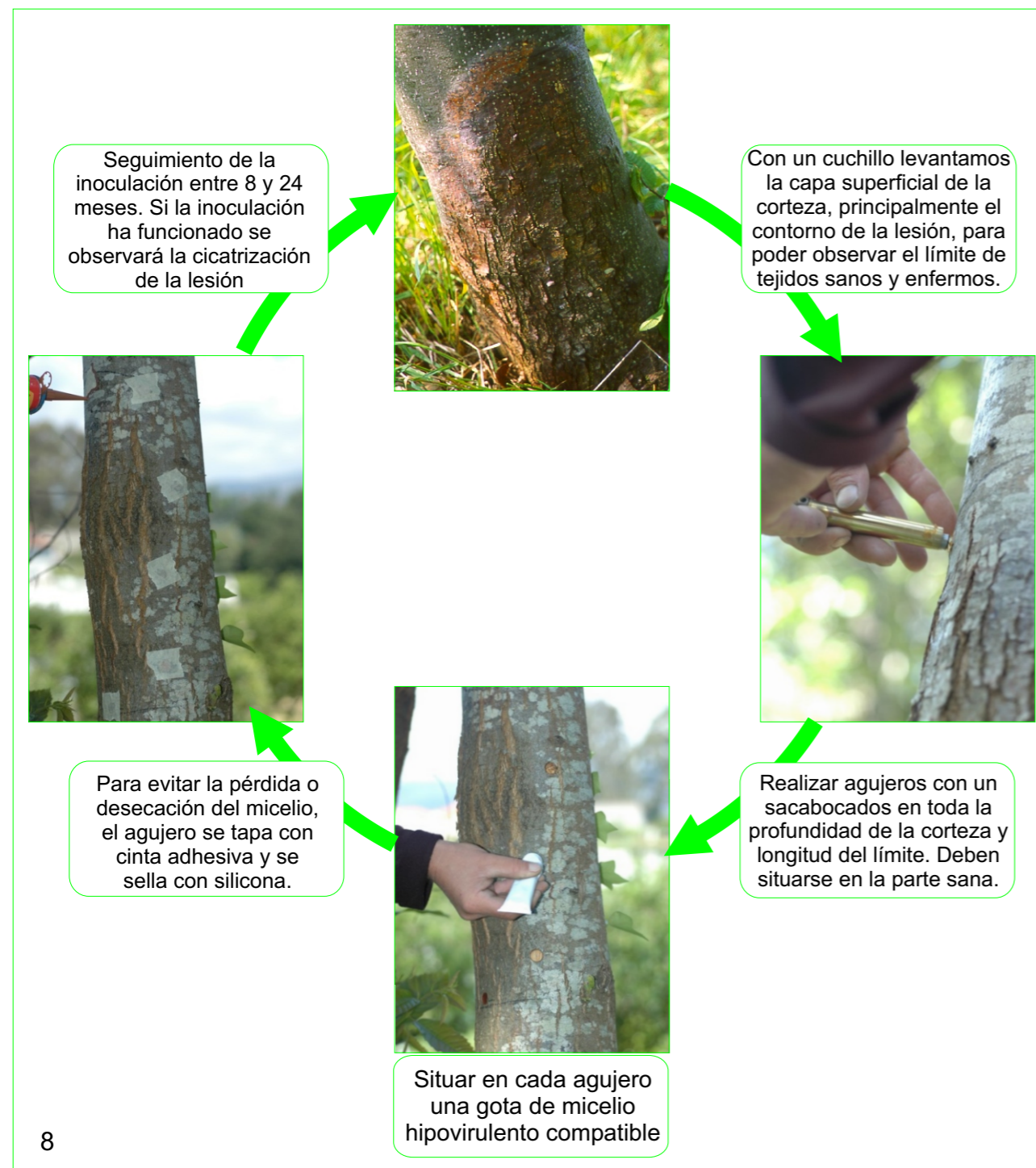


APLICACIÓN DE CEPAS HIPOVIRULENTAS EN CAMPO

El control biológico de *C. parasitica* mediante la hipovirulencia se inicia a partir de la obtención de cepas hipovirulentas compatibles con las virulentas de la zona a tratar. La inoculación se realizará en la periferia de los canchros, sobre los troncos y las ramas de la corteza lisa.

