

ESCOLA TÈCNICA SUPERIOR D'ENGINYERIA AGRÀRIA



**CARACTERIZACIÓN DE *Cryphonectria*
hypovirus (CHV) MEDIANTE PATRONES
RFLP EN CEPAS HIPOVIRULENTAS DE
Cryphonectria parasitica (Murrill) M.E.**

Barr DE CATALUÑA



TPT de ETF-Explotaciones Forestales

Autor: Carles Castaño Soler

Tutor: Carlos Colinas

Septiembre de 2009

ÍNDICE

ÍNDICE.....	1
AGRADECIMIENTOS.....	4
ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS.....	5
RELACIÓN DE ABREVIATURAS.....	7
INTRODUCCIÓN.....	8
El castaño.....	8
El castaño en Cataluña y su importancia.....	9
Problemática actual.....	12
Descripción de Cryphonectria parasitica.....	13
Efectos y consecuencias de la entrada de C. parasitica.....	14
El Control de Cryphonectria parasitica.....	14
Primera detección de cepas hipovirulentas de C. parasitica.....	15
El Control biológico de C. parasitica.....	17
La función de los GCV's.....	18
Descripción de Cryphonectria hipovirus.....	20
Especies y tipos de Cryphonectria hipovirus.....	20
Mecanismo de ataque del virus.....	21
Diferencias entre cepas hipovirulentas detectadas en América del Norte y Europa.....	22
CHV1-Euro7, CHV1-EP721 y CHV1-EP713, dos prototipos de virus muy estudiados.....	23
Variabilidad del hipovirus en Europa.....	24
El origen de los hipovirus europeos.....	25
JUSTIFICACIÓN DEL TRABAJO.....	26
OBJETIVO.....	27

PROCEDIMIENTOS Y MÉTODOS.....	28
Muestreo.....	28
Incubación del micelio.....	31
Compatibilidad vegetativa.....	32
Test Morfológico.....	33
Extracción del ARN de doble cadena (dcARN)	34
Digestión de DNA.....	35
Síntesis de la cadena complementaria de ADN.....	36
PCR.....	37
RFLP. Análisis de los patrones de fragmentos de restricción.....	39
Análisis de los datos.....	40
RESULTADOS.....	41
Muestreo.....	41
Test de hipovirulencia.....	41
Extracción de la dcARN.....	41
Digestión del ADN.....	42
Test de compatibilidad vegetativa.....	44
PCR.....	44
RFLP.....	45
DISCUSIÓN.....	

ANEXO..... 68

AGRADECIMIENTOS

·Agradecer, en primer lugar, a Carlos Colinas, por la confianza ciega que ha depositado en mi, por los consejos y por la oportunidad que me ha concedido al involucrarme en este ambicioso Trabajo Práctico Tutorado (TPT).

·A Ludovic Bassie por sus consejos, por la formación que me ha aportado, por su gran ayuda pero sobretodo por la confianza y seguridad que me ha dado

·A los compañeros y excompañeros del Área de Defensa del Bosque del por la gran ayuda prestada y, también, por su paciencia. Sin vosotros esto no hubiera sido posible.

·Al “Centre Tecnològic Forestal de Catalunya” por la beca concedida y por la oportunidad de trabajar en sus instalaciones.

·A mi familia (mis padres, abuela, hermanos...) por la fuerza, apoyo, paciencia, ánimos, por facilitarme las cosas, por tantos buenos momentos....

·A los compañeros de piso de Lleida

·A mis amigos.

·A Ceci.

....A quien quiera que sea el ser superior que me permitió trapear las dificultades y los quebraderos de cabeza.

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

Tablas

Tabla1: Relación de las muestras positivas en la extracción de la dcARN.....	69
Tabla 2: Relación de los patrones RFLP obtenidos en las muestras estudiadas.....	72

Figuras

Fig 1a: Plantación de castaños destinados a la explotación de fruto.....	10
Fig 1b: Plantación de castaños destinada a la obtención de madera.....	10
Fig 2. Típico aspecto que ofrecen las plantaciones de castaño en invierno.....	12
Fig 3a. Ejemplo de chancro virulento inducido por <i>Cryphonectria parasitica</i> .Fig 3b. Cultivo <i>in vitro</i> de una cepa virulenta de <i>Cryphonectria parasitica</i>	14
Fig 3b: Cultivo <i>in vitro</i> de una cepa virulenta de <i>Cryphonectria parasitica</i>	14
Fig 4a: Ejemplo de chancro hipovirulento inducido por <i>Cryphonectria parasitica</i>	16
Fig 4b: Cultivo <i>in vitro</i> de una cepa hipovirulenta de <i>Cryphonectria parasitica</i>	16
Fig 5: Gráfica de transmisión del hipovirus entre dos variedades compatibles. Adaptado de Van Alfen, (1988).....	19
Fig 6a. Mapa de puntos de muestreo de <i>C. parasitica</i> en la Serra de Prades.....	29
Fig 6b. Mapa de puntos de muestreo de <i>C. parasitica</i> en el Montseny, Guillerics-Savassona, Gavarres, Alt Empordà, Osor, Sant Hilari, Santa coloma de Farners, La Garrotxa, Montnegre-Corredor.....	

Fig 13: Resultado de la digestión del producto PCR en gel de agarosa al 2%.....	45
Fig 14: Mapa de distribución y diversidad del hipovirus en Osor.....	48

RELACIÓN DE ABREVIATURAS

- IFN:** Inventario Forestal Nacional
- CHV:** *Cryphonectria hypovirus*
- GCV:** Grupos de Compabilidad Vegetativa
- Kbp:** Kilopares de bases
- dcARN:** Doble cadena de ARN
- ORF:** "Open Reading Frame". Marco abierto de lectura
- PDA:** "Potato Dextrose Agar". Medio de cultivo
- cADN:** Cadena complementaria de ADN. Clon de ADN.
- RT:** Retrotranscriptasa inversa
- PCR:** "Polymerase Chain Reaction". Reacción en cadena de la polimerasa.
- RFLP:** "Restriction Fragment Length Polymorphism". Polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción.
- M-dcARN:** Formas internas suprimidas del genoma viral

INTRODUCCIÓN

El castaño

El castaño es un árbol forestal perteneciente a la familia de las *Fagaceae* y del orden de los *Fagales*. De las 13 especies existentes en las regiones templadas del hemisferio boreal, *Castanea sativa* Mill. es la única presente en Europa. (Berrocal, 1998).

El castaño europeo (*C. sativa*) alcanza de 20 a 22 metros de alto, sobrepasando frecuentemente los 25 metros, aunque raramente alcanza los 30 metros. Presenta hojas simples, caducas, alternas y con nervadura pinnada. Su corteza es clara y lisa, aunque con la edad sufre un estriado longitudinal y adquiere colores más oscuros. La floración es monoica y se da de finales de primavera a principios de verano. La fructificación se da a partir de los quince años, aunque mediante injerto dicha fructificación se puede adelantar bastantes años. El fruto, la castaña, madura a mediados de otoño (octubre-noviembre) y se presenta en grupos de tres castañas (Berrocal, 1998; de María *et al.* 2006).

Una de las características más relevantes del castaño es su gran longevidad, pudiendo vivir más de 500 años. El clima apropiado para el castaño es el mesotérmico, con valores de humedad alta durante todo el año excepto en verano. *C. sativa* es la especie del género mejor adaptada a la sequedad estival, su sistema radical es profundo, robusto y extendido, con el que tiende a asegurar el suministro suficiente de agua edáfica en el período seco. Por las características que presenta este sistema radical, el castaño se instala en suelos sueltos y profundos. Asimismo, el castaño es especial sensible a la presencia de carbonatos o sales (Berrocal, M. 1998; Tusell y Rovira, 2006; de María *et al.* 2006).

Respecto a los valores termométricos, el castaño prefiere inviernos frescos y veranos calurosos, siendo especialmente sensible a las heladas tardías. Su temperamento es heliófilo, aunque también tolera bien la semiumbría. Por la capacidad de regeneración y propagación que tiene el árbol, las masas de

castaño tienden a formar masas puras (Berrocal, M. 1998; de María *et al.* 2006).

Se cree que el castaño europeo fue introducido por los romanos o griegos, aún así los datos paleofitogeográficos demuestran que el castaño estaba ya presente a lo largo del cuaternario en Europa, con refugios en la provincia de Girona (Casals *et al.* 2005).

El castaño en Cataluña y su importancia

Las características máspreciadas del castaño europeo son su madera de calidad y sus frutos, de gran tamaño, siendo estas cualidades las que motivaron su plantación en Cataluña. En el tercer Inventario Forestal Nacional (IFN3) la consideran una especie autóctona, posiblemente por tratarse de una especie introducida en tiempos remotos (Ministerio de Medio Ambiente, 2002).

En Cataluña, el castaño se desarrolla sobretodo en terrenos silíceos de media montaña, con suelos neutros o ácidos y en zonas con cierta influencia marítima. Sus exigencias edáfico-climáticas explican su localizada presencia en Cataluña, encontrándose sobretodo en zonas costeras o montañosas, pero abrigadas y frescas.

Según el tercer Inventario Forestal Nacional (IFN3), la superficie de castaño como formación dominante es de 13.250 hectáreas en Cataluña (Ministerio de Medio Ambiente, 2002) y la provincia con mayor superficie ocupada por castaño es la de Girona, con una extensión de 9.890 ha., siendo la comarca de La Selva la comarca con mayor presencia de esta especie (Ministerio de Medio Ambiente, 2002).

El castaño se desarrolla entre los 200 m. y los 1200 m. de altitud, concentrándose sobretodo en umbrías y en laderas con pendiente pronunciado. En Cataluña esta especie se encuentra básicamente distribuida en el noreste, presentándose en La Garrotxa, Montnegre-Corredor, El Montseny, Les Guilleries-Savassona, Les Gavarres, L'Albera i Les Salines

(Tusell y Rovira, 2006) . En el sur de Cataluña tan solo encontramos castaño en la Sierra de Prades.

La principal forma fundamental de masa que encontramos en Cataluña es la de monte bajo exceptuando la Sierra de Prades, donde predomina el monte alto. Las formaciones de monte bajo de castaño son popularmente conocidas como *perxades* y su principal objetivo es la producción de madera. La explotación de la madera se ha visto en parte motivada por sus altas producciones, con valores anuales entre los 6 m³/ha y los 14 m³/ha, pudiendo llegar a los 20 m³/ha en zonas con suelos muy fértiles (Berrocal, 1998). Por otro lado, el monte alto únicamente se da en el primer turno de la especie o en castaños destinados a la producción de fruto. Los castaños cuyo objetivo es la producción de fruto acostumbran a tener edades muy avanzadas y tienen la típica apariencia de los árboles trasmochados. Asimismo, el marco de plantación es mucho más grande que en las *perxades* y en la mayoría de casos el tronco ofrece la típica cavidad en la base del mismo.



Fig 1a: Plantación de castaños destinada a la explotación del fruto



Fig 1b: Plantación de castaños destinada a la obtención de madera

La explotación del castaño ha constituido una fuente económica importante sobretodo en determinadas comarcas de Girona. Este aprovechamiento ha tenido varias época esplendorosas, aunque fue la primera mitad del siglo XX la de mayor importancia. El castaño se plantó de manera importante a principios del S. XIX en artigas (terrenos que sirvieron como cultivos agrícolas) para el aprovechamiento del fruto. A pesar del interés inicial por el fruto, más tarde se haría una reconversión para la producción de madera (Tusell y Rovira, 2006).

El gran interés por el castaño forjó una economía que supuso la creación de industrias y el establecimiento de familias que se dedicaban a la explotación de la especie. Solamente en Cataluña (Guilleries y Montseny) se concentraban unas cincuenta serrerías repartidas en 25 industrias dedicadas a la explotación de la especie. El castaño sufría entonces una revaloración muy importante ya que todas las dimensiones de la madera obtenida de las “perxades” tenían utilidad. Aunque la fabricación de botas era el destino más importante, la madera también se utilizaba para hacer vigas, tutores y bastones. Más recientemente, el parquet y los muebles también constituyeron una fuente de ingresos.

Junto con la explotación maderera, el castaño tenía importancia para la producción de fruto, la castaña, producto de alto interés gastronómico. A pesar de ello, la entrada de nuevos productos depreció el valor del fruto, fenómeno que también se dio con la extracción de taninos, antiguamente utilizados para el adobado de pieles.

A pesar de la depreciación de los productos tradicionales obtenidos de la especie, la madera es de buena calidad y considerada seminoble. Esta madera tiene una dureza media y es bastante flexible, caracterizándose también por ser resistente a la intemperie (Tusell y Rovira, 2006).

Además de su madera, el valor social de esta especie es aún patente, siendo buen ejemplo la celebración de la “Castanyada”, una fiesta popular catalana festejada por gran parte de la población. Por otro lado, el carácter protector y paisajístico de esta especie son cualidades reconocidas del castaño.

El castaño es, en definitiva, una especie multifuncional para el ecosistema y la sociedad.



Fig. 2. Típico aspecto que ofrecen las plantaciones de castaño en invierno

Problemática actual

La pérdida de valor de algunos de los productos obtenidos del castaño ha provocado una depreciación de la especie. Precisamente los productos que han perdido mayor valor son aquellos que exigen menores diámetros. Aún así, las propiedades de la madera del castaño son reconocidas y la madera con diámetro suficiente está bien valorada.

Para asegurar la viabilidad económica del castaño se ha sugerido un replanteo de su selvicultura, buscando diámetros adecuados para serrería y productos alternativos que permitan aprovechar los diámetros menores, anteriormente valorados y con un mercado amplio.

Por otro lado, se cree que el declive de la explotación del castaño es también debido a la aparición de *Phytophthora cinnamoni* Rands., que generó problemas en Cataluña sobretudo a mediados del siglo XX, y *Cryphonectria parasitica*, que comenzó a afectar seriamente las masas de castaño a mediados de los años ochenta (Argemí, J. comunicación personal).

Actualmente, en Cataluña no se han observado e



Fig 3a. Ejemplo de chancro virulento inducido por *Cryphonectria parasitica*

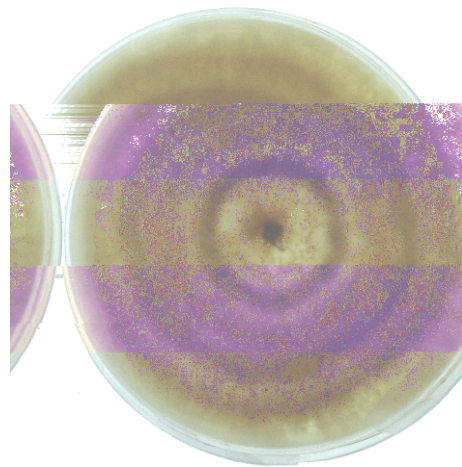


Fig 3b Cultivo in vitro de una cepa virulenta de *Cryphonectria parasitica*

Efectos y consecuencias de la entrada de *C. parasitica*

Cryphonectria parasitica fue observado por primera vez en 1904 en Estados Unidos (Elliston, 1981). La entrada del hongo en este país provocó la destrucción de 3,6 millones de hectáreas de castaño en tan solo 50 años (Manion, 1981). En Europa, este patógeno se introdujo en 1938 (Anziani y Robin, 1999) y 5 años más tarde también se observaría en España, posiblemente por la importación de castaño desde Asia con el fin de sustituir a castaños afectados por *Phytophthora cinnamoni* (Colinas y Uscuplic, 1999). En Cataluña no se conoce con exactitud la fecha de entrada del hongo, aunque fue en 1985 cuando propietarios y administración vieron al patógeno como un problema (Argemí, J. comunicación personal).

El Control de *Cryphonectria parasitica*

El control químico de *C. parasitica* no es efectivo y posee graves riesgos para el medio ambiente. Por otro lado, la búsqueda de híbridos resistentes no es aconsejable al ser incompatible con la conservación de la diversidad genética

de las poblaciones (Heiniger y Rigling, 1994). Aunque con una buena gestión de la masa se contribuye a su mejora sanitaria (Amorini *et al.* 2001), esta no constituye la solución al problema.

