

# FITOPATOLOGÍA DEL CASTAÑO

## EL CHANCRO Y LA TINTA EN LA PROVINCIA DE SALAMANCA

**PABLO GARCÍA BENAVIDES**  
**ENRIQUE MONTE VÁZQUEZ**



A large, full-canopied green tree stands prominently in a rural landscape. The tree has a thick, light-colored trunk and a dense, rounded canopy of bright green leaves. In the foreground, there is a dirt road and a grassy field. In the background, a stone wall and other trees are visible under a clear blue sky.

# PRÓLOGO

El estudio que el lector tiene en sus manos, titulado *“Fitopatología del Castaño: El Chancro y la Tinta en la Provincia de Salamanca”*, elaborado por Pablo García Benavides y Enrique Monte Vázquez (Centro Hispano-Luso de Investigaciones Agrarias. Universidad de Salamanca), forma parte de un conjunto de estudios y actuaciones desarrolladas en el marco del Programa de Iniciativa Comunitaria Interreg III-B: Espacio Atlántico, PROYECTO 019 AGRO. Dicho proyecto, cofinanciado por la Diputación de Salamanca y el FEDER (Fondo Europeo de Desarrollo Regional), ha sido promovido desde el Organismo Autónomo de Empleo y Desarrollo Rural de la Diputación de Salamanca que preside Avelino Pérez Sánchez. La Coordinación técnica ha sido desarrollada por Carlos Cortés González, Director – Gerente y Agustín Caballero Arencibia, Coordinador institucional.

El proyecto en su conjunto quiere promover una *“gestión prudente de la naturaleza”* y, por tanto, aunar cuestiones medio – ambientales y de promoción de los territorios implicados, en el sentido de buscar nuevas alternativas y fuentes para incentivar y propiciar el desarrollo sostenible del medio rural desde una perspectiva de cooperación interregional y transnacional. Esta perspectiva permite y favorece, entre otras cosas, la cooperación y el intercambio de experiencias y buenas prácticas.

De hecho, en el proyecto participan distintas organizaciones nacionales y europeas. La prioridad a la que se ajusta este proyecto es la denominada *“Promoción del medio ambiente, gestión sostenible de las actividades económicas y de los recursos naturales”*. Respecto de la presente prioridad señala el propio programa de iniciativa comunitaria lo que sigue:

“El objetivo de la presente prioridad es el de asegurar la protección del medio ambiente y de los recursos naturales que conforman la calidad de este medio ambiente y el de apoyar actividades que concurren en una ordenación duradera del espacio, con especial atención acordada a la promoción de prácticas agrícolas respetuosas con el medio ambiente (...) según un enfoque duradero e interregional” (página 46 PIC).

Este estudio, por tanto, forma parte de un todo más vasto donde se incluye la puesta en marcha de fincas experimentales para el tratamiento de la tinta y el chancro; estudios sobre las potencialidades micológicas del territorio y Guías de Buenas Prácticas en materia de Agricultura Ecológica, Micología y Selvicultura del castaño.

El lector interesado puede tener una visión más global del proyecto y del conjunto de socios implicados en el mismo en: <http://www.proyectoagro.info>. Asimismo, en lo que se refiere a las distintas actuaciones acometidas desde la Diputación de Salamanca en materia de desarrollo rural transfronterizo, puede consultarse: <http://www.lasalina.es/oaedr>.

Esperamos que este estudio sea de interés y sirva para iniciar nuevas actuaciones en la provincia de Salamanca que sepan aunar a distintas organizaciones en temas de gestión, desarrollo rural e investigación.

*Isabel García Jiménez*  
*Presidenta de la Diputación de Salamanca*

# INTRODUCCIÓN



La calidad fitosanitaria de los recursos forestales de la provincia de Salamanca debe ser una prioridad política por las implicaciones sociales y medioambientales que supondría el deterioro y la pérdida de los mismos. En particular, las masas de castaños de nuestra provincia (Figura 1) constituyen una fuente de riqueza ecológica y son motor económico en zonas de sierra y monte dónde otros recursos, de tipo agrícola e industrial, son escasos. La sanidad de los castaños necesita una apuesta decidida por la investigación encaminada a conocer el tipo, distribución e intensidad de las enfermedades y los métodos necesarios para su control.



Figura 1. Castaño sano. El Cerro (Salamanca)

Las principales enfermedades de los castaños de todo el mundo son causadas por hongos, tal es el caso de los chancros desarrollados en los troncos y ramas por *Cryphonectria parasitica*, de las infecciones de raíz producidas por *Armillaria mellea*, y de las manchas de color pardo con el borde amarillo producidas en las hojas por *Mycosphaerella maculiformis*. No obstante, es creciente la incidencia de la enfermedad conocida como “tinta”, cuyo responsable es un microorganismo que hasta hace poco se creía que se trataba de un hongo y hoy, con el uso de las técnicas de biología molecular para clasificar seres vivos, se incluye dentro del Reino Cromista, una nueva categoría taxonómica en la que se agrupan los microorganismos que antes se denominaban “hongos oomicetos”. Las enfermedades más importantes de los castaños son el chancro y la tinta (Cobos Suárez, 1989; Anagnostakis, 1995), aunque las restantes enfermedades no deben pasarse por alto, ya que el desarrollo de una infección depende de factores ambientales y edáficos, de la concentración de inóculo de los patógenos y de la capacidad del material vegetal para conducir la enfermedad; por lo que un patógeno que hoy puede ser menos importante, podrá convertirse en un peligro cuando confluayan las condiciones que le permitan ser más virulento.

# CHANCRO DEL CASTAÑO



## AGENTE CAUSAL

*Cryphonectria parasitica* (Murrill) Barr (Ascomycota, Diaporthales). Sinónimo: *Endothia parasitica* Estado asexual (mitótico): *Endothiella parasitica* (Murrill) P.J. & H.W. Anderson.

## OTROS NOMBRES

Chestnut blight o canker (inglés), Chancre de l'écorce du châtaignier (francés), Kastanienkrebs (alemán).

## ARBOLES HOSPEDADORES

*Castanea sativa* (castaño europeo), *Castanea dentata* (castaño americano), diferentes especies de *Quercus* (*Q. ilex*, *Q. pubescens*, *Q. petraea*), *Castanopsis*, *Acer*, *Rhus typhina* y *Carya ovata*.

## DISTRIBUCIÓN EN ESPAÑA

Se ha encontrado chancro en la mitad norte de España, en las comunidades de Galicia, Asturias, Castilla y León, País Vasco, Navarra y Cataluña.

## DISTRIBUCIÓN MUNDIAL

*C. parasitica* se introdujo en América del Norte, procedente de China y Japón, en el siglo XIX. Se cree que la entrada del patógeno desde Japón a Estados Unidos tuvo lugar en 1876. La realidad es que hacia 1900 los viveros norteamericanos vendían castaños japoneses por todo el país y en 1904 se describieron los primeros síntomas de la enfermedad en castaños de la ciudad de Nueva York (Merkel, 1905). En 1912, el chancro americano había alcanzado el grado de catástrofe nacional (Metcalf, 1912) y en un intento de buscar el agente causal, en 1913, se introdujo desde China una cepa de *C. parasitica* que, al ser inoculada sobre *Castanea dentata*, en Washington DC, sirvió para diseminar nuevamente la enfermedad (Anagnostakis, 1987; 1989). En 1938 se descubre el patógeno en Europa, en un foco localizado cerca de Génova (Italia). Nuevamente, el patógeno se disemina rápidamente y a finales de los años 1960 casi todas las regiones del sur de Europa donde se cultivan los castaños presentan los síntomas de la enfermedad. Actualmente se ha detectado el chancro del castaño en cuatro continentes:

- *Europa*: Alemania, Austria, Bélgica, Bosnia-Herzegovina, Croacia, Eslovaquia, Eslovenia, España, Francia, Grecia, Hungría, Italia,

Macedonia, Polonia, Portugal, Rusia (costa del Mar Negro y Cáucaso), Suiza, Ucrania y repúblicas yugoslavas.

- *Africa*: Túnez
- *Asia*: China, Corea del Norte, Corea del Sur, Georgia, India (Uttar Pradesh), Japón (Honshu), Taiwán y Turquía.
- *America del Norte*: Canadá (Columbia Británica y Ontario) y Estados Unidos.

### IMPACTO ECONÓMICO

Entre 1904 y 1950, *C. parasitica* ha causado la destrucción casi completa de los castaños de la costa oriental de los Estados Unidos. Sin embargo, los castaños europeos han corrido mejor suerte debido a la aparición de cepas hipovirulentas del patógeno que permiten la recuperación de los árboles una vez padecida la enfermedad (Grente, 1965). Las cepas europeas de *C. parasitica* son vegetativamente compatibles con las cepas virulentas. Esto significa que pueden transmitir, por contacto de las hifas, su incapacidad para atravesar el peridermo de las heridas antes de la suberización (Anagnostakis y Waggoner, 1981). Son muy pocos los grupos de compatibilidad vegetativa de *C. parasitica* detectados en Europa, por lo que la diseminación de la hipovirulencia se ve favorecida. Por el contrario, se han descrito más de 70 grupos de compatibilidad vegetativa entre las estirpes de *C. parasitica* americanas, con la consiguiente limitación de la transmisión de hipovirulencia. En China y Japón el patógeno es autóctono y causa daños poco relevantes en los castaños de esas zonas.

