



**5º CONGRESO FORESTAL
ESPAÑOL**

5º Congreso Forestal Español

Montes y sociedad: Saber qué hacer.

REF.: 5CFE01-504

Editores: S.E.C.F. - Junta de Castilla y León
Ávila, 21 a 25 de septiembre de 2009
ISBN: 978-84-936854-6-1
© Sociedad Española de Ciencias Forestales

El control biológico del chancro del castaño en Cataluña

COLINAS GONZÁLEZ, C.^{1,2}, ROJO SANZ, M.³, ARGEMÍ RELAT, J.⁴, HERAS DOLADER, J.⁵, CASTAÑO SOLER, C.², ROTLLAN PUIG, X.², GÓMEZ GALLEGU, M.², GILARTE CAYUELA, S.², USTRELL JUAN, E.² y SARRI TORRAS, H.²

¹ Universitat de Lleida. Dept. de Producció Vegetal i Ciència Forestal. Av. Alcalde Rovira Roure, 177. 25198. LLEIDA. carlos.colinas@pvcf.udl.cat

² Centre Tecnològic Forestal de Catalunya. Crta. St. Llorenç de Morunys, km. 2 (dir. Port del Comte), E-25280. SOLSONA

³ Departament de Medi Ambient i Habitatge. Servei de Sanitat Vegetal Dr. Roux, 80, 08017 Barcelona.

⁴ Diputació de Barcelona. Servei de Parcs Naturals. Ctra. de Sant Celoni al Turó de l'Home, Km. 10,8. 08470 Fogars de Montclús.

⁵ Departament de Medi Ambient i Habitatge. Servei de Gestió Forestal. Direcció General del Medi Natural. Dr. Roux, 80. 08017 Barcelona

Resumen

Cryphonectria parasitica, el hongo causante del chancro del castaño, es un ejemplo de patógeno introducido por el hombre. El avance de este hongo en Cataluña ha provocado un incremento de la mortalidad y decrepitud de las masas de castaño. La falta de la aplicación de un control efectivo contra este hongo ha provocado la desesperación de los propietarios que, al ver morir sus masas, han creído más viable sustituir los castaños por *Pseudotsuga menziesii* o *Pinus radiata*.

El único tratamiento efectivo contra el chancro del castaño es la aplicación del control biológico mediante el uso de cepas hipovirulentas infectadas por CHV1. El control biológico ha dado resultados muy satisfactorios en países como Italia, Francia y Suiza.

Con el objetivo de aplicar el control biológico en Cataluña, se estudiaron los grupos de compatibilidad vegetativa (GCV) del hongo y la incidencia de la hipovirulencia en las masas de castaño. Para evaluar la necesidad de aplicar el control, se hicieron inventarios sanitarios para medir la incidencia y severidad del chancro en las mismas.

Se obtuvo inóculo hipovirulento con la conversión de las cepas locales de GCV mayoritario y con la producción de micelio hipovirulento en cámaras a temperatura controlada. Las conversiones se hicieron con una cepa portadora de CHV1. Las inoculaciones se hicieron con micelio y con conidios. Asimismo, se ensayó una inoculación con conidios a gran escala, consistente en la fumigación de los chancros con un cañón fumigador ubicado en una camioneta.

Finalmente, para comprobar la efectividad de los tratamientos, se hicieron seguimientos en las masas tratadas y se estudió la dispersión de CHV1 dentro y fuera de las parcelas tratadas.

Los resultados muestran que la diversidad de GCV en Cataluña es baja, con tan solo 13 GCV descritos. Asimismo, el GCV EU-2 es en la mayoría de casos el dominante. La presencia de cepas hipovirulentas anteriores a las inoculaciones era baja (<4%) y en la mayoría de unidades de gestión estudiadas no se encontró ninguna cepa hipovirulenta. Estas cepas hipovirulentas estaban sobretodo concentradas en el Alt Empordà y en una finca concreta de l'Espai Natural de Guillerics-Savassona. El seguimiento de las inoculaciones permitió observar como la práctica totalidad de los árboles tratados se recuperaron. Asimismo, se observó dispersión de CHV1 en el 70% de las parcelas estudiadas y en el 44% esta dispersión también se observaba fuera de la unidad de gestión.

Palabras clave

Control biológico, GCV, *Cryphonectria parasitica*

1. Introducción

El chancro del castaño lleva afectando las masas europeas de castaño desde mediados del Siglo XX (Milgroom et al. 1996; Heiniger & Rigling, 1994; Griffin, 1986). En Estados Unidos esta enfermedad fue observada por primera vez en 1904 (Elliston, 1981) y en un periodo de 50 años destruyó 3,6 millones de hectáreas (Manion, 1991).

Cryphonectria parasitica (Murr.) Barr, el hongo causante del chancro del castaño, es un saprofito facultativo perteneciente a la clase de los Ascomycetes y al orden de los Diaphortales (Baidyaroy & Bertrand, 2001). *Cryphonectria parasitica* causa la muerte de las células de la albura debido a la acción de las toxinas que segrega (Vrot & Grente, 1985). La muerte de la albura impide el flujo de savia y causa el marchitamiento de las hojas distales y la formación de brotes epicórmicos (Vrot & Grente, 1985; Anagnostakis, 1987). Los signos de la enfermedad son la aparición de micelio blanco, fácilmente visible debajo de la corteza, y la formación de estromas naranjas visibles a simple vista, donde se forman los picnidios (Grente & Berthelay-Sauret, 1978).