La difícil erradicación del patógeno se debe a sus estrategias evolutivas; produce abundancia de conidios en un largo periodo de tiempo, puede sobrevivir como saprofito sobre varios huéspedes, tiene la capacidad de reproducirse sexual y asexualmente, invade y mata rápidamente al huésped y puede sobrevivir largos periodos en condiciones climáticas adversas (Manion, 1981).

Primera detección de cepas hipovirulentas de C. parasitica

En 1951, Biraghi observó castaños con chancros que cicatrizaban y que tenían apariencias inusuales. Este mismo autor observó también que estos chancros no llegaban a matar al árbol, lo cual generó durante años un gran interés por parte de la comunidad científica (Anagnostakis *et al.* 1987). Con el estudio de estas cepas, Grente las catalogó en 1965 como “hipovirulentas” al observar en ellas claros síntomas de debilitación. En cultivo, las cepas hipovirulentas también se pueden distinguir ya que presentan una morfología inusual, con menor esporulación y crecimientos más reducidos (Van Alfen, 1988; Macdonald y Fulbright, 1991; Peever *et al.* 2000). Van Alfen, (1988) observó además, que sufren una reducción en la producción de la lacasa y en la mayoría de los nueve polipéptidos más importantes del hongo. En campo, los rasgos que permiten diferenciar las cepas virulentas de las hipovirulentas es que estas últimas producen chancros superficiales y con baja esporulación (Macdonald y Fulbright, 1991; Robin *et al.* 2000).

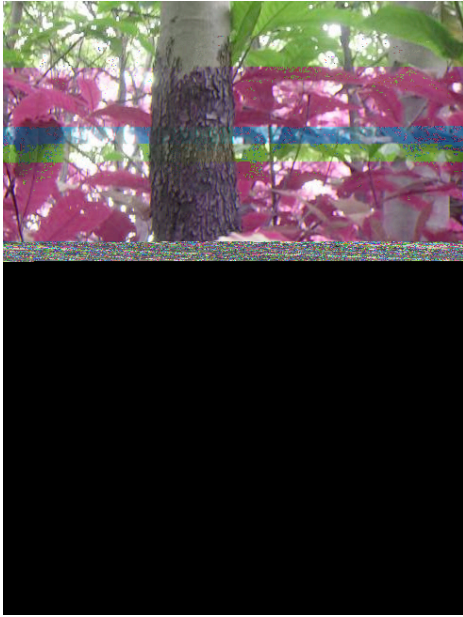


Fig 4a: Ejemplo de chancro hipovirulento inducido por una cepa hipovirulenta de *Cryphonectria parasitica*

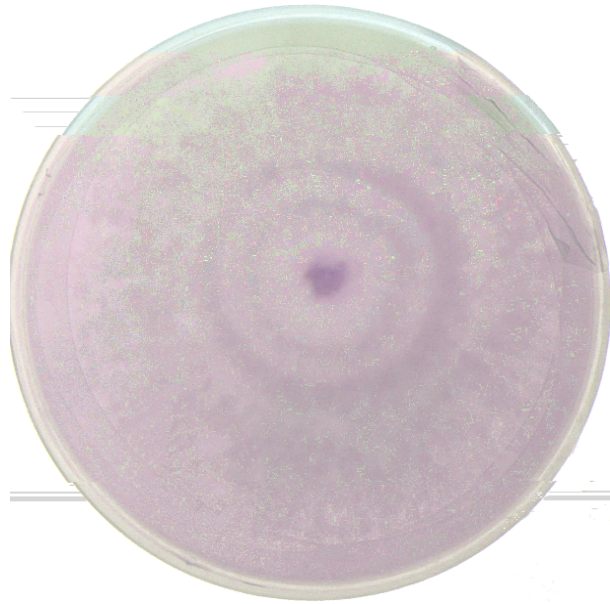


Fig 4b: Cultivo *in vitro* de una cepa hipovirulenta de *Cryphonectria parasitica*

Una de las características más relevantes de las cepas hipovirulentas es que tienen la capacidad de transmitir el carácter hipovirulento, tal y como se observa en cultivo *in vitro* (Grente y Berthelay-Sauret, 1978). Cuando una variedad virulenta adquiere el carácter hipovirulento se considera que ha sufrido una conversión. Esta conversión ocurre después de la anastomosis hifal entre estas dos cepas (Macdonald y Fulbright, 1991). Una vez producida la anastomosis, el hongo, inicialmente virulento y con morfología anaranjada, adquiere morfología blanca justo en el lugar de la interfase entre las dos colonias (Choi y Nuss, 1992).

Durante años se desconoció la naturaleza del agente causal de la hipovirulencia, pero Choi y Nuss, en 1992, comprobaron finalmente que *Cryphonectria hypovirus* (CHV) es el que provoca la hipovirulencia en *C. parasitica*.

El Control biológico de C. parasitica

Sin duda alguna el descubrimiento de cepas hipovirulentas de *C. parasitica* fue una esperanza para controlar el patógeno y es por ello que durante años se aplicaron programas de control biológico mediante el uso de estas cepas en Europa y Estados Unidos (Grente y Berthelay-Sauret, 1978; Vrot y Grente, 1985; Intropido *et al.* 1987; Bisiach *et al.* 1991; Hoegger *et al.* 2003).

El control biológico se basa en la inoculación de los chancros virulentos pero el objetivo final es provocar la conversión de los chancros no tratados gracias a la dispersión natural de chancros virulentos.

Los tratamientos con conidios también han resultado efectivos en la curación de los chancros (Kuhlman, 1983; Scibilia *et al.* 1992; Plana, 2006). Esto es posible porque a diferencia de las ascosporas, los conidios pueden presentar el hipovirus en su interior (Milgroom y Cortesi, 2004; Prospero *et al.* 2006). Además, la eficiencia de transmisión del virus en los conidios es alta, del 90% según Anagnostakis, (1994), del 95% según Peever *et al.* (2000) o del 69% según Prospero *et al.* (2006). Parece que las diferencias entre estos valores dependen de la cepa de hipovirus con el que el hongo está infectado (Lin *et al.* 2007).

La aplicación de una adecuada concentración de conidios hipovirulentos es un factor importante para garantizar el éxito del tratamiento. En ese sentido, Scibilia *et al.* (1992) estudiaron el porcentaje de conversión de chancros virulentos según la concentración de conidios hipovirulentos infectados por diferentes variedades.

El control biológico ha dado resultados positivos en Europa pero se considera un fracaso en Estados Unidos (Milgroom y Cortesi, 2004). 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 (Van Alfen, 1988; Anagnostakis *et al.* 1986; Hogan y Griffin, 2002).

La función de los GCV's

La importancia de los GCV es debida a que la transmisión del hipovirus se da eficientemente después de la anastomosis entre variedades compatibles de hongo (Choi y Nuss, 1992) mientras que en el caso de variedades incompatibles (diferentes GCV), esta transmisión se ve limitada (Liu y Milgroom, 1996).

Robin *et al.* (2000) consideran que se deberían encontrar un alto porcentaje de cepas hipovirulentas en aquellas poblaciones con baja diversidad de GCV, esto es debido a que una baja diversidad facilita la dispersión de la hipovirulencia (Homs *et al.* 2001). No obstante, es importante saber que la incompatibilidad no

necesariamente previene la conversión de una cepa virulenta a hipovirulenta (Anagnostakis y Day, 1979) ya que la anastomosis también puede ocurrir a veces entre variedades de diferentes grupos de compatibilidad (Van Alfen, 1988).

La incompatibilidad viene acompañada por la muerte de las células de los individuos incompatibles que anastomosan, por lo tanto, la variación en la transmisión del virus entre variedades incompatibles está correlacionada con el grado en que las células mueren después de la anastomosis (Milgroom y Cortesi, 2004). Por otro lado, Liu y Milgroom, (1996) observaron que el estudio del número de *vic* genes aún es más preciso que los GCV para predecir la capacidad de conversión ya que la frecuencia de transmisión entre aislamientos es inversamente proporcional al número de “*vic*” genes que difieren entre 2 cepas.

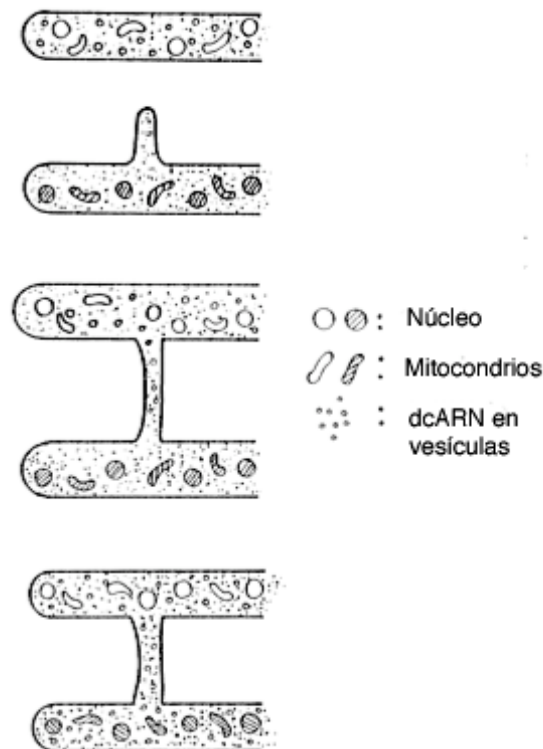


Fig 5: Gráfica de transmisión del hipovirus entre dos variedades compatibles. Adaptado de Van Alfen, (1988).

Descripción de *Cryphonectria hipovirus*

Con la introducción de una cadena de ADN complementaria a la cadena de ARN del hipovirus CHV1-EP713, Choi y Nuss, (1992) comprobaron que la hipovirulencia es un fenómeno causado por un virus denominado *Cryphonectria hipovirus* (CHV).

CHV es un virus citoplasmático con ARN bicatenario y perteneciente a la familia *Hypoviridae*, cuyos miembros no tienen una cápside real (Smart *et al.* 1999; Robin *et al.* 2000). Este virus carece de ruta extracelular de infección, tal y como sucede con otros virus citoplasmáticos (Dawe y Nuss, 2001; Gobbin *et al.* 2003). Se especula que el hipovirus que infecta *C. parasitica* es originario de China (Liu *et al.* 2007).

Se han observado virus de otras familias virales en *C. parasitica*. En concreto virus pertenecientes a *Reoviridae*, *Narnaviridae*, *Partitiviridae* y *Chrysoviridae*. De estas familias, solamente en *Reoviridae* se ha observado una especie que causa hipovirulencia en *C. parasitica*, mientras que en el caso de *Narnaviridae* aún no se ha podido determinar su efecto en el hongo (Turina y Rostagno, 2007).

Especies y tipos de *Cryphonectria hipovirus*

Se han descrito varios tipos del hipovirus de *Cryphonectria* catalogadas como CHV1, CHV2, CHV3 y CHV4 (Liu *et al.* 2007, Turina y Rostagno, 2007).

CHV1 se encuentra en Europa (Allemann *et al.* 1999, Turina y Rostagno, 2007), en China (Peever *et al.* 1998; Liu *et al.* 2007) en Corea (Park *et al.* 2008) y Japón (Peever *et al.* 1998; Liu *et al.* 2007) y el peso molecular de los tipos descritos hasta el momento es de aproximadamente 12,7 kbp (Allemann *et al.* 1999).

CHV2 se ha detectado en Estados Unidos, concretamente en New Jersey (Chung *et al.* 1994), aunque también en la provincia China de Anhui, de donde

se cree que se introdujo a Estados Unidos (Peever *et al.* 1998). La longitud genómica de CHV2 es de 12,5 kbp (Dawe y Nuss 2001).

CHV3 se ha encontrado en América del Norte (Peever *et al.* 1997; Melzer *et al.* 1997; Smart *et al.* 1999; Melzer y Boland, 1999), igual que CHV4, que se encuentra distribuido en el Este de Estados Unidos (Enebak *et al.* 1994; Peever *et al.* 1997). Los tipos CHV3 y CHV4 tienen un peso inferior al de CHV1, de 9,8 kbp y 9,1 kbp, respectivamente (Smart *et al.* 1999). De los tres tipos encontrados en Estados Unidos, CHV3 y CHV4 son las más abundantes (Turina y Rostagno, 2007).

El tipo que suscita más interés es CHV1, al presentar mayor efectividad en el control del patógeno y al encontrarse distribuido por Europa. La organización principal del genoma CHV1 es la presencia de dos grandes marcos abiertos de lectura (ORFs), ORF A y ORF B (Allemann *et al.* 1999). Recientemente, mediante la construcción de quimeras de virus con CHV1-Euro7, CHV1-EP713 y CHV1-EP721, se ha comprobado que la ORF B influye en la acumulación de dcARN en el huésped. Parece que esta acumulación de dcARN en el huésped está correlacionada con la eficiencia de transmisión del virus en los conidios (Lin *et al.* 2007).

Aunque se desconozca exactamente el grado de mutaciones que sufre el virus, si es verdad que existen datos muy interesantes. En ese sentido, se ha observado que en 20 años y mediante técnicas RFLP, *C. hypovirus* no ha generado ningún subtipo nuevo (Allemann *et al.* 1999). Chung *et al.* (1994) también observaron que la secuencia de su cepa de estudio (CHV4-NB58) era idéntica y no había sufrido ningún cambio transcurridos 4 años.

Mecanismo de ataque del virus

El proceso de inducción de la hipovirulencia en *C. parasitica* por CHV es actualmente motivo de estudio y discusión. Se especula la posibilidad que el virus afecte a los elementos implicados en la transducción de señales, como aquellos que están implicados con la actividad de la proteína-G, poniendo

especial énfasis en las subunidades α y $\beta\alpha$ (Turina y Rostagno, 2007). También se especula que CHV1 exprese un supresor de genes de interferencia. En este sentido, estudios recientes indican que la peptidasa p29 (presente en el hipovirus) podría desempeñar esa función en el hongo (Turina y Rostagno, 2007). Por otro lado, también existen dudas acerca del mecanismo del virus para evitar ser eliminado por el hongo. Asimismo, es posible que el virus evite la acción del ARN de interferencia del hongo por el hecho que su dcARN se encuentra en las vesículas membranosas del citoplasma del mismo.

Diferencias entre cepas hipovirulentas detectadas en América del Norte y Europa

En general, se ha observado que las cepas hipovirulentas americanas presentan una morfología más propia de variedades virulentas, explicada anteriormente (Chung *et al.* 1994; Enebak *et al.* 1994), a diferencia de las variedades hipovirulentas Europeas, que presentan la típica morfología blanca (Allemann *et al.* 1999; Peever *et al.* 2000).

Elliston, (1981) y L'Hostis *et al.* (1985) también observaron que las cepas víricas europeas eran distintas a las americanas y que las cepas de origen Europeo contenían dcARN de mayor longitud que las de origen americano. Este hecho se debe a que los tipos de CHV presentes en América del Norte (principalmente CHV3 y CHV4) tienen pesos moleculares inferiores al único tipo que se encuentra en Europa (CHV1). Estas diferencias se observan también en cultivo, ya que CHV4, tiene un efecto menor en la virulencia del hongo y en su morfología (Turina y Rostagno, 2007). Por otro lado, CHV3 tampoco reduce sustancialmente la esporulación ni la pigmentación, aunque si provoca crecimientos más lentos y lobulados del hongo, en comparación con los hongos sin virus (Smart *et al.* 1999).

Curiosamente, en algunas cepas americanas se observó dcARN con múltiples segmentos que oscilaban entre los 3 y 5 kbp (Peever *et al.* 1997). Este fenómeno también se detectó en China y Japón, donde se encontró una cepa

con dos segmentos de 1,8 kbps y 2 kbps (Peever *et al.* 1998). Aunque se ha sugerido que estos segmentos puedan ser formas internas suprimidas del genoma viral, recientemente, Park *et al.* (2008), en un estudio en el que tan solo detectaron CHV1, observaron cepas en Corea que presentaban bandas en gel de agarosa de 3,5 y 3,3 kbps, así como bandas de 0,5 a 2,5 kbps. Los autores observaron que ninguna de estas cepas se hibridó con CHV1, observando además una alta similitud de estos elementos con la organización de los *Chrysovirus*.

