecular. Los resultados de este trabajo abren nuevas posibilidades al estudio mediante la secuenciación de bandas específicas. Como ya hemos mencionado anteriormente, con determinados iniciadores la técnica RAPD podría ser utilizada como marcador interespecie, por tanto, esta técnica a pesar de ser sencilla ha mostrado ser útil para ser utilizada como marcador inter e intra especie.

Esta técnica ha sido utilizada por otros autores como Yan *et al.* (2007), que consiguieron diferenciar mediante esta técnica poblaciones geográficamente diferentes del hongo *C. parasitica* en China. Wronski *et al.* (1997) también usaron esta técnica para caracterizar distintas cepas del hongo *C. parasitica* de procedencia austriaca. Changxi *et al.* (2001) pudieron diferenciar, mediante RAPD, aislamientos de distintas procedencias del hongo *Endocronartium harknessii*, y Yuan *et al.* (1995) establecieron diferencias entre *Aspergillus parasiticus* y *Aspergillus sojae* (marcador interespecie) y a su vez dividieron ambas especies en dos grupos (marcador intraespecie). En nuestro laboratorio, esta técnica ha sido asimismo optimizada y aplicada con éxito para caracterizar y tipificar especies de bacterias fitopatógenas, utilizándose como apoyo a la identificación de *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* al ser la serie en estudio altamente homogénea y generar un único RAPD tipo distinto al generado por los otros patovares ensayados (Castaño *et al.*, 2003). En cambio, en otras especies como *Pseudomonas viridiflava* se ha utilizado para conocer la variación intraespecie (González *et al.*, 2003).

Sería conveniente extender al resto de la colección de *C. parasitica* la aplicación de esta técnica, para corroborar su utilidad en el apoyo al diagnóstico y ampliar el conocimiento de la epidemiología del patógeno en nuestra región.

La uniformidad encontrada al estudiar otros aspectos del hongo también se refleja en la caracterización morfológica, donde la mayor parte de los aislamientos se agruparon en el tipo I (78,41%), y los otros catorce tipos aparecieron en unos porcentajes que variaron del 0,39% al 4,88%. Ju *et al.* (2002) obtuvieron porcentajes similares al caracterizar morfológicamente aislamientos de *C. parasitica* de Corea, donde encontraron seis grupos, el mayoritario agrupó al 65,2% de los aislamientos mientras que el resto aparecieron con unos porcentajes del 1,8% al 5,7%.

La uniformidad también se observa si atendemos a la distribución geográfica, pues el tipo I aparece en casi todos los concejos en los que se ha detectado la enfermedad con la excepción de Tapia de Casariego y Villayón. Los tipos III, V y VII se localizan fundamentalmente en la zona sur-oriental de la provincia, que corresponde con los concejos en los que primero se detectó el patógeno.

Al incluir las características de color, tanto superior como inferior de la placa y la formación de pústulas, se obtuvieron 84 subtipos diferentes, en los que los más comunes fueron los que pertenecían al tipo I siendo el subtipo 1.1 con el 35,99% de los aislamientos el mayoritario seguido del subtipo 1.4 con el 17,61% de los aislamientos. Hubo 46 subtipos presentes con un sólo aislamiento.

En cuanto a la presencia de más de una cepa en las muestras, se ha visto que al realizar los cultivos mono/conidiales del hongo, en 24 de ellos crecían dos tipos de colonias diferentes. Esta situación se acentúa en uno de los aislamientos donde una de las colonias presenta el idiomorfo *MAT-1* y la otra el *MAT-2*, lo que nos hace pensar en la presencia en un mismo chancro de diferentes individuos, probablemente debido a múltiples infecciones (Bisseger *et al.*, 1997).

Los resultados de virulencia obtenidos con el ensayo madera-corteza, reflejaron que 168 cepas (21,59%) están por debajo del valor medio que mostraron las hipovirulentas usadas como testigo. Este porcentaje es muy similar al que encontraron Ju *et al.* (2002) en Corea, que fue del 21,9%, si bien el límite superior que consideraron fue ligeramente mayor debido a que midieron la lesión después de transcurridos cinco días desde la inoculación. Nueve de estas cepas corresponden a chancros con aspecto coincidente con posibles hipovirulentos según las anotaciones de campo.

En el ensayo de la actividad del enzima lacasa, 29 cepas (6,16%) presentaron valores por debajo del control, para las dos formas de evaluación de la actividad del enzima. Ocho de estas cepas se corresponderían con chancros posiblemente hipovirulentos en las anotaciones de campo.