El chancro del castaño en España puede ser preocupante ya que la enfermedad afecta casi de forma generalizada a los castaños de la mitad norte de la Península Ibérica (Mansilla et al., 2003). Sin embargo, la situación actual de baja diversidad de grupos de compatibilidad vegetativa se presenta como la idónea para la aplicación del control biológico de la enfermedad. Es por ello, que una adecuada atención a los programas de control biológico del chancro, por medio de cepas hipovirulentas del patógeno, puede servir para reducir el peligro que supone la presencia en nuestros bosques de un patógeno tan devastador como *C. parasitica*.

### DAÑOS

Se produce mortalidad de la parte distal del árbol, descendiendo desde los brotes hasta las ramas y tronco, pudiendo causar la muerte del mismo. Las

cepas hipovirulentas de *C. parasitica* causan chancros menos severos e infecciones superficiales de la corteza con daños más leves.

### SINTOMATOLOGÍA EN EL ÁRBOL

El primer síntoma que se aprecia es el amarilleamiento y muerte del follaje y de las estructuras reproductivas del árbol, ya sean de una rama o del tronco principal, con marchitez posterior de las hojas y flores que pueden permanecer sobre el árbol durante largos periodos de tiempo (Figura 2). Cuando el follaje presenta estos síntomas, pueden aparecer en las ramas chancros elipsoidales, a menudo hundidos y con la madera expuesta en el centro (Figura 3). Los cinco síntomas más característicos del chancro son los siguientes (Mansilla et al., 2003):

- Presencia de ramas muertas con hojas marchitas de color marrón.
- Presencia de chancros en el tronco, ramas y brotes. Se reconoce la aparición de un chancro por el enrojecimiento e hinchazón de la corteza. Posteriormente, la corteza se rompe y se abre en fracturas longitudinales (Figura 4).
- También pueden aparecer sobre el chancro pústulas de color amarillo o naranja, especialmente cuando el clima es húmedo (Figura 5).
- Presencia de protuberancias acuosas por debajo del chancro.
- Desarrollo de micelio amarillo-parduzco en forma de abanico bajo la corteza (Figura 6).



Figura 2. Rama seca con hojas marchitas



Figura 3. Chancro con exposición de la madera



Figura 4. Fracturas longitudinales de un chancro



Figura 5. Chancro con pústulas de color amarillo



Figura 6. Micelio de *C. parasitica* bajo la corteza

## IDENTIFICACIÓN DEL PATÓGENO

Sobre las zonas más viejas de los chancros el hongo forma cuerpos fructíferos (conidiomas picnidiales o picnidios) muy pequeños y apreciables con una lupa, de color amarillento o naranja, en el interior de los cuales se producen esporas asexuales (conidios). En condiciones de humedad suficiente, los conidios exudan de los picnidios en forma de un cirro anaranjado.

Las muestras procedentes de ramas con chancros anaranjados se colocan en cámara húmeda y después de incubar a la temperatura del laboratorio durante 3-4 días se pueden observar picnidios con cirros amarillos.

Si las muestras no presentan chancros anaranjados, se toma una parte del floema, en la zona de avance del hongo donde se puede ver el típico micelio amarillento en forma de abanico, y se siembra en el medio de cultivo patata dextrosa agar. Después de varios días se puede apreciar un micelio blanco y los primeros cirros amarillos saliendo de los picnidios.

Los diferentes estudios realizados durante el verano de 2004 en castañares de Béjar, El Cerro y Lagunilla nos indican que existen síntomas de chancro en los bosques de la provincia de Salamanca, apreciándose en algunos casos la recuperación de los árboles una vez padecida la enfermedad (Figura 7). No se ha logrado aislar *C. parasitica* en el laboratorio a partir las muestras obtenidas en los tres municipios prospectados.



Figura 7. Castaño sano con chancro cicatrizado. El Castañar (Béjar, Salamanca)

## MORFOLOGÍA

El ciclo biológico de *C. parasitica* aparece representado en la Figura 8. Los picnidios son de color amarillo o marrón amarillento, con un ostiolo, y de tamaño variable hasta 300  $\mu\text{m}$ . Desde la pared interna de los picnidios surgen conidióforos ramificados, tabicados, hialinos, de superficie lisa, con una longitud hasta 60  $\mu\text{m}$  y anchura de 1.5  $\mu\text{m}$ . Las células conidiógenas son enteroblásticas y los cirros amarillos contienen conidios hialinos, rectos o ligeramente curvados, unicelulares y redondeados en sus extremos, con un tamaño 3-5 x 1-1.5  $\mu\text{m}$  (CABI, 1994). Las masas de conidios aparecen en primavera.

Durante el verano y otoño surgen las formas sexuales de *C. parasitica* que se agrupan en estromas de 10 a 20 peritecios globosos (Figura 9) con un cuello alargado, de color marrón oscuro, que aparece de color negro en el interior del estroma, y tamaño hasta 400  $\mu\text{m}$ . Las ascas son alargadas (32-55 x 7-8.5  $\mu\text{m}$ .), unitunicadas y con 8 ascosporas. Las ascosporas son elípticas, redondeadas en sus extremos, con un tabique central poco constreñido, y un tamaño entre 7-12 x 3-5.5  $\mu\text{m}$  (CABI, 1994) (Figura 10).

## CICLO BIOLÓGICO

Los conidios y ascosporas de *C. parasitica* se diseminan por el viento y lluvia, pero también por insectos, ácaros y pájaros. Para la dispersión del cirro de conidios se necesita agua. La entrada en la madera del árbol se realiza por las heridas causadas por la poda, fenómenos climáticos o insectos vectores.

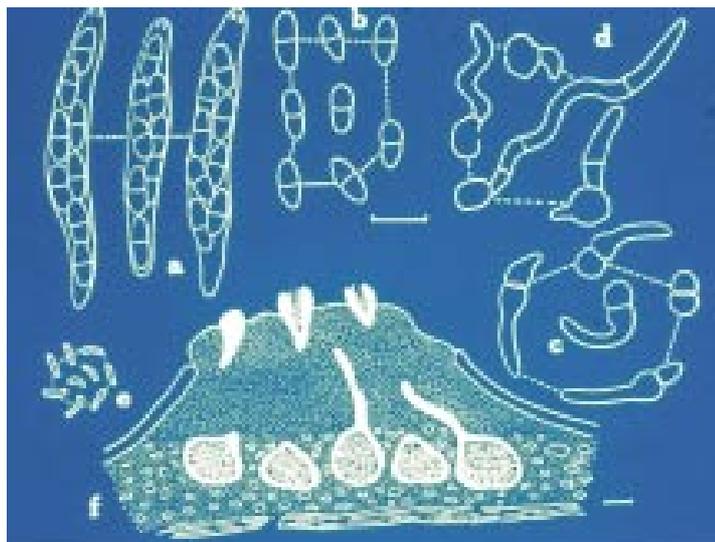


Figura 8. *Cryphonectria parasitica*: a) ascas con ascosporas, b) ascosporas, c, d) ascosporas germinadas, e) conidios, f) estroma con peritecios y picnidios.



Figura 9. Peritecios (cuerpos fructíferos sexuales) de *Cryphonectria parasitica* aislado en Castilla y León

La diseminación en el hospedador es rápida, salvo en algunos tipos de chancro en los que el hongo puede aparecer temporalmente restringido. El hongo también puede vivir de forma saprofita sobre árboles con follaje abundante. Es típico el micelio desarrollado en forma de abanico, en la cara interna de la corteza y el cambium, que puede sobrevivir hasta 10 meses en la corteza seca del árbol. En los frutos se asocia *C. parasitica* a la cáscara y no parece afectar a la germinación de semillas ni al desarrollo de plántulas. Aunque la transmisión por insectos parece ser menos importante que la transmisión eólica, se han descrito 69 especies de insectos que son capaces de transmitir inóculo de *C. parasitica*.

El patógeno no penetra la corteza íntegra y sana del castaño. Los castaños se infectan cuando las esporas del patógeno, diseminadas a largas

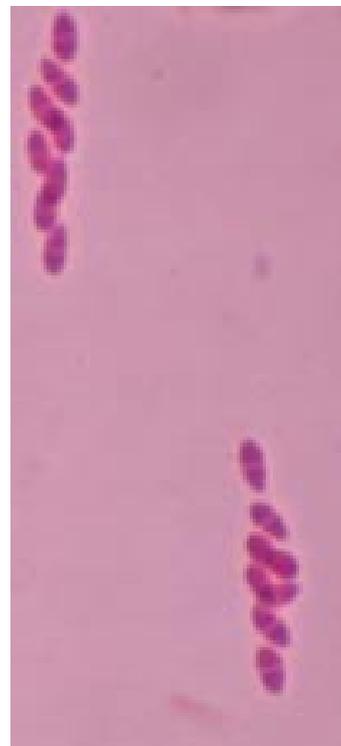


Figura 10. Ascas con ocho ascosporas de una cepa de *Cryphonectria parasitica* presente en castaños de Castilla y León.

distancias fundamentalmente por el viento, alcanzan heridas recientes en la corteza, fisuras naturales o daños mecánicos.