Por otro lado, se han descrito lo que podrían ser infecciones mixtas con dos cepas distintas del hipovirus de *Cryphonectria* (Peever *et al.* 1997). Asimismo, en 2007, Liu *et al.* encontraron una cepa vírica en *C. parasitica* que no se hibridó con ningún tipo descrito. Según los autores, es probable que este virus tenga relaciones evolutivas entre CHV1/CHV2 y CHV3/CHV4.

CHV1-Euro7, CHV1-EP721 y CHV1-EP713, dos prototipos de virus muy estudiados

Las dos cepas más estudiadas de CHV1 son CHV1-Euro7 y CHV1-EP713, ambas aisladas en Europa. Estas dos cepas suscitan interés ya que tienen comportamientos y efectos diferentes en *C. parasitica*.

En primer lugar Chen y Nuss, (1999) constataron, tanto transfiriendo artificialmente un virus en el hongo como con conversiones de los mismos mediante anastomosis, que las variedades fúngicas infectadas con el virus CHV1-Euro7 crecen más rápidamente y son más virulentas que con CHV1-EP713. Este efecto se traduce en chancros más pequeños y con nula o muy poca esporulación asexual cuando se infectan por CHV1-EP713. Peever *et al.* (2000) también constataron las mismas diferencias entre CHV1-EP713 y CHV1-Euro7. Asimismo, posteriormente Lin *et al.* (2007) han observado que en los hongos transfectados con CHV1-EP713 se produce el doble de acumulación de dcARN que en los hongos transfectados con CHV1-Euro7, hecho que explica porque CHV1-Euro7 tiene menores transmisiones del

hipovirus en los conidios que CHV1-EP713. A pesar de las diferencias entre estos dos prototipos de virus, la esporulación en ambos es claramente reducida en comparación con las cepas libres de virus (Chen y Nuss, 1999). Por otro lado, a pesar de las diferencias descritas entre estos dos virus, en realidad presentan secuencias muy similares: del 87 al 93% y del 90 al 98% a nivel de nucleótidos y aminoácidos, respectivamente. Además, el genoma de CHV1-Euro7 solo tiene 11 nucleótidos menos que el genoma de CHV1-EP713 (Chen y Nuss, 1999).

Otra cepa europea estudiada recientemente es la CHV1-EP721, aislada en Italia. Los hongos infectados por CHV1-EP721 manifiestan signos de infección típicos de CHV1, presentando morfología blanca y reducida esporulación. No obstante, tal y como sucede con CHV1-Euro7, los hongos infectados por CHV1-EP721 crecen más rápidamente y presentan más esporulación que los infectados por CHV1-EP713 (Lin *et al.* 2007). Asimismo, Lin *et al.* (2007) observaron que en el caso de los hongos transfectados con CHV1-EP721 se producía una acumulación de dcARN diez veces menor que en los transfectados con CHV1-EP713. Por lo tanto, la diferencia más evidente entre CHV1-Euro7 y CHV1-EP721 recae en la capacidad de acumular dcARN en el hongo. Curiosamente, a pesar de estas diferencias, la similitud genética de CHV1-Euro7 con CHV1-EP721 es sorprendente, del 99% a nivel de nucleótidos y del 99% a nivel de aminoácidos (Lin *et al.* 2007).

Variabilidad del hipovirus en Europa

Allemann *et al.* (1999) observaron importante diversidad de CHV1 en Europa. Gobbin *et al.* (2003) estimaron la lejanía de las cepas europeas en aproximadamente unos 1000 años para un método o un mínimo de 2500 años para otro método. Esto reafirma la teoría de las múltiples introducciones del hipovirus de *Cryphonectria* en Europa (Allemann *et al.*, 1999; Gobbin *et al.* 2003). En el mismo sentido, Montenegro *et al.* (2008) afirman que en España también ha habido múltiples introducciones del hipovirus, ya que hasta el

momento se han detectado varias cepas infectadas por distintos subtipos de CHV1.

Mediante el estudio de los patrones RFLP obtenidos a partir de la amplificación de una zona concreta del marco abierto de lectura A y B (ORF A y ORF B), Allemann *et al.* (1999) agruparon en 5 los subtipos de CHV1 encontrados en Europa. El primer subtipo, denominado CHV1-I y al que pertenecía la cepa Italiana conocida como CHV1-EP747, englobaba los aislamientos de Italia, Suiza, Croacia, Bosnia, Hungría, Grecia, Córcega y también algún aislamiento más de Francia. Más tarde, Gobbin *et al.* (2003) mediante secuenciación de una parte de la ORF A observarían una secuencia idéntica de CHV1-Euro7 con 17 cepas Suizas previamente incluidas dentro de CHV1-I y todas ellas pertenecientes al estudio de Allemann *et al.* (1999).

Allemann *et al.* (1999) identificaron un segundo subtipo, denominado como CHV1-F1, al que pertenecía una variedad descrita anteriormente, CHV1-EP713, que englobaba algunos aislamientos franceses. Asimismo, estudios recientes han identificado este subtipo en España, concretamente en la provincia de León (Montenegro *et al.* 2008). Los otros subtipos encontrados por Allemann *et al.* (1999) eran mucho menos representativos, estando uno representado por dos muestras del Pirineo Francés (CHV1-F2), otro por una de Navarra (CHV1-E) y el último perteneciente a Alemania (CHV1-D). No obstante, aunque las cepas CHV1-E y CHV1-D pertenezcan a diferentes subtipos, estas solo diferían en un 1,7% a nivel de nucleótidos (Gobbin *et al.* 2003) y la lejanía estimada fue solo de 91 años.

El origen de los hipovirus europeos

El origen exacto de CHV1 en Europa es desconocido (Allemann *et al.* 1999). En primer lugar China tiene una mayor diversidad vírica y parece ser que las cepas de CHV1 italianas pueden proceder de Japón. Asimismo, la distancia genética de las poblaciones Chinas con las de Japón son cortas y es posible que el hipovirus se introdujera en Japón a través de China (Liu *et al.* 2007). Por

otro lado, se especula la posibilidad de que el hipovirus de *Cryphonectria* entrara por primera vez en Europa por el oeste de Francia o España (Allemann *et al.* 1999).

JUSTIFICACIÓN DEL TRABAJO

CHV1 ha demostrado ser efectivo para el control biológico de *C. parasitica* (Heiniger y Rigling, 2009). Otra cepa que podría tener buen potencial para el control biológico es la CHV3-GH2, por su capacidad de producir esporulación y a la vez reducir la virulencia del hongo (Melzer y Boland, 1999), aunque CHV3 no ha sido aún observada en Europa.

Las cepas incluidas en CHV1 han sido ampliamente estudiadas y no todas ellas producen el mismo efecto en el hongo. Heiniger y Rigling (2009) consideran muy importante seleccionar la cepa de CHV1 adecuada para asegurar el éxito del control biológico. Por ejemplo, una gran reducción del crecimiento y la esporulación de *C. parasitica* resultan en una dispersión muy pobre de CHV1. Los efectos severos que produce el subtipo CHV1-F1, explicaría porque este hipovirus no persistió en las zonas tratadas de Francia con esta cepa (Heiniger y Rigling, 2009).

Allemann *et al.* (1999) consideran que la aplicación de la técnica RFLP en una parte de la ORF A del hipovirus constituye una buena herramienta para distinguir subtipos de CHV1. Una de las ventajas en la aplicación de esta metodología en la ORF A es que se consigue distinguir CHV1-Euro7 (perteneciente a CHV1-I) de CHV1-EP713 (perteneciente a CHV1-F). Una de las desventajas es que mediante esta metodología no es posible distinguir CHV1-Euro7 de CHV1-EP712, dos cepas muy parecidas pero con diferentes acumulaciones de dcARN y con diferente porcentaje de transmisión del hipovirus en los conidios.

La identificación del subtipo vírico permite conocer el comportamiento de este, predecir su evolución en el tiempo e incluso evaluar su potencial para uso en el

control biológico. El aspecto más importante del control biológico es que las cepas hipovirulentas introducidas tengan capacidad de dispersarse. Con el tiempo, los chancros tratados deben transmitir el hipovirus a otros chancros no tratados. Seguidamente, la dispersión se daría fuera de la parcela tratada hasta afectar a todas las masas circundantes. Para conseguir estos objetivos al menos es necesario conocer los GCV del hongo pero también el tipo y subtipo vírico a utilizar. En ese sentido, en Cataluña se da el potencial para una buena dispersión de CHV1 ya que la diversidad de GCV del hongo es baja, con solo 13 grupos distintos cuyo dominante es el EU-2, con un 67% de representación (Colinas y Uscuplic, 1999).

Finalmente, Montenegro *et al.* (2008) discutían las posibles múltiples introducciones de *C. hypovirus* en España. Con el estudio genético de *C. hypovirus*, podemos estudiar esta posibilidad en Cataluña y por lo tanto, aportar más datos que reafirmen aún más esta teoría.

OBJETIVO

Caracterizar las poblaciones de *Cryphonectria hypovirus* (CHV) en Cataluña y su distribución en los GCV de *Cryphonectria parasitica*.

PROCEDIMIENTOS Y MÉTODOS

Muestreo

Para caracterizar el hipovirus fue necesario realizar un muestreo de las poblaciones de *Cryphonectria parasitica*. En las figuras 6a y 6b se adjunta la distribución de los puntos de muestreo utilizados en el estudio. Los árboles muestreados se marcaron con spray y se tomaron también las coordenadas UTM con el GPS (Garmin i Que® M5). Asimismo, se fotografiaron los chancros para su mejor análisis (Figuras 3a y 4a). Las zonas geográficas de estudio fueron el Alt empordà, Montseny, Sant Hilari, Osor, Santa Coloma de Farners, Montnegre-Corredor, Sierra de Prades, Garrotxa, Guillerics-Savassona y Les Gavarres.

MAPA DE MUESTREO EN PRADES

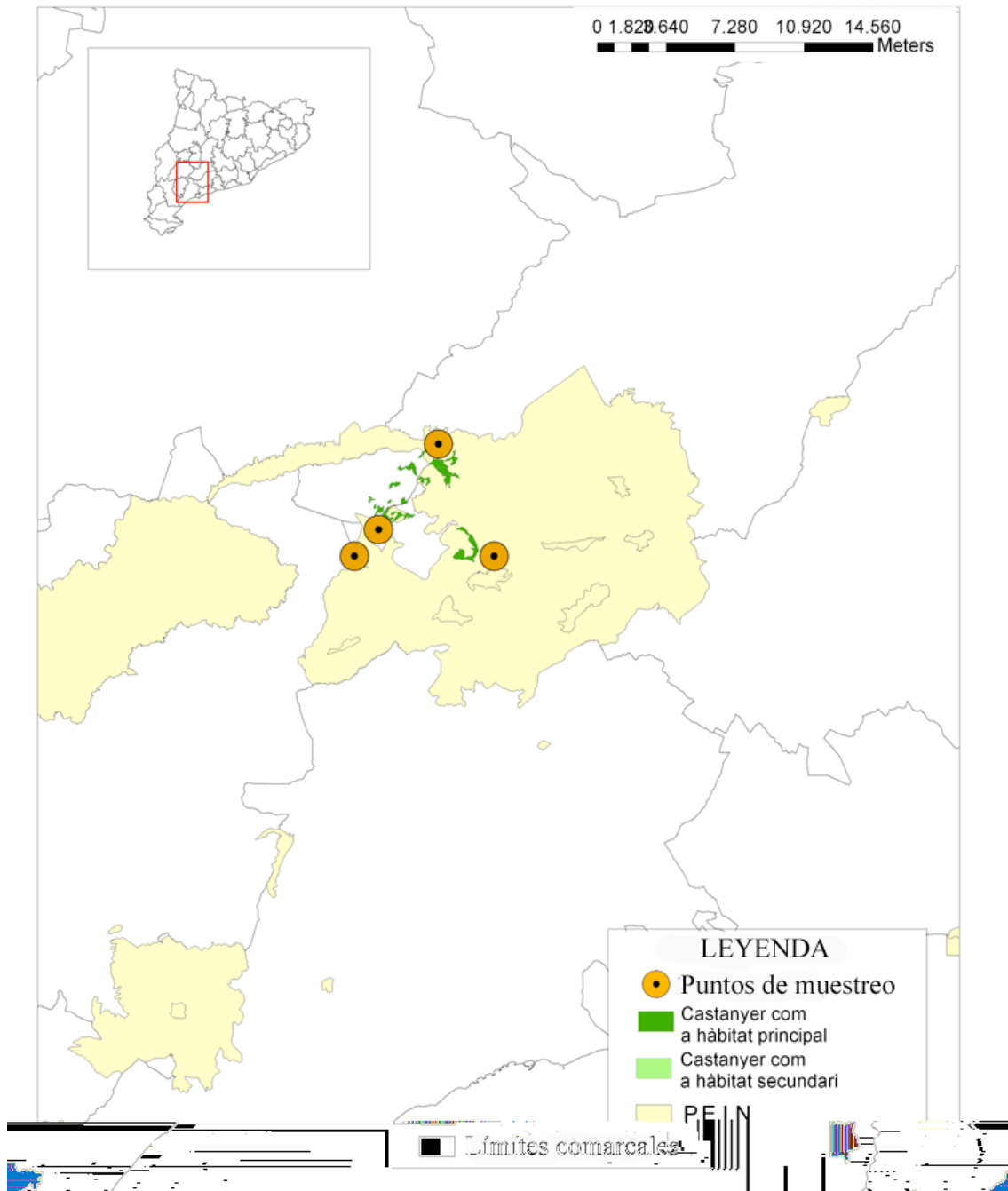


Fig 6a. Mapa de puntos de muestreo de *C. parasitica* en la Serra de Prades

MAPA DE MUESTREO EN EL NORDESTE DE CATALUÑA

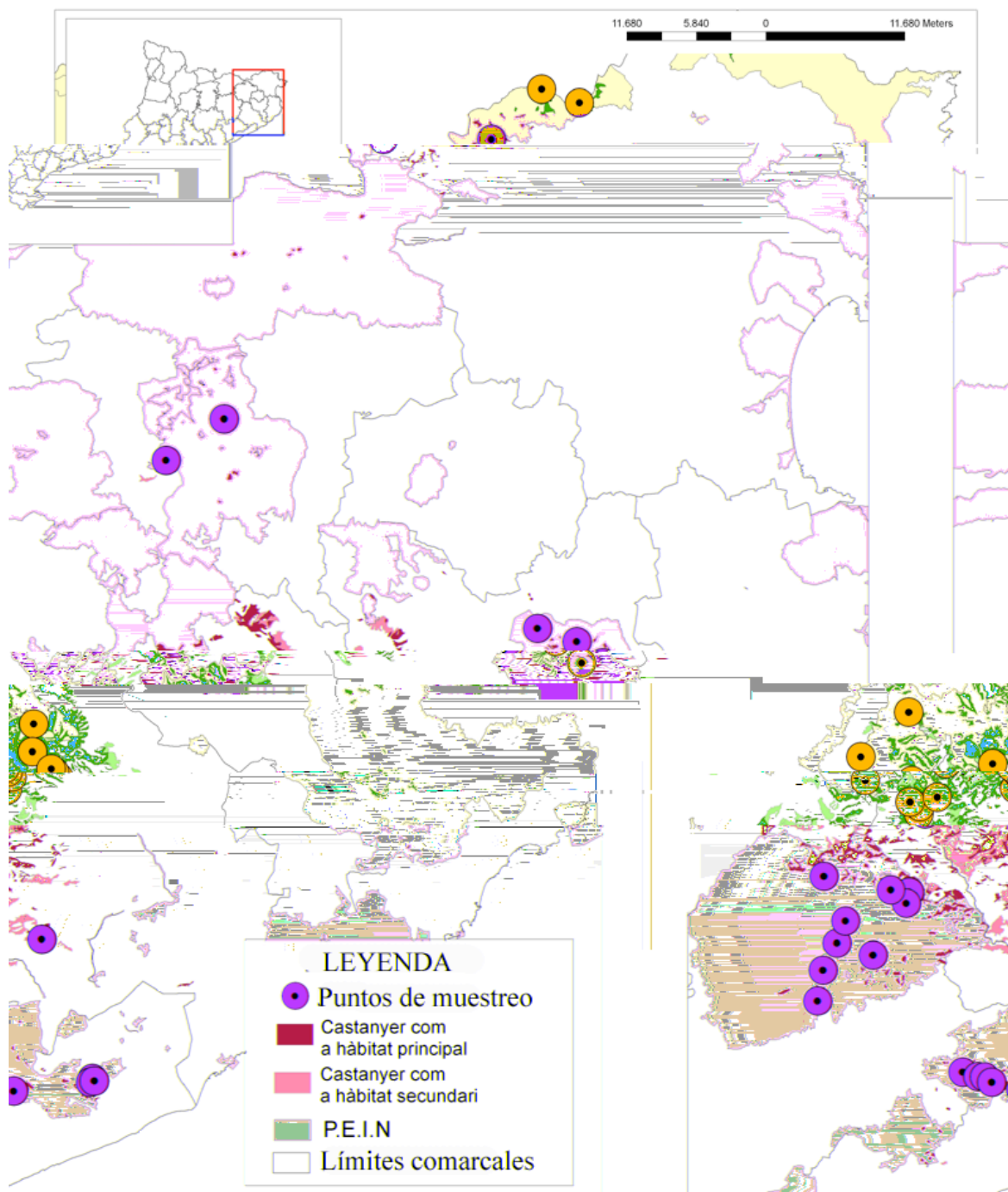


Fig 6b. Mapa de puntos de muestreo de *C. parasitica* en el Montseny, Guillerries-Savassona, Gavarres, Alt Empordà, Osor, Sant Hilari, Santa coloma de Farners, La Garrotxa, Montnegre-Corredor