Sin embargo, al combinar los resultados de ambos ensayos, se reducen a dos las cepas que compartirían todos los criterios para ser consideradas hipovirulentas. Esta situación no es la esperada, ya que según Robin *et al.* (2000), en situaciones de baja diversidad del patógeno esperaríamos encontrar un alto porcentaje de cepas infectadas por el hipovirus. Sin embargo, este resultado apoyaría lo indicado por Gómez (2004) que describe la situación en Navarra y sugiere que en esa provincia, el hongo está en expansión y el porcentaje de cepas hipovirulentas, por tanto, sería muy bajo. Estos resultados también coinciden con los obtenidos por Ju *et al.* (2002) que señalan que algunos aislamientos podrían ser considerados hipovirulentos o no según el método aplicado.

Hay que señalar que sería necesario comprobar la presencia del hipovirus mediante la extracción del ARN para asegurar que son hipovirulentas. Este trabajo no se ha podido incluir en la presente memoria pero está prevista su realización.

Desde la detección de la enfermedad se han realizado varios intentos de control químico usando diferentes productos fungicidas, tales como Methyl-2-Benzimidazol-Carbamato, Carbendazima, Oxiclóruo de Cobre, Benomilo, Azaconazol + Imazalil, y se han seguido distintas estrategias para la aplicación de estos productos. Así, en unos casos se trataron directamente los chancros y en otros se eliminó el tejido dañado y se aplicó el producto sobre el tronco limpio. Para la aplicación de estos productos, se usaron desde cepillos para aplicar directamente en la zona a tratar, pasando por la pulverización del follaje de la planta, hasta la inyección de los productos bajo la corteza. Todos estos intentos mostraron un mayor o menor éxito en el control de la enfermedad pero, o bien han resultado ser poco efectivos para un tratamiento a largo plazo, o bien su aplicación resultaba ser poco práctica (Jaynes y Van Alfen, 1977; Anagnostakis, 1982, Canciani et al, 1995; Aksoy y Serdar, 2004).

En cuanto al estudio de la eficacia de productos fitosanitarios, aunque los resultados del ensayo *in vitro* parecían prometedores, pues mostraron marcadas diferencias entre las distintas materias activas ensayadas, en el ensayo *in vivo* estas diferencias se redujeron considerablemente. Así, aunque en la mayoría de los casos se obtuvieron diferencias significativas entre los controles y los distintos tipos de tratamientos y entre los controles y las distintas materias activas, estas diferencias no siempre fueron significativas entre materias activas ni entre tratamientos. En concreto, en cuanto a formas de aplicación, el tratamiento de aplicación localizada con rodillo es el que ha obtenido el mejor resultado, y en cuanto a materias activas el Epoxiconazol (12,5%) ha sido la que mejor resultado ha dado en todos los parámetros evaluados, excepto en la formación de grietas.

Al final del tercer año, las diferencias se fueron acortando y sólo se observaron diferencias en el número de rebrotes sanos que presentaban los distintos tratamientos. El tratamiento aplicado por pulverización fue el que mostró el porcentaje de rebrotes sanos más alto, al contrario que en el resto de parámetros analizados que fue el tratamiento de aplicación localizada. En este caso también la materia activa Epoxiconazol (12,5%) mostró un porcentaje de rebrotes más alto que el resto.

Por tanto, la vía química no parece ser una alternativa muy eficaz, lo que unido a la sensibilidad que existe en la sociedad actual hacia temas como la contaminación medio-ambiental o la seguridad alimentaria hacen que este tipo de tratamientos no estén aconsejados de forma generalizada. Es también de destacar que la Comunidad Económica Europea revisa y reduce periódicamente la lista de productos fitosanitarios autorizados en los diversos cultivos.

Todo esto hace que la posibilidad de aplicar control biológico sea muy atractiva dado su mejor aceptación social y su autosostenibilidad. Este trabajo que hemos realizado en el ámbito de la Comunidad Autónoma del Principado de Asturias, pone las bases del conocimiento necesario para poder iniciar un programa de este tipo.

5.- CONCLUSIONES

Este trabajo se enmarca en un contexto de atención a una necesidad que los órganos correspondientes del Principado de Asturias detectan y trasladan al SERIDA (Servicio Regional de Investigación y Desarrollo Agroalimentario), y ha supuesto el inicio de una línea de investigación en este campo, con las dificultades que ello conlleva. A continuación se enumeran las conclusiones:

1.- *Cryphonectria parasitica* se ha podido aislar, tanto en masas de castaño como en castaños aislados, en 69 de los 78 concejos que conforman el Principado de Asturias. En nueve concejos (Castropol, Grandas de Salime, Illano, San Martín de Oscos, San Tirso de Abres, Santa Eulalia de Oscos, Taramundi, Vegadeo y Villanueva de Oscos), todos ellos de la zona occidental de la Comunidad Autónoma, no se han encontrado castaños afectados por la enfermedad.

