

El cancro del castaño: estado actual de la enfermedad y de su control mediante transmisión de hipovirulencia

Pedro Mansilla¹,
Olga Aguin¹,
María Jesús Sainz²

¹ Estación Fitopatológica Areeiro, Diputación de Pontevedra, Pontevedra

² Departamento de Producción Vegetal y Proyectos de Ingeniería, Universidad de Santiago de Compostela, Lugo

El cancro del castaño es una enfermedad fúngica grave causada por el ascomiceto *Cryphonectria parasitica* (= *Endothia parasitica*), que afecta principalmente a los castaños europeos (*Castanea sativa*) y americanos (*C. dentata*). Este hongo, de origen asiático, convive como patógeno débil, sin causar apenas daños, con el castaño japonés (*C. crenata*) y, sobre todo, con el castaño chino (*C. mollissima*), considerados tolerantes. *Cryphonectria parasitica* está presente fundamentalmente en áreas de castaño del hemisferio Norte (Figura 1).

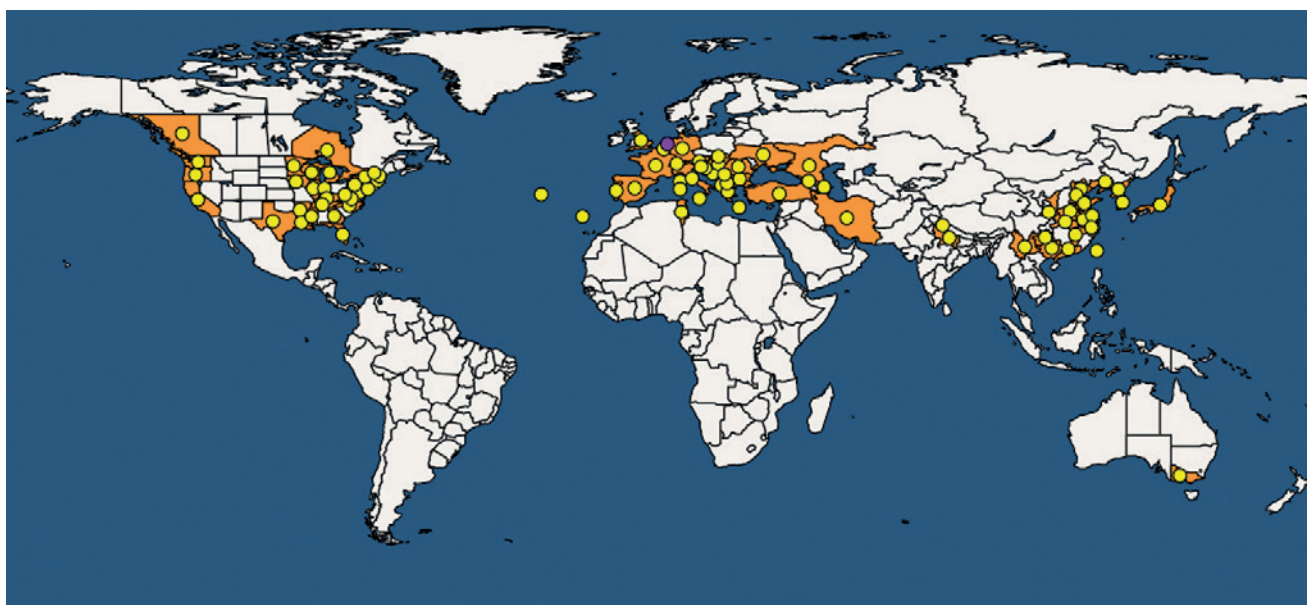


Figura 1. Mapa mundial de distribución de *Cryphonectria parasitica* (EPP0, 2020a).

C*ryphonectria parasitica* fue introducido de forma fortuita a través de material vegetal infectado en Estados Unidos a principios del siglo XX (1904), ocasionando uno de los mayores desastres ecológicos conocidos, ya que causó la muerte de millones de castaños americanos y eliminó prácticamente a *Castanea dentata* como especie dominante en sus áreas naturales.