Las cepas fúngicas se obtuvieron mediante muestreos aleatorios en las distintas poblaciones de castaño afectadas con el fin de conseguir un inventario de muestras representativas de Cataluña. La metodología de muestreo utilizada es la descrita por Homs *et al.* (2001). En cada punto de muestreo se recolectaron de 20 a 30 muestras, obteniendo de 2 a 3 muestras de corteza por árbol, dos en los extremos del chancro y una en el medio. Por cada muestra se obtenían aproximadamente 141 mm³ de corteza infectada por *C. parasitica*.

Además de las muestras obtenidas según la metodología de muestreo descrita por Homs *et al.* (2001), también se muestrearon chancros que presumiblemente eran hipovirulentos en base a las descripciones de chancros por Vrot y Grente (1985) o Bisiach *et al.* (1991). Estas muestras eran: LL1168, LL1169, LL1170, LL1016, LL1017, LL1001, LL0983, LL0984, LL0559, LL0998, LL1437, LL1020, LL1023, LL1398.

Por otro lado, se incorporaron en el estudio muestras que fueron recolectadas en 2003 y que también pertenecían a chancros presumiblemente hipovirulentos. Estas muestras eran: LL657, LL656, LL655, LL653, LL647, LL642, LL640, LL638, LL633, LL622, LL615, LL612, LL611, LL609, LL604, LL606, LL648, LL652, LL654.

Finalmente, la muestra LL0559 fue aislada en el verano de 2000 y se incorporó en el estudio como control positivo. Según Homs *et al.* (2000), el tipo vírico de la cepa era CHV1-I.

Incubación del micelio

Las muestras de corteza obtenidas en el muestreo se guardaron en la nevera a 4°C un máximo de 3 días. Seguidamente, se sumergieron las muestras en peróxido de hidrógeno (Panreac) durante 10 segs., en Agua MilliQ autoclavada otros 10 segs. y se dejaron secar durante 3 a 5 minutos en papel estéril. Finalmente, las muestras se transfirieron a medio de cultivo de Agar (Cultimed).

Una vez se observaron las primeras hifas del micelio (de 2 a 3 días), se

cortaron trozos de Agar con el micelio a medio de cultivo PDA (Biokar diagnostics). Seguidamente se incubó el micelio 7 días a unos 20-25 °C bajo luz natural y con un fotoperiodo comprendido entre 8 y 14 horas de luz. A continuación se guardaron las muestras en la nevera a 4°C. Transcurridos tres meses, se renovaron las placas siguiendo el mismo protocolo, para evitar la contaminación y pérdida de las cepas.

Compatibilidad vegetativa

Para cruzar las cepas fúngicas se siguió la metodología de Robin *et al.* (2000). Primero se cruzaron entre si todos los aislamientos de una misma parcela de muestreo para obtener así un aislamiento de cada GCV como representante de grupo. A continuación, los representantes de cada parcela eran cruzados con los representantes de las otras parcelas. Para determinar el GCV se disponía de cepas téster catalogadas universalmente. Finalmente, una cepa de cada grupo compatible se cruzó con los tésters catalogados universalmente. Para una mayor rapidez, se cruzaban primero con los tésters de los GCV más abundantes en Cataluña, según Homs *et al.* (2001). En caso de no corresponder a ningún GCV de Cataluña, se cruzaba con los restantes 72 GCV Europeos descritos.

Los cruces entre las cepas se hacían a una distancia entre si de unos 3 mm. y a 1 cm. del margen de la placa. Las placas con los cruces se incubaban a 25 °C en la oscuridad durante 7 días seguido de 7 días en la luz (Robin *et al.* 2000). Con una placa se hacían hasta 8 cruces (figura 8).

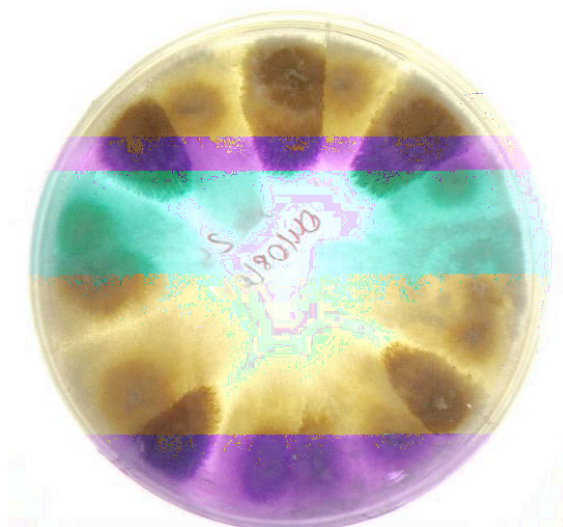


Figura 7: Ejemplo de cruces entre representantes de parcela y tésters

Transcurridos 14 días del cultivo se hacía una lectura de la placa mediante un transiluminador, observando presencia o no de barrera. Se consideraban incompatibles aquellas muestras que formaban una barrera visible compuesta por células muertas (Anagnostakis *et al.* 1986).

Test Morfológico

El test morfológico para la detección de cepas hipovirulentas se llevó a cabo siguiendo la metodología de Bissegger *et al.* (1997). Todas las cepas de *C. parasitica* se cultivaron en medio de cultivo de PDA a 25°C y a la oscuridad durante 7 días y seguidamente se incubaron bajo luz durante 7 días. Bajo estas condiciones, las cepas sin virus desarrollaron una clara morfología anaranjada mientras que las cepas con virus adquirieron morfología blanca (Figuras 4a y 5a). Para detectar posibles virus que no tengan un efecto tan importante en la esporulación, se consideraron también válidas para el estudio cepas que desarrollaban una morfología intermedia.

Extracción del ARN de doble cadena (dcARN)

En primer lugar, se cultivaron en placas con medio de cultivo PDA y con celofán las cepas posibles portadoras del hipovirus. Los cultivos se realizaron a temperatura ambiente y sin luz. El motivo del cultivo de las placas a oscuras se debe a que Hillman *et al.* (1990) observaron correlación negativa entre la acumulación de dcARN y la intensidad de luz a la que están sometidas las cepas hipovirulentas. Una vez transcurridos 7 días del cultivo, se extrajo el micelio de *C. parasitica* de la superficie del celofán, se transfirió a un tubo de 2-mL. y se liofilizó a -20°C durante 24 horas, para almacenar finalmente las muestras a -20°C. A continuación se seguía la metodología de extracción descrita por Allemann *et al.* (1999). Se pulverizó el micelio seco con “pellet pestlers” (SIGMA-ALDRICH), sumergiendo los Eppendorf de 2 mL en nitrógeno líquido para una mejor trituración. La dcARN fue aislada con 40 mg. de micelio pulverizado y mediante columnas de cromatografía (BIO-RAD. Bio-Spin® Disposable Chromatography Columns).

Después de la precipitación con etanol, la dcARN fue redisuelta con 20 µL de agua libre de nucleasas (Promega) y almacenada a -20°C. La cantidad de dcARN de interés y la presencia de otros elementos de dcARN fueron analizados con 1-3 µL de muestra en gel de agarosa (Agarosa MS-8, Laboratorios Conda S.A.) al 0.8% (figura 8). Para determinar el peso de la dcARN así como la cantidad de dcARN se hizo una electroforesis en gel de agarosa utilizando como marcador el Lambda de ADN digerido con HindIII (Sigma). Las muestras positivas se almacenaron a -20°C indefinidamente.



Fig 8: Resultados de la extracción en gel de agarosa al 08%. L1: Marcador. L2,L3, L4, L5, L6, L10, L11, L13: presencia de banda a 12,7 kbp. L7, L8, L9, L12: sin presencia de banda a 12,7 kbp.

Digestión de DNAsas

Las muestras con resultado positivo en la extracción eran susceptibles de presentar dcARN. No obstante, como la dcARN del virus migra de manera similar que el ADN del hongo (Allemann *et al.* 1999), el gel de agarosa no permite asegurar la presencia del virus. Para confirmar presencia de dcARN, se realizó una digestión del ADN con una mezcla de los siguientes reactivos; 1 μ L. de 1 M Tris / HCl pH 7.75, 2 μ L. de 100 mM $MgCl_2$, 11 μ L. de agua libre de nucleasas, 2 μ L. de DNAsas, 10x tampón de reacción (Promega), 1 μ L. de DNasa libre de RNasa (1 u/ μ L. Promega) y 3 μ L. de muestra de dcARN. La mezcla se incubó en el termociclador (Biometra T-personal 48) durante 20 minutos a 37 °C. A continuación se añadió 1 μ L. de solución de parada de la

digestión con DNAsa, para luego aumentar la temperatura del termociclador a 65°C durante 10 minutos. La presencia de dcARN se confirmó cargando 10 µL. de muestra en 0.8% gel de agarosa a 80 Voltios (Figura 9).

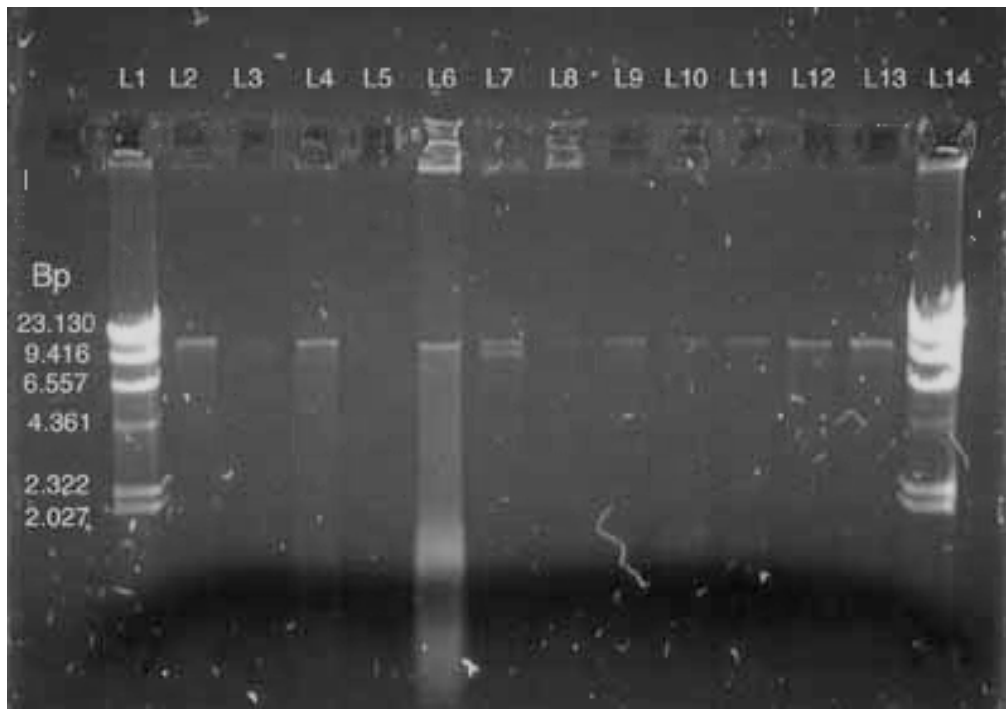


Fig 9: Resultados de la digestión de DNA en gel de agarosa al 08%. L1, L14: Marcador. L2,L3, L4, L6, L7, L8, L9, L10, L11, L12, L13: presencia de banda a 12,7 kbp. L5: sin presencia de banda a 12,7 kbp., la muestra era contaminación de ADN, posiblemente del genoma fúngico. Observese la doble banda en la L7, la primera representa el L-dsRNA (toda la cadena del genoma fúngico) y la segunda el M-dsRNA.

Síntesis de la cadena complementaria de ADN

Paralelamente a la digestión del ADN, la primera cadena de cADN del hipovirus fue sintetizada con dcARN cebado con iniciadores aleatorios y mediante el sistema de la retrotranscriptasa inversa (Promega).

En primer lugar se obtenía una cantidad superior a 100 nanogramos de dcARN (la cantidad de dcARN se medía mediante un espectofómetro Nanodrop (Thermo scientific)). A estos 100 nanogramos se les añadía suficiente agua libre de nucleasas de manera que la solución final llegara a los 20 μ L. (incluyendo los otros reactivos para la síntesis del cADN). Seguidamente, para conseguir la separación de la doble cadena de ARN, se incubaba la solución en termociclador a una temperatura de 70°C durante 8 minutos. Finalmente se dejaba reposar la muestra en hielo durante unos 5 minutos mientras se preparaba la mezcla master que viene descrita a continuación.

Para la síntesis de la cadena de DNA se preparó una mezcla con las cantidades de los siguientes reactivos (para una muestra); 4 μ L. de 25 mM $MgCl_2$, 2 μ L de 10x tampón RT, 2 μ L de 10 mM de mezcla de dNTPs, 0.5 μ L rRNasin® (inhibidor de ribonucleasas), 0.4 μ L de AMV RT (alta concentración), 1 μ L de iniciadores aleatorios. Finalmente se añadía la dcARN a la mezcla, se introducía la nueva mezcla en el termociclador (Biometra T-personal 48) y se seguían los pasos y ciclos recomendados por Promega.

PCR

El molde utilizado para la amplificación era parte del marco abierto de lectura A (ORF A) del hipovirus y su longitud genómica era de 1439 bp. Los oligonucleótidos utilizados para la amplificación de esta parte eran específicos del genoma de CHV1, utilizados por Allemann *et al.* (1999). Se preparó una mezcla master con los siguientes reactivos (para una muestra); 5 μ L de 10x tampón de reacción PCR, 3 μ L de 25 mM de $MgCl_2$, 1 μ L de 10 mM de dNTPs, 1 μ L del iniciador EP713-5 (concentración 25 pmol) y 1 μ L del iniciador R2280 (concentración 25 pmol), 37.5 μ L. de agua estéril (Fluka) y 0.5 μ L de Taq ADN polimerasa. Finalmente, a la mezcla master se le añadió 1 μ L de muestra de cADN construida en el apartado anterior. Seguidamente se puso la mezcla en

el termociclador (Biometra T-personal 48) con los ciclos aconsejados por Allemann et al. (1999).