Esta situación permite, si se compara con los resultados de muestreos realizados por otros investigadores con anterioridad, confirmar la rápida dispersión de la enfermedad en nuestra Comunidad Autónoma, que podría estar favorecida por el abandono y la falta de tratamientos selvícolas que se da en Asturias.

2.- La caracterización morfológica nos ha permitido establecer 15 tipos morfológicos. El tipo más frecuente es el que denominamos I, que agrupa al 78,4 % de los aislamientos y aparece en casi todos los concejos en los que se ha detectado la enfermedad, excepto Tapia de Casariego y Villayón.

3.- Los 778 aislamientos asturianos de *C. parasitica* utilizados en este trabajo han podido ser asignados a tres grupos de compatibilidad vegetativa cuya correspondencia con los grupos europeos y frecuencia es la siguiente:

- El EU-1 agrupó al 94,6% de los aislamientos y se encuentra en todos los concejos.
- El EU-13 agrupó al 5,1 % de los aislamientos correspondientes a 13 concejos distribuidos por toda la geografía asturiana.
- El EU-3 representa casi el 0,3 % de los aislamientos y se encuentra en los concejos de Morcín y Sobrescobio. Este último sería el único concejo en el que están presentes los tres grupos.

4.- Los idiomorfos *MAT*-1 y *MAT*-2 se encuentran en la serie en estudio en una relación 3:1, que difiere significativamente de la 1:1 esperada en una población que se está reproduciendo sexualmente. Señalar también que se han encontrado dos heterocariontes para este carácter.

5.- Mediante la utilización de 16 loci microsatélite hemos podido diferenciar 13 haplotipos diferentes que han mostrado una clara relación con los grupos de compatibilidad vegetativa. Estos resultados, unidos a los obtenidos en GCV y proporción de idiomorfos *MAT*, reflejan el carácter clonal de la población asturiana de *C. parasitica* y apoyarían la hipótesis de que habría habido tres introducciones diferentes del patógeno que se corresponderían con los tres GCV.

6.- La técnica RAPD ha permitido diferenciar tipos en cepas del hongo *C. parasitica* pertenecientes a nuestra serie en estudio. También ha permitido obtener diferentes RAPD-tipos en distintas especies de la familia *Cryphonectriaceae*, lo que permitiría su uso como marcador tanto intra como inter especie en estudios de epidemiología molecular.

7.- Los ensayos de virulencia realizados han permitido identificar dos aislamientos supuestamente hipovirulentos según los métodos utilizados: el ensayo madera-corteza y la actividad del enzima lacasa. Sin embargo, se han obtenido diferencias entre los dos métodos siendo más restrictivo el resultado de la actividad del enzima lacasa combinando el color en el medio y la absorbancia a 405 nm.

8.- Por lo que respecta al control químico, en el ensayo *in vitro* realizado el Epoxiconazol (12,5%) ha resultado ser el fitosanitario más eficaz, pues inhibió el crecimiento del hongo a la concentración de 1 µg/ml, con acción fungicida. Las mezclas de Carbendazima (20%) + Flutriafol (9,4%) y Flusilazol (0,5%) + Carbendazima (1%) también han sido eficaces.

En el ensayo *in vivo* se han obtenido diferencias significativas entre los controles y los diferentes productos fitosanitarios ensayados, y también con las formas de aplicación de los mismos. No siempre se obtuvieron diferencias significativas entre los distintos tratamientos entre sí, ni entre las diferentes formas de aplicación. Sin

embargo, el tratamiento de aplicación localizada con rodillo es el que mejor resultado ha obtenido excepto en el porcentaje de rebrotes sanos, y en cuanto a la materia activa, el Epoxiconazol (12,5%) ha sido la más eficaz. Con los resultados obtenidos en los ensayos con fitosanitarios no parece apropiado pensar que el control químico pueda ser una buena alternativa.

9.- Por tanto, considerando la baja diversidad de GCV presentes en la región y la más probable reproducción asexual del hongo, nos encontramos en una situación idónea para la propagación del hipovirus responsable de la hipovirulencia, y por tanto, para utilizarlo como método de control.