En Europa se observaron por primera vez chancros que no correspondían a las descripciones anteriores. Estos chancros tenían apariencias inusuales y estaban cicatrizando. Se ha observado que los chancros que presentan estas características están infectados por un virus de doble cadena de RNA que atenúa la virulencia del hongo (MacDonald & Fulbright, 1991; Choi & Nuss, 1992; Heiniger, 1994). Las cepas infectadas, al perder parte de la virulencia, se denominan hipovirulentas.

El control biológico consiste en la introducción y establecimiento de cepas hipovirulentas en las masas de castaño. Durante años se han aplicado programas de control biológico mediante el uso de cepas hipovirulentas en Europa y Estados Unidos (Zechini D'Aulerio et al. 1982; Bisiach et al. 1991; Vrot & Grente, 1985; Intropido et al. 1987; Campanella & Sammarco, 1999a; Grente & Berthelay-Sauret, 1978; Hoegger et al. 2003). En la mayoría de estos programas, la metodología utilizada ha consistido en la aplicación de micelio hipovirulento en los bordes de los chancros (Intropido et al. 1987), no obstante, se ha comprobado que la aplicación de conidios hipovirulentos del hongo también es efectiva (Kuhlman, 1983; Scibilia et al. 1992; Plana, 2006).

El control biológico ha dado resultados muy positivos en Europa pero se considera un fracaso en el este de Estados Unidos (Milgroom & Cortesi, 2004; Anagnostakis et al. 1986). El fracaso del control biológico en Estados Unidos puede deberse a que en este país hay mayor diversidad de grupos de compatibilidad vegetativa (GCV) que en Europa (Hogan & Griffin, 2002; Van Alfen, 1988; Melzer et al. 1997). En ese sentido, una baja diversidad de GCV facilita la dispersión de la hipovirulencia y por lo tanto el éxito del control biológico (Anagnostakis et al. 1986; Homs et al. 2001). Esta circunstancia hace preciso que se aplique un programa de control biológico lo más pronto posible después de la aparición de la enfermedad y antes de que el número de tipos haya aumentado excesivamente.

El objetivo final del control biológico es, además de sanar los árboles tratados, provocar una expansión natural del carácter hipovirulento a los otros chancros. Es por ello que la exposición de un chancro virulento al inóculo hipovirulento debe no sólo causar la conversión de la cepa virulenta, sino también reducir la cantidad de inóculo virulento e iniciar la producción de inóculo hipovirulento (MacDonald & Fulbright, 1991). Con la producción de inóculo hipovirulento se incrementa así la probabilidad de dispersión en el medio.

La dispersión de cepas hipovirulentas en zonas donde se ha aplicado el control biológico es un fenómeno que se ha observado ampliamente en Europa (Bisiach et al. 1991; Heiniger & Rigling, 1994; Bisiach et al. 1985; Grente & Berthelay-Sauret, 1978; Hoegger et al. 2003), otros estudios ponen de manifiesto la dispersión y el establecimiento natural del hipovirus en

las masas de castaño no tratadas (Bisseger et al. 1997; Robin et al. 2000). La transmisión horizontal del hipovirus sucede mediante la anastomosis hifal entre un hongo virulento y uno hipovirulento. Este fenómeno también es visible en cultivo *in vitro* (Choi & Nuss, 1992). La transmisión vertical del hipovirus se da a través de conidios (Homs et al. 2001). Por el contrario, las ascosporas no son capaces de transmitir el hipovirus (Prospero et al. 2006; Milgroom & Cortesi, 2004).

Los vectores responsables de la dispersión del hipovirus pueden ser ácaros, al alimentarse del material fúngico (Nannelli et al. 1998), pájaros, insectos y pequeños mamíferos (Elliston, 1981; Scharf & De Palma, 1981; Heiniger & Rigling, 1994; Anagnostakis, 1987). Por otro lado, a diferencia de las ascosporas, el viento no es capaz de transportar a grandes distancias los conidios (Anagnostakis, 1987).

2. Objetivos

El objetivo de este trabajo ha sido la aplicación de un programa de control biológico en Cataluña entre los años 2006-2009, consistente en la introducción del hipovirus CHV1 para la recuperación de las masas afectadas y, a su vez, el estudio de la dispersión de CHV1 en las parcelas tratadas.

3. Metodología

3.1. Localización de las parcelas de tratamiento

Entre los años 2006 y 2008 la administración, en contacto con los propietarios, propusieron parcelas de tratamiento contra el chancro del castaño. Las parcelas estaban repartidas en 3 provincias catalanas (Girona, Barcelona y Tarragona). Algunas de las parcelas tenían figuras de protección especial como el Parc Natural del Montnegre-Corredor, Parc Natural del Montseny, Parc Natural de la Zona Volcànica de la Garrotxa, el Espai Natural de les Guillerries-Savassona o el Espai Natural de les Muntanyes de Prades. Asimismo, en las parcelas de tratamiento figuraban tanto parcelas de titularidad públicas como privadas.