Las ascosporas y conidios procedentes de un árbol infectado son capaces de germinar a temperaturas comprendidas entre 18 y 38 °C, e infectar a nuevos árboles.

## FACTORES DE RIESGO

Las heridas de poda son el principal factor de riesgo.

## MEDIDAS PREVENTIVAS

El Real Decreto 58/2005, relativo a las medidas de protección contra la introducción y difusión en el territorio nacional y de la Comunidad Europea, de organismos nocivos para los vegetales o productos vegetales, así como la exportación y el tránsito hacia países terceros, es la normativa básica legal en la Unión Europea, en lo concerniente a la sanidad de los materiales vegetales.

La Sección 2 de la Parte A del Anexo II de ese Real Decreto se refiere a los organismos nocivos de cuya presencia se tiene constancia en la Comunidad Europea y cuyos efectos son importantes para toda ella. En esa Sección se incluye *C. parasitica* como patógeno de cuarentena en la UE y se especifica que los materiales objeto de contaminación son los vegetales de *Castanea* y *Quercus* destinados a la plantación, excepto las semillas, madera y corteza aislada de *Castanea*. Igualmente, se prohíbe la introducción en la UE de vegetales con hojas de *Castanea* y *Quercus*, procedentes de países no europeos; y la importación de corteza de *Castanea* de terceros países.

En las Secciones 1 y 2 de la Parte A del Anexo IV de ese mismo Real Decreto, se especifica que la movilidad de la madera dentro de la UE deberá contar con una declaración oficial de que los vegetales son originarios de zonas en las que se sabe están exentas de *C. parasitica* y que no se han observado síntomas de este patógeno en la parcela de producción ni en las inmediaciones desde el principio del último ciclo completo de vegetación. Para destruir el hongo en la madera es recomendable desinfectarla durante cinco minutos con una solución al 5% de formaldehído (40%) y pentaclorofenolato sódico (5%). Los métodos de prevención de *C. parasitica* han ido evolucionando y actualmente no se conoce uno realmente eficaz. Las medidas preventivas más frecuentes son:

- Evaluación del arbolado para determinar la presencia de chancros
- Eliminar las ramas infectadas

- Desinfectar las herramientas de poda
- Destrucción de los residuos de poda

## CONTROL

Son tres las estrategias que han demostrado ser más eficaces en el control de *C. parasitica*: a) la mejora genética, b) el acolchado con lodo y c) el control biológico con cepas hipovirulentas.

### a) Mejora Genética

La producción de híbridos resistentes, a partir de cruzamientos entre castaños europeos y japoneses o chinos, no ha dado los resultados deseados, no existiendo, por tanto, un híbrido totalmente resistente. Sin embargo, los avances en este terreno son notables y se dispone de metodología adecuada para poder tener éxito en esta forma de control.

### b) Acolchado con lodo

Se trata de una adaptación del método Doromaki, aplicado por los agricultores japoneses de finales del siglo XIX para combatir los chancros producidos por hongos del género *Valsa* en manzanos. Se necesita suelo que no haya sido tratado con pesticidas, o compost; una bolsa de plástico o una cortina de ducha, y cuerda. Se aplica agua para formar lodo que se dispondrá sobre el chancro. Para mantener la humedad, el lodo situado sobre las heridas del árbol se tapa con el plástico apretado fuertemente con la cuerda. Después de dos meses, se retira el plástico y la corteza del árbol aparecerá hinchada y el patógeno estará muerto. Aunque un chancro se cure, el patógeno podrá desarrollar nuevos chancros en el mismo árbol, por lo que habrá que repetir la operación cuantas veces sea necesario. El método no resulta práctico cuando se tenga que aplicar a un gran número de árboles (Weidlich, 1978).

### c) Hipovirulencia

La hipovirulencia es una enfermedad de *C. parasitica*, causada por un virus, que fue descrita por primera vez por el francés J.Grente en 1965. El virus impide que el hongo mate a los árboles que infecta y puede ser transmitido entre poblaciones de *C. parasitica* siempre que pertenezcan al mismo grupo de compatibilidad vegetativa (Milgroom y Cortesi, 2004).

Mientras el chancro arrasaba los bosques de castaños americanos, los castaños europeos parecían recuperarse de la enfermedad en el norte de Italia. Los aislamientos de *C. parasitica* obtenidos de chancros cicatrizados eran “hipovirulentos”,

infectaban *C. sativa* pero rara vez causaban infecciones letales. Años más tarde, también se aislaron cepas hipovirulentas de *C. parasitica* en castaños americanos del estado de Michigan. Además tanto las colonias hipovirulentas de *C. parasitica* italianas como las americanas presentaban una morfología anormal en el desarrollo de las colonias cuando se cultivaban en el laboratorio (Figura 11) y ello era debido a que contenían un virus RNA de doble cadena (Figura 12), responsable de su escasa agresividad sobre el castaño (MacDonald y Fullbright, 1991). Hoy sabemos que los virus causantes de hipovirulencia en *C. parasitica* pertenecen a tres familias distintas, con amplia variación en sus efectos sobre el hongo y, por tanto, en su capacidad de biocontrol de la enfermedad (Choi y Nuss, 1992).

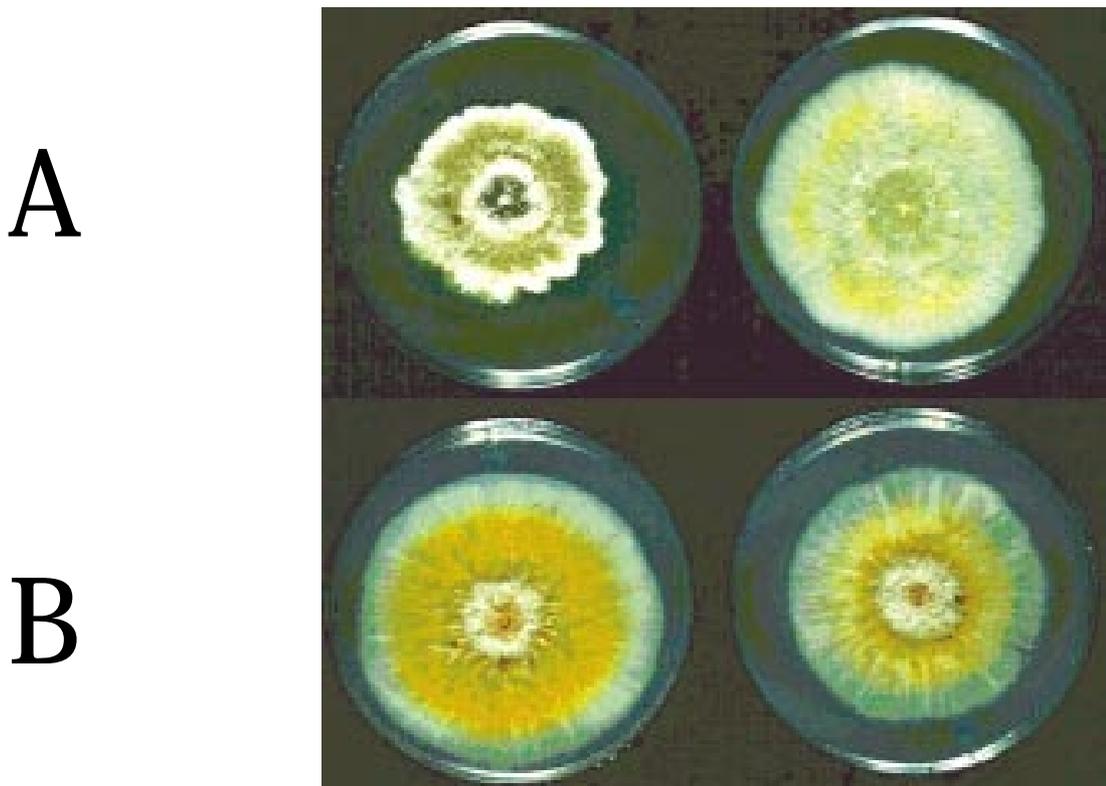


Figura 11. Cepas hipovirulentas con menor crecimiento y esporulación (A) y virulentas (B) de *C. parasitica*.