Para confirmar la amplificación se cargaron 5 μ L. de muestra en gel de agarosa al 1% y a 80 Voltios. En el caso de una amplificación insatisfactoria, se incrementaban los ciclos de la PCR, se disminuía a 55°C la temperatura de alineamiento o bien se realizaba una nueva PCR con más cantidad de cADN. Para la determinación del peso molecular de la región amplificada se utilizó el marcador 100 bp de ADN (Invitrogen), (Figura 10).

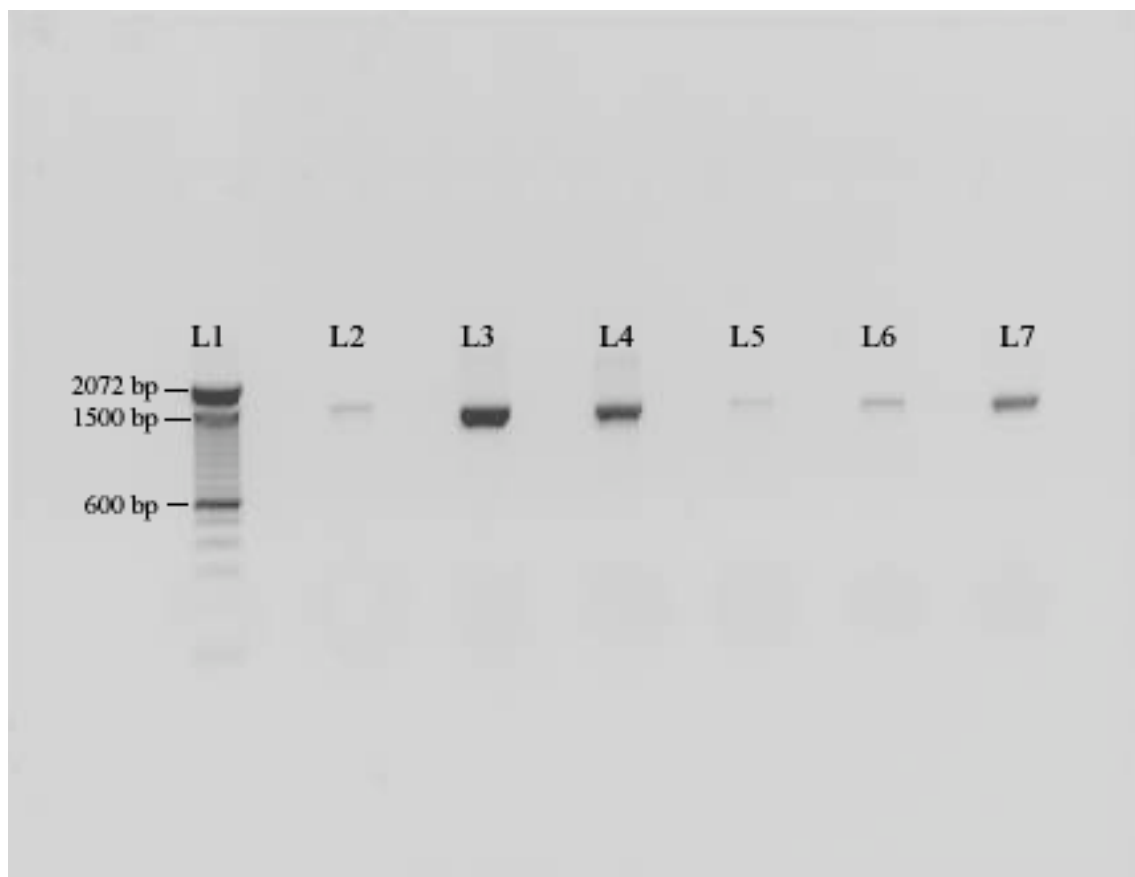


Fig 10: Resultados de la amplificación de la región específica del hipovirus en gel de agarosa al 1%. L1: Marcador 100 bp. de ADN. L2, L5 y L6: Amplificación con un peso molecular aproximado de 1439 bp, aunque insuficiente. L3, L4 y L5: Amplificación correcta con un peso molecular aproximado de 1439 bp.

RFLP. Análisis de los patrones de fragmentos de restricción

El producto de la PCR se digirió con dos enzimas, BsuRI (Invitrogen), también citado HaeIII y que reconocía la secuencia GG'CC, y HinfI (Invitrogen), que reconocía G'AnTC. Para la digestión se preparó una mezcla máster para cada enzima. La mezcla era la siguiente (para una muestra): 2 μ L de tampón de reacción React 2, 7.25 μ L de agua estéril (Fluka) y 0.75 μ L de enzima. A la mezcla se le añadían 10 μ L de producto PCR y se introducía en el termociclador durante 2 horas a 37 °C. Para confirmar la digestión y para la lectura de los patrones, se cargaban 10 μ L del producto en agarosa al 2%, donde se visualizaban los patrones obtenidos en la digestión con el enzima BsuRI (Invitrogen, Figura 11a) y con el enzima HinfI (Invitrogen, Figura 11b). El peso de las bandas obtenidas se determinaba con el marcador 100 bp. y 50 bp. de ADN (Invitrogen).

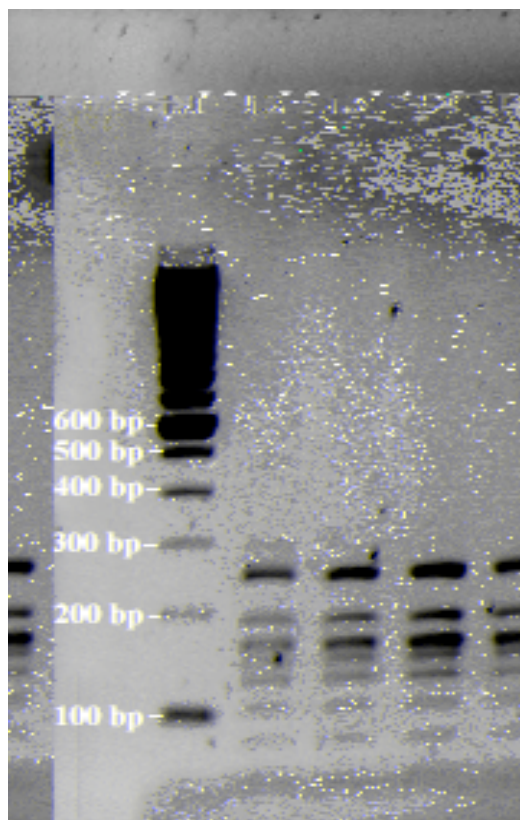


Figura 11a: Resultado de la digestión del producto PCR en gel de agarosa al 2%. El enzima utilizado es el BsuRI (que reconoce la secuencia la secuencia GG'CC). L1: marcador. L2, L3, L4, L5: Muestras digeridas.

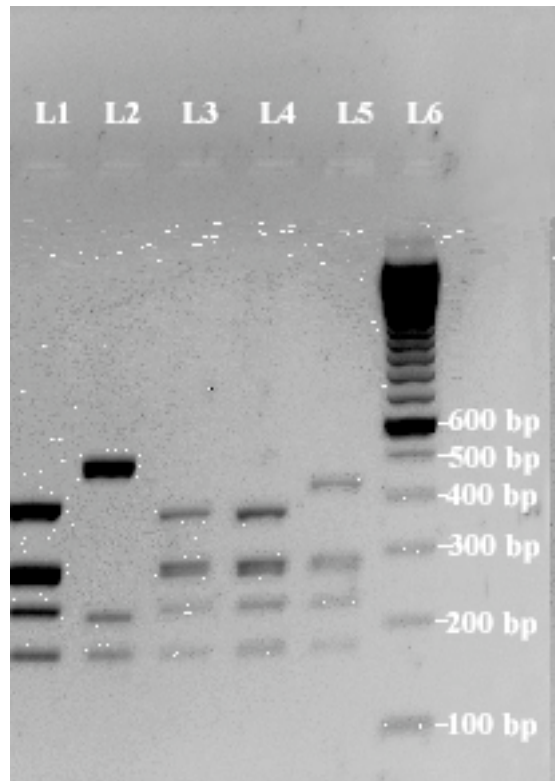


Figura 11b: Resultado de la digestión del producto PCR en gel de agarosa al 2%. El enzima utilizado es el HinfI (que reconoce la secuencia G'AnTC). L1, L2, L3, L4, L5: Muestras digeridas. L6: Marcador

Análisis de los datos

Con los resultados obtenidos en el gel de agarosa de la RFLP, se apuntaba el peso molecular de cada fragmento. Para conocer el tipo y subtipo vírico (véase Allemann *et al.* (1999)) se estudiaba el peso molecular de las bandas de ADN y se comparaban con los patrones de los mismos autores.

kbp. no aseguraba la presencia de dcARN ya que el ADN genómico del hongo migra de manera muy similar a la dcARN del virus.

Digestión del ADN

La digestión de ADN confirmó la presencia de dcARN en casi todas las muestras, exceptuando solamente las cepas LL0982, LL1187 y LL1369. En estas muestras, el resultado en el gel de agarosa después de la digestión fue siempre negativo, sugiriendo así que la banda observada en la extracción era ADN fúngico. Asimismo, en el caso de las muestras que continuaron presentando banda después de la digestión del ADN, la longitud genómica en el gel de agarosa siguió siendo la misma que en la extracción, de unos 12 kbp.

Con la digestión del ADN se observó por lo tanto que eran 40 las muestras detectadas con dcARN.

Confirmadas 40 cepas con dcARN, se pudo observar que la distribución de las cepas hipovirulentas aisladas en Cataluña era bastante irregular (Figura 12). No obstante, se detectaron puntos de muestreo con un porcentaje elevado de estas cepas. En el Espai Natural de Guillerics-Savassona solamente se detectaron cepas hipovirulentas en la parcela Bansells, detectando en esta parcela un total de 8 cepas pertenecientes a 6 árboles diferentes. En esta parcela, el porcentaje de hipovirulencia era del 38%. Por otro lado, en Les Gavarres se encontraron 9 cepas, de las cuales 7 se detectaron en la parcela Xocolatera. Asimismo, en esta parcela el porcentaje de hipovirulencia era del 35%. Otra zona con especial presencia de hipovirulencia era el Alt Empordà, con 10 cepas detectadas en 9 árboles. Entre Osor i Santa Coloma de Farners, zona en la anteriormente se detectó presencia de cepas hipovirulentas, también se pudieron aislar cepas con el hipovirus.

Aparte de estos casos, la hipovirulencia en Cataluña era nula o muy testimonial.

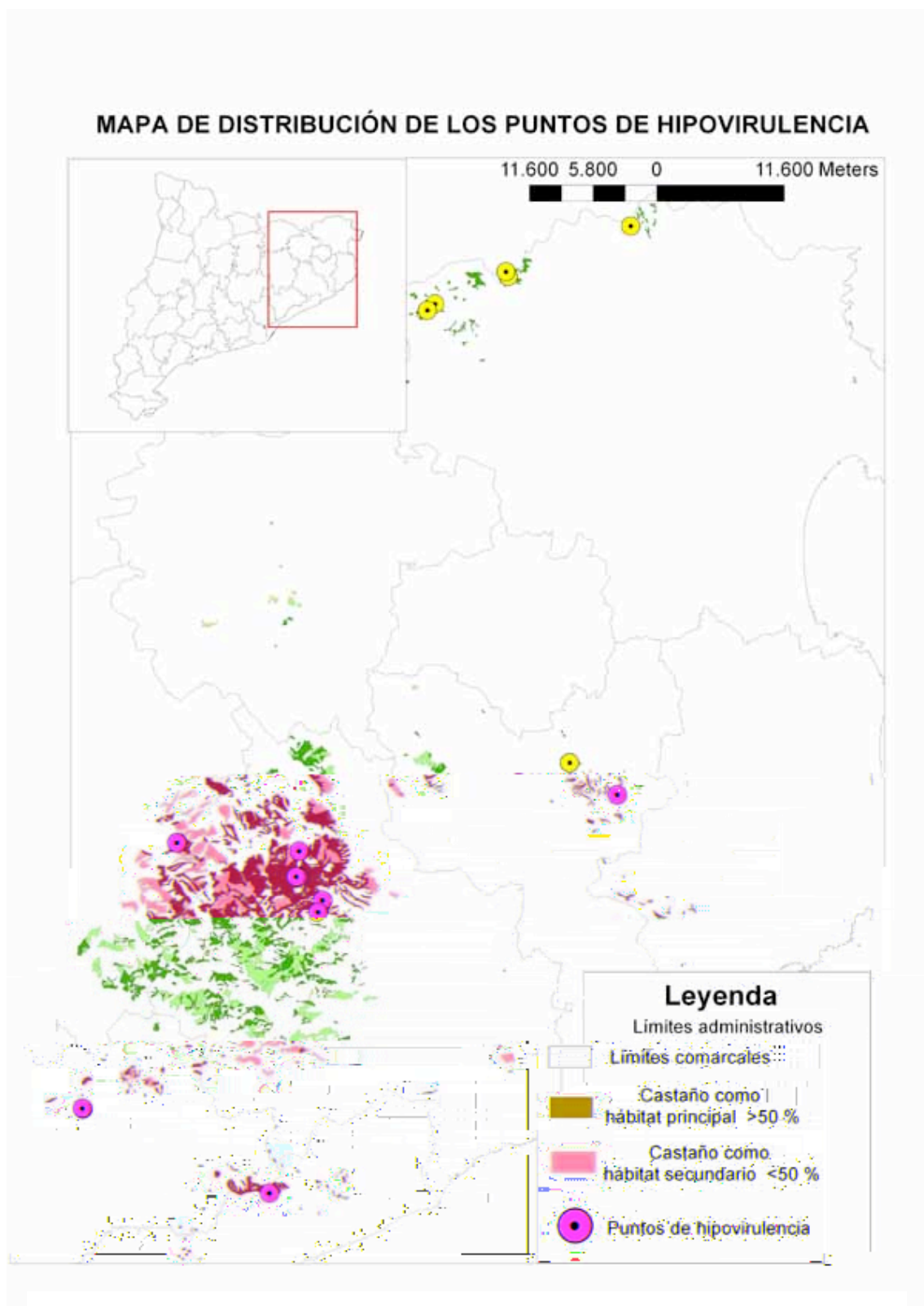


Figura 12: Mapa de distribución de los puntos de hipovirulencia detectados en Cataluña. Cada punto representa una parcela en la que se detectaron cepas hipovirulentas. Por ello, algunos de los puntos representan más de una cepa hipovirulenta detectada.

Test de compatibilidad vegetativa

En el presente estudio se observó cierta diversidad de GCV en las muestras estudiadas con dcARN. Los GCV con mayor representación en las muestras con dcARN eran el EU-2 y EU-1, con 18 y 12 muestras encontradas, respectivamente. El GCV EU-2 se encontró en varias zonas como Les Gavarres, Alt empordà, Montseny, Osor y Santa Coloma de Farners. El GCV EU-1 también estaba presente en varias zonas como el Alt empordà, Santa Coloma de Farners, Guillerries-Savassona y Osor. Los otros GCV encontrados eran mucho menos representativos: el EU-67, con 2 cepas detectadas solamente en el Alt empordà, EU-5, con dos cepas también aisladas en el Alt empordà, EU-12, con una única cepa encontrada en Santa Coloma de Farners y el EU-72, con una cepa detectada en una parcela de Guillerries-Savassona. No obstante, la cepa detectada perteneciente al GCV EU-72 presentaba una débil reacción de incompatibilidad. Finalmente, se detectaron 4 cepas que no pertenecían a ningún GCV Europeo.