Las parcelas a tratar eran prioritariamente latizales o castañares de fruto en los que no había prevista una actuación silvícola en al menos un año. Para evaluar la necesidad de tratamiento, se realizaron inventarios sanitarios en los que se estudiaba la severidad e incidencia de la enfermedad.

3.2. Muestreo, aislamiento y estudios previos de las cepas de *Cryphonectria parasitica*

En las parcelas seleccionadas se hizo un estudio de los GCV presentes según la metodología de Homs et al. (2001), para identificar así el GCV dominante que posteriormente se utilizaría como cepa portadora de CHV1. Con el objetivo de detectar la presencia de CHV1 previa a la inoculación, se realizó el test morfológico de detección de cepas hipovirulentas según la metodología de Bisseger et al. (1997). Se consideraron hipovirulentos los aislamientos que no presentaban picnidios y posibles los que presentaban picnidios pero en menor cantidad que los pigmentados normales. Los aislamientos con crecimientos raquíuticos también se consideraron hipovirulentos. La presencia de CHV1 en los aislamientos con morfología posiblemente hipovirulenta se confirmó mediante la extracción del dsRNA según la metodología de Allemann et al. (1999).

3.3. Producción y aplicación de cepas hipovirulentas

3.3.1 Conversión de cepas virulentas con cepas portadoras del virus

La producción de conidios y micelio hipovirulento se hizo mediante cepas portadoras de CHV1 locales y del GCV dominante en la zona. Las cepas seleccionadas para ser portadoras fueron inoculadas en el laboratorio mediante cocultivo con el aislamiento LL0559 (originario de Osor) portador de CHV1. Anteriormente, esta cepa fue descrita como CHV1-I (Homs et al. 2001). Para ello, se cultivaba una porción de micelio del aislamiento receptor con otra del portador del virus, ambos separados 5 mm. entre sí. Transcurridos 7 días, se realizaba la evaluación de la conversión observando si el aislamiento receptor había perdido la pigmentación en el frente de avance. En caso de existir conversión, la cepa virulenta presentaba un cambio de coloración en el punto de unión con la cepa portadora del virus. En este caso, se aislaba el cultivo convertido tomando una muestra de micelio receptor de la zona de la placa más alejada del aislamiento donador. Este proceso se repetía una segunda vez usando el aislamiento convertido como donador y el mismo aislamiento como receptor una segunda vez. Así se reduce el riesgo de introducir un aislamiento alóctono en la zona de tratamiento. La presencia de CHV1 en el aislamiento convertido se comprobó mediante el test morfológico y la extracción de dsRNA como en el apartado anterior. La conversión de aislamientos de GCV diferentes al EU-2, el GCV de LL0559, se realizó repitiendo el proceso anterior en un gran número de placas hasta obtener la conversión. En este caso, al final del proceso se comprobó la pertenencia del aislamiento convertido al GCV del receptor para evitar el riesgo de contaminación.

3.3.2. Producción de inóculo

3.3.2.1 Producción de micelio hipovirulento

La producción de micelio hipovirulento se hacía cultivando cepas portadoras de CHV1 en placas PDA circulares. Las placas se dejaban crecer durante 7 días a 24°C y con un fotoperiodo de 10 horas en cámara de germinación. Finalmente, se recogía el micelio de las placas con una espátula y se introducía en un tubo de plástico para ser guardado a 4°C y utilizado al día siguiente.

3.3.2.2. Producción de conidios hipovirulentos

Para la producción de conidios hipovirulentos las cepas portadoras de CHV1 eran cultivadas en placas PDA cuadradas y se dejaban en la cámara de germinación durante 15 días a 24°C. El fotoperiodo y la intensidad lumínica eran factores muy importantes para favorecer la conidiación y obtener así mayor cantidad de conidios. Para ello, las placas se sometían a una intensidad lumínica de 10.000 luxes, valor que permite la máxima conidiación del hongo (Hillman et al. 1990). Asimismo, el fotoperiodo era de 16 horas. Transcurridos los 15 días de crecimiento, se introducían unos 40 mL. de agua mineral en las placas y se dejaban reposar. Finalmente, se recogía el agua con conidios de las placas hasta obtener un volumen conocido. Con ello se obtenía una solución madre de conidios. La evaluación de la concentración de conidios se hacía con un hematocitómetro.

3.3.3. Aplicación de las cepas hipovirulentas

3.3.3.1. Aplicación con micelio

El protocolo de aplicación de micelio hipovirulento en los chancros era el descrito por Intropido et al. (1987). Primeramente se hacían orificios en la corteza separados 3 cm. entre si. Asimismo, se guardaba una distancia de 2 cm. del borde superior del chancro y de 3 cm. del borde lateral. Seguidamente, se aplicaba el micelio hipovirulento en los orificios y se tapaban con cinta adhesiva de papel para evitar la desecación (Anagnostakis & Waggoner, 1981).

