



Dispersión natural de la Hipovirulencia en *Cryphonectria parasitica*. Un caso de estudio, Sergude - Minho - Portugal

Natural spread of Hypovirulence in *Cryphonectria parasitica*. A case study, Sergude - Minho – Portugal

Isabel Ibáñez^{1*}, Eric Pereira¹, Moura, Luísa^{2,3}; Castro, João Paulo, ^{1,2} e Eugénia Gouveia^{1,2}

¹Instituto Politécnico de Bragança, Campus de Santa Apolónia, 5300-253 Bragança, Portugal.

E-mail: *isaibanez84@gmail.com, author for correspondence

²CIMO-Centro de Investigação de Montanha, Campus de Santa Apolónia - Apartado 1172, 5301-854 Bragança, Portugal

³Instituto Politécnico de Viana do Castelo, Largo 9 de Abril, Ap. 186, 4901-911 Viana do Castelo, Portugal.

Recibido/Received: 2015.03.02

Aceite/accepted: 2015.06.14

RESUMEN

El castaño (*Castanea sativa*) es una especie de gran importancia económica y social en la región del Norte de Portugal. Uno de los mayores obstáculos en el aumento de la producción de castaña está relacionada con la presencia de factores bióticos como la antigua y conocida enfermedad de la Tinta y más recientemente con el chancro que provoca elevada mortalidad en los castaños. No hay sustancias químicas capaces de bloquear el desarrollo del chancro del castaño y todos los medios de lucha cultural mostraron baja eficacia. La hipovirulencia es el medio de lucha biológica y la manera más ventajosa para parar la enfermedad en Europa. El método mostro una elevada capacidad de cura en los chancros y la recuperación completa de los castaños atacados. El mecanismo molecular de hipovirulencia está asociado a la presencia en el hongo parasítico del virus dsRNA denominado Hypovirus (CHV). En Sergude (Minho) en una parcela con todos los árboles atacados por *C. parasitica* se verifico en un periodo de 3 – 4 años la remisión natural de los chancros llevando a la recuperación de los árboles enfermos. Conocer los mecanismos implicados en la expresión de la hipovirulencia y los factores asociados a su dispersión natural fue el objeto de este trabajo. Se estudió la estructura poblacional de *C. parasitica* presente en la parcela así como la micoflora epifítica y endofítica asociada.

Palabras clave: chancro del castaño, *C. parasitica*, micoflora epifítica y endofítica, dispersión natural de la hipovirulencia

ABSTRACT

Chestnut (*Castanea sativa*) is a species of great economic and social importance in the Northern region of Portugal. One of the biggest barriers to increased nut production is related to the presence of biotic factors such as the old and familiar Ink Disease and more recently the Chestnut Blight that is causing high mortality in chestnut. In the absence of chemical fungicides capable of stopping the development of the Chestnut Blight and considering the reduced effectiveness of other mitigation measures, hypovirulence is the most advantageous way to control the disease in Europe. The method showed high ability to heal the cankers and promote the complete recovery of chestnut. The molecular mechanism of hypovirulence is associated with the presence of dsRNA virus of the genus Hypovirus. In Sergude (Minho) in a chestnut grove with all trees attacked by *C. parasitica* in a period of 3-4 years occurred the natural remission of cankers leading to the recovery of diseased trees. Our objective was to understand the mechanisms involved in the expression of hypovirulence and factors associated with its natural dispersion. We studied the population structure of *C. parasitica* present in chestnut and associated epiphytic and endophytic mycoflora

Keywords: chestnut blight, *C. parasitica*, epiphytic and endophytic mycoflora, natural spread of hypovirulence

Introducción

El castaño europeo pertenece a la familia Fagaceae y su nombre científico es *Castanea sativa* Mill. El castaño es una especie de gran importancia económica y social en la región Norte de Portugal. Una de las mayores barreras en el aumento de la producción de la castaña está relacionada con la presencia de factores bióticos como la antigua y conocida enfermedad de la tinta y más recientemente con el chancro del castaño que provoca elevada mortalidad en el castaño.

La enfermedad del castaño, es causada por el hongo *Cryphonectria parasitica* una enfermedad muy extendida, causando necrosis de ramas y troncos. En 1938 fue detectada por primera vez en Europa en Italia cerca de Genova, diseminándose rápidamente y a finales de la década de 1960 por la Europa Mediterránea. En 1989 es detectado en la región de Trás-os-Montes (EPPO; Flórez *et al.*, 2001; Anastácio y Pereira, 2001; Bragança *et al.*, 2009). La enfermedad se encuentra dispersa en focos de mayor o menor extensión en Trás-os-Montes y con un grado variable de incidencia de la enfermedad (Gouveia *et al.*, 2001). En Europa, *C. parasitica* es un organismo de cuarentena que se encuentra en la lista A2 de la EPPO.