PCR

La amplificación en parte del marco abierto de lectura A (ORF A) de la cADN del hipovirus resultó en bandas de peso molecular aproximado de 1400 bp de longitud (Figura 10). Algunas de las muestras estudiadas presentaron dificultades ya sea por una amplificación insuficiente o inexistente. Este problema se solucionó en algunos casos incrementando los ciclos de la PCR juntamente con una disminución de la temperatura de alineamiento a 55°C. En el caso de muestras que tampoco pudieron ser amplificadas mediante estas modificaciones, se optó por hacer nuevas extracciones e incrementar la cantidad inicial de dcARN en la síntesis de la cADN. A pesar de estas modificaciones, las muestras LL1020, LL1023, LL0622 i LL0606 no pudieron ser amplificadas.

Finalmente, no se observaron diferencias en las longitudes genómicas de los productos PCR obtenidos de las distintas muestras.

RFLP

El producto PCR de parte del marco abierto de lectura A (ORF-A) del hipovirus fué digerido con los enzimas de restricción sugeridos por Allemann *et al.* (1999). Los patrones obtenidos con la digestión fueron analizados en gel de agarosa al 2% (Figura 12).

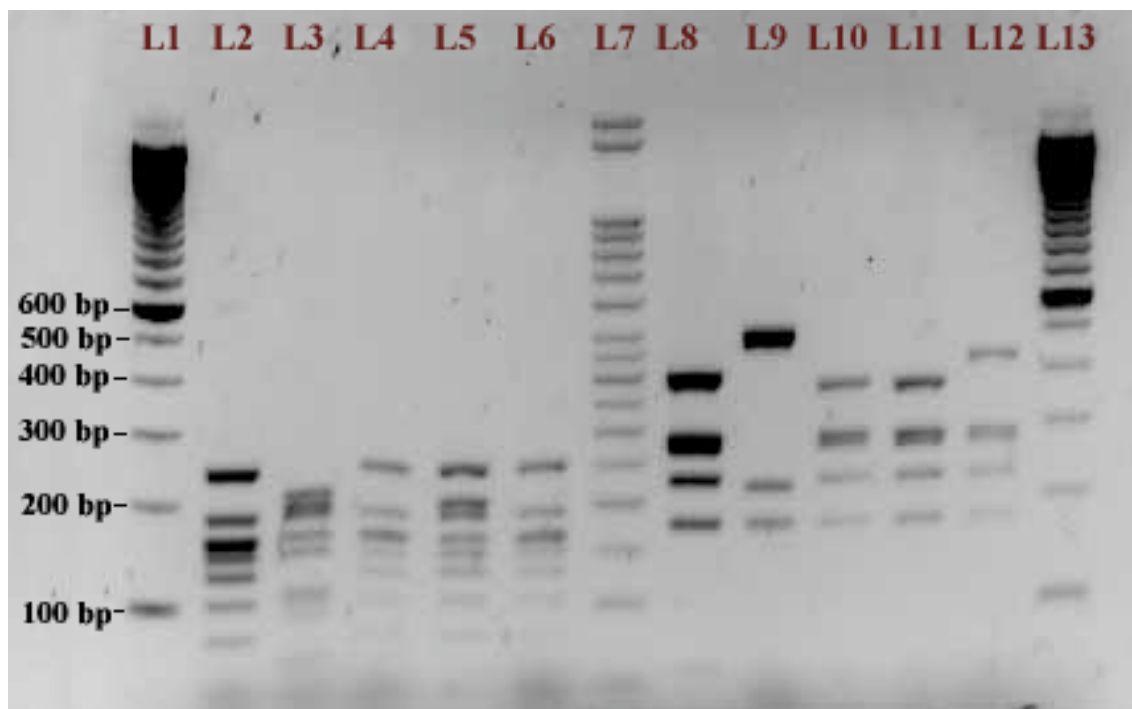


Figura 13: Resultado de la digestión del producto PCR en gel de agarosa al 2%. L1, L13: Marcador 100 bp. L2, L3, L4, L5, L6: Patrones obtenidos de la digestión con *Hinfl*. L7: Marcador 50 bp., el intervalo de pesos moleculares de el marcador 50 bp es de 50 pares de bases. L8, L9, L10, L11, L12: Patrones obtenidos de la digestión con *HaeIII*.

Mediante la técnica RFLP se detectó cierta diversidad genética de CHV1. En ese sentido, las digestiones obtenidas con el enzima *Hinfl* presentaron mayor diversidad de patrones que en el caso de las digestiones realizadas con *HaeIII*. En el caso de las muestras digeridas con *Hinfl*, se observó que casi la mitad de ellas presentaban el mismo patrón (Patrón 1 *Hinfl*) que el control positivo, muestra aislada en el año 2000 en Osor. Este patrón obtenido se considera propio del subtipo CHV1-I y, según Allemann *et al.* (1999), el mismo patrón se

detectó en muestras de Italia, Córcega, Francia y Croacia. Aparte de este patrón, los resultados demuestran la detección de diferentes patrones pero pertenecientes al mismo subtipo. Curiosamente, el segundo patrón más representativo (Patrón 2 HinfI y también perteneciente a CHV1-I) fue detectado solamente en Croacia por Allemann *et al.* (1999), mientras que en el presente estudio 9 son las cepas que mostraron dicho patrón.

Respecto a los resultados obtenidos con HaeIII, se observó también una clara predominancia de un patrón concreto (Patrón 1 HaeIII), también propio del subtipo CHV1-I y al que pertenecían 23 muestras. En este caso, el mismo patrón se detectó en cepas de Italia, Croacia, Bosnia, Hungría, Grecia, Francia y Córcega (Allemann *et al.* 1999). Asimismo, con HaeIII solamente se observó un patrón (Patrón 2 HaeIII) que fuera distinto al anterior y a su vez perteneciera a CHV1-I, estando solamente representado por una cepa.

Tanto con HinfI como con HaeIII se observaron patrones que aún no han sido descritos. En el caso de HinfI se observó un patrón aún no descrito (Patrón 3 HinfI) y representado por un grupo de 6 muestras, todas pertenecientes a la misma parcela. El patrón de estas muestras era muy similar al Tipo 1 (Tipo 1 HinfI) ya que la única diferencia entre estos tipos recae en una sola banda, de mayor peso molecular.

Los patrones más raros obtenidos en este estudio correspondieron a la muestra LL1437 (Patrón 4 HinfI y Patrón 5 HaeIII). Esta muestra presentó patrones aún no descritos, tanto con el enzima HinfI como con HaeIII. El hecho más llamativo era una banda de unos 500 bp., característica más bien propia del subtipo CHV1-F1. En el caso de la digestión con HinfI, esta muestra presentó tan solo 3 bandas, hecho que no detectaron Allemann *et al.* (1999) con ninguna de sus muestras. Los patrones obtenidos con el enzima HaeIII también presentaron cierta cercanía al subtipo CHV1-F1.

Por otro lado, los patrones de las muestras LL1168, LL1169 y LL1170 (Patrón 7 HinfI y Patrón 4 HaeIII) resultaron especialmente interesantes por el hecho de no estar aún descritos pero también por tener mucha semejanza con un patrón incluido dentro de

con HinfI, la diferencia se dió únicamente en el peso de una banda concreta. y era de tan solo unos 20 bp.

Curiosamente, las cepas LL1168, LL1169, LL1170 y LL1437 se encontraron en una zona concreta cerca de Osor, lo cual indica que puede haber más cepas nuevas en esa zona (Figura 13). Por otro lado, la cepa LL0559, cepa que se aisló en el verano del año 2000 cerca de Osor y fue la primera cepa hipovirulenta detectada en Cataluña (Homs *et al.* 2001), resultó estar a pocos metros de las cepas LL1168, LL1169, LL1170 aunque pertenecieran a una parcela distinta (Figura 13).

La diversidad genética observada con los patrones RFLP no solamente se daba a nivel autonómico sino que también se observó a nivel parcelario. Tanto en el caso de la parcela Bansells como en Xocolatera se observaron 3 patrones distintos con el enzima HinfI y 2 con el HaeIII. Por otro lado, en el conjunto de parcelas muestreadas del Alt Empordà también se observaron 3 patrones distintos con HinfI y 2 con HaeIII.

MAPA DE DISTRIBUCIÓN Y DIVERSIDAD DEL HIPOVIRUS EN OSOR

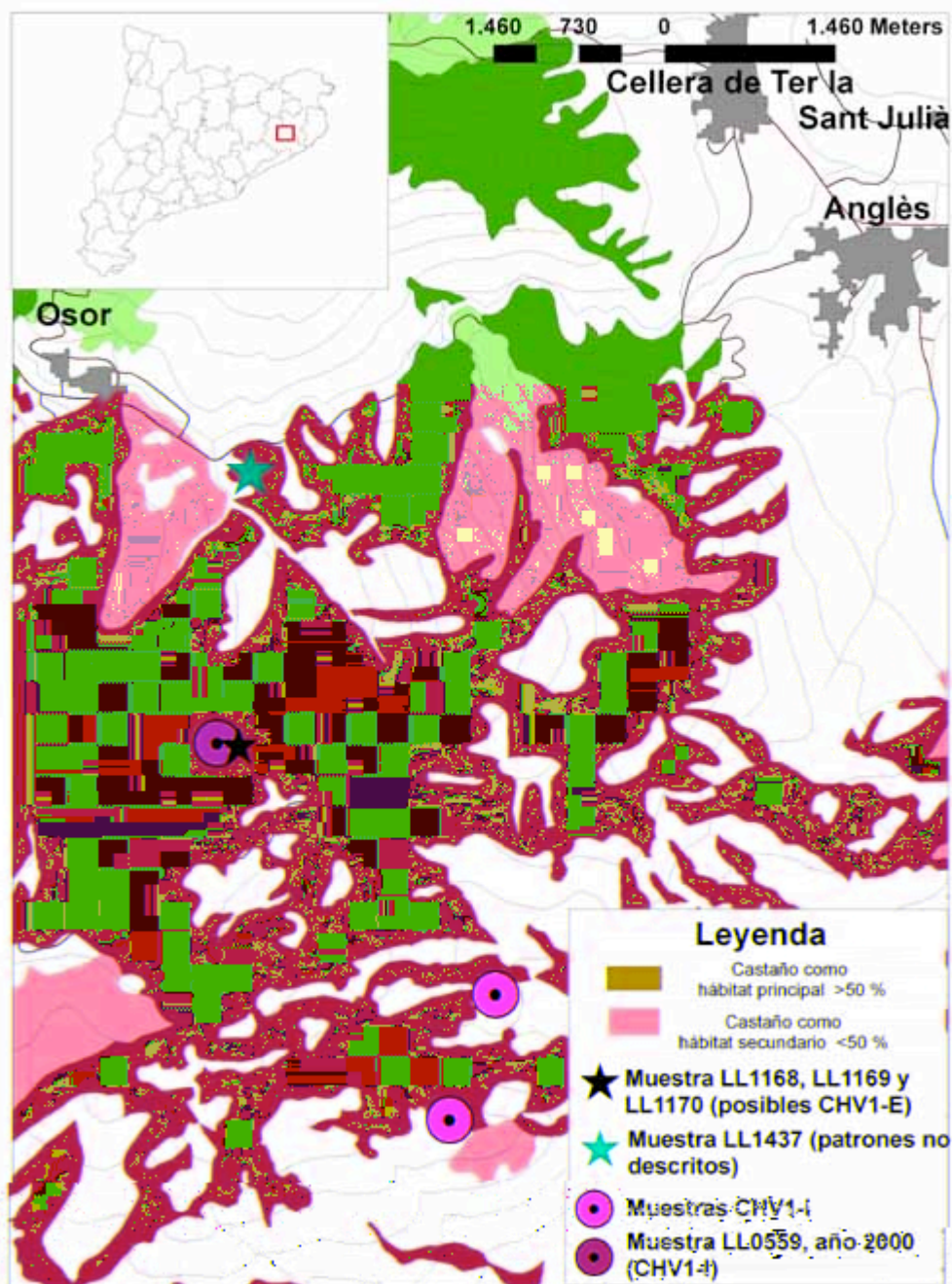


Fig. 14. Mapa de distribución y diversidad del hipovirus en Osor. Estrella negra: Muestras LL1168, LL1169, LL1170. En el análisis RFLP se observó que eran muy cercanas al subtipo vírico CHV1-E. Estrella Lila: Muestra LL1437. En el análisis RFLP se observaron patrones no descritos tanto con HaeIII como con HinfI. Círculo en marrón claro: Muestra LL0559, aislada en el año 2000 y primera cepa hipovirulenta detectada en Cataluña. Círculos amarillos: Cepas hipovirulentas detectadas pertenecientes a CHV1-I.

DISCUSIÓN

Test morfológico

El test morfológico permitió separar 223 cepas que presentaban en cultivo *in vitro* los rasgos típicos de las cepas virulentas. Estos rasgos, descritos por Van Alfen, (1988), Macdonald y Fulbright, (1991) y Peever *et al.* (2000) han permitido hacer una primera diferenciación de las cepas que posiblemente contienen dcARN de las que no lo contienen. Además de las cepas con morfología blanca, en el análisis de presencia de dcARN también se incorporaron cepas con pigmentación intermedia. El motivo de la incorporación de estas cepas en el análisis se basa en el estudio realizado por Hogan y Griffin (2007). En el estudio realizado por los mismos autores, se observó que un porcentaje de cepas intermedias también contiene CHV1, destacando la importancia de las mismas en la dispersión del hipovirus en el medio.

Los chancros infectados por CHV1 se pueden distinguir en campo por su carácter hipovirulento. Los chancros hipovirulentos se caracterizan por presentar chancros superficiales y con baja esporulación (Macdonald y Fulbright, 1991; Robin *et al.* 2000). No obstante, si bien es verdad que chancros posiblemente hipovirulentos muestreados han resultado estar infectados por el hipovirus *Cryphonectria*, en este estudio se ha observado que algunos de los chancros hipovirulentos en campo no presentaban dcARN. Este hecho podría deberse a una pérdida del hipovirus durante el manejo de la cepa o bien a que durante el muestreo se recogió una parte del chancro sin infección por el hipovirus.

Incidencia del hipovirus

Con la extracción de la dcARN se pudo comprobar la existencia de cepas infectadas por el hipovirus. Aún así, solamente 40 de las 490 cepas muestreadas presentaron dcARN, demostrando así la baja presencia del

mismo en las masas de castaño. De las muestras con hipovirus obtenidas, 11 presentaron morfología intermedia en el test de hipovirulencia, corroborando las observaciones realizadas por Hogan y Griffin (2007). En un principio se detectaron 43 cepas con posible presencia de dcARN pero una vez realizada la digestión del ADN se observó que 3 muestras en realidad no presentaban dcARN. En el gel de agarosa de la extracción ya se intuían diferencias en las bandas de estas 3 muestras en comparación con el resto ya que estaban más difuminadas y tenían menor intensidad.

En algunas cepas se pudo observar la presencia de formas suprimidas internas del genoma viral (concretamente M-dcARN) del hipovirus, tal y como indica la doble banda presente en algunas de ellas. Además, algunas de las cepas estudiadas presentaron bandas de pesos moleculares muy reducidos, pudiéndose tratar de ARN ribosómico del hongo que no se lavó adecuadamente o bien, tal y como sugieren Montenegro *et al.* (2008), formas internas suprimidas del genoma viral.

Homs *et al.* (2001) cifraron la presencia de cepas hipovirulentas en Cataluña en un porcentaje muy bajo, inferior al 1%, con tan solo una cepa detectada y que ha sido incorporada en el presente estudio. No obstante, el porcentaje de cepas hipovirulentas detectadas en este estudio no puede ser comparado con el de estos autores debido a que en el presente estudio hay muestras que se han obtenido mediante muestreos dirigidos únicamente a este tipo de cepas.