3.3.3.2. Aplicación con conidios mediante fumigadora

En primer lugar se diluía la solución madre obtenida en el laboratorio con agua mineral. La dilución dependía del número de conidios observados en el hematocitómetro. La inoculación en los chancros se aplicaba siempre por encima de 380 millones de conidios/m², cuyo valor permite que el 92% de los chancros originados sean hipovirulentos (Scibilia et al. 1992). No obstante, estos mismos autores observaron conversión en el 100% de los chancros aplicando una solución de 76 millones de conidios/m² mientras que con otra cepa diferente se convirtieron el 87% de los chancros aplicando 140 millones de conidios/m². La aplicación de conidios en el control biológico es posible porque se ha observado que el porcentaje de conidios portadores de CHV1 es alto, entre valores observados del 70,5% según Plana, (2006), del 69% según Prospero et al. (2006) y del 95%, según Peever et al. (2000). La aplicación de la dilución de conidios se hacía con una fumigadora a motor, mojando los chancros y evitando el escurrimiento, tal y como recomienda Plana, (2006). El raspado previo de los chancros no era necesario ya que Plana, (2006) observó efectividad en las inoculaciones realizadas en chancros sin raspado previo.

3.3.4. Tratamientos en campo

3.3.4.1. Tratamiento manual

Los tratamientos en las unidades de gestión se hicieron por transectos o por subparcelas cuadradas de 20x20 m. En el caso de inoculaciones por transectos, las intensidades de inoculación eran variables según las condiciones de la parcela. En el caso de las parcelas inoculadas por subparcelas de 20x20 m. se establecían 3 subparcelas con distintas metodologías e intensidades de inoculación; en una primera subparcela se inoculaban el 100% de los chancros con micelio, en la segunda se inoculaban el 50% de los chancros con micelio y en la última se inoculaban el 100% de los chancros con conidios. En total, se inocularon 102 unidades de gestión. De las 102 unidades, 59 se inocularon con conidios y 43 con micelio.

3.3.4.2. Tratamiento mecanizado

En la finca Can Prat, perteneciente al Parc Natural del Montseny, se hizo una inoculación con conidios mediante un cañón fumigador ubicado en una camioneta. La preparación de la solución conidial seguía el mismo procedimiento que en el caso de las inoculaciones con fumigadora. La aplicación de la solución conidial consistió en repartir inóculo en ambos lados de una pista forestal de 800 m. En los 160 litros de solución conidial utilizada en la inoculación había 297.000 millones de conidios. Asimismo, se marcaron 3 parcelas control circundantes a la pista para estudiar su evolución. De estas parcelas control, se marcaron los chancros y se evaluó su carácter.

3.4. Seguimiento de las inoculaciones

Para comprobar el efecto de las inoculaciones, se hicieron seguimientos en las parcelas tratadas. Los seguimientos en las parcelas se hicieron un año después de su inoculación. Asimismo, en algunas de las parcelas inoculadas en el año 2006, se hizo un segundo seguimiento transcurridos dos años de la inoculación.

3.4.1. Seguimiento de las parcelas inoculadas manualmente

El seguimiento de las inoculaciones consistió en observar el estado de los chancros tratados y en el estudio de la dispersión de CHV1 dentro y fuera de la unidad de gestión. Para estudiar la dispersión de CHV1 dentro de la unidad de gestión, se hicieron transectos de control a 6 metros de los transectos de la inoculación y se observó el carácter de los chancros. En el seguimiento de las subparcelas de 20x20 m., se hicieron transectos de control dentro de las mismas y se observaron los chancros no inoculados de estos transectos. Para estudiar la dispersión de CHV1 fuera de la parcela, se observaron los chancros situados fuera de la unidad de gestión. Con los datos obtenidos, se categorizaban las parcelas según el grado de dispersión de CHV1: en clase I el efecto de la inoculación fue nulo, en clase II los chancros tratados cicatrizaron, en clase III los chancros tratados cicatrizaron y se observó dispersión de CHV1 dentro la parcela y, en clase IV, la dispersión se observó, además, fuera de la parcela. La clasificación del carácter de los chancros fue en función de la sintomatología descrita por Grente & Berthelay-Sauret, (1978) y Robin et al. (2000). Los chancros eran clasificados en virulentos e hipovirulentos. Para identificar chancros hipovirulentos se observaba la aparición de callos, frente de crecimiento parado, formación de nuevos tejidos, desprendimientos de corteza conidiada por crecimiento de tejido subcortical, la formación de corteza con morfología gris y la presencia de chancros superficiales. Los chancros dudosos que solamente presentaban una de estas características eran clasificados como virulentos. En el caso de los chancros tratados con micelio, se consideraban chancros hipovirulentos aquellos que habían detenido el crecimiento en el frente de inoculación. El seguimiento se hizo en un total de 43 unidades de gestión, de las cuales 9 se inocularon con conidios.

3.4.2. Seguimiento de la parcela inoculadas con tratamiento mecanizado

En la finca Can Prat, inoculada de manera mecanizada, se siguió la misma metodología de identificación y descripción del carácter de los chancros. Se estudiaron los chancros colindantes a la pista de inoculación y los marcados en las parcelas control para comprobar la efectividad del tratamiento.

4. Resultados

Del total de 943 muestras aisladas en el laboratorio, se obtuvieron 11 GCV conocidos. No obstante, se encontraron 54 muestras que no pertenecían a los GCV descritos en Cataluña y que se clasificaron como NoCat. Además, también se encontraron 9 muestras que no pertenecían a los GCV descritos en Europa y que fueron clasificadas como NoEU.