6.- BIBLIOGRAFÍA

Adamčíková, K., Juhásová, G. y Kobza, M. 2006. Genetic diversity of *Cryphonectria parasitica* population in the Štiavnicko-krupinská subpopulation in Slovakia. Plant Protect. Sci. **42**: 119-124.

Aguín, O., Mata, M., Mansilla, J.P., Martín, A.B. y Sierra, J.M. 2005. Distribución y diversidad de los tipos de compatibilidad vegetativa de *Cryphonectria parasitica* (Murrill) Barr en castaños de Castilla y León. Bol. San. Veg. Plagas **31**: 287-297.

Aguín, O., Montenegro, D., Sainz, M.J., Hermida, M. y Mansilla, J.P. 2008. Caracterización morfológica y molecular de las poblaciones de *Cryphonectria parasitica* en castaños de Galicia. Bol. San. Veg. Plagas **34** (4): 581-594.

Aksoy, H.M. y Serdar, U. 2004. A research on chemical control against chestnut blight (*Cryphonectria parasitica* (Murrill)Barr.). Plant Pathol. J. **3**: 44-47.

Anagnostakis, S.L. 1982. Biological control of chestnut blight. Science **215**: 466-471.

Anagnostakis, S.L. 1984. Nuclear gene mutations in *Endothia* (*Cryphonectria*) *parasitica* that affect morphology and virulence. Phytopathology **74**: 561-565.

Anagnostakis, S.L. 1988. *Cryphonectria parasitica*, cause of chestnut blight. Adv. Plant Pathol. **6**: 123-136.

Anagnostakis, S.L. 1995. The pathogens and pests of chestnuts. Adv. Bot. Res. **21**: 125-145.

Anagnostakis, S.L. 2001. The effect of multiple importations of pests and pathogens on a native tree. Biol. Invasions **3**: 245-254.

Anagnostakis, S.L. y Day, P.R. 1979. Hypovirulence conversion in *Endothia parasitica*. Phytopathology **69**: 1226-1229.

Anagnostakis, S.L., Chen, B., Geletka, L.M. y Nuss, D.L. 1998. Hypovirus transmission to ascospore progeny by field-released transgenic hypovirulent strains of *Cryphonectria parasitica*. Phytopathology **88**: 598-604.

Anagnostakis, S.L., Hau, B. y Kranz, J. 1986. Diversity of vegetative compatibility groups of *Cryphonectria parasitica* in Connecticut and Europe. Plant Dis. **70**: 536-538.

Anagnostakis, S.L., Hau, B. y Kranz, J. 1986. Diversity of vegetative compatibility groups of *Cryphonectria parasitica* in Connecticut and Europe. Plant Dis. **70**: 536-538.

Ana-Magán, F. 1984. Patología de los castaños híbridos. Congreso Internacional sobre El Castaño. 201-215. Lourizán. Pontevedra. Octubre.

Anónimo, 1997:

<http://www.unitus.it/dipartimenti/dpp/progetti/cost/vcgroup.htm>
(Consultado 9 de noviembre 2009)

Anónimo, 2003a:

<http://www.sadei.es/datos/cuadros%20tematicos/capitulo%20K/2/K28201A2000a.xls>
(Consultado 9 de noviembre 2009)

Anónimo, 2003b:

<http://www.sadei.es/datos/cuadros%20tematicos/capitulo%20K/2/K28201A2000c.xls>
(Consultado 9 de noviembre 2009)

Anónimo, 2005:

<http://www2.uni-jena.de/biologie/mikrobio/tipps/rapd.html>.
(Consultado 9 de noviembre 2009)

Anónimo, 2008:

<http://www.sadei.es/datos/cuadros%20tematicos/capitulo%20K/2/K28404SSSSSa.xls>
(Consultado 9 de noviembre 2009)

Bissegger, M., Rigling, D. y 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.

Breuillin, F., Dutech, C. y Robin, C. 2006. Genetic diversity of the chestnut blight fungus *Cryphonectria parasitica* in four French populations assessed by microsatellite markers. *Mycol. Res.* **110**: 288-296.

Brownstein, M.J., Carpten, J.D. y Smith, J.R. 1996. Modulation of non-templated nucleotide addition by taq DNA polymerase: primer modifications that facilitate genotyping. *Biotechniques* **20** (6): 1004-1009.

Canciani, L., Dallavalle, E., Zambonelli, A. y D'Aulerio, A.Z. 1995. Prove di protezione chimica su innesti di castagno. *Difesa delle Piante* **18**: 116-121.

Cassago, A., Panepucci, R.A., Baião, A.M.T. y Henrique-Silva, F. 2002. Cellophane based mini-prep method for DNA extraction from the filamentous fungus *Trichoderma reesei*. *BMC Microbiol.* **2**: 14.