Figura 1 - Localización de la parcela muestreada de *Cryphonectria parasitica* en Sergude

La compatibilidad sexual en *C. parasitica* es controlada por un único locus (MAT), que tiene dos idiomorfos MAT-1 y MAT-2. Estudios en poblaciones de *C. parasitica* en Suiza, España, Macedonia y Grecia indican que el grupo que predomina es el MAT-1 sobre el MAT-2 (Aguín *et al.*, 2008).

Algunas cepas de *C. parasitica* producen chancros superficiales causando poco o ningún daño en el árbol. Estos casos están asociados con la hipovirulencia asociada con la presencia del hipovirus RNA de doble cadena. Por otro lado, están las cepas que son virulentas de *C. parasitica* y que no presentan el virus dsRNA y causan la muerte de los árboles. La posibilidad de transmitir el virus para las cepas virulentas es un importante mecanismo de control biológico y depende de los grupos de compatibilidad vegetativa. La principal forma de transmisión del hipovirus es por anastomosis de hifas y puede también ocurrir por esporas de origen asexual, los conidios. Las ascosporas sexuales no contienen el virus (Montenegro *et al.*, 2008).

La micoflora existente en los árboles, la cual tiene diferentes tipos de hongos, constituye un ecosistema complejo y diversificado. Su acción perjudica o beneficia al castaño, depende de la respuesta de las interacciones que se establecen.

Los hongos son muy diversificados, tanto al nivel de estructura como a nivel funcional y adopta diferentes estrategias tróficas, que pueden ser saprófitas, simbiotes, patogénicas o parásitas (Pereira, 2010).

El objetivo de este trabajo fue estudiar la estructura poblacional de *C. parasitica* presente en la parcela, la presencia de cepas hipovirulentas así como la micoflora epifítica y endofítica asociada a *C. parasitica*, para entender cómo es que estos influyen en la dispersión natural de la hipovirulencia que se verifico en esta parcela.

Material e Métodos

En octubre del 2013 en el Norte de Portugal una parcela de castaños (*Castanea sativa* Mill.) fue muestreada debido a que la parcela presentaba chancros agresivos causados por *C. parasitica* y a la vez aparecían chancros curados sin haber habido intervención por parte del hombre. La parcela estudiada se sitúa en Sergude, perteneciente a Felgueiras en la región del Minho. Concretamente se estudió la parcela de Sergude debido a que en el 2010 la parcela presentaba más del 75% de su población con presencia de chancros, durante 2012 a 2013 la enfermedad fue remitiendo y durante el 2014 la parcela presentaba una recuperación natural casi del 100% de los árboles enfermos.

En cada árbol se realizó la anotación tanto de las características morfológicas del chancro como de las coordenadas geográficas del árbol. Anotando si el árbol presentaba un chancro curado o agresivo, si presentaba estructuras (picnidios o peritecas), el grado de severidad y si se procedía a la recogida de muestras (anotando el código asignado). Para estimar el grado de severidad del chancro, se estableció una escala de severidad de síntomas de 1 a 5 para indicar el porcentaje del chancro del castaño que presentaba el árbol, donde 1 son árboles sanos o recuperados (todos los chancros presentes en el árbol están curados), 2 son árboles con presencia de un chancro, 3 son árboles con presencia de 2 chancros, 4 son con más de 2 chancros de grandes dimensiones y 5 son árboles muertos.

Recogida de muestras, aislados y características

Las muestras fueron tomadas de la corteza de las extremidades de los chancros y de las proximidades de ellos, tanto de los chancros curados como de los agresivos. Se cogieron trozos de corteza entre los 5 y 10 cm², fueron colocados individualmente en sacos debidamente identificados con el número de árbol y el código asignado para dicha muestra y almacenados hasta su utilización en el laboratorio. Se muestreo un total de 105 árboles.