Los bajos valores de presencia del hipovirus encontrados en este estudio y en el de Homs *et al.* (2001) contrastan con los encontrados en Europa, sobretudo en aquellos países en los que se ha aplicado el control biológico. En Francia, país en el que aplicaron varios programas de control biológico, estos mismos autores observaron que el porcentaje de chancros cicatrizados o en proceso de cicatrización de sus seis regiones de estudio era superior al 30%. Asimismo, observaron que en parcelas donde no se aplicó el control biológico el porcentaje de chancros cicatrizados o en proceso era del 27% al 41%, demostrando por lo tanto que el hipovirus en Francia se ha dispersado a lo largo de los años en parcelas no tratadas. Por otro lado, en Suiza, Bissegger *et al.* (1997) observaron un 59% y 40% de cepas blancas (hipovirulentas) en sus

dos zonas de estudio y, más recientemente, Gobbin *et al.* (2003) detectaron la presencia de CHV1-I en el 65% y 64% de los chancros muestreados en dos zonas de Suiza.

La alta incidencia del hipovirus *Cryphonectria* en Europa contrasta con la de China y Japón, del orden del 2% y del 6%, respectivamente. En el caso de Corea, la incidencia es mayor, del orden del 12,4% (Park *et al.* 2008). La baja incidencia del hipovirus en China parece paradójica ya que, recientemente, Liu *et al.* (2007) especulaban la posibilidad que el hipovirus fuese originario de este país.

Con la baja presencia del hipovirus en los hongos muestreados en este estudio podemos deducir que *Cryphonectria parasitica* está capacitado para producir aún mayores daños y destrucción en las masas de castaño, lo cual se puede evitar o reducir aplicando un control biológico, tal y como se ha hecho en diversos países europeos (Berthelay-Sauret, 1978; Vrot y Grente, 1985; Intropido *et al.* 1987; Bisiach *et al.* 1991).

Además de su escasa presencia, la distribución de las cepas con hipovirus era bastante irregular, concentrándose en ciertos puntos de la geografía catalana. En primer lugar, llamaba la atención la parcela Bansells, situada en Guillerics-Savassona, con 8 cepas hipovirulentas (38%) detectadas en el muestreo aleatorio aplicando da m a

En el presente estudio también se detectaron cepas hipovirulentas entre Santa Coloma de Farners y Osor, muy cerca de donde se describió una zona con especial presencia de hipovirulencia.

Por otro lado, se observaron 3 cepas hipovirulentas en el Montseny y 2 en el Montnegre, a diferencia de la Sierra de Prades y Garrotxa, donde no se detectó ninguna cepa hipovirulenta.

La distribución irregular a nivel parcelario del hipovirus indica que este pudo ser transportado varias veces, ya sea por la introducción de material vegetal contaminado o bien por el propio movimiento humano o de otros vectores. De hecho, en Europa se ha demostrado mediante estudios genéticos que CHV1 ha sido introducido varias veces (Allemann *et al.* 1999).

Finalmente, aunque se detectó la presencia de hipovirulencia, en general, la mayoría de las parcelas presentaban solamente chancros virulentos que provocaban una mortalidad y decrepitud en la masa característica de la enfermedad.

Descripción de los hipovirus detectados

La longitud genómica de las cepas detectadas indicaba un peso molecular aproximado de 12,7 kbp, sugiriendo que se trata de CHV1. Estos resultados concuerdan con Allemann *et al.* (1999) ya que en Europa solamente detectaron CHV1. La doble banda observada en algunas muestras ya fue observada también estos mismos autores y sugirieron que se trataba de M-dcARN.

La amplificación de parte de la ORF-A del virus resultó en bandas de unos 1400 bp. No obstante, mediante PCR no era posible identificar el subtipo de las cepas.

Mediante RFLP se pudo observar cierta diversidad genética de *C. hypovirus*,

por las diferencias que se dan entre ellos. Por otro lado, Chen y Nuss, (1999), Lin *et al.* (2007) y Peever *et al.* (2000) reportaron importantes diferencias entre virus pertenecientes a CHV1.

El subtipo vírico claramente predominante en Cataluña era el CHV1-I. Aunque este subtipo estaba muy asociado a un patrón concreto, se obtuvieron otros patrones diferentes tanto con HaeIII como con HinfI igualmente pertenecientes a CHV1-I. Teniendo en cuenta que CHV1-I es un subtipo que se dispersa con facilidad y que se ha encontrado de manera escasa pero bastante repartida, es lógico pensar que el hipovirus está en una fase de expansión y por lo tanto es muy posible que en pocos años tenga mucha más representación en las masas de castaño.

En este estudio se detectaron patrones RFLP idénticos a algunos de los descritos por Allemann *et al.* (1999). Curiosamente, el patrón RFLP más observado en Cataluña es también el más frecuente de Europa, tanto el obtenido con HaeIII como con HinfI.

Además de los distintos patrones pertenecientes a CHV1-I, se observaron patrones aún no descritos. En ese sentido, se detectaron patrones especialmente interesantes por su rareza. En primer lugar, la muestra LL1437 estaba alejada de los patrones típicos de CHV1-I, presentando una banda de 500 bp., más bien propia de CHV1-F. Aún así, existe también la posibilidad que esta muestra sufriera una digestión incompleta debido a un exceso de ADN en el momento de su digestión.

Las muestras LL1168, LL1169 y LL1170 eran también especialmente interesantes por su gran similitud con CHV1-E. CHV1-E fue detectada por Allemann *et al.* (1999) en Navarra y es el subtipo Español. Gobbin *et al.* (2003) observaría una alta similitud de CHV1-E con CHV1-D, detectado en Alemania.

Tal y como se observa en la figura 14, las cepas más interesantes por su rareza estaban en una zona concreta de la geografía catalana (cerca de Osor). Este hecho podría sugerir que en la zona hubo cierta actividad asociada con el transporte de material vegetal y, por lo tanto, se favoreció la entrada del hipovirus. Para la detección y corroboración de esta hipótesis sería interesante

realizar un segundo muestreo en la zona para detectar otros posibles subtipos o incluso tipos diferentes.

Aparte de estas muestras, se han detectado cepas con patrones que tampoco han sido descritos, aunque presenten bastante similitud con CHV1-I.

Montenegro *et al.* (2008) afirmaban que en España ha habido múltiples introducciones de CHV1, al detectarse en León el tipo CHV1-F y en Cataluña el CHV1-I. No obstante, tal y como muestran los resultados del presente estudio, en Cataluña también hubo múltiples introducciones incluso a nivel parcelario. Precisamente las dos parcelas con mayor porcentaje de hipovirulencia detectada (Bansells y Xocolatera) demostraron tener diversidad vírica, lo cual significaría que el virus se introdujo en estas parcelas reiteradas veces. Además, no todas las cepas detectadas en estas parcelas pertenecían a CHV1-I, aunque si presentaban patrones similares a los mostrados por este subtipo. En el caso de Bansells, todas las muestras digeridas con HaeIII mostraron una pertenencia a CHV1-I, aunque no las digeridas con HinfI. En el caso de las muestras digeridas con HinfI, casi todas las muestras presentaron un patrón al que no pertenecía ninguna otra cepa catalana. Este patrón era muy similar al patrón más representativo de Cataluña (Patrón 1 HinfI) y únicamente difería en el peso molecular de una banda. En el caso de Xocolatera sucedió al contrario ya que el patrón obtenido con HinfI pertenecía a CHV1-I mientras que el obtenido con HaeIII aún no había sido descrito.

En la discusión de este estudio se ha sugerido que las cepas del Alt Empordà proceden de Francia, ya que Robin *et al.* (2000) observaron importante presencia de hipovirulencia en Languedoc-Rousillon, zona cercana a el Alt Empordà. Por otro lado, Allemann *et al.* (1999) observaron diversidad de CHV1-I en Francia. En este estudio se pudo observar como muchos de los patrones RFLP observados en las cepas del Alt Empordà fueron también detectados por Allemann *et al.* (1999) en Francia, lo cual sugiere que la hipovirulencia del Alt Empordà pudo provenir de Francia o viceversa.

Las dificultades por describir las nuevas cepas detectadas se deben en parte a que los patrones obtenidos por HaeIII tenían pesos moleculares muy pequeños (de hasta 105 bp.). Además, las bandas obtenidas acostumbraban a presentarse muy juntas, lo cual dificultaba una buena visualización de las distintas bandas y obligaba a tener una buena cantidad de producto PCR para una buena visualización posterior de los patrones en gel de agarosa. Por otro lado, mediante gel de agarosa era imposible describir exactamente el peso de las bandas sino que para ello se debe utilizar un gel de m (e) Tj 500 0 54Tj 50 0 0 50 859t

la diana por tratarse de muestras pertenecientes a otro tipo vírico. Para contrastar estas hipótesis, sería interesante desarrollar nuevos intentos de amplificación o bien utilizar otras técnicas moleculares que permitan conocer el tipo vírico.

GCV's de las cepas con hipovirus

En el presente estudio también se observó una variabilidad de GCV's con hipovirus bastante alta. De las

ud ad (e) Tj 50 0 0 50 3461 0 Tm ()Tj 50 0 0

Mediante el estudio de los patrones RFLP se pudo estudiar mejor la relación entre los GCV's y el hipovirus. Por ejemplo, se observaron idénticos patrones en distintos GCV's de muestras pertenecientes a la misma parcela, fenómeno que podría sugerir que existe cierta capacidad de transmisión del hipovirus entre distintos GCV's. No obstante, se daba algún caso en el que un patrón se daba únicamente en un único GCV, como el caso de la muestra LL1378 (perteneciente al GCV EU-72), que presentaba el patrón más común de Cataluña (Tipo 1 HinfI) pero que en la parcela únicamente se detectó en este GCV.

Predicción de la persistencia del hipovirus estudiado en Cataluña

Chen y Nuss, (1999), Peever *et al.* (2000) y Lin *et al.* (2007) describieron detalladamente la distinta capacidad de CHV1-Euro7 y CHV1-EP713 para afectar al hongo. Según Chen y Nuss, (1999) y Peever *et al.* (2000) el prototipo CHV1-Euro7 posibilita una mayor virulencia en el hongo que CHV1-EP713. A efectos prácticos, este hecho significa que un hongo infectado con CHV1-EP713 genera menos estrés y provoca chancros más pequeños en el árbol que con CHV1-Euro7 pero, desgraciadamente, un hongo infectado por CHV1-EP713 tiene menor capacidad de dispersión que el infectado por CHV1-Euro7. Es tal la diferencia en la capacidad de dispersión de ambas cepas que Heiniger y Rigling, (2009) asociaban los efectos producidos por CHV1-F1 (tipo al que pertenece CHV1-EP713) con la poca persistencia de esta en las zonas tratadas con CHV1-EP713 en Francia.

En base a estas premisas, podemos considerar que en Cataluña se dan las condiciones adecuadas para que el hipovirus persista en las masas de castaño. En primer lugar, está presente un tipo vírico que ha resultado ser efectivo en el control del patógeno, el CHV1-I (Heiniger y Rigling, 2009), y, en segundo lugar, la diversidad de GCV es baja (Homs *et al.* 2001).

Las cepas hipovirulentas de *Cryphonectria parasitica* tienen distinta capacidad de transmitir el hipovirus en los conidios. Lin *et al.* (2007) reportó esta capacidad en función de la cepa vírica infectada. Estos autores observaron que CHV1-EP713 tiene una eficiencia de transmisión del 100%, CHV1-EP721 del 77% y CHV1-Euro7 del 85%. Como los prototipos más parecidos a las cepas estudiadas en el presente estudio son CHV1-Euro7 y CHV1-EP721, suponemos que la eficiencia de transmisión de las cepas hipovirulentas en Cataluña ronda entre el 77% y el 85%. Plana (2006) utilizó la cepa vírica estudiada en el presente estudio (LL0559) para tratar árboles enfermos. Este autor cifró en el 70,5% el porcentaje de transmisión del hipovirus en los conidios. Con los datos obtenidos por Plana (2006) podríamos pensar que la cepa LL0559 es más afín a CHV1-EP721, aunque no podemos de ninguna manera asegurarlo. Desgraciadamente, la tecnología RFLP utilizada en el presente estudio tampoco permite diferenciar CHV1-EP721 de CHV1-Euro7, para ello sería necesaria la tecnología de secuenciación de los dos marcos abiertos de lectura.

La importancia de conocer el porcentaje de transmisión del hipovirus en los conidios se basa principalmente en su uso en la aplicación del control biológico. La eficiencia de este control mediante la aplicación de conidios depende en parte de la cantidad de conidios hipovirulentos que se aplican en los chancros (Scibilia *et al.* 1992). Por lo tanto, en caso de utilizar las cepas detectadas en este estudio para producción de conidios hipovirulentos se debería tener en cuenta el porcentaje de transmisión del hipovirus en los conidios, de esta manera se determinaría la cantidad efectiva de conidios hipovirulentos que produce la cepa.

CONCLUSIONES

En este trabajo se realizó un estudio genético de *C. hypovirus* mediante patrones RFLP, así como un estudio de los GCV de las cepas fúngicas con hipovirus. Con los resultados obtenidos las conclusiones son:

- La hipovirulencia en Cataluña es aún un fenómeno localizado. En general, las masas de castaño se ven aún muy afectadas por la virulencia de *C. parasitica*.

- Se observó cierta diversidad genética del hipovirus, hecho que sugería que *C. hypovirus* fue introducido en Cataluña reiteradas veces. Estas reiteradas introducciones de *C. hypovirus* también se dieron a nivel parcelario.

- La mayoría de las muestras pertenecían al subtipo CHV1-I, lo cual significa que es de esperar un incremento de la presencia del hipovirus en las masas, al ser este subtipo el más adecuado para dispersarse en el medio. Es de esperar que este fenómeno implique una mejoría del estado sanitario de las masas de castaño. Asimismo, se detectó una cepa que podría pertenecer a CHV1-E.

- Se detectaron cepas con patrones RFLP aún no descritos. Estos patrones podrían pertenecer a otros subtipos. Por lo tanto, se debería hacer un estudio genético más detallado de estas muestras para conocer el subtipo al que pertenecen.

- Se debería hacer una secuenciación de los hipovirus detectados para conocer de manera más exacta su similitud a los distintos prototipos de CHV1.

·Existe cierta diversidad de GCVs asociada a las cepas con el hipovirus. Este hecho podría sugerir que los GCVs presentes en Cataluña tienen una buena capacidad por transmitir el virus o bien sería otra evidencia que *C. hypovirus* ha sido introducido reiteradamente en Cataluña.

·Se detectó una zona especialmente interesante con diversidad de hipovirus y con hipovirus aún no descritos, así como cepas que podrían pertenecer a CHV1-E. Esto sugiere que en la zona podría haber aún mayor diversidad del hipovirus y por lo tanto podría ser interesante realizar nuevos muestreos.