Años más tarde se constataría la presencia del patógeno en Europa: primero en Italia (1938), después en España (1947) y Suiza (1948), y durante la segunda mitad del siglo XX en la mayoría de los países europeos con áreas de castaño (Robin y Heiniger, 2001). Hoy en día, su incidencia es particularmente preocupante en Fran-

cia, Italia, Suiza, España y Portugal, los países europeos con mayor superficie cubierta por *Castanea sativa*, donde la rentabilidad de su cultivo se ha visto claramente mermada.

Cryphonectria parasitica es un patógeno de herida que ataca fundamentalmente a la corteza de las ramas y tronco, provocando lesiones necróticas llamadas canchros, que son los que le dan nombre a la enfermedad y los que, en casos graves, pueden ocasionar la muerte del árbol (Figura 2).

Aunque es un hongo que tiene una fase asexual y otra sexual, su ciclo de vida es predominantemente asexual; se caracteriza por la formación de un micelio vegetativo haploide y picnidios de color amarillo a naranja que forman conidias (esporas asexuales).

Como sucede en otras especies fúngicas filamentosas puede producirse la fusión de células de hifas de dos cepas distintas (anastomosis hifal), siempre y cuando ambas cepas sean compatibles. El sistema de compatibilidad vegetativa de *Cryphonectria parasitica* está controlada por al menos seis loci, cada uno con dos alelos (Milgroom y Cortesi, 1999), y permite que una cepa del hongo diferencie a sus propias células de las de otras cepas. Para que se produzca anastomosis hifal entre dos cepas es necesario que tengan alelos idénticos en los seis loci. Hay que tener en cuenta que, al haber al menos seis loci (con dos alelos por locus) que determinan la compatibilidad vegetativa (vc), pueden existir más de 64 (2^6) tipos vc. En Europa, de hecho, hay una colección



Figura 2. Diferentes estados de enfermedad y tipologías de canchros en castaños afectados por *Cryphonectria parasitica*.

de cepas de referencia de *Cryphonectria parasitica* de 74 tipos vc, numeradas como EU-1 a EU-74 (Cortesi y Milgroom, 1998; Robin et al., 2000), si bien, en algunos países europeos como por ejemplo España y Portugal, se han detectado cepas de grupos vc que no pertenecen a ninguno de ellos (Bragança et al., 2007; Montenegro et al., 2008; Zamora et al., 2012), lo que indica que posiblemente existen más *loci* implicados en la compatibilidad de *C. parasitica*.

Por otra parte, en las áreas europeas de castaño suele encontrarse una baja diversidad de tipos vc; los tipos más frecuentes en Europa son EU-1, EU-2, EU-12 and EU-14 (Aguín et al., 2020).

En cuanto a la fase sexual, *Cryphonectria parasitica* es una especie heterotálica, es decir son necesarias dos cepas distintas genéticamente compatibles para que se forme un cigoto. La reproducción sexual está controlada por un único *locus*, denominado MAT, que tiene dos alelos, de manera que podrá haber reproducción sexual entre dos cepas si tienen distintos alelos MAT.

Otro aspecto muy importante de la biología del hongo es que algunas

cepas están infectadas por un virus que causa cambios en la morfología de sus colonias y en su fisiología. Los virus que tienen la capacidad de infectar a hongos se denominan micovirus. Se conocen unas 150 especies de micovirus (ICTV, 2020), de las cuales nueve se han encontrado infectando cepas de *C. parasitica* (Aguín et al., 2020). En Europa, hasta la fecha, sólo se ha detectado la especie de micovirus *Cryphonectria hypovirus 1* (CHV1), que también afecta a cepas del hongo en China, Japón y Corea (Lee et al., 2006; Liu et al., 2007). Probablemente este micovirus, que tiene un genoma de ARN monocatenario positivo, se introdujo en Europa junto con su hongo hospedador, *Cryphonectria parasitica*.

Las cepas infectadas por CHV1 son menos agresivas que las que no están infectadas, causando menos síntomas, canchros superficiales y menos daños y nunca la muerte de ramas o del propio árbol. Es decir, las cepas infectadas por el micovirus muestran una virulencia atenuada, por lo que se denominan cepas hipovirulentas. Por extensión, a los micovirus que causan hipovirulencia se les denomina comúnmente hipovirus y a las cepas

fúngicas infectadas por los hipovirus, hipovirulentas.