Para el aislamiento de los hongos, primero cada muestra se cortó en fracciones más pequeñas, de aproximadamente 3 cm² y se procedió a la desinfección superficial de cada muestra, utilizando para ello etanol al 70% durante 3 minutos y seguidamente era pasado por la llama para quitar la humedad y terminar de desinfectarlo, a continuación era depositado en papel absorbente esterilizado. Para el aislamiento de las muestras se utilizó medio de cultura PDA (Potato Dextrose Agar). Una vez estaban todas las muestras desinfectadas y secas, cada muestra se dividió en 5 trozos de aproximadamente 0,5 cm² y se colocaron en placas Petri (9 cm de diámetro) que contenían 20 ml de medio PDA y con su respectiva identificación. Las placas fueron incubadas a 25 ± 1°C en oscuridad durante 4 o 5 días con el fin de proporcionar el crecimiento del micelio. Cada trozo de madera desinfectado y puesto en placa Petri con PDA que desarrollo micelio fue transferido un pequeño fragmento de micelio a una nueva placa Petri (9 cm de diámetro) con 20 ml de medio PDA para obtener cultivo puro.

En el caso que el trozo de micelio transferido fuera de *C. parasitica*, se incubaban a 25 ± 1°C en oscuri-

dad durante 7 días y luego eran puestos a la luz del laboratorio durante 5 días para analizar el color y la presencia o ausencia de picnidios en las placas (Garbelotto *et al.*, 1992). Considerándose como virulentas cuando presentaban micelio anaranjado/castaño y con presencia de picnidios y posibles hipovirulentas cuando presentaban un micelio blanco y sin picnidios.

En cambio, cuando los hongos eran diferentes a *C. parasitica* el proceso era diferente, se realizaba una caracterización morfológica del hongo para estudiar el crecimiento y características morfológicas que presentaba. Anotando color, aspecto y tamaño del hongo al cabo de los 3 y 7 días a la oscuridad y luego a los 5 y 14 días a la luz, para la observación de los posibles cambios que podría tener en oscuridad y en la luz.

Determinación de los grupos de compatibilidad vegetativa de *C. parasitica*

Se estudió la compatibilidad vegetativa de los aislados de *C. parasitica* en la parcela mediante el procedimiento propuesto por Anagnostakis (1988) y adaptada por Bisseggeret *et al.* (1997) y Cortesi *et al.* (1998). Los aislados obtenidos de ambas parcelas se confrontaron con los 5 grupos de compatibilidad vegetativa europeos EU1, EU2, EU11, EU12 y EU66 que se han descrito en Portugal.

En este estudio se utilizaran placas Petri (9 cm de diámetro) el medio de cultivo utilizado fue PDA y cada placa fue dividía en 5 partes, colocando esporas con la ayuda de un palillo esterilizado. Cada una de las placas Petri contenía el mismo aislado emparejado con los diferentes grupos de compatibilidad vegetativa de referencia. Se sellaron con parafilm y se incubaron a 25 ± 1°C en oscuridad durante 7 días, seguidos de un período de exposición a la luz de laboratorio durante 5 días. Se observó a los 7 y 14 días las compatibilidades vegetativas. Los aislados se consideraron compatibles cuando los dos micelios se fusionaron completamente, mientras que los aislados son incompatibles cuando se observó una barrera entre los dos micelios.

La diversidad de tipos de compatibilidad vegetativa se calculó mediante la relación S/N y el índice de diversidad de Shannon ($H' = - \sum p_i (\ln p_i)$, $i = 1, \dots, S$, donde p_i es la frecuencia de cada tipo de compatibilidad vegetativa y S es el número de tipos de compatibilidad vegetativa).

Extracción de DNA

Para la extracción de DNA los hongos fueron cultivados en placas con celofán. La extracción de DNA total de *C. parasitica* y de los hongos diferentes fue realizada utilizando el método de extracción tampón SDS Lysis Buffer seguido del empleo de un kit comercial (DNeasy® Plant mini kit de Qiagen, California, EUA).

La integridad del DNA se evaluó por electroforesis en tinas horizontales (BioRad) llenadas con tampón 1x TAE, en gel de agarosa 0.8% (Promega, Madison, U.S.A). La separación electroforética fue realizada con una diferencia de potencial de 80 V. El DNA fue visualizado bajo un transiluminador UV y observado con el sistema vídeo Eagle Eye II Still Vídeo System (Stratagene), utilizando el programa Eagle Sight 3.2 (Stratagene).