El GCV mayoritario en todas las zonas de estudio era el EU-2, excepto en la zona de Montnegre, donde el GCV mayoritario era el EU-1. No obstante, el GCV EU-2 estaba presente en todos los puntos de muestreo. El porcentaje del GCV EU-2 en cada zona oscilaba entre el 26% (Montnegre) y el 70% (Gavarres). En total, el GCV EU-2 representaba el 53% de la totalidad de los GCV encontrados.

La mayor diversidad de GCV se encontraba en el Alt Empordà, junto con Guillerries y la Garrotxa. Estas 3 zonas, junto con Gavarres, son las situadas más al norte de Cataluña. La menor diversidad de GCV correspondía a las zonas de Gavarres y Montnegre.

4.2. Presencia del hipovirus *Cryphonectria*

De las muestras estudiadas, 35 eran posibles portadoras del virus al presentar morfología blanca, raquílica o posible. La presencia de CHV1 en estas muestras se confirmó mediante la extracción de dsRNA. La mayoría de cepas con CHV1 eran del GCV EU-2 y EU-1 (37% y 34%, respectivamente). El punto de muestreo que presentó más cepas hipovirulentas en campo correspondió a la finca Bansells, ubicada dentro del Espai Natural Guillerries-Savassona.

4.3. Seguimientos de las inoculaciones

19 de las 43 parcelas estudiadas fueron incluidas dentro de la clase IV (Tabla 1) al observarse dispersión de CHV1 fuera de la parcela tratada. Algunas de estas parcelas presentaron dispersión de CHV1 a una distancia de 60 m. del punto de inoculación. El grado de establecimiento de CHV1 en estas parcelas era muy variable, mientras que algunas parcelas presentaban CHV1 de manera puntual en otras el establecimiento de CHV1 se observaba en prácticamente todos los árboles. De las 19 parcelas incluidas en Clase IV, 6 fueron inoculadas con conidios.

Otras 11 de las 41 parcelas estudiadas se incluyeron dentro de clase III al observarse dispersión dentro de la parcela (Tabla 1). En algunas de estas parcelas, CHV1 estaba completamente establecido y en otras tan solo se vieron algunos chancros hipovirulentos. Algunas de estas parcelas no se pudieron incluir dentro de Clase IV por no presentar masas de castaño vecinas. La parcela de Can Prat, inoculada en 2008 mediante camioneta, presentaba hipovirulencia dentro de la parcela y fue incluida en Clase III.

El resto de parcelas se incluyeron dentro de clase II al ver un efecto positivo en los chancros inoculados. Una de las parcelas dentro de Clase II se inoculó con un GCV codominante. Otras 7 de las parcelas incluidas en Clase II eran masas de castaño de avanzada edad y con corteza agrietada, con lo cual no se pudo observar el carácter de los chancros, aunque sí en el caso de que estos presentaran chirpiales jóvenes.

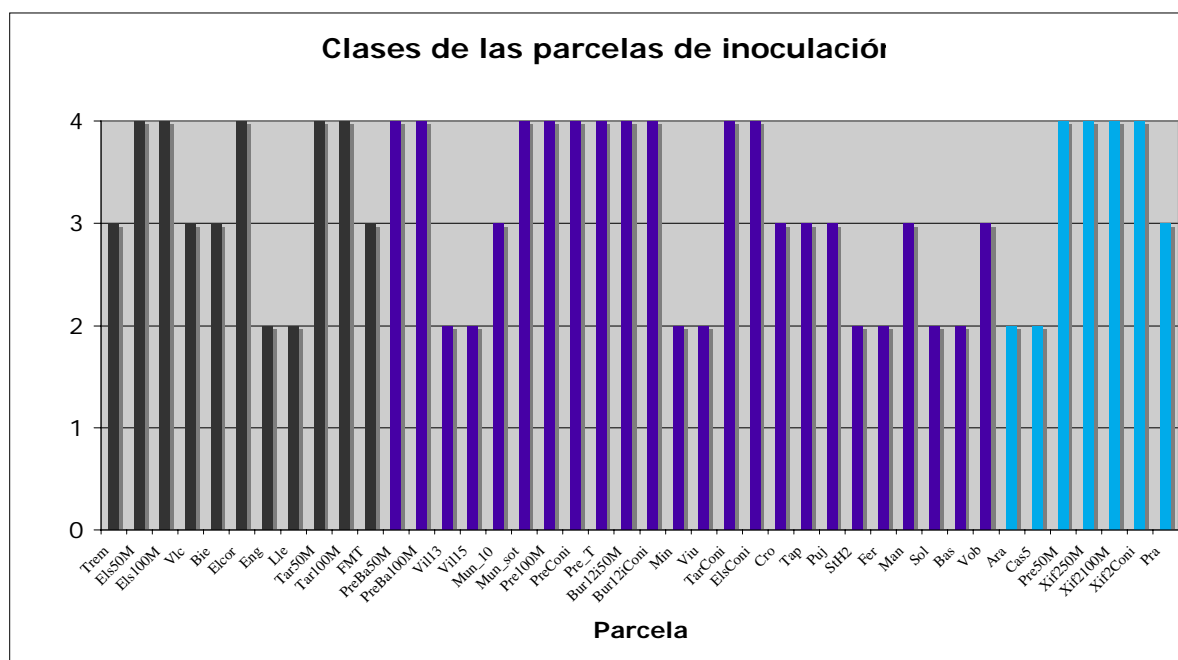


Tabla 1: Clases de las parcelas de inoculación. En gris, parcelas inoculadas en 2006. En azul oscuro, parcelas inoculadas en 2007 y en azul claro, parcelas inoculadas en 2008