En contraste, las cepas no infectadas por micovirus son virulentas, ocasionando, tras la entrada en alguna herida del árbol, la aparición de síntomas. Son las cepas responsables de la muerte de ramas o de los propios árboles.

Cuando se aíslan y se cultivan en laboratorio, puede observarse que cepas virulentas e hipovirulentas muestran morfología y velocidad de crecimiento diferentes. Así, en medio de cultivo PDA, las colonias de las cepas infectadas por CHV1 son blancas, con márgenes generalmente lobulados, escaso micelio aéreo y producción de pocos o ningún picnidio, mientras que las colonias de cepas libres de virus muestran un micelio con crecimiento organizado y regular, producen numerosos picnidios que proporcionan un color amarillo-naranja característico y crecen más rápidamente que las hipovirulentas (Figura 3).

Cuando una cepa hipovirulenta forma anastomofosis hifales con una cepa virulenta compatible, le transmite el hipovirus. La cepa virulenta así infectada se convierte en hipovirulenta. Este fenómeno, que ocurre de



Figura 3. Cancro virulento en tronco de castaño europeo y colonia de un aislado virulento de *Cryphonectria parasitica* a partir de este cancro.

forma natural, permite la diseminación del hipovirus, pero también el control natural espontáneo de la enfermedad (Figura 4). Desafortunadamente, en campo, la mayoría de las cepas son virulentas, por lo que frecuentemente no sucede el control natural del cancro y la enfermedad se extiende.

Para tratar de prevenir la introducción y dispersión de *C. parasitica* en nuevas áreas de castaño, y ante la gravedad de los daños que causa y la amenaza que supone para la supervivencia de los árboles, se han adoptado una serie de medidas en todo el mundo que afectan al movimiento de madera, semillas y plantas. En Europa la Directiva 2000/29/CE del Consejo, modificada por la Directiva 2004/102/CE de la Comisión, incluyó a *Cryphonectria parasitica* en el grupo de organismos nocivos para los vegetales o productos vegetales, estableciendo medidas de protección contra la introducción y propagación de este patógeno dentro de la UE. Esta directiva obligaba al control de cualquier material vegetal de los géneros *Castanea* y *Quercus* destinado a plantación que pudiera entrar en la UE, con excepción de las semillas, así como al control de madera (excepto

madera libre de corteza) y de corteza aislada de castaño.

La Directiva 2000/29/CE y sus posteriores modificaciones, así como la Directiva 2004/105/CE (por la que se fijan los modelos oficiales de certificados fitosanitarios o certificados fitosanitarios de reexportación que deben acompañar los vegetales, productos y otros objetos procedentes de terceros países y enumerados en la Directiva 2000/29/CE) se incorporaron a la normativa española mediante el Real Decreto 58/2005, de 21 de enero, por el que se adoptaron medidas de protección contra la introducción y difusión en el territorio nacional y de la Comunidad Europea de organismos nocivos para los vegetales o productos vegetales, así como para la exportación y tránsito hacia países terceros.

La Organización Europea y Mediterránea para la Protección de Plantas, una organización internacional (con 52 países miembros en la actualidad) que identifica organismos que pueden ser patógenos y plagas de riesgo para plantas y propone medidas fitosanitarias para su control, incluye a *Cryphonectria parasitica* como patógeno de cuarentena en su lista A2 (EPPO, 2020b). La lista A2 inclu-

ye especies de patógenos y plagas, presentes en alguno o varios de los países miembros de la Organización, para las que se propone que se regulen como patógenos de cuarentena. *Cryphonectria parasitica* también se considera un patógeno de cuarentena en varios países en todo el mundo, como es el caso de Estados Unidos (EPPO, 2020a).

Sin embargo, las restricciones existentes no han sido totalmente eficaces, y no han podido detener completamente la dispersión del patógeno en Europa. El principal problema son las plantas asintomáticas infectadas, ya que no pueden ser detectadas a través de inspecciones visuales (Rigling y Prospero, 2018).