Identificación molecular de los hongos (ITS)

Para la identificación molecular de los hongos, previamente se realizó una extracción DNA. Los hongos a los que se procedió a su identificación fueron los hongos diferentes encontrados en los castaños así como para la confirmación de *C. parasitica*, debido a que *C. parasitica* presentaba diferentes características morfológicas (L1, L2, L3, L4 y estrellado). Para la identificación de los hongos se utilizó por PCR la amplificación de la región espaciador transcrito interno (ITS), empleando la pareja de cebadores específicos ITS1 (5' - TCCGTAGGTGAACCTGCCG - 3') y ITS4 (5' - TCCTCCGCTTATTGATATGC - 3') según el método descrito por White *et al.* (1990). La reacción fue realizada siguiendo las condiciones siguientes: desnaturalización inicial a 94°C durante 4 minutos, seguida de 40 ciclos que consistían en la desnaturalización a 94°C durante 30 segundos, el anillamiento a 50°C durante 1 minuto y extensión a 72°C durante 1 minuto. Se incluyó una extensión final a 72°C durante 10 minutos para completar los fragmentos de PCR que estuvieran incompletos y en proceso de extensión. Utilización de un control negativo (sin DNA) en cada PCR para detectar cualquier contaminación.

Los productos amplificados se separaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% en tampón TAE 1X, como se ha descrito anteriormente.

Para confirmar la identidad de los hongos detectados mediante PCR, los productos obtenidos fueron enviados para su secuenciación. Posteriormente, y con el objetivo de establecer la identidad de cada

muestra, se realizó la comparación de cada una de las secuencias, mediante GenBank; BLAST ("Basic Local Alignment Search Tool") con secuencias depositadas en la base de datos del NCBI ("National Center for Biotechnology Information").

Mating-types

Se realizó el estudio del mating-type según lo descrito por Marra y Milgroom (1999, 2001) en los aislados obtenidos de *C. parasitica*. El DNA del hongo fue extraído como se ha descrito anteriormente. Los Mating-types fueron identificados por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) amplificación de los dos idiomorfos del locus MAT *C. parasitica* utilizando los pares de cebadores M1-GS1 (5' - GACATCA-CAAGTCGGCTCCCACGAACA - 3') y M1-GS2-rev (5' - GTGCTTTGTGTCGTGTTAATCGCCGC - 3') para MAT-1 y M2-GS2 (5' - GGAAGTTGGGTC-CAAATATGGGTACAG - 3') y Inv-A5n (5' - TGA-AAGCAGCCTTGATGTCGGCAGCCTT - 3') para MAT-2. La PCR se realizó siguiendo condiciones siguientes: desnaturalización inicial a 94°C durante 4 minutos, seguida de 34 ciclos que consistían en la desnaturalización a 94°C durante 30 segundos, el anillamiento a 66°C durante 1 minuto y extensión a 72°C durante 4 minutos. Se incluyó una extensión final a 72°C durante 4 minutos para completar los fragmentos de PCR que estuvieran incompletos y en proceso de extensión. Utilización de un control negativo (sin DNA) en cada PCR para detectar cualquier contaminación.

Los productos amplificados fueron separados en gel de agarosa al 1% en tampón TAE 1X, como se ha descrito anteriormente.

Hongos diferentes

El aislamiento de los hongos diferentes se obtuvo de las placas de los aislamientos de *C. parasitica*. Los cultivos puros de cada aislado se obtuvieron por cultivo del micelio en el mismo medio donde se realizó el aislamiento de los hongos. La identificación de todos los aislados fúngicos se confirmó molecularmente por amplificación PCR de la región genómica ITS como se ha descrito anteriormente.

Resultados y discusión

La severidad del chancro causado por *C. parasitica* presente en los castaños fue clasificado con el grado de severidad asignando del 1 al 5, donde 1 son

árboles sanos o curados y 5 son árboles muertos. Como se observa en la figura 2 el grado de severidad de la enfermedad presente en los castaños analizados varía entre 1 y 5. Los árboles analizados se observa que se ha producido una disminución del chancro del castaño causado por *C. parasitica* en los árboles afectados. Cuando se realizó el muestreo en octubre del 2013 36 árboles de los 105

que tiene la parcela presentaban chancros curados o eran arboles sanos, de los cuales 23 árboles representan a árboles sanos. En la observación del 2014 se observó que había más recuperación de árboles presentando un total de 86 árboles curados de chancro o sanos del total, representando un 82% de recuperación en la parcela de Sergude.