5. Discusión

Los resultados muestran que el GCV EU-2, con una representación del 53%, es el dominante en casi toda Cataluña. En estudios anteriores realizados en Prades, La Garrotxa y La Selva, se observó la dominancia de este GCV en un 71% (Homs et al. 2001). Esta variación en el porcentaje de EU-2 puede deberse a que en este estudio se han incluido muchas más zonas de estudio como por ejemplo la zona de Montnegre, donde el GCV EU-2 tan solo representa el 26% de las muestras estudiadas.

En Europa se considera que la diversidad de GCV es baja. En Italia solamente encontraron 20 GCV en las 716 muestras analizadas (Cortesi et al. 1996) y en Francia, Robin et al. (2000) detectaron 30 GCV en las 1113 muestras estudiadas. Los resultados obtenidos en este estudio indican que la diversidad de GCV en Cataluña es muy similar a la Europea. Asimismo, los GCV obtenidos en el Alt Empordà son muy similares a los obtenidos por Robin et al. (2000) en Languedoc-Roussillon, regiones limítrofes con el Alt Empordà, siendo EU-2, EU-1 y EU-5 los GCV más abundantes en ambas regiones.

Esta baja diversidad de GCV se debe mantener para favorecer la dispersión de CHV1. Se debería evitar en la medida de lo posible la introducción de material vegetal portador de *Cryphonectria parasitica* ya que se podría favorecer la entrada de nuevos GCV, provocando así un efecto negativo en la dispersión de CHV1 (Cortesi et al. 1998).

La proporción de cepas hipovirulentas encontradas fue del 3,7%, con un total de 35 muestras hipovirulentas obtenidas. No obstante, el porcentaje de hipovirulencia en las zonas muestreadas varió considerablemente según la región estudiada. En la mayoría de los casos no se detectó ninguna cepa hipovirulenta. La zona que presentó mayor hipovirulencia fue el Alt Empordà con 12 cepas hipovirulentas. Es posible que estas cepas hipovirulentas encontradas en el Alt Empordà llegaran desde Francia ya que Robin et al. (2000) observó un alto porcentaje de chancros curados en Languedoc-Roussillon, zona limítrofe con el Alt Empordà y en la que se aplicó el control biológico. Por otro lado, el punto de muestreo con mayor hipovirulencia fue en la finca Bansells, situada en el Espai Natural de Guillerries-Savassona, con 7 cepas detectadas.

El control biológico mediante el uso de CHV1 ha demostrado ser un éxito en Cataluña. En primer lugar, los resultados muestran una clara efectividad del tratamiento en la curación de los chancros. Asimismo, la dispersión de CHV1 es un fenómeno que se observa en muchas de las parcelas inoculadas transcurrido un año. El grado de dispersión de CHV1 es variable en cada parcela y eso puede deberse a las diferentes condiciones de cada una de ellas. En primer lugar, es posible que en algunas parcelas la dispersión se vea dificultada o retardada por la presencia de otros GCV codominantes.

Tanto el intenso estudio de los GCV como el uso de la variedad de hipovirus adecuada han contribuido sin duda al éxito en la aplicación del control biológico. Heiniger & Rigling, (2007) consideran muy importante seleccionar la cepa de CHV1 adecuada para asegurar el éxito del control biológico. Por ejemplo, una gran reducción del crecimiento y de la esporulación de *C. parasitica* resultan en una dispersión muy pobre de CHV1. Los efectos severos que produce el subtipo CHV1-F1 explicarían porque este hipovirus no persistió en las zonas de Francia tratadas con este subtipo (Heiniger & Rigling, 2007).

Durante estos últimos años, en Cataluña se ha producido un abandono progresivo de las masas de castaño debido al chancro pero también a la caída de sus mercados. Ello ha provocado que muchas masas presenten un alto porcentaje de árboles que murieron por el chancro y que no han sido eliminados. Para mejorar el estado actual de aquellas masas que ya tengan el hipovirus CHV1 en fase de expansión, se pueden eliminar los árboles muertos y dejar aquellos árboles que ya presenten chancros hipovirulentos (Heiniger, 1994; Heiniger & Rigling, 1994). La madera muerta en el monte ha sido en muchos casos motivo de preocupación, no obstante, esta madera puede constituir una fuente de inóculo en masas donde la hipovirulencia está bien establecida ya que el hongo hipovirulento puede vivir como mínimo un año en la madera muerta. Además, parece que las cepas hipovirulentas tienen mayor esporulación en la madera muerta que en los árboles vivos (Prospero et al. 2006), este hecho podría favorecer la rápida expansión de la hipovirulencia en la masa.

Los resultados observados hasta la fecha muestran una clara efectividad del tratamiento y permiten comenzar una nueva fase de la silvicultura del castaño en Cataluña basada en criterios puramente silvícolas donde las restricciones impuestas por el chancro del castaño en los últimos 20 años comienzan a desaparecer.