El inóculo hipovirulento se introduce en determinados puntos que rodean a la zona atacada. Los primeros años es aconsejable tratar aproximadamente del 10-15 por ciento de los canchros presentes en la parcela. En los años siguientes es necesario continuar interviniendo sobre los nuevos canchros. Así, la cepa hipovirulenta se generaliza por toda la zona tratada.

En la figura 8 se muestra el proceso de aplicación de la cepa hipovirulenta en campo.



Hipovirulencia

El castaño, incluido en el género *Castanea* Miller, forma parte de la familia *Fagaceae*. Este género está ampliamente extendido por todo el mundo. La especie *Castanea sativa*, denominada castaño europeo o común, tiene una distribución en Galicia de 29.000 ha. y una gran relevancia económica, motivada por la importante producción y aprovechamiento de su madera y fruto, por la obtención de hongos comestibles; y por su significado ecológico, ya que mejora la fertilidad del suelo, ejerce un gran impacto en la fauna silvestre, y tiene una gran relevancia social y cultural. Sin embargo, durante los últimos años los castaños se han visto afectados por varias enfermedades y plagas. Una de las enfermedades más relevantes ha sido la ocasionada por *Cryphonectria parasitica*, hongo responsable del cancro del castaño, que ha comprometido seriamente los castaños de nuestra comunidad (figura 1). Esta enfermedad se haya bastante extendida y actúa con gran rapidez. Está encuadrada en la lista A2 de la EPPO (Organización Europea de la Protección de las Plantas) como enfermedad de cuarentena. Debido a la gravedad de los daños ocasionados por *C. parasitica* se han utilizado distintos métodos de control (químicos, mecánicos, utilización de híbridos), sin embargo la opción más prometedora ha sido la del control biológico mediante la utilización de la hipovirulencia.



LA HIPOVIRULENCIA COMO SISTEMA DE CONTROL DE *CRYPHONECTRIA PARASITICA*

La hipovirulencia se define como una atenuación de la virulencia del patógeno provocada por la infección del hongo por un virus ARN de doble cadena (dsARN). A las cepas de *C. parasitica* que contienen este virus se denominan hipovirulentas en contraposición a las cepas normales virulentas.

Hasta hace pocos años la diferenciación entre los dos tipos de cepas se basaba únicamente en características morfológicas como ausencia de cuerpos de fructificación, coloración del micelio, crecimiento, textura, etc., lo que en la mayor parte de los casos llevaba a resultados confusos, sin embargo la puesta a punto de técnicas moleculares ha facilitado en gran medida la determinación rápida y fiable de las cepas.

En campo, la hipovirulencia se observa como un fenómeno en el que aparece una corteza nueva que inicia en los tejidos del cancro, no es atacada por el patógeno, y repone las partes enfermas hacia el exterior oponiéndose a la progresión del cancro en la superficie. El hongo pierde su poder patógeno, sin poder atravesar las barreras de la corteza cuando se completa su formación, las defensas del árbol pueden actuar así contra estas formas, y se produce la cicatrización de los canchros. Una cepa se

considera hipovirulenta cuando presenta tres características:

1ª Ocasiona lesiones limitadas de fácil cicatrización.

2ª Protege a la planta contra una infección por una cepa por lo general virulenta, cuando ha sido inoculada al árbol en el punto de infección, antes o al mismo tiempo que la cepa virulenta (poder de protección).

3ª Cuando se inocula en la periferia de un cancro en desarrollo, provocado por una cepa virulenta evoluciona hacia la cicatrización en algunos meses.