Una vez que se establece en una nueva área de castaños, no existe ningún método eficaz cultural ni químico de control de *Cryphonectria parasitica*, ni ningún cultivar de castaño europeo tolerante o resistente a la enfermedad (EPPO, 1997). La propagación de la enfermedad se intenta limitar mediante la eliminación de árboles sintomáticos o ramas afectadas, la desinfección de herramientas de corte y la destrucción de los restos de poda. Pero generalmente estas

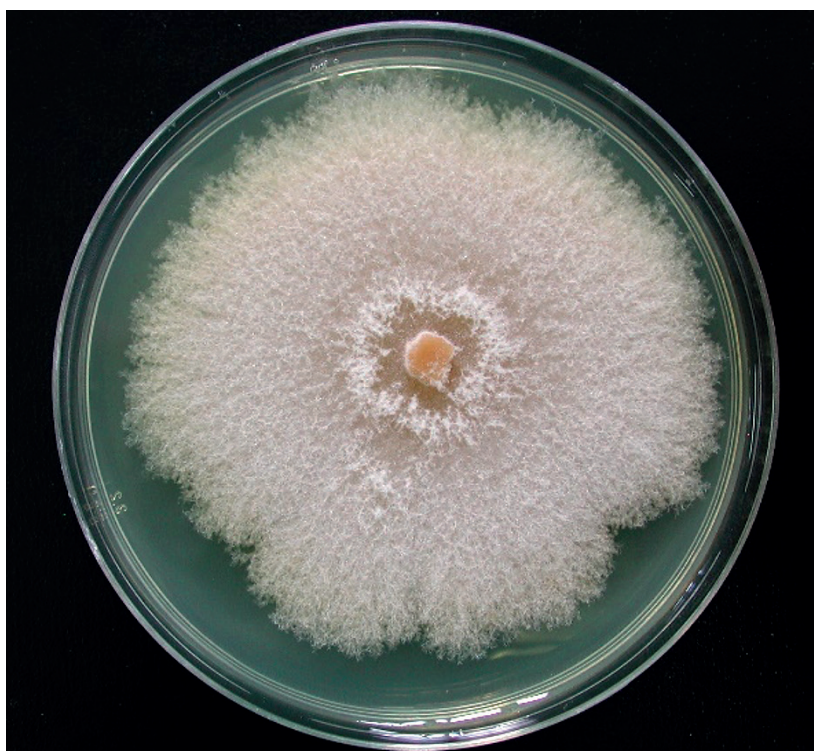


Figura 3. Cancro hipovirulento en tronco de castaño europeo y colonia de un aislado hipovirulento de *Cryphonectria parasitica* a partir de este cancro.



Figura 4. Éxito (izquierda) y fracaso (derecha) en la transmisión del micovirus CHV1 desde un aislado hipovirulento (colonia blanca) a uno virulento (colonia naranja). En cada placa, se han dispuestos dos fragmentos de cultivos de una cepa hipovirulenta y dos de una virulenta en medio PDA. En el cultivo de la izquierda, los aislados tenían el mismo tipo vc, mientras que en el de la derecha, no.

medidas no surten el efecto deseado debido a la facilidad con la que el patógeno se disemina.

Ante la ineficacia de los métodos culturales y/o químicos, en los últimos 20 años la investigación sobre el control del cancro del castaño se ha basado en el desarrollo de métodos biológicos basados en la transmisión de micovirus de cepas hipovirulentas a virulentas. Para un área de castaños afectados por la enfermedad, el primer paso para llevar cabo estos métodos es tomar muestras de canchros y aislar en el laboratorio cepas virulentas e hipovirulentas, si las hay, de *Cryphonectria parasitica* a partir de ellos. Es importante obtener un alto número de cepas virulentas para conocer la diversidad de tipos de compatibilidad vegetativa. Si se tiene la fortuna de encontrar cepas hipovirulentas, hay que determinar también su tipo vc.

Existen zonas de castaño europeo en Suiza, Francia, Croacia, Eslovenia, Bosnia y Macedonia en las que los canchros causados por *Cryphonectria parasitica* tienen una alta prevalencia de infección por hipovirus, con una proporción de más de un 50 %. Sin embargo, en otras zonas europeas

donde se ha detectado este hongo patógeno todavía no se han detectado cepas hipovirulentas o su prevalencia es muy baja. Es el caso de España, Portugal, Bulgaria, Rumania, algunas zonas de Suiza y Turquía (Rigling y Prospero, 2018).