Grado de severidad en la parcela de Sergude

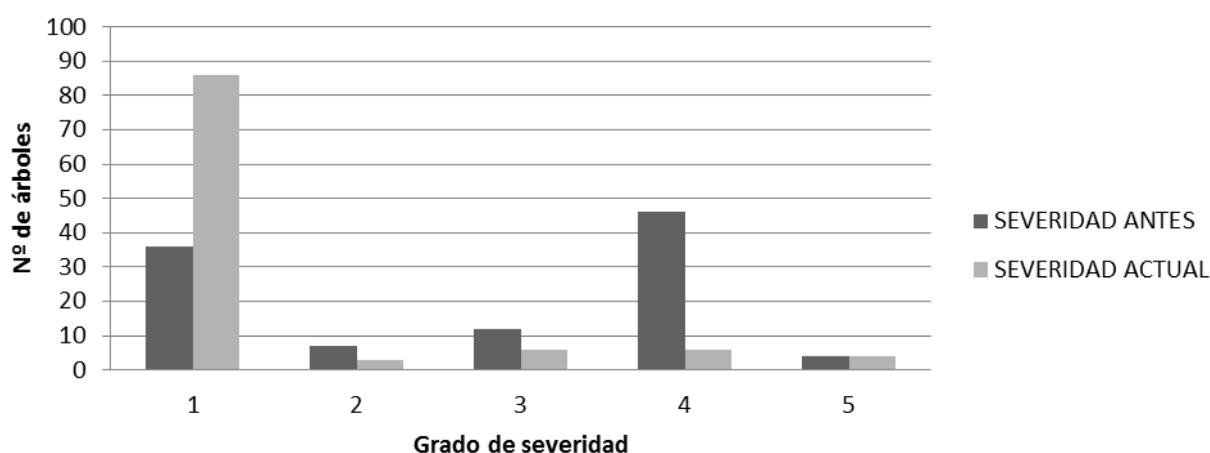


Figura 2 - Grado de severidad (%) en los árboles en Sergude, en el muestreo de octubre del 2013 (severidad antes) y la observación del 2014 (severidad actual)

En el laboratorio con la ayuda de un microscopio óptico se realizó la observación de las muestras recogidas en la parcela y se observó que solo había presencia de picnidios y en ningún caso se dio la presencia de peritecas. La mayoría de las muestras presentaban micelio.

Se recogieron un total de 99 muestras de las proximidades de los chancros tanto de los agresivos como de los curados. Se obtuvieron 141 aislados de hongos diferentes y 137 aislados de *C. parasitica*.

Los aislados de *C. parasitica* mostraban diferentes características morfológicas en cuanto a coloración, procediendo a separarlas por aspecto morfológico. Se dividió en 6 grupos morfológicos, asignando como L1 a los aislados que mostraban un micelio blanco y amarillo con ausencia de picnidios, L2 a los aislados que presentaban un micelio blanco y naranja con presencia de picnidios naranjas/rojos, L3 a los aislados que mostraban un micelio blanco y castaño con presencia de picnidios castaños, L4 a los aislados que presentaban un micelio blanco y amarillo con presencia de picnidios amarillos, se

le asigno como Blancos a los que mostraban un micelio blanco con ausencia de picnidios y como Estrellados a los que presentaban un micelio blanco y castaño en forma irregular y con picnidios naranjas. Los grupos morfológicos que más abundaban son L2 y L4 con un total de 41 aislados cada uno, seguidos de L1 con un total de 25 aislados y L3 con 24 aislados. En menor cantidad se encuentran los llamados Blancos y los Estrellados con un total de 3 aislados cada uno. Del total de los aislados 65 presentaban características típicas de los aislados virulentos (L2 y L3), 69 aislados presentaban características morfológicas intermedias (L1, L4 y Estrellado) y 3 aislados presentaron color blanco y fueron considerados posibles hipovirulentos (Figura 3).