Bibliografía:

- Allemann, C.; 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(5): 843-854.
- Amorini, E.; Manetti, M.C.; Turchetti, T.; Sansotta, A.; Villani, F. 2001. Impact of silvicultural system on *Cryphonectria parasitica* incidence and on genetic variability in a chestnut coppice in Central Italy. *Forest Ecology and Management*, 142: 19-31.
- Anagnostakis, S. L. 1987. Chestnut blight: the classical problem of an introduced pathogen. *Mycologia*, 79: 23-37.
- Anagnostakis, S. L. 1994. Protecting chestnut trees from blight. 85th Annual meeting of the Northern Nut Growers' Association in Morgantown (West Virginia USA) 7-10 Aug. 1994. Annual Report Northern Nut Growers' Association, 85: 118-123.
- Anagnostakis, S. L.; Day, P. R. 1979. Hipovirulence conversion in *Endothia parasitica*. *Phytopathology*, 69 (12): 1226-1229.
- 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.
- Anziani, C.; Robin, C. 1999. Le chancre du châtaignier en France. *Phytoma, La Défense des Végétaux*, 517: 44-47.
- Argemí, J. 2009. El Castanyer a Catalunya. Perspectives i oportunitats. Comunicació oral. 22 de Gener. Sant Hilari.
- Berrocal, M.; Gallardo, J.; Cardeñoso, J. M. 1998. Ediciones Mundi-Prensa. El Castaño. Productor de fruto y madera. Creador de paisaje y protector.
- Bisiach, M.; De Martino, A.; Intropido, M. 1991. Nuove esperienze di protezione biologica contro il cancro della

- 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.
- Casals, V.; Pardo, F.; Xalabarder, M.; Postigo, J. M.; Gil, L.: La transformación histórica del paisaje forestal en Cataluña, Madrid, Tercer Inventario Forestal Nacional, Ministerio de Medio Ambiente, 2005, 320 p.
- Chen, B.; Nuss, D. L. 1999. Infectious cDNA Clone of Hypovirus CHV1-Euro7: a Comparative Virology Approach To Investigate Virus-Mediated Hypovirulence of the Chestnut Blight Fungus *Cryphonectria parasitica*. *Journal of Virology*, 73(2): 985-992.
- Choi, G.H.; Nuss, D.L. 1992. Hypovirulence of chestnut blight fungus conferred by an infectious viral cDNA. *Science*, 257(5071): 800-803.
- Chung, P.; Bedker, P.J.; Hillman, B.I. 1994. Diversity of *Cryphonectria parasitica* hypovirulence-associated double-stranded RNAs within a chestnut population in New Jersey. *Phytopathology*, 84: 984-990.
- Colinas, C.; Uscuplic, M. 1999. Studies on chestnut blight (*Cryphonectria parasitica* (Murr.) Barr) in North-East Spain. *Acta Horticulturae* 494: 495-500.
- Dawe, A. L.; Nuss, D. L. 2001. Hypoviruses and chestnut blight: exploiting viruses to understand and modulate fungal pathogenesis. *Annual Review of Genetics* 35: 1-29.
- De María, A.; Novo, A.; Gil, M.; Gómez, E.; Caldas, S.; García, M. J.; Manzano, I. 2006. Manual de Biodiversidad de los Espacios Forestales. El castaño. Asociación Profesional de Selvicultores de Galicia "Silvanus Galicia". 130 pg.
- Elliston, J. E. 1981. Hypovirulence and chestnut blight research: fighting disease with disease. *Journal of Forestry*, 79(10): 657-660.

- Elliston, J. E. 1985. Characteristics of dsRNA-free and dsRNA-containing strains of *Endothia parasitica* in relation to Hypovirulence. *Phytopathology*, 75(2): 151-158.
- Enebak, S.A.; MacDonald, W.L.; 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.
- Gobbin, D.; Hoegger, P.J.; Heiniger, U.; Rigling, D. 2003. Sequence variation and evolution of *Cryphonectria hypovirus 1* (CHV-1) in Europe. *Virus Research*, 97(1): 39-46.
- Grente, J.; Berthelay-Sauret, S. 1978. Biological control of chestnut blight in France. *Proc. Am. Chestnut Symp.* 4-5:30-34.
- Heiniger, U.; Rigling, D. 1994. Biological control of chestnut blight in Europe. *Annu. Rev. Phytopathol.* 32: 581-599.
- Heiniger, U.; Rigling, D. 2009. Application of the *Cryphonectria hypovirus* (CHV-1) to control the chestnut blight, experience from Switzerland. *Proc. IW on Chestnut Management in Med. Countries*. Eds. A. Soylu and C. Mert. *Acta Hort.* 815, ISHS 2009.
- 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.
- Hogan, E. P.; Griffin, G. J. 2007. Importance of *Cryphonectria parasitica* stromata production and intermediate-pigmented isolates in spread of *Cryphonectria hypovirus 1* on grafted american chestnut trees. *For. Path.*, 38: 302-313.
- 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.

- 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.
- L'Hostis, B.; Hiremath, S.T.; Rhoads, R.E.; Ghabrial, S.A. 1985. Lack of sequence homology between double-stranded RNA from European and American hypovirulent strains of *Endothia parasitica*. *J. Gen. Virol.*, 66: 351-355.
- Lin, H.; Lan, X.; Liao, H.; Parsley, T.B; Nuss, D. L.; Chen, B. Genome sequence, full-length infectious cDNA clone, and mapping of viral double-stranded RNA accumulation of determinant of hypovirus CHV1-EP721. *Journal of Virology.*, 81: 1813-1820.
- Liu, F. -X.; Ding, P.; Xu. C. -X.; Wang. K. -R. 2007. Genetic diversity of *Cryphonectria hypovirus 1* in China, Japan and Italy. *J. Phytopathology*, 155: 662-669.
- Liu, Y. -C.; Dynek, J. N.; Hillman, B. I.; Milgroom, M. G. 2007. Diversity of viruses in *Cryphonectria parasitica* and *C. nitschkei* in Japan and China, and partial characterization of a new chrysovirus species. *Mycological Research*, 3: 433-442.
- Liu, Y.C.; Milgroom, M.G. 1996. Correlation between hypovirus transmission and the number of vegetative incompatibility (vic) genes different among isolates from a natural population of *Cryphonectria parasitica*. *Phytopathology*, 86 (1): 79-86.
- Macdonald, W.L.; Fulbright, D.W. 1991. Biological-Control of Chestnut Blight - Use and Limitations of Transmissible Hypovirulence. *PLANT DISEASE*, 75: 656-661.
- Manion, P.D., 1981: Tree disease concepts. Prentice Hall, New Jersey, EEUU. 402p.

- Melzer, M. S.; Boland, G. J. 1999. CHV3-type dsRNAs and the GH2 genotype in a population of *Cryphonectria parasitica* in Ontario. Can. J. Plant Pathol., 21:248-255. 12237
- 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. Revue Canadienne De Phytopathologie, 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.
- Ministerio de Medio Ambiente (2002): Tercer Inventario Forestal Nacional para Barcelona, Girona, Lleida y Tarragona. Madrid, Dirección General de la Naturaleza.
- Montenegro, D.; Aguín, O.; Sainz, M. J.; Hermida, M.; 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 Ecology and Management, 256: 973-980.
- Nannelli, R.; Turchetti, T.; Maresi, G. 1998. Corticolous mites (Acari) as potential vectors of *Cryphonectria parasitica* (Murr.) Barr hypovirulent strains. International Journal of Acarology, 24(3): 237-244.
- Peever, T. L.; Liu, Y. C.; Milgroom, M. G. 1997. Diversity of hypoviruses and other double-stranded-RNAs in *Cryphonectria parasitica* in North America. Phytopathology, 87(10):1026-1033.
- Peever, T. L.; Liu, Y. C.; Wang, K.; Hillman, B. I.; Foglia, R.; Milgroom, M. G. 1998. Incidence and diversity of double-stranded RNAs occurring in the chestnut blight fungus, *Cryphonectria parasitica* in China and Japan. Phytopathology, 88(8): 811-817.
- Peever, T. L.; Liu, Y.; 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.

- 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.
- Robredo Junco, F.; Berrocal del Río, M.; Cardeñoso Herrero, J. M. 1995. El chancro del castaño (*Cryphonectria parasitica*) en Castilla y León. *Montes*, 42: 32-42.
- 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. *CANADIAN JOURNAL OF FOREST RESEARCH-JOURNAL CANADIEN DE LA RECHERCHE FORESTIERE*, 22: 1338-1342.
- Smart, C. D.; Yuan, W.; Foglia, R.; Nuss, D. L.; Fulbright, D. W.; Hillman, B. I. 1999. *Cryphonectria hypovirus 3*, a virus species in the family hypoviridae with a single open reading frame. *Virology*, 265: 66-73.
- Turina, M.; Rostagno, L. 2007. Virus-induced hypovirulence in *Cryphonectria parasitica*: still an unresolved conundrum. *Journal of Plant Pathology*, 89(2):165-178.
- Tusell, Josep Maria; Rovira, Núria. 2006. La situació actual del castanyer (*Castanea sativa* Mill.) a Catalunya. Informe del Consorci Forestal de Catalunya al Departament de Medi Ambient i Habitatge.
- 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, 1988. pg.12-20.

Vrot, F.; Grente, J. 1985. Le chancre de l'écorce du châtaignier. Phytoma-Défense des cultures: 35-37.

Wayne A. Sinclair, Howard H. Lyon, Warren T. Johnson. 1987. Diseases of trees and shrubs Ithaca, New York London Cornell University cop.

ANEXO

Tabla 1: Relación de las muestras positivas en la extracción de la dcARN

Codigo Lab.	Muestra	GCV	UTM x	UTM y	Morfología	Digestión ADN
LL1378	Ban1a	EU-72	453453	4644105	B	+
LL1381	Ban2b	EU-1	453453	4644105	Ra	+
LL1382	Ban3a	EU-1	453453	4644105	B	+
LL1383	Ban3b	EU-1	453453	4644105	B	+
LL1384	Ban4a	EU-1	453453	4644105	B	+
LL1385	Ban4b	EU-1	453453	4644105	B	+
LL1391	Ban8a	NoDet	453453	4644105	B	+
LL1168	Sob1.1a	EU-1	464500	4640991	Po	+
LL1169	Sob1.1b	EU-1	464500	4640991	Po	+
LL1170	Sob1.1c	EU-1	464500	4640991	Po	+
LL1016	OL1	EU-2	449252	4619867	B	+
LL1017	OL2	EU-2	449252	4619867	B	+
LL0652	LL652	EU-2	482230	4696124	B	+
LL0983	AE-Cb5a.1	EU-67	482440	4695692	B	+
LL0984	AE-Cb5b.2	EU-67	482440	4695692	B	+
LL1054	Tar5a	EU-2	449241	4619862	Po	+
LL0994	Ffre3b	EU-1	475080	4692596	Po	+
LL1001	MolH1c	EU-1	475787	4693181	Ra	+
LL1124	Malb13	EU-12	466688	4638863	B	+
LL1095	Elcor1b	EU-2	466298	4637792	Po	+
LL1096	Elcor2a	EU-2	466298	4637792	Po	+
LL0998	FfreH1c	EU-1	475080	4692596	Po	+
LL1369	Ang2b	EU-2	464596	4643335	Po	-
LL1187	PreH6a	-	466339	4612394	B	-
LL1437	AngH3a	EU-1	464596	4643335	B	+
LL0559	Osor	EU-2	464316	4641007	B	+
LL0982	AE-Cb3a.1	EU-67	482440	4695692	Po	-
LL1020	38	EU-2	466227	4612171	B	+
LL1023	62	EU-2	449192	4619911	B	+
LL0622	LL622	EU-2	493594	4700291	Po	+
LL0606	LL606	EU-2	493594	4700291	B	+
LL0648	LL648	EU-5	482230	4696124	Po	+
LL0647	LL647	EU-5	482230	4696124	Po	+
LL1398	BanH1b	NoDet	453453	4644105	B	+
LL1475	Pix6b	EU-2	493516	4648469	B/Ra	+
LL1477	Pix7b	EU-2	493516	4648469	B	+
LL1481	Xoc2b	Eu-2	488049	4651384	B	+
LL1483	Xoc3b	EU-2	488049	4651384	R	+
LL1486	Xoc5a	EU-2	488049	4651384	B	+
LL1487	Xoc5b	NoDet	488049	4651384	B/Ra	+
LL1492	Xoc8a	NoDet	488049	4651384	B	+
LL1494	Xoc9a	EU-2	488049	4651384	B	+
LL1497	Xoc10b	EU-2	488049	4651384	B	+

Leyenda

·**Código Lab.:** Código de la muestra.

·**Muestra:** Nombre de la muestra. Empezando con la abreviatura de la parcela seguido del número de árbol

·**GCV.** Grupo de compatibilidad vegetativa.

NoDet significa que no se ha conseguido determinar el GCV. Se ha observado incompatibilidad con todos los tésters europeos.

·**UTM X:** Coordenadas UTM del orden las “X” con georeferencia ED-50.

·**UTM Y:** Coordenadas UTM del orden las “Y” con georeferencia ED-50.

·**Morfología:** B= Blanca

Po= Posible (pigmentación intermedia)

Ra= Raquítica

·**Digestión ADN:** + =Continua presentando banda a 12,7 kbp. La muestra tiene dcARN.

- =No presenta banda a 12,7 kbp. La muestra no tiene dcARN.

Tabla 1: Relación de las muestras digeridas

Codigo Lab.	Muestra	Patron HinfI	subtipo Hinf	Patrón HaeIII	subtipo HaeIII
LL1378	Ban1a	1	CHV1-I	2	CHV1-I
LL1381	Ban2b	5	no identif	1	CHV1-I
LL1382	Ban3a	3	no identif	1	CHV1-I
LL1383	Ban3b	3	no identif	1	CHV1-I
LL1384	Ban4a	3	no identif	1	CHV1-I
LL1385	Ban4b	3	no identif	1	CHV1-I
LL1391	Ban8a	3	no identif	1	CHV1-I
LL1168	Sob1.1a	7	no identif (cercano a CHV1-E)	4	no identif (cercano a CHV1-E)
LL1169	Sob1.1b	7	no identif (cercano a CHV1-E)	4	no identif (cercano a CHV1-E)
LL1170	Sob1.1c	7	no identif (cercano a CHV1-E)	4	no identif (cercano a CHV1-E)
LL1016	OL1	1	CHV1-I	1	CHV1-I
LL1017	OL2	1	CHV1-I	1	CHV1-I
LL0652	LL652	1	CHV1-I	1	CHV1-I
LL0983	AE-Cb5a.1	2	CHV1-I	1	CHV1-I
LL0984	AE-Cb5b.2	2	CHV1-I	1	CHV1-I
LL1054	Tar5a	1	CHV1-I	1	CHV1-I
LL0994	Ffre3b	6	Mezcla entre patrón 1 i 2	1	CHV1-I
LL1001	MolH1c	1	CHV1-I	1	CHV1-I
LL1124	Malb13	1	CHV1-I	4	no identif (cercano a CHV1-E)
LL1095	Elcor1b	8	CHV1-I	1	CHV1-I
LL1096	Elcor2a	8	CHV1-I	1	CHV1-I
LL0998	FfreH1c	1	CHV1-I	1	CHV1-I
LL1437	AngH3a	4	no identif	5	no identif
LL0559	Osor	1	CHV1-I	1	CHV1-I

LL0648	LL648	1	CHV1-I	1	CHV1-I
LL0647	LL647	1	CHV1-I	1	CHV1-I
LL1398	BanH1b	3	no identif	1	CHV1-I
LL1475	Pix6b	1	CHV1-I	1	CHV1-I
LL1477	Pix7b	1	CHV1-I	1	CHV1-I
LL1481	Xoc2b	2	CHV1-I	6	no identif (cercano a CHV1-I)
LL1483	Xoc3b	2	CHV1-I	6	no identif (cercano a CHV1-I)
LL1486	Xoc5a	2	CHV1-I	6	no identif (cercano a CHV1-I)
LL1487	Xoc5b	2	CHV1-I	6	no identif (cercano a CHV1-I)
LL1492	Xoc8a	2	CHV1-I	6	no identif (cercano a CHV1-I)
LL1494	Xoc9a	8	CHV1-I	3	no identif
LL1497	Xoc10b	1	CHV1-I	3	no identif

Leyenda

·**Código Lab.:** Código de la muestra.

·**Muestra:** Nombre de la muestra. Empezando con la abreviatura de la parcela
seguido del número de árbol.

·**Patrón Haelll y Subipo Haelll:**

Pesos moleculares en bp.

Patrón	251	240	220	204	195	189	170	165	148	135	129	120	105	Número aisl	Subtipo
1														23	CHV1-I
2														1	CHV1-I
3														2	no identificado
4*														4	parecido a CHV1-E
5*															

·Patrón HinfI y Subipo HinfI:

Pesos moleculares en bp

Patrón	500	480	460	440	430	397	390	340	285	274	250	224	220	180	Número aisl	Subtipo
1															14	CHV1-I
2															9	CHV1-I
3*															6	No identificado
4*															1	no identificado
5*															1	no identificado
6															1	Mezcla entre patrón 1 i 2
7*															3	parecido a CHV1-E
8															1	CHV1-I