Hay que señalar también que no es fácil detectar cepas hipovirulentas en campo, sobre todo cuando su incidencia es baja, ya que se aíslan de canchros superficiales que no llegan a afectar al cambium en los que no se forman, o apenas hay, cuerpos de fructificación (Heiniger y Rigling, 1994).

Aunque podría pensarse que canchros aparentemente superficiales son indicadores de la presencia de cepas hipovirulentas, esto no siempre es así, ya que puede tratarse de canchros iniciales que con el tiempo evolucionarán a lesiones más importantes. Por ello, cuando se obtiene un aislado de *Cryphonectria parasitica*, independientemente de las características del cancro del que se obtenga y de la morfología de su colonia en un medio de cultivo, la única manera de confirmar que está infectado por un micovirus es obtener el ARN vírico y proceder a la identificación de la especie vírica en laboratorios de análisis

(Bryner et al., 2012). En la Figura 5, se muestra un gel de agarosa en el que se observan los fragmentos de ARN obtenidos a partir de aislados hipovirulentos de *C. parasitica*.

En caso de encontrar cepas hipovirulentas compatibles con las cepas virulentas dominantes en la zona, pueden elaborarse inóculos de cepas hipovirulentas para su introducción en áreas de castaños afectados por cancro. Estos inóculos pueden incluir una o más cepas hipovirulentas. Se ha comprobado que, si en una misma zona de castaños existen cepas virulentas de varios tipos vc codominantes, se podrían aplicar un inóculo que contuviera una mezcla de cepas hipovirulentas pertenecientes a esos diferentes tipos vc para incrementar el éxito en el control de la enfermedad (Robin et al., 2000).

Las cepas hipovirulentas de los inóculos deben aislarse de la misma zona del castaño donde se reintroducirán. No se recomienda utilizar cepas hipovirulentas obtenidas de otras zonas o de otros países, ya que pueden no adaptarse y/o desplazarse (Feau et al., 2014).

El inóculo puede realizarse en diferentes formulaciones. Éstas deben

tener características adecuadas para garantizar la viabilidad de las cepas hipovirulentas y para permitir una fácil aplicación del inóculo sobre las lesiones, de manera que se favorezca el contacto entre las cepas hipovirulentas del inóculo y las virulentas del árbol tratado y que se produzca la transmisión del micovirus, en Europa de CHV1, mediante anastomosis hifal.

Distintos equipos de investigación en Europa y en Estados Unidos han elaborado formulaciones de inóculos de cepas hipovirulentas para estudiar su eficacia en la transmisión de hipovirulencia a cepas virulentas y su eficacia en el control del cancro del castaño en campo a nivel experimental, pero ninguno está comercializado. En España, la empresa Fauna Útil tiene una patente referida a la composición y preparación de un gel para el tratamiento de castaños afectados por cancro, concedida hace 10 años. Se ha probado la eficacia de ese gel para servir como portador de inóculos hipovirulentos y su utilidad para ser aplicado en los cancos de árboles afectados.

En Europa, donde suele encontrarse una baja diversidad de tipos vc de *Cryphonectria parasitica*, el control

biológico del cancro del castaño mediante la introducción de cepas hipovirulentas del hongo infectadas con el micovirus CHV-1 ha tenido una gran eficacia (Robin y Heiniger, 2001), aunque en el caso de Francia, donde se ha registrado una incidencia similar de hipovirulencia en sitios tratados y no tratados, no se sabe con certeza si la propagación de la hipovirulencia se ha debido a las cepas introducidas o a cepas hipovirulentas presentes naturalmente en las áreas afectadas por la enfermedad (Robin et al., 2000). Hay que precisar que los tratamientos con cepas hipovirulentas en Europa han sido particularmente efectivos en cancos pequeños y delimitados en árboles jóvenes, mientras que, en cancos grandes en árboles viejos, su efectividad ha sido baja (Rigling y Prospero, 2018).