Cryphonectria parasitica

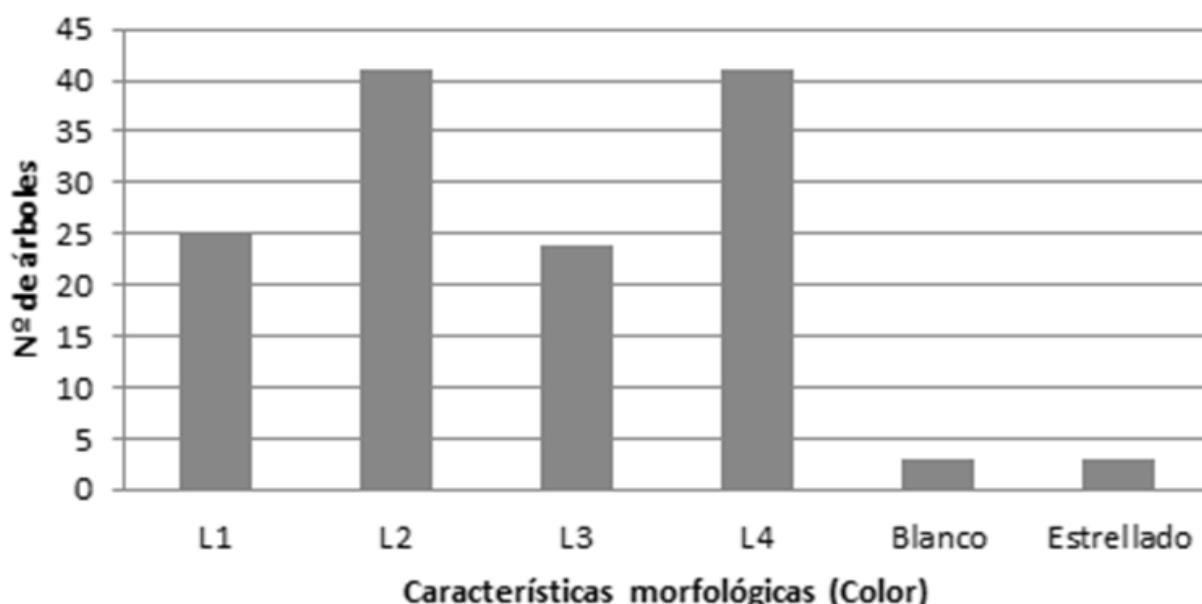


Figura 3 - Características morfológicas de los aislados de *C. parasitica* en Sergude. L1 aislados con micelio blanco y amarillo con ausencia de picnidios, L2 aislados con micelio blanco y naranja con presencia de picnidios naranjas/rojos, L3 aislados con micelio blanco y castaño con presencia de picnidios castaños, L4 aislados con micelio blanco y amarillo con presencia de picnidios amarillos, Blanco aislados con micelio blanco con ausencia de picnidios y Estrellados aislados con micelio blanco y castaño en forma irregular y con picnidios naranjas.

El índice de diversidad de Shannon de los grupos de compatibilidad vegetativa encontrados en la parcela de Sergude fue de 1,090. Se determinó tres grupos de compatibilidades en la parcela estudiada pero el 98% de los aislados pertenecían a un solo tipo, correspondiente a EU11, los otros dos aislados pertenecían al grupo EU12 y al EU66, con lo que la diversidad de la población de *C. parasitica* es prácticamente inexistente. En Europa sucede lo mismo, se encuentra una baja diversidad de grupos de compatibilidad vegetativa. Según Cortesi *et al.* (1996) en Italia solo se encontraron 20 grupos de compatibilidad vegetativa de 716 muestras estudiadas y según Robin *et al.* (2000) en Francia se detectaron 30 grupos de compatibilidad vegetativa de 1113 muestras analizadas.

Al estudiar la estructura sexual de la parcela de estudio (un total de 30 aislados elegidos al azar), se observó que el tipo de apareamiento fue exclusivamente MAT – 2. Los autores Hoeeger *et al.*, 2000, Sotirovski *et al.*, 2004 y Aguin *et al.*, 2008 observan que muchas poblaciones europeas están dominadas por uno de los tipos MAT, pero en Suiza, Macedonia, Grecia y España el tipo dominante es MAT – 1, no como en este caso que es del tipo MAT – 2.

Para aplicar con éxito técnicas de control biológico con cepas hipovirulentas es muy recomendable que sean del mismo tipo de compatibilidad vegetativa que las cepas virulentas y que las cepas virulentas presenten principalmente reproducción asexual (Aguin *et al.*, 2008). En la parcela estudiada se cumple la característica de mismo grupo de compatibilidad vegetativa, las cepas virulentas pertenecen al grupo EU11 excepto dos árboles que pertenecen a grupos diferentes, las posibles cepas hipovirulentas también pertenecen al grupo EU11. La otra condición de presentar principalmente reproducción asexual se cumple, ya que lo analizado hasta el momento pertenece al grupo de apareamiento MAT – 2, con lo que la reproducción es principalmente asexual. Estos dos hechos podrían aclarar porque de forma natural en la parcela de estudio se observa tanta hipovirulencia. Según Anagnostakis (1988), para que la reproducción sexual juegue un papel importante la proporción de individuos MAT – 1 y MAT – 2 tiene que ser 1:1. Condición que no se cumple en la parcela de estudio.

La identidad de los hongos diferentes de *C. parasitica* presentes en los chancros fue obtenida por la secuencia de la región ITS y se compararon con las

producción de estromas en la corteza de los ramos muertos o como patogénico (Jiménez *et al.*, 2005).