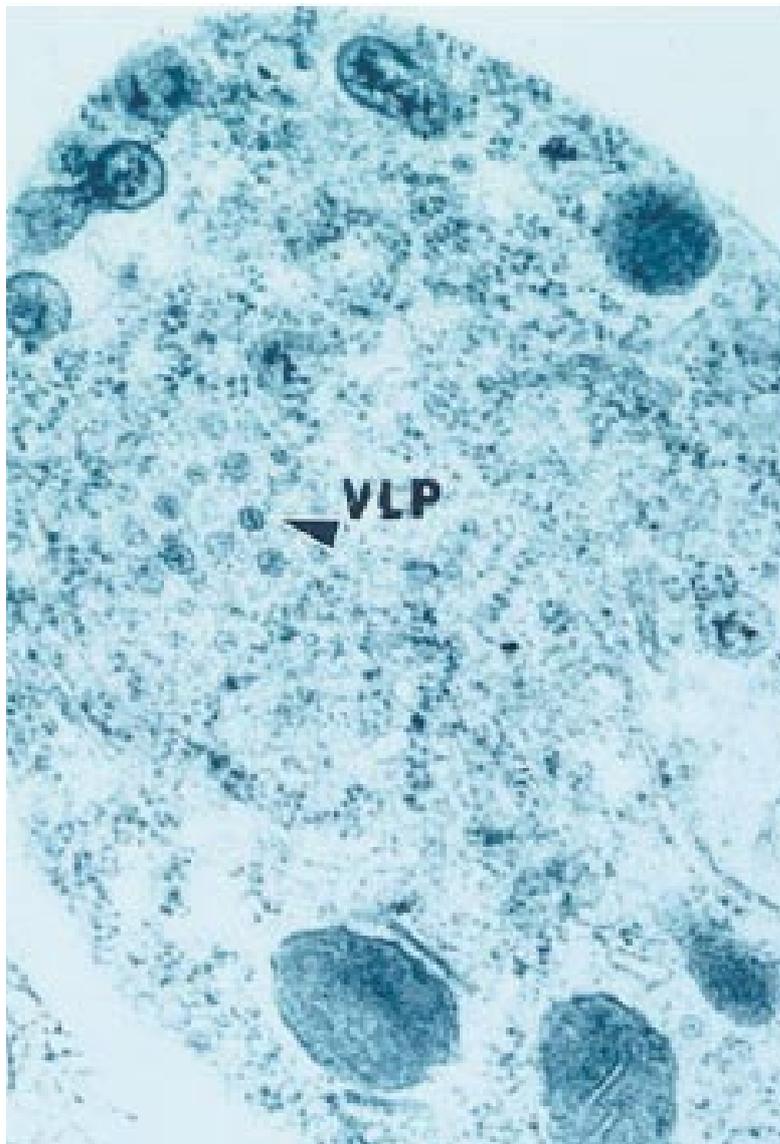


Figura 12. Partículas víricas (VLP) en el interior de una hifa de *C. parasitica*.

Cuando se inoculan cepas hipovirulentas de *C. parasitica* en agujeros efectuados en la corteza del castaño, alrededor de los chancros, los virus pueden transmitirse a las cepas virulentas (Figura 13). El resultado es el cese en la expansión del chancro y el éxito de las propias defensas del árbol que mantienen al patógeno controlado (Heiniger y Rigling, 1994). Una vez que la hipovirulencia se ha establecido en un árbol, las esporas hipovirulentas de *C. parasitica* se desplazan hacia otros árboles, transmitiendo su capacidad de control a las cepas virulentas que pudieran estar presentes en los mismos.



Figura 13. Aplicación de *C. parasitica* hipovirulenta en la corteza de un castaño

Alrededor de un 10 % de los conidios producidos por cepas hipovirulentas de *C. parasitica* no contienen el virus. Esto significa que siempre habrá inóculo virulento dispuesto a producir un chancro. Por otro lado, la existencia de diversos grupos de compatibilidad vegetativa disminuye las probabilidades de que dos cepas de *C. parasitica* puedan transmitirse la hipovirulencia. Estos problemas pueden obviarse con el uso de mezclas de cepas hipovirulentas de *C. parasitica* (Jaynes y Elliston, 1980) y, posteriormente, con la utilización de cepas del patógeno que llevan insertado en su genoma los genes de hipovirulencia del virus (Chen et al., 1993).

Existen evidencias de que las cepas hipovirulentas de *C. parasitica* producen menos enzimas hidrolíticas, del tipo lacasa, cutinasa y pectinasa, que juegan un papel fundamental en la penetración y establecimiento de la enfermedad, que las cepas virulentas (Varley et al., 1992). Se ha observado que la presencia del RNA vírico de doble cadena provoca en las cepas hipovirulentas

de *C. parasitica* la expresión de una proteína G heterotrimérica, una celobiohidrolasa, una endopoligalacturonasa, una lacasa, dos feromonas sexuales y una hidrofobina de pared celular (Choi et al., 1995; Rigling y van Alfen, 1991; Wang y Nuss, 1995; Milgroom y Cortesi, 2004). El papel de los niveles y patrones de transcripción de estos genes necesita ser elucidado en los fenotipos hipovirulentos de *C. parasitica*.

La hipovirulencia ha sido utilizada con éxito en Italia y Francia, estando en fase de experimentación en Galicia, Navarra y Cataluña.

### **Conclusiones**

- 1) El chancro del castaño no parece ser un problema grave en los castañares de la provincia de Salamanca, pero no tenemos datos que nos permitan asegurar que no lo será en un futuro próximo.
- 2) La existencia de chancros aislados parece confirmar la presencia de *C. parasitica*. El desarrollo de la enfermedad parece restringido pero existe el riesgo de que la enfermedad pueda alcanzar cotas importantes.
- 3) Los métodos existentes para el control del chancro del castaño han demostrado su eficacia allí donde se han aplicado.
- 4) No se disponen de programas de control biológico en Castilla y León, y sería deseable que se establezcan medidas de control de las enfermedades del castaño.

# TINTA DEL CASTAÑO



## AGENTE CAUSAL

*Phytophthora cinnamomi* Rands.

Otra especie de *Phytophthora*, *P. cambivora* (Petri) Buisman, se ha citado como responsable de la tinta del castaño, de forma independiente o asociada a *P. cinnamomi*. La realidad es que *P. cambivora* es mucho menos frecuente en castaños españoles y portugueses (Mansilla et al., 2003, Madureira, 2004). También se han citado en castaño las especies *P. cryptogea*, *P. megasperma* y *P. citricola*, siendo esta última especie la única con esporangio papilado. Una descripción micológica más detallada de estas especies puede consultarse en Stamps et al. (1990).

## OTROS NOMBRES

Ink disease (inglés), tinta do castanheiro (portugués)

## ARBOLES HOSPEDADORES

El rango de hospedadores de *P. cinnamomi* es muy amplio, con casi 1000 especies vegetales a las que puede infectar (Zentmyer, 1983). El principal hospedador es el aguacate, al que causa podredumbre de raíz; aunque también ataca de forma significativa a castaños, robles, coníferas o eucaliptos.

Los principales hospedadores de este patógeno son: *Persea americana*, *Ananas comosus*, *Cinnamomum zeylanicum*, *Castanea*, *Pinopsida*, *Ericaceae*, *Rhododendron*, *Eucalyptus*, *Juglans*, *Camellia*, *Fagus*, *Quercus*, *Banksia*, *Chamaecyparis*, *Cupressus*, *Taxus baccata* y *Xanthorrhoea*.

## DISTRIBUCIÓN EN ESPAÑA

Generalizada. A principios del siglo pasado *P. cinnamomi* estaba presente en casi todos los sotos gallegos y se estima que en los años 1940 la mitad de los castaños de Lugo habían sido destruidos por la tinta (Vieitez et al., 1996).

## DISTRIBUCIÓN MUNDIAL

Generalizada. El origen geográfico de *P. cinnamomi* no está claro. Se describió por primera vez en la isla de Sumatra (Indonesia), por lo que podría tratarse de un hongo de clima tropical o subtropical que se ha diseminado a otros países.

En 1838 se describió en el norte de Portugal una enfermedad de la raíz de castaño conocida como “tinta”, aunque la enfermedad podría haberse extendido con el árbol desde su entrada en Europa a través de Turquía.

### IMPACTO ECONÓMICO

Los daños más importantes son los producidos en aguacate y piña, pero empieza a ser considerable el efecto económico de la tinta sobre la industria de madera y fruto de castaño. También se ve afectada la industria de viveros que suministran plántulas de castaño.

En el norte de Portugal la tinta es una enfermedad devastadora (Abreu, 1996) y, dada la proximidad fronteriza de Salamanca, las consecuencias de la enfermedad en nuestra provincia podrían ser muy graves.

### DAÑOS

*P. cinnamomi* afecta en primer lugar a las raíces absorbentes y les provoca una rápida maceración. A continuación, ataca a las raíces gruesas y al cuello de la planta. Los síntomas empiezan a manifestarse sobre la parte aérea con amarilleamiento de las hojas, aclaramiento de la copa del árbol, y puntas secas en algunas ramas (Figura 14). Las hojas se reducen en número y tamaño, y caen antes del otoño. Los frutos no alcanzan la madurez y permanecen en las ramas. Sin embargo, estos síntomas no son característicos de la enfermedad y pueden ser provocados por otros factores bióticos y abióticos (carencia nutricional o estrés hídrico).