6. Conclusiones

En este estudio se ha descrito la diversidad de GCV y la incidencia de CHV1 en las poblaciones de *Cryphonectria parasitica*. Con el fin de mejorar las masas de castaño, se ha realizado un programa de control biológico del chancro del castaño, para ello, se ha aplicado la metodología de inoculación con conidios y micelio, además de una primera prueba de inoculación a gran escala. Para comprobar la efectividad de las inoculaciones, se han realizado seguimientos tanto de los chancros tratados como de los chancros sin tratamiento para estudiar así la dispersión de CHV1.

Las conclusiones del estudio son:

La diversidad de GCV en Cataluña es baja, con tan solo 13 GCV descritos.

La presencia de cepas hipovirulentas en Cataluña antes de las inoculaciones era baja y estaba concentrada en unos pocos puntos de la geografía Catalana, principalmente en el Alt Empordà.

La aplicación de cepas infectadas por CHV1 es efectiva para la recuperación de los árboles, ya sea aplicando micelio o conidios.

Se ha observado una dispersión de CHV1 gracias a las inoculaciones realizadas. Es previsible que en los próximos años se establezca por completo la hipovirulencia en las parcelas tratadas.

7. Agradecimientos

Este estudio fue financiado por el Departament de Medi Ambient i Habitatge y la Obra Social de “la Caixa” mediante los convenios firmados con la Diputació de Tarragona y de Barcelona y la Associació per la Defensa de les Muntanyes de Prades.

Agradecemos a los autores Dr. Paolo Cortesi (Istituto di Patologia Vegetale, Università degli Studi di Milano, Italy), Dr. Cecile Robin (INRA Pathologie Vegetale, Villenave d'Ornon, France) y Dr. Daniel Rigling (Swiss Federal Research Institute of Forest, Snow and Landscape, Birmensdorf, Suiza) por la aportación de las cepas téster.

8. Bibliografía

ALLEMANN, G.; HOEGGER, P.; HEINIGER, U.; RIGLING, D. 1999. Genetic variation of *Cryphonectria hypoviruses* (CHV1) in Europe, assessed using restriction fragment length polymorphism (RFLP) markers. *Molecular Ecology* 8 843-854.

ANAGNOSTAKIS, S. L. 1987. Chestnut blight: the classical problem of an introduced pathogen. *Mycologia* 79 23-37.

ANAGNOSTAKIS, S. L.; HAU, B.; KRANZ, J. 1986. Diversity of vegetative compatibility groups of *Cryphonectria parasitica* in Connecticut and Europe. *Plant Disease* 70 (6) 536-538.

ANAGNOSTAKIS, S. L.; WAGGONER, P. E. 1981. Hypovirulence, vegetative incompatibility, and the growth of cankers of chestnut blight. *Phytopathology* 71 (11) 1198-1202.

BAIDYARROY, D.; BERTRAND, H. 2001. Biological control of the chestnut blight pathogen using mitochondrial agents. *Recent research developments in genetics* 1 93-104.

BISIACH, M.; DE MARTINO, A.; INTROPIDO, M. 1991. Nuove esperienze di protezione biologica contro il cancro della corteccia del castagno. *Rivista di Frutticoltura* 53 (12) 55-58.

BISIACH, M.; GOBBI, E.; INTROPIDO, M. 1985. Esperienze di lotta biologica contro il cancro della corteccia del castagno. *La difesa delle piante* 2 187-196.

BISSEGGER, M.; RIGLING, D.; 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.

CAMPANELLA, V.; SAMMARCO, G. 1999. Biological control of chestnut blight: morphological characterization and vegetative compatibility of Sicilian strains of *Cryphonectria parasitica* (Murr.) Barr. *Phytophaga Palermo* 9 137-143.

CHOI, G.H.; NUSS, D.L. 1992. Hypovirulence of chestnut blight fungus conferred by an infectious viral cDNA. *Science* 257 (5071) 800-803.

CORTESI, P.; MILGROOM, M.G.; BISIACH, M. 1996. Distribution and diversity of vegetative compatibility types in subpopulations of *Cryphonectria parasitica* in Italy. *Mycol. Res.* 100 (3) 383-390.

CORTESI, P.; RINGLING, D.; HEINIGER, U. 1998. Comparison of vegetative compatibility types in Italian and Swiss subpopulations of *Cryphonectria parasitica*. *Eur. J. For. Path.* 28 167-176.

ELLISTON, J. E. 1981. Hypovirulence and chestnut blight research: fighting disease with disease. *Journal of Forestry* 79 (10) 657-660.

GRENTÉ, J.; BERTHELAY-SAURET, S. 1978. Biological control of chestnut blight in France. *Proc. Am. Chestnut Symp* 4-5 30-34.

GRIFFIN, G.J. 1986. Chestnut Blight and its control. *Horticultural reviews* 8 291-335.

HEINIGER, U. 1994. Le chancre de l'écorce du châtaignier (*Cryphonectria parasitica*). Symptômes et biologie. Nierhaus-Wunderwald, Dagmar 22 1-7.