Castaña, B. 2003. Utilidad de la técnica RAPD para la identificación y diferenciación de *Pseudomonas syringae* pv. *Phaseolicola*. Seminario de investigación. Dirección: Ana J. González y M^a del Carmen Mendoza Fernández. Departamento de Biología de Organismos y Sistemas. Facultad de Biología. Universidad de Oviedo.

Cenis, J.L. 1992. Rapid extraction of fungal DNA for PCR amplification. *Nucleic Acids Res.* **20** (9): 2380.

Changxi, L., Francis, C. Y. y Yasu, H. 2001. Random amplified polymorphic DNA variability among geographic isolates of western gall rust fungus in Canada. *Can. J. For. Res.* **31**: 1304-1311.

- Chung, H.J., Kwon, B.R., Kim, J.M., Park, S.M., Park, J.K., Cha, B.J., Yang, M.S. y Kim, D.H.** 2008. A tannic acid-inducible and hypoviral-regulated laccase3 contributes to the virulence of the chestnut blight fungus *Cryphonectria parasitica*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **21** (12): 1582-1590.
- Cobos, P.** 1989. Fitopatología del Castaño (*Castanea sativa* Miller). Bol. San. Veg. Plagas. Fuera de Serie **16**: 129 pp.
- Cortesi, P. y Milgroom, M.G.** 1988. Genetics of vegetative incompatibility in *Cryphonectria parasitica*. *Appl. Environ. Microbiol.* **64** (8): 2988-2994.
- Cortesi, P., McCulloch, C.E., Song, H., Lin, H. y Milgroom, M.G.** 2001. Genetic control of horizontal virus transmission in the chestnut blight fungus, *Cryphonectria parasitica*. *Genetics* **159**: 107-118.
- 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.
- Davis, J.E., Kubisiak, T.L. y Milgroom, M.G.** 2005. Polymorphic sequence-characterized codominant loci in the chestnut blight fungus, *Cryphonectria parasitica*. *Mol. Ecol. Notes* **5**: 195-197.
- Day, P.R., Dodds, J.A., Elliston, R.A., Jaynes, R.A. y Anagnostakis, S.L.** 1977. Double-stranded RNA in *Endothia parasitica*. *Phytopathology* **67**: 1393-1396.
- Dean, J.F.D. y Eriksson, K.E.** 1994. Laccase and the deposition of lignin in vascular plants. *Holzforschung* **18**: 21-33.
- Díaz, M.B.; Ciordia, M; Ramos, A.M. y Pereira-Lorenzo, S.** 2009. Cultivares de castaño (*Castanea sativa* Mill.) de Asturias. KRK Ediciones, Oviedo. 90 pp.
- Elorrieta, J.** 1949. El castaño en España. Ministerio de Agricultura. Madrid, 319 pp.
- Enebak, S.A., MacDonald, W.L. y Hillman, B.I.** 1994. Effect of dsRNA associated with isolates of *Cryphonectria parasitica* from the central Appalachians and their relatedness to other dsRNAs from North America and Europe. *Phytopathology* **84**: 528-534.
- Fitch, W.M.** 1997. Networks and Viral Evolution. *J. Mol. Evol.* **44** (Suppl 1): S65-S75.
- Friese, C, Allen, M, Martin, R y Van Alfen, N.** 1992. Temperature and structural effects on transfer of double-stranded RNA among isolates of the chestnut blight fungus (*Cryphonectria parasitica*). *Appl. Environ. Microbiol.* **58** (6): 2066-2070.

Fulbright, D.W. 1984. Effect of eliminating dsRNA in hypovirulent *Endothia parasitica*. *Phytopathology* **74**: 722-724.

Gams, W., Van der Aa, H.A, Van der Plaats-Niterink, A.J., Samson, R.A., Stalpers, J.A. 1980. CBS Course of mycology, 2^a Ed. Institute of the Royal Netherlands Academy of Sciences and Letters, 109 pp.

García-Benavides, P. y Monte, E. 2005. Fitopatología del Castaño: el chancro y la tinta en la provincia de Salamanca. Salamanca: Excma. Diputación Provincial de Salamanca, 58 pp.

Glass, N.L., Jacobson, D.J. y Shiu, P.K.T. 2000. The genetics of hyphal fusion and vegetative incompatibility in filamentous ascomycete fungi. *Annu. Rev. Genet.* **34**: 165-186.