A medida que el patógeno invade el sistema radicular y los tejidos del árbol, se manifiestan síntomas más característicos: aparecen ramas muertas y pudrición de las raíces que pueden presentar sobre las mismas exudados negro-azulados como consecuencia de la oxidación de las sustancias fenólicas que se producen como reacción del árbol al ataque de *P. cinnamomi* (Mansilla et al., 2003). La pudrición puede avanzar desde las raíces hasta el cuello, a una altura de unos 50 cm sobre la base del tronco (Figura 15), con aparición de grietas en la corteza que se desprende con facilidad (Figura 16), y exudación de una sustancia gomosa de color negro (tinta).



Figura 14. Castaño con pérdida de masa foliar, infectado por *Phytophthora cinnamomi*. Lagunilla (Salamanca)



Figura 15 Daños en el cuello (tinta) causados por *P. cinnamomi*



Figura 16. Castaño con síntomas de tinta bajo la corteza. El Cerro (Salamanca)

## IDENTIFICACIÓN DEL PATÓGENO

*P. cinnamomi* puede aislarse de raíces y de suelo. Las raíces finas potencialmente infectadas se lavan, se secan, se cortan en trozos de 1-2 cm y se siembran en medios selectivos [Ponchet (agar 17 g, malta 10 g, penicilina G sódica 250 mg, sulfato de polimixina B 250 mg, benomilo 15 mg, pentacloronitrobenzeno (PCNB) 100 mg) o V8-agar con pimarcina 5 mg/litro, rifampicina 25 mg/litro, benomilo 5-10 mg/litro e himexazol 5 mg/litro]. Las raíces más gruesas se desinfectan con lejía al 2%, se lavan con agua estéril, se secan, se seleccionan trozos de la zona límite interior de la corteza y se siembran en medios selectivos. En los márgenes de los chancros de la corteza que presentan coloración marrón-rojiza, se puede aislar *P. cinnamomi* sembrando trozos de tejido adyacente al chancro en los medios patata dextrosa agar (PDA) o V8-agar. Las colonias desarrolladas en los medios de cultivo indicados se resiembran en PDA o en agar-malta para estudiar las características morfológicas.

La presencia del patógeno de muestras de suelo se determina directamente mediante cuantificación del número de propágulos de *P. cinnamomi* en suelo infestado de forma natural o artificial. El método utilizado es el descrito por Gees y Coffey (1989) ligeramente modificado: de la muestra de suelo se prepara, en matraces de 100 ml, una suspensión de 25 g de suelo y 50 ml de agar agua al 0.1% (AA: 1 g de agar disuelto en 1 l de agua). Estas matraces se mantienen en agitador durante 60 minutos a 150 rpm. Pasado este tiempo, y con ayuda de una jeringa, se toma 1 ml de esta mezcla de AA y suelo y se extiende en placas Petri con un medio selectivo para *P. cinnamomi* descrito por Kellan y Coffey (1985):PARPH (composición por litro de medio: harina de maíz agar: 17 g/l; pimaricina: 10 mg/l; ampicilina: 250 mg/l; rifampicina: 10 mg/l; PCNB: 100mg/l; hymexazol: 50 mg/l). Se hacen de tres a cinco repeticiones por muestra. Las placas se incuban en oscuridad durante dos días. Transcurrido este tiempo, se retira la mezcla que permanece en la superficie de la placa, pulverizándola con agua destilada, a continuación se determina el número de colonias de *P. cinnamomi* que se han desarrollado. Para aislar *P. cinnamomi* de muestras de suelo se dispone una suspensión del mismo (125 g de suelo /500 ml de agua) en placas Petri sobre las que se depositan 4-5 pétalos inmaduros de clavel u hojas jóvenes de aguacate, a modo de cebo para capturar esporangios del patógeno. Posteriormente, se transfieren los esporangios a medios selectivos para observar el micelio característico de *P. cinnamomi* después de 3-4 días de incubación a temperatura ambiente.

Las colonias se localizan primero a simple vista, tienen un aspecto de roseta, y seguidamente se confirman las que son de *P. cinnamomi*, al observar el micelio coraloide y las características hinchazones de las hifas con el microscopio invertido. Al día siguiente, se realiza una nueva lectura para asegurar el resultado y anotar el posible desarrollo de nuevas colonias de *P. cinnamomi*. Si la concentración de *P. cinnamomi* en suelo es muy alta se hacen diluciones de la mezcla en agar-agua. El resultado se expresa como unidades formadoras de colonias por gramo de suelo (ufc/g suelo).

Entre los días 4 de junio y 7 de julio de 2004, se realizó una prospección de suelos y árboles sospechosos de padecer tinta en diferentes localizaciones de la provincia de Salamanca: Béjar (Monte Mario y El Castañar), El Cerro y Lagunilla; demostrándose la existencia de *P. cinnamomi* y la enfermedad de la tinta en nuestros castaños.

### CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA

Las principales características de *P. cinnamomi* son los esporangios no papilados, persistentes, de forma y tamaño variable aunque en su mayoría son ovoides o elipsoidales (Figura 17). La hifas son continuas, sin tabicar salvo en micelio viejo, y con hinchazones esféricas que les confieren un aspecto coraloide. También se puede encontrar en el micelio clamidosporas intercalares y terminales. Sólo se aprecian estructuras sexuales (anteridios, oogonios y oosporas) cuando se produce cruzamiento entre estirpes compatibles (OEPP/EPPO, 2004).

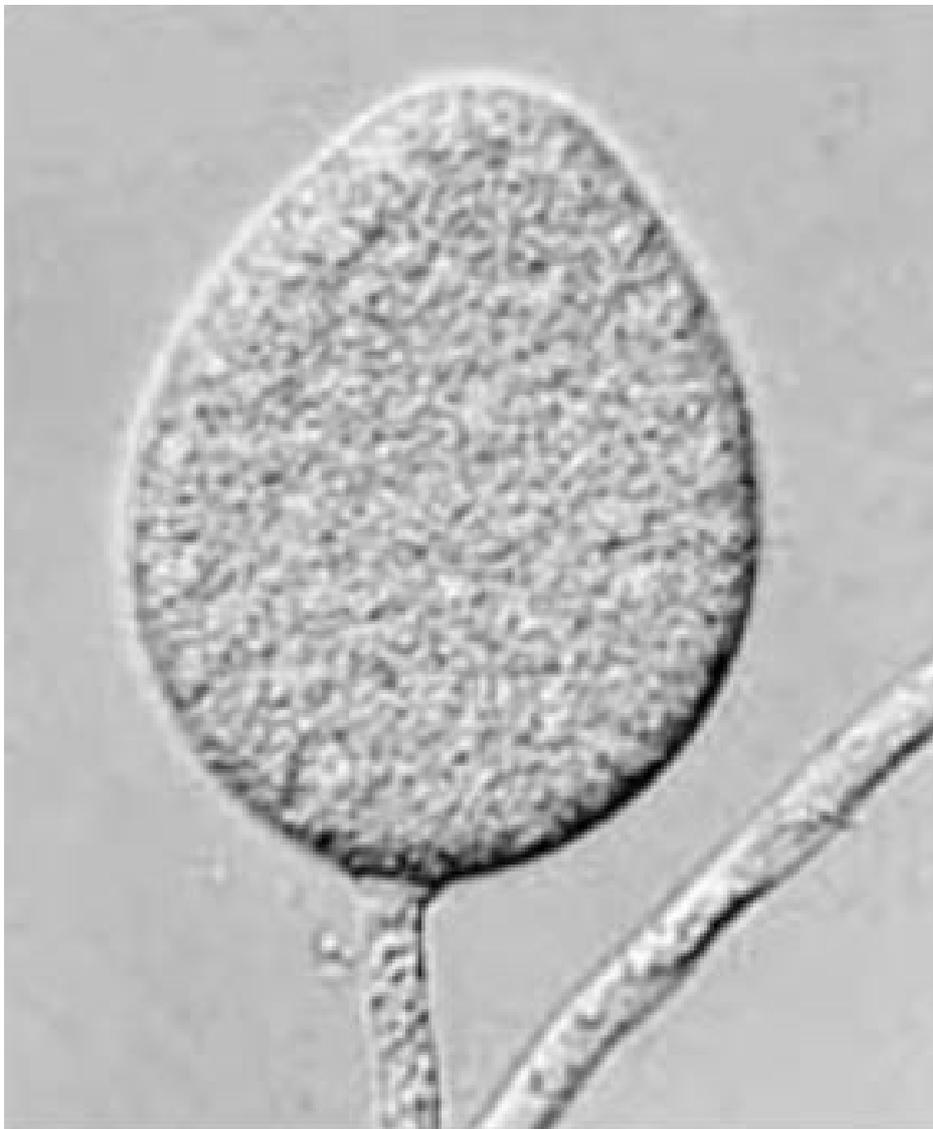


Figura 17. Esporangio no papilado de *P. cinnamomi*

## DETECCIÓN INMUNOLÓGICA

*P. cinnamomi* se puede detectar por métodos serológicos. Existen inmunoensayos del tipo ELISA-DAS que son específicos del género *Phytophthora* y se han validado para *P. cinnamomi*. Hay anticuerpos específicos disponibles para este patógeno (Cahill y Hardham, 1994). MacDonald y Duniway (1979) desarrollaron un método de detección de *P. cinnamomi* basado en anticuerpos fluorescentes.