En cambio, en Estados Unidos el control biológico del cancro del castaño basado en la introducción del hipovirus CHV-1 no ha tenido éxito, lo cual se ha relacionado con el elevado número de tipos vc en las poblaciones de *Cryphonectria parasitica* (Milgroom y Cortesi, 2004). Es decir, había muchas cepas virulentas en campo que

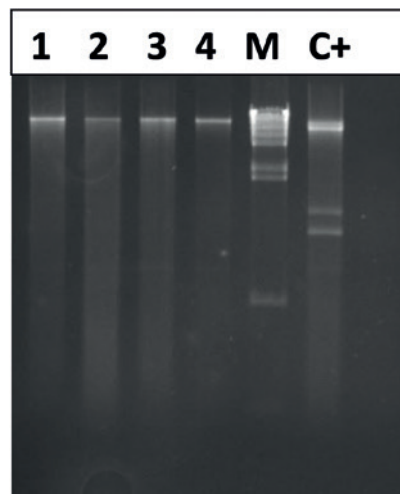


Figura 5. Gel de agarosa mostrando los fragmentos de ARN obtenidos a partir de aislados hipovirulentos de *C. parasitica*.

Calles 1-4: aislados hipovirulentos, M: marcador, C+: control positivo.

tenían un tipo vc diferente al de la cepa o cepas hipovirulentas introducidas.

En resumen, el éxito de la transmisión de la hipovirulencia como método de control biológico del cancro del castaño depende de factores relacionados con la biología de las poblaciones de *Cryphonectria parasitica* en las áreas afectadas y con la calidad



Figura 6. Cancro en el tronco de un castaño europeo (izquierda) y aspecto del mismo cancro un año después de la aplicación de un inóculo hipovirulento (derecha).

de los inóculos. La situación más favorable para controlar la enfermedad se daría en zonas dominadas por cepas virulentas del hongo con uno o pocos tipos de compatibilidad vegetativa y con un solo tipo MAT, de manera que la reproducción fuese principalmente asexual; las cepas hipovirulentas seleccionadas para la inoculación tendrían que tener una alta capacidad de conversión y ser compatibles vegetativamente con las cepas virulentas, para que pueden transmitir el virus; y tendría que disponerse de una formulación adecuada de inóculo que garantizase la estabilidad y capacidad de dispersión de las cepas hipovirulentas incluidas en él (Kunova et al., 2016).

En muchos rodales de castaños afectados por cancro en el noroeste de España, las poblaciones de *Cryphonectria parasitica* presentan pocos tipos de compatibilidad vegetativa, muchas veces con uno marcadamente dominante, y un solo tipo MAT, detectándose en ellas cepas hipovirulentas infectadas por el virus CHV1 (Montenegro et al., 2008). Estas condiciones permiten la implementación exitosa del control biológico de la enfermedad mediante la aplicación de inóculos hipovirulentos de calidad obtenidos mediante la multiplicación y reintroducción de esas cepas hipovirulentas.

Debe señalarse, sin embargo, que, a pesar de las evidencias y estudios científicos sobre el éxito del control biológico del cancro mediante inóculos hipovirulentos en las principales zonas europeas afectadas por *Cryphonectria parasitica* (Italia, Francia, Portugal, España, Suiza), no existe todavía una regulación para la transferencia de esta metodología al sector. Como otros investigadores europeos han indicado en publicaciones previas, depende de los organismos competentes esperar a que la hipovirulencia natural actúe y se propague, si hay cepas hipovirulentas en las áreas afectadas que puedan llegar a poder hacerlo, o facilitar el establecimiento de una hipovirulencia natural implementada mediante la multiplicación y reintroducción de esas cepas hipovirulentas, de manera que los resultados sean más rápidos y se puedan recuperar lo antes posible los castaños afectados.