HEINIGER, U.; RIGLING, D. 1994. Biological control of chestnut blight in Europe. *Annu. Rev. Phytopathol* 32 581-599.

HEINIGER, U.; RIGLING, D. 2007. Application of the *Cryphonectria* Hypovirus (Chv-1) to control the chestnut blight, experience from Switzerland. *Acta Hort. (ISHS)* 815 233-246.

HILLMAN, B.I.; SHAPIRA, R.; NUSS, D.L. 1990. Hypovirulence-Associated Suppression of Host Functions in *Cryphonectria Parasitica* Can Be Partially Relieved by High Light Intensity. *phytopathology* 80 950-956.

HOEGGER, P.J.; HEINIGER, U.; HOLDENRIEDER, O.; RIGLING, D. 2003. Differential transfer and dissemination of hypovirus and nuclear and mitochondrial genomes of a hypovirus-infected *Cryphonectria parasitica* strain after introduction into a natural population *Applied and Environmental Microbiology* 69 (7) 3767-3771.

HOGAN, E. P.; GRIFFIN, G. J. 2002. Spread of *Cryphonectria* hypovirus 1 into 45 vegetative compatibility types of *Cryphonectria parasitica* on grafted American chestnut trees. *Forest Pathology* 32 (2) 73-85.

HOMS, G., RODRÍGUEZ, J., RIGLING, D.; COLINAS, C. 2001. Caracterización de la población de *Cryphonectria parasitica* y detección de cepas hipovirulentas en 3 subpoblaciones de Cataluña. Montes para la sociedad del nuevo milenio. *III Congreso Forestal Español*. Ed. Junta de Andalucía. Granada.

INTROPIDO, M.; MARTINO, A. DE; BISIACH, M. 1987. Lotta biologica contro il cancro della corteccia del castagno. *Monti e Boschi* 38 31-37.

KUHLMAN, E.G. 1983. Effects of hypovirulence in *Cryphonectria parasitica* and of secondary blight infections on dieback of American chestnut trees. *Phytopathology* 73 (7) 1030-1034.

- MACDONALD, W. L.; FULBRIGHT, D. W. 1991. Biological control of chestnut blight: use and limitations of transmissible hypovirulence. *Plant disease* 75 (7) 656-661.
- MANION, P.D. 1991. Tree Disease Concepts. Prentice-Hall, Inc., Englewood Cliffs, NJ. 402 pp.
- MELZER, M. S.; DUNN, M.; ZHOU, T.; BOLAND, G. J. 1997. Assessment of hypovirulent Isolates of *Cryphonectria parasitica* for potential In biological control of chestnut blight. *Canadian Journal of Plant Pathology* 19 (1) 69-77.
- MILGROOM, M.G.; CORTESI, P. 2004. Biological control of chestnut blight with hypovirulence: a critical analysis. *Annual review of phytopathology* 42 311-338.
- MILGROOM, M.G.; WANG, K.; ZHOU, Y.; LIPARI, S.E.; KANEKO, S. 1996. Intercontinental population structure of the chestnut blight fungus, *Cryphonectria parasitica*. *Mycologia* 88 (2) 179-190.
- NANNELLI, R.; TURCHETTI, T.; MARESI, G. 1998. Corticolous mites (Acari) as potential vectors of *Cryphonectria parasitica* (Murr.) Barr hypovirulent strains. *Internat. J. Acarol.* 24 (3) 237-244.
- PEEVER, T. L.; LIU, Y. -C.; CORTESI, P.; MILGROOM, M. G. 2000. Variation in tolerance and virulence in the chestnut blight fungus-hypovirus interaction. *Applied and environmental Microbiology* 66 (11) 4863-4869.
- PLANA. O. 2006. Control biológico de *Cryphonectria parasitica* (Murrill) Barr. Trabajo Práctico Tutorado. Tutorado por Carlos Colinas. Universitat de Lleida.
- PROSPERO, S.; CONEDERA, M.; HEINIGER, U.; RIGLING, D. 2006. Saprophytic activity and sporulation of *Cryphonectria parasitica* on dead chestnut wood in forests with naturally established hypovirulence. *Phytopathology* 96 1337-1344.
- 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.
- SCHARF, C. S.; DE PALMA, N. K. 1981. Birds and mammals as vectors of the chestnut blight fungus (*Endothia parasitica*). *Can. J. Zool.* 59 1647-1650.
- SCIBILIA, K. L.; HEBARD, F. V.; SHAIN, L. 1992. Conidia of hypovirulent strains of *Cryphonectria Parasitica* differ in their potential for biocontrol of chestnut blight. *Can. J. For. Res.* 22 1338-1342.
- VAN ALFEN, N.K. 1988. Hypovirulence of *Cryphonectria* (*Endothia*) *parasitica*: Mother nature's example for fungal biotechnologists. In Risk assessment in agricultural biotechnology: *Proceedings of the International Conference, Davis, USA*, 12-20.
- VROT, F.; GRENTÉ, J. 1985. Le chancre de l'écorce du châtaignier. *Phytoma- Défense des cultures* 35-37.

ZECHINI D'AULERIO, A.; CARBONE, W.; DELLA VALLE, E. 1982. Il cancro della corteccia del castagno: prove di lotta biologica. *Informatore Fitopatologico* 6 43-46.