## CARACTERIZACIÓN MOLECULAR

Existen técnicas moleculares, basadas en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), que permiten identificar *P. cinnamomi* de otras especies de *Phytophthora*. Coelho et al (1997) determinaron polimorfismos en el gen que codifica para el metabolito cinnamomina, pero no deja de haber reacciones cruzadas con *P. cambivora*. Los espaciadores intergénicos ITS, adyacentes al gen 5.8S rDNA, han demostrado ser más útiles en la identificación de *P. cinnamomi* (Cacciola et al., 2001). Recientemente, la comparación de secuencias de la región ITS y la aplicación de la técnica RAPD-PCR ha permitido separar poblaciones portuguesas de *P. cinnamomi* y *P. cambivora*, dentro de un tesis doctoral presentada en la Universidad de Tras os Montes y Alto Douro en Vila Real (Madureira, 2004).

## MORFOLOGÍA

*P. cinnamomi* es un cromista englobado en la Sección VI de la antigua clave de hongos oomicetos propuesta por Stamps y Waterhouse (Stamps et al., 1990). En agar-malta las hifas son coraloides, con frecuentes nódulos de hasta 8 µm de anchura, pudiendo presentar grupos de hinchazones típicamente esféricos y tamaño medio de 42 µm. Los esporangios sólo se producen en soluciones acuosas, son entre ovoides y elipsoides (57 x 33 µm, pero pueden alcanzar un tamaño de 100 x 40 µm) y no presentan papila. Las estructuras sexuales son muy raras de ver en medios con agar. Los oogonios tienen un diámetro medio de 40 µm, presentan pared lisa y amarillean con la edad. Los anteridios son anfígenos y tienen una longitud media de 21-23 x 17 µm. Las oosporas tienen un grosor de 2 µm y casi llenan el oogonio.

Las colonias de *P. cinnamomi* crecen entre 5 y 32-34 °C y su micelio aéreo puede presentar un aspecto de roseta. La presencia de hifas coraloides en agar malta puede ayudar a distinguir *P. cinnamomi* de *P. cambivora*.

## CICLO BIOLÓGICO

*P. cinnamomi* necesita agua libre para desarrollarse, pero puede vivir en el suelo sobre materia orgánica durante varios años. Cuando las condiciones de humedad son favorables, *P. cinnamomi* desarrolla esporangios que al germinar liberan zoosporas capaces de nadar hasta las raíces del castaño, a una distancia de 35 mm en agua estancada o largas distancias en corriente. Las zoosporas son atraídas por quimio y electrotactismo hacia las raíces, donde penetran directamente o por zonas lesionadas. El patógeno invade progresivamente el sistema radicular del castaño hasta alcanzar el cuello de la planta produciendo finalmente la muerte. Cuando las condiciones son desfavorables para el crecimiento vegetativo, *P. cinnamomi* puede producir oosporas y clamidosporas que, junto al micelio saprofita, pueden ser transportadas por el agua, tierra, hombre, animales, labores agrícolas, aperos, etc, hacia otras zonas. Cuando las condiciones de agua y temperatura del suelo (15-30° C) son favorables, las oosporas y clamidosporas germinan, y se producen esporangios y zoosporas que continúan el ciclo (Figura 18).

## FACTORES DE RIESGO

La penetración del hongo en el sistema radicular se produce directamente o a través de heridas o lesiones mecánicas. También son factores de riesgo las heridas de injertos y poda (Figura 19).

## MEDIDAS PREVENTIVAS

Los suelos en los que se acumula agua y mal drenados son favorables para el desarrollo de la tinta. Son deseables medidas culturales que impliquen la elevación de suelos inundables, la mejora de la aireación y una atención a los nutrientes minerales. Los microorganismos antagonistas (Ej.: *Trichoderma*) y ectomicorrizas, junto a enmiendas del suelo adecuadas, pueden ayudar a mantener el patógeno controlado. También puede prevenirse la tinta por medio de híbridos resistentes de castaños europeos y japoneses o chinos, así como con la no propagación de semillas de castaño de procedencia desconocida o dudosa. En cualquier caso, las plantas afectadas deberán destruirse y se evitará el movimiento del suelo infectado con el calzado, herramientas y maquinaria (Mansilla et al., 2003).

La solarización de los suelos, efectiva en aguacate, presenta dificultades técnicas de aplicación en determinados castañares. No obstante, puede ser útil en plantas de vivero.

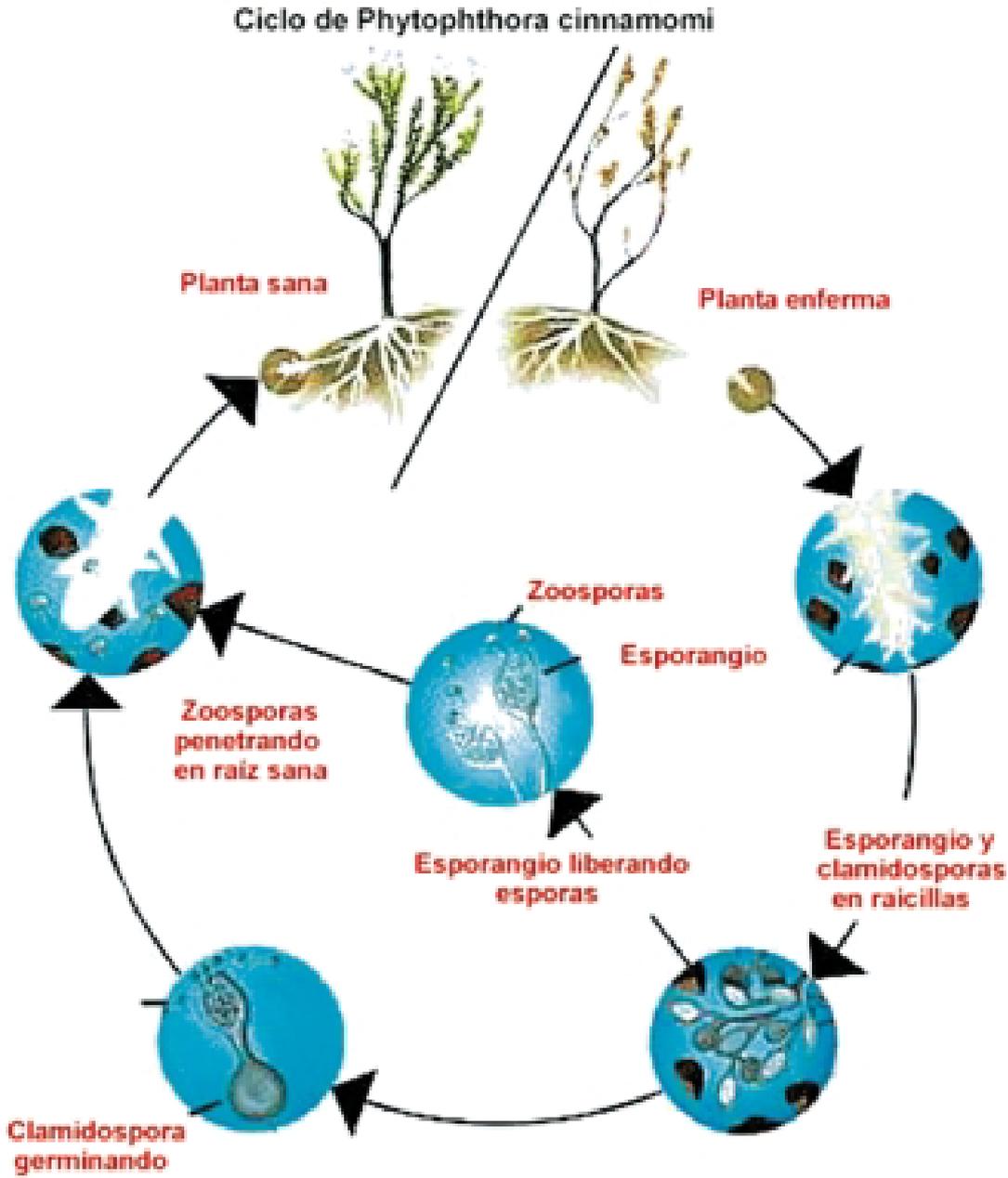


Figura 18. Ciclo biológico de *Phytophthora cinnamomi*

Con frecuencia, los agricultores dan cortes con una navaja sobre la corteza de árboles debilitados con síntomas de tinta. (Figura 20). Transcurrido un tiempo, los árboles se recuperan y no desarrollan la enfermedad. Una explicación a este fenómeno la encontramos en el hecho de que las heridas, al igual que el ataque por microorganismos o por insectos, provocan en la planta una respuesta de defensa sistémica que mantiene al patógeno controlado. Tras la herida provocada deliberadamente por el agricultor se esconde la activación de una cascada de señales moleculares que regulará en la planta los niveles de ácido jasmónico y etileno, que a su vez modularán la síntesis de proteínas inhibitoras de proteasas y de proteínas de respuesta a heridas, que colaborarán para mantener al patógeno controlado (Buchanan et al., 2000).