DETERMINACIÓN DE LA HIPOVIRULENCIA

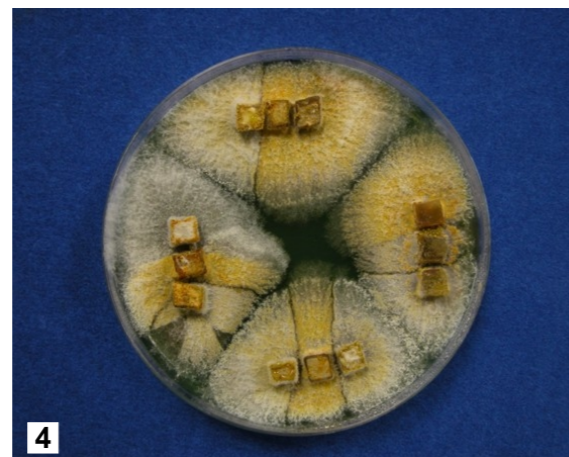
La observación del hongo en campo no es suficiente para determinar si la cepa observada es hipovirulenta. Para ello se deberán tomar muestras de corteza afectada y realizar el aislamiento en laboratorio. Se toman fragmentos de corteza y después de una desinfección superficial, se siembran en el medio nutritivo PDAMB (Patata-dextrosa-agar+metionina+ biotina) y se mantienen a 24 °C. La identificación de la virulencia de los aislados se hace mediante criterios morfológicos: las cepas virulentas presentan un micelio de color rojizo con presencia de cuerpos de fructificación; mientras que en las hipovirulentas se observa ausencia de picnidios y micelio blanco; y por la técnica molecular basada en la extracción del dsARN.



COMPATIBILIDAD VEGETATIVA Y CONVERSIÓN

Para que el control biológico sea más eficaz es recomendable que la variabilidad genética de *C. parasitica* sea la menor posible; para comprobarlo se lleva a cabo el estudio de compatibilidad. Se deberá determinar la compatibilidad vegetativa de los aislados de *C. parasitica* en la zona de estudio. En el proceso se seleccionan fragmentos de micelio de 7 días de vida media de los aislados que se enfrentan en todas las combinaciones posibles en el medio de cultivo PDAG.

Dos aislamientos son compatibles cuando los micelios de la colonia del hongo se fusionan



completamente, mientras que cuando aparece una barrera visible entre los dos micelios, éstos se consideran incompatibles. Estos aislamientos se enfrentan entre sí en todas las combinaciones posibles. Los aislados compatibles entre sí se incluyen en un tipo de compatibilidad vegetativa (vc).

A partir de los resultados obtenidos se establece la diversidad de los tipos de la zona. Cuanto menor sea la diversidad, más fácil será llevar a cabo el control.

Una vez establecidos los tipos vc se lleva a cabo la compatibilidad con las cepas hipovirulentas detectadas. Si alguna es compatible se puede proceder a su aplicación en campo. Pero en el caso de no encontrar cepas hipovirulentas compatibles, se puede realizar un método que consiste en la obtención de cepas hipovirulentas compatibles de forma artificial y que se conoce como conversión.

MÉTODO DE CONVERSIÓN

Los aislados virulentos y los hipovirulentos se enfrentan en todas las combinaciones posibles. En una placa Petri sobre el medio de cultivo PDA se colocan 4 fragmentos de micelio (dos de micelio virulento y dos de hipovirulento) enfrentados entre sí y se mantienen en cámara de cultivo a aproximadamente 24 °C y con un fotoperíodo de 16 horas luz. Para observar las características de crecimiento de la colonia se transfiere un fragmento de las zonas de intersección de los micelios a una nueva placa Petri con medio de cultivo PDA para comprobar las características de crecimiento de la colonia. Si se ha realizado la conversión, a nivel morfológico se observa unión de los micelios sin líneas de separación y un crecimiento típico de cepa hipovirulenta con micelio blanco y ausencia o escasa presencia de cuerpos de fructificación. En caso contrario se observará un micelio blanco que cambia a anaranjado y con presencia de cuerpos de fructificación. En las zonas de confrontación de los micelios se observan líneas miceliales de separación muy evidentes y los micelios no llegan a unirse. A continuación se lleva a cabo la extracción molecular del dsARN. Cuando en la extracción se observa la presencia de moléculas de dsARN de alto peso molecular existen indicios de que la conversión se ha realizado con éxito.