Gómez, M. 2004. Caracterización de la población de *Cryphonectria parasitica* (Murrill) Barr. y detección de cepas hipovirulentas en la comunidad foral de Navarra. Proyecto fin de carrera. E.T.S.I.A. Universidad de Lérida. Tutor: Carlos Colinas. <http://labpatfor.udl.es/tptpfc/Gomez.pdf> (Consultado 9 de noviembre 2009).

González, A.J., Rodicio, M.R. y Mendoza, M.C. 2003. Identification of an emergent and atypical *Pseudomonas viridiflava* lineage causing bacteriosis in plants of agronomic importance in a Spanish region. *Appl. Environ. Microbiol.* **69** (5): 2936-2941.

González, M.M. 2004. Aislamiento y caracterización de *Cryphonectria parasitica* en *Castanea sativa* del Concejo de Aller. Trabajo Fin de Carrera. Dirección: Juan Majada Guijo y Elena Landeras Rodríguez. E.U. de Ingenierías Técnicas de Mieres I.T. Forestal Esp Explotaciones Forestales.

Gouveia, M.E., Cardoso, P. y 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** (3): 387-390.

Griffin, G. 1986. Chestnut blight and its control. *Hortic. Rev.* **8**: 291-336.

Grünwald, N.J., Goodwin, S.B., Milgroom, M.G. y Fry, W.E. 2003. Analysis of genotypic diversity data for populations of microorganisms. *Phytopathology* **93**: 738-746.

Gryzenhout, M., Wingfield, B. y Wingfield, M. 2009. Taxonomy, phylogeny, and ecology of bark-inhabiting and tree-pathogenic fungi in the *Cryphonectriaceae*. APS Press, St. Paul, Minnesota, 119 pp.

Gwo-Fang, Y., Chiung-Shu, L. y Chann-Chao C. 1995. Differentiation of *Aspergillus parasiticus* from *Aspergillus sojae* by random amplification of polymorphic DNA. *Appl. Environ. Microbiol.* **61** (6): 2384-2387.

Heiniger, U. y Rigling, D. 1994. Biological control of chestnut blight in Europe. *Annu. Rev. Phytopathol.* **32**: 581-599.

- Hillman, B.I. y Suzuki, N.** 2004. Viruses of the chestnut blight fungus, *Cryphonectria parasitica*. *Advances in virus research* **63**: 423-472.
- Hoegger, P.J., Rigling, D., Holdenrieder, O. y Heiniger, U.** 2000. Genetic structure of newly established populations of *Cryphonectria parasitica*. *Mycol. Res.* **104** (9): 1108-1116.
- Homs, G., Rodríguez, J., Rigling, D. y Colinas, C.** 2001. Caracterización de la población de *Cryphonectria parasitica* y detección de cepas hipovirulentas en tres subpoblaciones de Cataluña. Montes para la sociedad del nuevo milenio. III Congreso Forestal Español. Ed. Junta de Andalucía. Granada.
- Jaynes, R.A. y Elliston, J.E.** 1980. Pathogenicity and canker control by mixtures of hypovirulent strains of *Endothia parasitica* in American chestnut. *Phytopathology* **70**: 453-456.
- Jaynes, R.A. y Van Alfen, N.** 1977. Control of the chestnut blight fungus with infected methyl-2-benzimidazolecarbamate. *Plant Dis. Repr.* **61**: 1032-1036.
- Ju, Y.J., Kim, D.H. y Cha, B.** 2002. Isolation of *Cryphonectria parasitica* from cankers on chestnut trees in Korea. *Plant Pathol. J.* **18** (1): 23-29.
- Kronstad, J.W. y Staben, C.** 1997. Mating type in filamentous fungi. *Annu. Rev. Genet.* **31**: 245-276.
- Kubisiak, T.L., Dutech, C. y Milgroom, M.G.** 2007. Fifty-three polymorphic microsatellite loci in the chestnut blight fungus, *Cryphonectria parasitica*. *Mol. Ecol. Notes* **7**: 428-432.
- Laconcha, I., López-Molina, N., Rementería, A., Audicana, A., Perales, I. y 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.
- Lecomte, P., Péros, J.P., Blancard, D., Bastien, N. y Délye, C.** 2000. PCR Assays That Identify the Grapevine Dieback Fungus *Eutypa lata*. *Appl. Environ. Microbiol.* **66** (10): 4475-4480.
- Lee, J.K., Tattar, T.A. Berman, P.M. y 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.
- Lin, A.W., Usera, M.A., Barnet, T.J. y Goldsby, R.A.** 1996. Application of random amplified polymorphic DNA analysis to differentiate strains of *Salmonella enteritidis*. *J. Clin. Microbiol.* **34**: 870-876.
- Liu, D., Coloe, S., Baird, R. y Pederson, J.** 2000. Rapid Mini-Preparation of Fungal DNA for PCR. *J. Clin. Microbiol.* **38** (1): 471.