Figura 19. Tinta desarrollada en un rama injertada por "ambudillo". El Cerro (Salamanca)



Figura 20. Corte preventivo sobre una rama injertada y podada de castaño. El Cerro (Salamanca).

## CONTROL

### Control químico

Se obtienen aceptables resultados con productos sistémicos, particularmente fosetil aluminio y metalaxil en forma de aplicación al suelo, spray foliar o inyección en el árbol. Otros agroquímicos utilizados son: etridiazol, furalaxil y propamocarb. Todos ellos detienen el crecimiento de *P. cinnamomi* en las raíces infectadas, pero no lo matan, por lo que son especialmente útiles en la prevención de la enfermedad.

### Control biológico

El Control Biológico se puede definir como la utilización de organismos naturales o modificados genéticamente, genes o productos génicos, para redu-

cir los efectos de organismos indeseables y para favorecer organismos útiles para el hombre, tales como cultivos, árboles, animales y microorganismos beneficiosos. El agente de control biológico que se introduce en un cultivo para controlar una enfermedad recibe el nombre de “antagonista”. Los antagonistas pueden actuar de distintas formas (Harman et al., 2004): 1) colonizando el suelo y/o partes de la planta, ocupando un espacio físico y evitando que los patógenos puedan multiplicarse. 2) por medio de proteínas (“enzimas líticas”) que son producidas para destruir la pared celular de los patógenos. 3) por medio de antibióticos que matan al patógeno. 4) promoviendo el desarrollo de la planta y 5) activando los mecanismos de defensa de la planta. Algunos agentes de biocontrol utilizan sólo uno de estos mecanismos pero los mas eficaces despliegan, simultánea o secuencialmente, varios métodos de control. Este es el caso del hongo *Trichoderma* (Figura 21) (Monte, 1999).

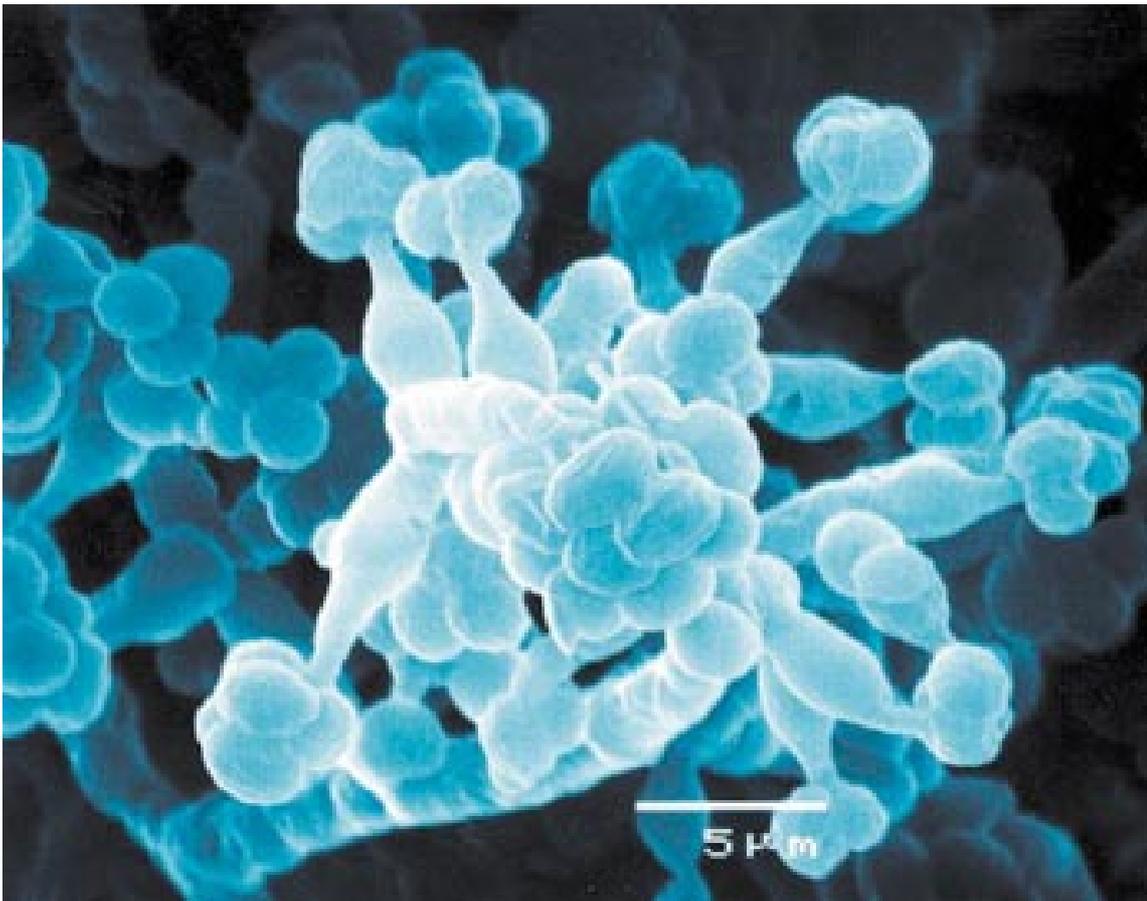


Figura 21. Conidios y conidióforo de *T. harzianum*.

Los hongos del género *Trichoderma* están ampliamente distribuidos en la naturaleza, son fáciles de aislar y cultivar, crecen rápidamente en muchos sustratos, no afectan al hombre, animales y plantas superiores, actúan como micoparásitos, compiten bien por el alimento y por el espacio, producen antibióticos y tienen un sistema enzimático ( $\beta$ -1,3-glucanasas,  $\beta$ -1,6-glucanasas, quitinasas, proteasas y celulasas) capaz de atacar a un gran número de patógenos (Sanz et al., 2004). Los hongos del género *Trichoderma*, y en particular el agregado de especies *Trichoderma harzianum*, constituyen una alternativa biológica más sana, limpia, no acumulable en la cadena alimentaria y respetuosa con el medio ambiente, en contraposición a los pesticidas químicos polucio-nantes de uso común en Agricultura

*P. cinnamomi* es un patógeno sensible a la acción de *Trichoderma* como agente de control biológico (Kelley, 1977) y en nuestro laboratorio de la Universidad de Salamanca hemos seleccionado y patentado una combinación de cepas de *Trichoderma* eficaces frente a *P. cinnamomi* (López-Herrera et al., 1999). Estas cepas han sido formuladas y registradas bajo el nombre de TUSAL® (*Trichoderma* de la Universidad de Salamanca). La capacidad de bicontrol de una cepa de *T. harzianum* frente a *P. cinnamomi* queda reflejada en la Figura 22.



Figura 22. Control biológico de *T. harzianum* (colonias verdes, sembradas a la derecha de cada placa) frente a *P. cinnamomi* (colonia blanca, sembrada a la izquierda con 48 h de antelación). En la placa superior se puede apreciar la invasión y destrucción de la colonia de *P. cinnamomi* por parte de *T. harzianum*.

## CONCLUSIONES

- 1) La tinta del castaño está presente en la provincia de Salamanca. Aunque no parece ser un problema fitosanitario de primera magnitud. La proximidad a las zonas de castañar portuguesas, donde *P. cinnamomi* sí es un problema importante, nos obliga a estar alerta ante esta enfermedad.
- 2) *P. cinnamomi* es un patógeno relacionado con la tinta en los castaños de Salamanca y no parece que las especies próximas, como *P. cambivora*, constituyan un problema real en nuestra provincia.
- 3) Las medidas preventivas, como un buen manejo de la humedad del suelo, drenaje y uso de híbridos resistentes, son esenciales para controlar la enfermedad y no debería permitirse la siembra de semillas de castaño cuyo origen sea dudoso.
- 4) El control biológico con cepas de *Trichoderma* ha demostrado ser eficaz para controlar *P. cinnamomi*.

# OTROS DAÑOS



### *ARMILLARIA MELLEAE* (VAHL.) KUMMER

Se trata de un hongo basidiomiceto que crece de forma saprofita en suelos forestales, desarrollando cuerpos fructíferos (carpóforos) con su sombrerillo color miel, visibles a simple vista en corros próximos a los árboles (Figura 23). Cuando hay humedad suficiente en el sistema radicular del castaño, *A. mellea* puede atacar las raíces que, debido a su debilidad, no podrán absorber agua suficiente en periodos de déficit hídrico, causando la muerte del árbol (Mansilla et al., 2003).

La característica principal de la infección es el desarrollo de micelio blanco bajo la corteza del árbol (Figura 24). Se ha aislado este hongo en las prospecciones realizadas en los meses de junio y julio de 2004 en la provincia de Salamanca (Figura 25).



Figura 23. Carpóforos de *A. mellea* en corros sobre un árbol



Figura 24. Micelio de *A. mellea* desarrollado bajo la corteza de un castaño. Lagunilla (Salamanca).

Las estrategias de lucha frente a este hongo oportunista consisten en evitar suelos encharcados, disponer de buen drenaje, eliminar tocones que pudieran ser reservorio y reducir los aportes de materia orgánica.

Las medidas de control consisten en eliminar los árboles enfermos. *A. mellea* es sensible al control biológico con *Trichoderma*.