Bionectria ochroleuca es un hongo ascomiceto de la clase Sordariomycetes. Según Chagas *et al.* (2010), puede ser utilizado como control biológico de hongos fitopatogénicos, utilizando su forma anamorfa *Clonostachys rosea* que produce conidios unicelulares en dos formas distintas, penicilado y verticilado, siendo este un micoparásita destructivo contra algunos hongos fitopatogénicos, incluyendo en este género *Botrytis* spp.

Conclusiones

Los resultados muestran como la parcela de estudio sin ninguna acción del hombre prácticamente se ha recuperado del chancro del castaño. Se destaca que EU11 es el grupo de compatibilidad vegetativa más abundante con un 98% de los aislados. La baja diversidad de los grupos de compatibilidad vegetativa y la dominancia de un solo grupo de compatibilidad vegetativa EU11 podría explicar la expresión en esa parcela de la hipovirulencia. En este estudio no se llega a explicar el motivo de la dispersión natural de la hipovirulencia y se debería estudiar las cepas hipovirulentas, como se comportan, si producen conidios y si son capaces de transmitir el virus.

Las posibles cepas hipovirulentas aisladas halladas en la parcela de estudio se deben confirmar por técnicas moleculares si presentan el virus subtipo CHV1 que tiene mayor capacidad de dispersión que los otros subtipos hallados en Europa (Allemann *et al.*, 1999).

Para comprobar el efecto de los hongos diferentes encontrados en los chancros del castaño con respecto a *C. parasitica* para ver si produce algún efecto inhibitorio de *C. parasitica*, se debe proceder a la realización de confrontaciones de los hongos diferentes con *C. parasitica* y observar lo que sucede. Este trabajo se está realizando actualmente.

Agradecimientos

Este trabajo ha sido financiado proyecto PTDC/AGR-PRO/4606/2012.

Referencias bibliográficas

- Aguín, O.; Montenegro, D.; Sainz, M.J.; Hermida, M. e Mansilla, J.P. (2008) - Caracterización morfológica y molecular de las poblaciones de *Cryphonectria parasitica* en castaños de Galicia. *Bolletín Sanidad Vegetal. Plagas*, vol. 34, n. 4, p 581 – 594.
- Allemann, C.; Hoegger, P.; Heiniger, U. e Rigling, D. (1999) - Genetic variation of *Cryphonectria hypoviruses* (CHV1) in Europe, assessed using RFLP markers. *Molecular Ecology*, vol. 8, p. 843-854.
- Anagnostakis, S.L. (1988) - *Cryphonectria parasitica*: cause of chestnut blight. *Advances in Plant Pathology*, vol. 6, p. 123-136.
- Anastácio, D. e Pereira, V.A. (2001) - O cancro do Castanheiro. *Cryphonectria parasitica* (Murr.) Barr. *Ministério da Agricultura, do Desenvolvimento Rural e das Pescas, Direcção-Geral de Protecção das Culturas*. Oeiras, 7p.
- Barbosa, M.A. (1958) - O carvão do entrecasco *Hypoxylon mediterraneum* (de Not.) Ces. et de Not. Contribuição para o seu estudo. *Publicações da Direcção Geral dos Serviços Florestais e Aquícolas* vol. XXV, p. 93-132.
- Bisseger, M.; Rigling, D. e Heiniger, U. (1997) - Population structure and disease development of *Cryphonectria parasitica* in European chestnut forests in the presence of natural hypovirulence. *Phytopathology*, vol. 87, n. 1, p. 50-59.
- Bragança, H.; Simões, S.; Onofre, N. e Santos, N. (2009) - Factors influencing the incidence and spread of chestnut blight in northeastern Portugal. *Journal of Plant Pathology*, vol. 91, n. 1, p. 53-59.
- Bragança, H.; Simões, S.; Onofre, N.; Tenreiro, R. e Rigling, D. (2007) - *Cryphonectria parasitica* in Portugal: diversity of vegetative compatibility types, mating types, and occurrence of hypovirulence. *Forest Pathology*, vol. 37, n. 6, p. 391-402.
- Chagas, H.; Rosa, D.; Basseto, M.; Zanutto, M. e Furtado, E.L. (2010) - Avaliação da esporulação de *Bionectria ochroleuca* em diferentes meios de culturas. *Bioscience Journal*, vol. 26, n. 3, p. 334-338.
- Cortesi, P.; Milgroom, M. e Bisiach, M. (1996) - Distribution and diversity of vegetative compatibility types in subpopulations of *Cryphonectria parasitica* in Italy. *Mycological Research*, vol. 100, n. 3, p. 383-390.
- Cortesi, P. y Milgroom, M. (1998) - Genetics of vegetative incompatibility in *Cryphonectria parasitica*. *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 64, n. 8, p. 2988-2994.