Liu, Y.C. y Milgroom, M.G. 2007. High diversity of vegetative compatibility types in *Cryphonectria parasitica* in Japan and China. *Mycologia* **99** (2): 279-284.

Liu, Y.C., Double, M.L., MacDonald, W.L. y Milgroom, M.G. 2002. Persistence of *Cryphonectria* hypoviruses after their release for biological control of chestnut blight in West Virginia forests. *For. Path.* **32**: 345-356.

Mansilla, P., Pérez, R. y Pintos, C. 1999. Plagas y enfermedades que dañan al castaño. *Frutic. Prof.* **107**: 43-52.

Manuel, C., Díaz-Fernández, P. y Gil, L. 2003. Tercer Inventario Forestal Nacional 1997-2006. La transformación histórica del paisaje forestal en Asturias. Ministerio de Medio Ambiente, Madrid, 139 pp.

Marra, R.E. y Milgroom, M.G. 2001. The mating system of the fungus *Cryphonectria parasitica*: selfing and self-incompatibility. *Heredity* **86**: 134-143.

Martín, A.B. 2003. Primeros trabajos en el tratamiento biológico del chancro del castaño *Cryphonectria parasitica*. En: La salud de los bosques de Castilla y León. Junta de Castilla y León, 169 pp.

McGuire, I.C., Davis, J.E., Double, M.L., McDonald, W.L., Rauscher, J.T., McCawley, S. y Milgroom M.G. 2005. Heterokaryon formation and parasexual recombination between vegetatively incompatible lineages in a population of the chestnut blight fungus, *Cryphonectria parasitica*. *Mol. Ecol.* **14**: 3657-3669.

McGuire, I.C., Marra, R.E. y Milgroom, M.G. 2004. Mating type heterokaryosis and selfing in *Cryphonectria parasitica*. *Fungal Genet. Biol.* **41**: 521-533.

McGuire, I.C., Marra, R.E., Turgeon, B.G. y Milgroom, M.G. 2001. Analysis of mating-type genes in the chestnut blight fungus, *Cryphonectria parasitica*. *Fungal Genet. Biol.* **34**: 131-144.

Menéndez, C. 1984. El castaño (*Castanea sativa* MILL.) en Asturias. Congreso Internacional sobre El Castaño. 121-131. Lourizán. Pontevedra. Octubre.

Milgroom, M.G. y Cortesi, P. 1999. Analysis of population structure of the chestnut blight fungus based on vegetative incompatibility genotypes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**: 10518-10523.

Milgroom, M.G. y Cortesi, P. 2004. Biological control of chestnut blight with hypovirulence: a critical analysis. *Annu. Rev. Phytopathol.* **42**: 311-338.

Milgroom, M.G. y Lipari, S.E. 1995. Spatial analysis of nuclear and mitochondrial RFLP genotypes in populations of the chestnut blight fungus, *Cryphonectria parasitica*. *Mol. Ecol.* **4**: 633-642.