Figura 25. Colonia de *A. mellea*.

## DAÑOS CAUSADOS POR EL HOMBRE

Cabe destacar la poca sensibilidad por la conservación de los castaños por parte de las personas que realizan tendidos eléctricos y telefónicos, o que simplemente cercan sus fincas (Figura 26). Valgan como ejemplo algunos castaños de El Castañar (Béjar, Salamanca). La prevención a estos daños solo tiene un camino: la educación medioambiental.



Figura 26. Tendido telefónico en la copa de un castaño (arriba) y cercado de alambre atravesando a un castaño (abajo). El Castañar (Béjar, Salamanca).

A large, leafy green tree stands prominently in a grassy field under a clear blue sky. The tree's canopy is dense and rounded, filling much of the upper half of the frame. The ground is covered in tall, green grass, and a dirt path or road is visible in the lower-left foreground. In the background, there are other trees and a fence line, suggesting a rural or park setting.

# **BIBLIOGRAFÍA**

Abreu, C.G. 1996. Doença de tinta: causas e consequências do declínio do castanhal. *Estudios Transmontanos* 6: 269-289.

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

Anagnostakis, S. L. 1989. An historical reference for chestnut introductions into North America. *Annual Report of the Northern Nut Growers Assn.* 80:132-143.

Anagnostakis, S.L. 1995. The pathogens and pests of chestnuts. In: *Advances in Botanical Research*, J. H. Andrews and I. Tommerup, eds., Academic Press, New York. Vol. 21:125-145.

Anagnostakis, S.L. y Waggoner, P.E., 1981. Hypovirulence, vegetative incompatibility and the growth of cankers of chestnut blight. *Phytopathology* 71, 1198-1202.

Buchanan, B.B., Gruissem, W. y Jones, R.L. 2000. *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. American Society of Plant physiologists, Rockville (USA).

CABI 1994. *Distribution Maps of Plant Diseases No. 66* (edition 6). CAB International, Wallingford, UK.

Cacciola, S.O., Williams, N., Cooke, D.E.L. y Duncan, J.M. 2001. Molecular identification and detection of *Phytophthora* species on some important Mediterranean plants including sweet chestnut. *For. Snow. Landsc. Res.* 76: 251-365.

Cahill, D.M. y Hardham, A.R. 1994. A dipstick immunoassay for the specific detection of *Phytophthora cinnamomi* in soils. *Phytopathology* 84: 1284-1292.

Chen, B. Choi, G.H. y Nuss D.L. 1993. Mitotic stability and nuclear inheritance of integrated viral cDNA in engineered hypovirulent strains of the chestnut blight fungus. *EMBO J.* 12: 2991-2998

Choi, G. H. y Nuss, D. L. 1992. Hypovirulence of chestnut blight fungus conferred by an infectious viral cDNA. *Science* 257: 800-803.

Choi, G.H., Chen B. y Nuss D.L. 1995. Virus-mediated or transgenic suppression of a G-protein alpha subunit and attenuation of fungal virulence. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 305-309.

Cobos Suárez, P. 1989. Fitopatología del castaño. *Boletín de Sanidad Vegetal*. Fuera de Serie 16. Ministerio de Agricultura Pesca y Alimentación, Madrid.

Coelho, A.C., Cravador, A., Bollen, A., Ferraz, J.F.P., Moreira, A.C., Fauconnier, A. y Godfroid, E. 1997. High specific and sensitive non-radioactive molecular identification of *Phytophthora cinnamomi*. *Mycological Research* 101: 1499-1507.

Gees, R. y Coffey, M.D. 1989. Evaluation of strain of *Myrothecium roridum* as a potencial biocontrol agent against *Phytophthora cinnamomi*. *Phytopathology* 79: 1079-1084.

Grente, J. 1965. Les formes Hypovirulentes d'*Endothia parasitica* et les espoirs de lutte contre le chancre du châtaignier. *Académie d'Agriculture de France, Extrait du Procès-verbal de la Séance*. 51:1033-1037.

Harman, G.E. Howell, C.R. Viterbo, A. Chet, I. y Lorito, M. 2004 *Trichoderma* species-opportunistic, avirulent plant symbionts *Nat Rev* 2:43-56.

Heiniger, U. y Rigling, D. 1994. Biological control of chestnut blight in Europe. *Annual Review of Phytopathology* 32:581-599.

Jaynes, R. A. y J. E. Elliston. 1980. Pathogenicity and canker control by mixtures of hypovirulent strains of *Endothia parasitica* in American chestnut. *Phytopathology* 70:453-456.

Kellam, M.K. y Coffey, M.D. 1985. Quantitative comparison of the resistance to *Phytophthora* root rot in three avocado rootstocks. *Phytopathology* 75: 230-234.

Kelley, W.D. 1977. Interactions of *Phytophthora cinnamomi* and *Trichoderma* spp. in relation to propagule production in soil cultures at 26 degrees C. *Can. J. Microbiol.* 23: 288-294.

López-Herrera, C.J., Pérez-Jiménez, R.M., Llobel, A., Monte-Vázquez, E., Zea-Bonilla, T. 1999. Estudios *in vivo* de *Trichoderma* como agente de bio-control contra *Phytophthora cinnamomi* y *Rosellinia necatrix* en aguacate. *Revista Chapingo Serie Horticultura* 5: 261-265.

MacDonald, J.D. y Duniway, J.M. 1979. Use of fluorescent antibodies to study the survival of *Phytophthora megasperma* and *P. cinnamomi* zoospores in soil. *Phytopathology* 69: 436-441.

MacDonald, W.L. y Fulbright, D.W. 1991. Biological control of chestnut blight: use and limitations of transmissible hypovirulence. *Plant Dis.* 75:656-661.

Madureira Gouveia, M.E. 2004. Metodos moleculares na identificação, caracterização e detecção de *Phytophthora cambivora* (Petri) Buisman e *Phytophthora cinnamomi* Rands associadas com a doença da tinta do castanheiro. Tesis Doctoral, Universidad de Tras os Montes e Alto Douro, Vila Real (Portugal).

Mansilla, J.P., Salinero, C., Pérez Otero, R. y Pintos, C. 2003. *Problemas fitosanitarios de los robles y castaños en Galicia*. Pontevedra: Servicio de publicaciones de la Excma. Diputación de Pontevedra.

Merkel, H. W. 1905. A deadly fungus on the American chestnut. *N.Y. Zoological Society, 10th Annual Report*, p 97-103.

Metcalf, H. 1912. The chestnut bark disease. En: *Yearbook of the Department of Agriculture for 1912*, Washington, D.C. p. 363-372.

Milgroom, M.G. y Cortesi, P. 2004. Biological control of chestnut blight with hypovirulence: a critical analysis. *Annual Review of Phytopathology* 42: 311-338.

Monte, E. 2001. Understanding *Trichoderma*: Between Agricultural Biotechnology and Microbial Ecology *Int Microbiol* 4:1-4

OEPP/EPPO. 2004. *Phytophthora cinnamomi*. *Bulletin OEPP/EPPO* 34: 201-207.

Rigling, D. y Van Alfen, NK. 1991. Regulation of laccase biosynthesis in the plant-pathogenic fungus *Cryphonectria parasitica* by double-stranded RNA. *J. Bacteriol.* 173: 8000-8003.

Sanz L., Montero M., Grondona I., Vizcaíno J.A., Hermosa R., Llobell A. y Monte E. 2004. Cell wall degrading isoenzyme profiles of *Trichoderma* biocontrol strains have correlation with rDNA taxonomical species. *Curr. Genet.* 46: 277-286.

Stamps, D.J., Waterhouse, G.M., Newhook, F.J. y Hall G.S. 1990. Revised tabular key to the species of *Phytophthora*. *Mycological Papers* 162. CAB International, Wallingford (UK).

Varley, D.A., Podila, G.K., Hiremath, S.T. 1992. Cutinase in *Cryphonectria parasitica*, the chestnut blight fungus -suppression of cutinase gene expression in isogenic hypovirulent strains containing double-stranded RNAs. *Mol. Cell. Biol.* 12: 4539-4544.

Vieitez Cortizo, E., Vieitez Madriñán M.L., Vieitez Madriñán F.J. (1996). *El Castaño*. Ed. Edilesa.

Wang, P. y Nuss, D.L. 1995. Induction of a *Cryphonectria parasitica* cellobiohydrolase I gene is suppressed by hypovirus infection and regulated by a GTP-binding-protein-linked signaling pathway involved in fungal pathogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 11529-1153.

Weidlich, W. H. 1978. A preliminary report on a method of biological control of the chestnut blight not involving the use of a hypovirulent strain of *Endothia parasitica*. pp 79-83. In: *Proceedings of the American Chestnut Symposium*. Eds. W. L. MacDonald, F. C. Cech, J. Luchock, and C. Smith. West Virginia University, Morgantown. 122 pp.

Zentmyer, G.A. 1983. The world of *Phytophthora*. En: *Phytophthora its biology, taxonomy, ecology and pathology*. Eds. D.C. Erwin, S. Bartnicki-García, P.M. Tsao. APS Press, St. Paul. pp. 1-8.