Figura 6. Otro ejemplo de un cancro en el tronco de un castaño europeo (izquierda) y aspecto del mismo cancro un año después de la aplicación de un inóculo hipovirulento (derecha)

REFERENCIAS

- Aguín O, Mansilla JP, Salinero C et al. 2020. Biological control with transmissible hypovirulence: Keys to success in chestnut blight. En: De Cal A, Melgarejo P, Magan n (Eds.). *How research can stimulate the development of commercial biological control against plant diseases*. Springer, Basilea (en prensa).
- Bragança H, Simões S, Onofre N et al. 2007. *Cryphonectria parasitica* in Portugal: diversity of vegetative compatibility types, mating types and occurrence of hypovirulence. *For. Pathol.* 37: 391–402.
- Bryner SF, Rigling D, Brunner PC. 2012. Invasion history and demographic pattern of *Cryphonectria hypovirus 1* across European populations of the chestnut blight fungus. *Ecol. Evol.* 2: 3227–3241.
- Cortesi P, Milgroom MG. 1998. Genetics of vegetative incompatibility in *Cryphonectria parasitica*. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 2988–2994.
- EPPO. 1997. *Cryphonectria parasitica*. Quarantine Pests for Europe, 2ª ed., pp. 729–732. CAB International, Wallingford.
- EPPO. 2005. *Cryphonectria parasitica*. EPPO Bulletin 35: 295–298.
- EPPO. 2020a. *Cryphonectria parasitica* (ENDOPA). <https://gd.eppo.int/taxon/ENDOPA> (26.9.2020).
- EPPO. 2020b. EPPO A2 List of pests recommended for regulation as quarantine pests. https://www.eppo.int/ACTIVITIES/plant_quarantine/A2_list (15.10.2020).
- Feau N, Dutech C, Brusini J et al. 2014. Multiple introductions and recombination in *Cryphonectria hypovirus 1*: perspective for a sustainable biological control of chestnut blight. *Evol. Appl.* 7: 580–596.
- Heiniger U, Rigling D. 1994. Biological control of chestnut blight in Europe. *Annu. Rev. Phytopathol.* 32: 581–589.
- ICTV. 2019. Virus Metadata Repository: ver. June 1, 2019; MSL34. <https://talk.ictvonline.org/taxonomy/vmr/m/vmr-file-repository/8287> (15.10.2020).
- Kunova A, Pizzatti C, Cerea M et al. 2016. New formulation and delivery method of *Cryphonectria parasitica* for biological control of chestnut blight. *J. Appl. Microbiol.* 122: 180–187.
- Lee SH, Moon BJ, Lee JK. 2006. Characteristics of hypovirulent strains of chestnut blight fungus, *Cryphonectria parasitica*, isolated in Korea. *Mycobiology* 34: 61–66.
- Liu YC, Milgroom MG. 2007. High diversity of vegetative compatibility types in *Cryphonectria parasitica* in Japan and China. *Mycologia* 99: 279–284.
- Milgroom MG, Cortesi P. 1999. Analysis of population structure of the chestnut blight fungus based on vegetative incompatibility genotypes. *PNAS* 96: 10518–10523.
- Milgroom MG, Cortesi P. 2004. Biological control of chestnut blight with hypovirulence: A critical analysis. *Annu. Rev. Phytopathol.* 42: 311–338.
- Montenegro D, Aguín O, Sainz MJ et al. 2008. Diversity of vegetative compatibility types, distribution of mating types and occurrence of hypovirulence of *Cryphonectria parasitica* in chestnut stands in NW Spain. *For. Ecol. Manag.* 256: 973–980.
- Rigling D, Prospero S. 2018. *Cryphonectria parasitica*, the causal agent of chestnut blight: invasion history, population biology and disease control. *Mol. Plant Pathol.* 19: 7–20.
- Robin C, Anziani C, Cortesi P. 2000. Relationship between biological control, incidence of hypovirulence and diversity of vegetative compatibility types of *Cryphonectria parasitica* in France. *Phytopathology* 90: 730–737.
- Robin C, Heiniger U. 2001. Chestnut blight in Europe: diversity of *Cryphonectria parasitica*, hypovirulence and biocontrol. *For. Snow Landsc. Res.* 76: 361–367.
- Robin C, Lanz S, Soutrenon A et al. 2010. Dominance of natural over released biological control agents of the chestnut blight fungus *Cryphonectria parasitica* in south-eastern France is associated with fitness-related traits. *Biol. Control* 53: 55–61.
- Zamora P, Martín AB, Rigling D et al. 2012. Diversity of *Cryphonectria parasitica* in western Spain and identification of hypovirus-infected isolates. *For. Pathol.* 42: 412–419.