- Milgroom, M.G., Lipari, S.E. y Wang, K.** 1992. Comparison of genetic diversity in the chestnut blight fungus, *Cryphonectria (Endothia) parasitica*, from China and the U.S. Mycol. Res. **96**: 1114-1120.
- Milgroom, M.G., Lipari, S.E., Ennos, R.A. y Liu, Y.C.** 1993. Estimation of the outcrossing rate in the chestnut blight fungus, *Cryphonectria parasitica*. Heredity **70**: 385-392.
- Miyata, M., Aoki, T., English, V., Yoshida, T. y Endo, M.** 1995. RAPD analysis of *Aeromonas salmonicida* and *Aeromonas hydrophila*. J. Appl. Bacteriol. **79** (2): 181-185.
- Moffitt, E.M. y Lister, R.M.** 1975. Application of a serological screening test for detecting double-stranded RNA mycoviruses. Phytopathology **65**: 851-859.
- Molina, F.** 1984. Cuarenta años de investigación sobre el castaño en el departamento forestal de Lourizán. Congreso Internacional sobre El Castaño. 23-38. Lourizán. Pontevedra. Octubre.
- Montenegro, D., Aguin, O., Sainz, M.J., Hermida, M. y Mansilla, J.P.** 2008. Diversity of vegetative compatibility types, distribution of mating types and occurrence of hypovirulence of *Cryphonectria parasitica* in chestnut stands in NW Spain. Forest Ecol. Manage. **256**: 973-980.
- Muñoz, M.C. y Cobos, P.** 1990. Informe de resultados: Sobre la situación de *Endothia parasitica* (Murr.) And. en los castaños de Asturias.
- Muñoz, M.C. y Cobos, P.** 1991. *Endothia parasitica* (Murril) Anderson. Sintomatología e identificación. Situación de la enfermedad en los castaños asturianos. Bol. San. Veg. Plagas **17** (2): 287-298.
- Nuss, D.L.** 1992. Biological control of chestnut blight: an example of virus-mediated attenuation of fungal pathogenesis. Microbiol. Rev. **56** (4): 561-576.
- Nuss, D.L.** 1996. Using hypoviruses to probe and perturb signal transduction processes underlying fungal pathogenesis. Plant Cell **8**: 1845-1853.
- Posada D. y Grandall, K.A.** 2001. Intraspecific gene genealogies: trees grafting into networks. Trends in Ecology & Evolution **16** (1): 37-45.
- Powel, W.A.** 1995. Vegetative incompatibility and mycelial death of *Cryphonectria parasitica* detected with a pH indicator. Mycologia **87** (5): 738-741.
- Rigling, D., Heiniger, U. y Hohl, H.R.** 1989. Reduction of laccase activity in dsRNA-containing hypovirulent strains of *Cryphonectria (Endothia) parasitica*. Phytopathology **79**: 219-223.
- Robin, C. y Heiniger, U.** 2001. Chestnut blight in Europe: Diversity of *Cryphonectria parasitica*, hypovirulence and biocontrol. For. Snow Landsc. Res. **76** (3): 361-367.

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.

Robin, C., Capdevielle, X., Martin, M., Traver, C. y Colinas, C. 2009. *Cryphonectria parasitica* vegetative compatibility type analysis of populations in south-western France and northern Spain. *Plant Pathol.* **58**: 527-535.

Schuelke, M. 2000. An economic method for the fluorescent labelling of PCR fragments. *Nature Biotechnology* **18**: 233-234.

Sotirovski, K., Papazova-Anakieva, I., Grünwald, N.J. y Milgroom, M.G. 2004. Low diversity of vegetative compatibility types and mating type of *Cryphonectria parasitica* in the southern Balkans. *Plant Pathol.* **53**: 325-333.

Suzuki, N. y Nuss, D.L. 2002. Contribution of protein p40 to hypovirus-mediated modulation of fungal host phenotype and viral RNA accumulation. *J. Virol.* **76** (15): 7747-7759.

Thurston, C.F. 1994. The structure and function of fungal laccases. *Microbiology* **140**: 19-26.

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. *For. Snow Landsc. Res.* **76** (3): 391-396.

Turchetti, T. 1982. Hypovirulence in chestnut blight (*Endothia parasitica* (Murr.) And) and some practical aspects in Italy. *Eur. J. For. Path.* **12**: 414-417.

Turgeon, B.G. y Yoder, O.C. 2000. Proposed nomenclature for mating type genes of filamentous ascomycetes. *Fungal Genet. Biol.* **31**: 1-5.

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., Koentz, T. y Lupski, J. 1991. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nuc. Acids Res.* **19**: 6823-6831.

Welsh, J. y McClelland, M. 1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nuc. Acids Res.* **18** (24): 7213-7218.

White, T.J., Bruns, T., Lee, S. y Taylor, J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: *PCR protocols: a guide to methods and applications* (M.A. Innis, D.H. Gelfand, J.J. Sninsky and T.J. White, eds.): 315-322. Academic Press, San Diego, EE.UU.

Williams, J.G.K., Kubelik, A.R., Livak, K.J., Rafalski, J.A. y 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. y 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. y Qin, L. 2007. Genetic diversity and population differentiation of chestnut blight fungus, *Cryphonectria parasitica*, in China as revealed by RAPD. *Biochem. Genet.* **45** (5-6): 487- 506.

Yuan, G.F., Liu, C.S. y Chen, C.C. 1995. Differentiation of *Aspergillus parasiticus* from *Aspergillus sojae* by random amplification of polymorphic DNA. *Appl. Environ. Microbiol.* **61** (6): 2384-2387.

Zamora, P., Martín, A.B., Arrate, J. Rigling, D. y Diez, J.J. 2008. Detection of the vegetative compatibility groups of *Cryphonectria parasitica* in Castilla y León region. *Acta Hortic.* **784**: 159-62.