- Jiménez, J.; Sánchez, M. e Trapero, A. (2005) – El Chancro Carbonoso de Quercus II: Patogenicidad de *Biscogniauxia mediterranea*. *Boletín de Sanidad Vegetal. Plagas*, vol. 31, n. 4, p. 563 – 575.
- Junta de Andalucía. (2010). El Chancro del tronco del alcornoque causado por *Botryosphaeria* (Chancro de Diplodia). Visto en Diciembre de 2014.
http://www.juntadeandalucia.es/medioambiente/portal_web/web/temas_ambientales/montes/plagas/fichas_plagas_enfermedades/chancro_tronco.pdf
- EPPO. *Cryphonectria parasitica* [online]. [citado 2015-02-10]. Disponible en: <http://www.eppo.int/QUARANTINE/fungi/Cryphonectria_parasitica/ENDOPA_ds.pdf>
- Flórez, J.; Santín, P.J.; Sánchez, J.A.; Del Pino, F.J. e Melcón, P. (2001) - *El castaño. Manual y guía didáctica*. Autor-Editor. León, 327 pp.
- Garbelotto, M.; Frigimelica, G. e Mutto-Accordi, S. (1992) - Vegetative compatibility and conversion to hypovirulence among isolates of *Cryphonectria parasitica* from northern Italy. *European Journal of Forest Pathology*, vol. 22, n. 6-7, p. 337 – 348.
- Gouveia, E.; Cardoso, P. e Monteiro, M.L. (2001) - Incidence of chestnut blight and diversity of vegetative compatible types of *Cryphonectria parasitica* in Trás-os-Montes (Portugal). *Forest Snow and Landscape Research*, vol. 76, n. 3, p. 387 – 390.
- Hoegger, P.J.; Rigling, D.; Holdenrieder, O. e Heiniger, U. (2000) - Genetic structure of newly established populations of *Cryphonectria parasitica*. *Mycological Research*, vol. 104, n. 9, p. 1108-1116.
- Marra, R. e Milgroom, M. (1999) - PCR amplification of the mating-type idiomorphs in *Cryphonectria parasitica*. *Molecular Ecology*, vol. 8, n. 11, p. 1947-1950.
- Marra, R. e Milgroom, M. (2001) - The mating system of the fungus *Cryphonectria parasitica*: Selfing and self-incompatibility. *Heredity*, vol. 86, p. 134-143.
- Montenegro, D.; Aguin, O.; Sainz, M.J.; Hermida, M. e 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*, vol. 256, n. 5, p. 973-980.
- Pereira, E. (2010) - *Estudo da interação do fungo saprófita *Hypholoma fasciculare* com microrganismos filamentosos e seu efeito no crescimento de plantas de castanheiro*. Dissertação Biotecnologia. Bragança, Escola Superior Agrária de Bragança. 79p.
- Robin, C.; Anziani, C. e Cortesi, P. (2000) - Relationship between biological control, incidence of hypovirulence, chestnut blight severity and the population structure of *Cryphonectria parasitica* in France. *Phytopathology*, vol. 90, n. 7, p. 730-737.
- Santos, M.N. (2003) – Contribuição para o Conhecimento das Relações *Quercus suber*- *Biscogniauxia mediterranea* (syn. *Hyposilon mediterraneum*). *Silva Lusitana*, vol. 11, n. 1, p. 21 – 29.
- Sotirovski, K.; Papazova-Anakieva, I.; Grunwald, N. e Milgroom, M. (2004) - Low diversity of vegetative compatibility types and mating type of *Cryphonectria parasitica* in the Southern Balkans. *Plant Pathology*, vol. 53, n. 3, p. 325-333.
- Tsopelas, P.; Slippers, B.; Gonou-Zagou, Z. y Wingfield, M.J. (2010) - First report of *Diplodia corticola* in Greece on kermes oak (*Quercus coccifera*). *Plant Pathology*, vol. 59, n. 4, p. 805.
- White T.J.; Bruns, T.; Lee S. e Taylor, J. (1990) - Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ, eds. *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. San Diego, CA, USA: Academic Press Inc

ENTIDADES PATROCINADORAS DA REVISTA



Aubos de Portugal



A P D E A
ASSOCIAÇÃO
PORTUGUESA
DE ECONOMIA
AGRÁRIA



Associação Portuguesa
de Horticultura



Sociedade Portuguesa
da Ciência do Solo

syngenta®

Syngenta Crop Protection, Lda