



2025 | **16-20**
GIJÓN | JUNIO

9º CONGRESO FORESTAL ESPAÑOL

9CFE-1642

Actas del Noveno Congreso Forestal Español
Edita: **Sociedad Española de Ciencias Forestales. 2025.**
ISBN: **978-84-941695-7-1**

Organiza





Determinación de la incidencia de *Gnomoniopsis* en castaño mediante PCR y qPCR

SOLA-LANDA, A. (1), DE LA PUENTE, C. (1), PÉREZ-REDONDO, R. (1), KOSALKOVA, K. (1), CASADOMET, C. (2), ARIAS, D. (2), ORTIZ, L. (2), CAÑIBANO, C. (1), RUBIO-GUTIÉRREZ, R. (2)

(1) Área de Biotecnología. Fundación Cesefor (Centro de Servicios y Promoción Forestal y de su Industria de Castilla y León), Parque Científico de León. Avda. Real 1, 24006 León, España

(2) Área de Recursos naturales y biodiversidad. Fundación Cesefor (Centro de Servicios y Promoción Forestal y de su Industria de Castilla y León), Parque Científico de León. Avda. Real 1, 24006 León, España

Resumen

Gnomoniopsis smithogilvyi es un hongo ascomiceto que causa la podredumbre marrón de la castaña. Aunque inicialmente fue descrito como un microorganismo endófito común en la microbiota del castaño, en los últimos años se ha disparado su patogenicidad en toda Europa, causando graves pérdidas en la producción de castañas, afectando tanto a la cantidad como a la calidad de las mismas. Empleando como referencia distintas cepas del hongo aisladas a partir de hojas y castañas infectadas, se han puesto a punto las técnicas de PCR y qPCR para la detección temprana del hongo en distintos tipos de muestras naturales, como hojas, erizos o castañas. Estas técnicas se han validado durante las campañas de 2023 y 2024, analizando muestras recogidas en 60 puntos distintos de la región de El Bierzo (León). De este modo, se ha visto que la distribución del hongo no es homogénea, si no que el grado de afectación por el fitopatógeno depende del lugar y de la variedad de castaña analizada, llegando a detectarse en algunas áreas geográficas hasta un 90 % de casos positivos.

Palabras clave

Castanea sativa, fitopatógenos, plagas, detección temprana de hongos.

1. Introducción

Los castaños (*Castanea* spp.) son árboles de notable importancia económica, cultural y medioambiental, cuya población se ha visto reiteradamente afectada por plagas en todas sus áreas de distribución. La incesante introducción de nuevas enfermedades vegetales en el continente europeo ha perjudicado gravemente a los cultivos del castaño europeo (*Castanea sativa* Mill.). Entre estas amenazas, el hongo fitopatógeno *Gnomoniopsis smithogilvyi* destaca como la causa de una de las enfermedades más severas que estos cultivos enfrentan en la actualidad (NICOLETTI et al., 2021; DOBRY & CAMPBELL, 2022).

El hongo *G. smithogilvyi* es un ascomiceto descrito por primera vez en 2012 de



forma independiente por SHUTTLEWORTH *et al.* (2012) y VISENTIN *et al.* (2012), denominado en este último caso como *Gnomoniopsis castaneae*. Posteriormente, el análisis morfológico y bioinformático del ADN secuenciado confirmó que ambos hongos correspondían a la misma especie (SHUTTLEWORTH *et al.*, 2015). Desde entonces, *G. smithogilvyi* ha sido reconocido como la nomenclatura válida (SHUTTLEWORTH *et al.*, 2018). Este hongo es endófito del castaño, por lo que puede colonizar diversos tejidos que permanecen asintomáticos ante la infección. En su forma de patógeno, provoca podredumbre marrón en los frutos, lesiones similares al chancro en varios tejidos vegetales y necrosis en las hojas. Adicionalmente, ha sido detectado en agallas generadas por la avispa del castaño (*Dryocosmus kuriphilus* Yasumatsu), que sirven como foco de entrada hacia los tejidos vegetales (RIGLING & PROSPERO, 2018). Aunque el ciclo de vida completo y el mecanismo de infección del hongo no se han aclarado con exactitud, se plantea que *G. smithogilvyi* inicia una infección primaria en su fase de ascospora (fase sexual), continuando con una infección secundaria que se propaga por medio de sus conidios (fase asexual) (SHUTTLEWORTH & GUEST, 2017). Las ascosporas, halladas en los restos de plantas infectadas que permanecen en el suelo durante el invierno, son dispersadas durante la floración mediante agentes meteorológicos como el viento y la lluvia, así como por insectos polinizadores. De esta manera, estas ascosporas alcanzan flores, hojas y ramas del árbol (LIONE *et al.*, 2019). El hongo no origina una infección sistémica, afectando únicamente a la parte femenina de la flor (pistilo). Desde el estigma y el estilo, las ascosporas acceden a los óvulos, pero no logran atravesar la pared del ovario ni la membrana que rodea cada embrión. Este fenómeno explica por qué en una misma planta pueden coexistir frutos con embriones sanos y enfermos (SHUTTLEWORTH & GUEST, 2017). La colonización de otros órganos de la planta, como ramas y hojas, requiere de la presencia de heridas o lesiones previas (DAR & RAI, 2015).

En la mayoría de los casos, la podredumbre marrón de la castaña se reconoce posteriormente a la recolección del fruto, ya que el hongo no se manifiesta visualmente en la cáscara, incluso cuando el interior ya está completamente afectado. El hongo deteriora la calidad de las castañas al afectar su textura, nivel de hidratación, color interior y sabor, anulando su valor comercial (LIONE *et al.*, 2019; VANNINI *et al.*, 2017). La prevalencia y capacidad de difusión de *G. smithogilvyi* están estrechamente vinculadas a condiciones climáticas específicas, como temperaturas elevadas, vientos fuertes y lluvias durante la floración. Estas variables, exacerbadas por los efectos del cambio climático, podrían intensificar aún más el impacto de este patógeno en los castañares (LIONE *et al.*, 2015).

En España, TRAPIELLO *et al.* (2018) publicaron la primera detección de *G. smithogilvyi* en castaños. Este hallazgo adquiere relevancia considerando que, en 2021, España produjo 174.050 toneladas de castañas (Food and Agricultural Organization of the United Nations [FAO], 2024). Esta producción supone una considerable fuente de ingresos en las regiones con tradición del cultivo de castaños. Un ejemplo de ello se encuentra en la comarca de El Bierzo (León), donde se encuentra una extensa superficie de cultivo de castaños de 19000 hectáreas, que en 2020 proporcionó una cosecha de aproximadamente 6700 toneladas de castañas. Sin embargo, en el otoño de 2021 ya se alertó sobre problemas como la defoliación prematura de los castaños y la disminución en la cosecha de castañas.



Problemas que se agravaron en la campaña de 2022, con pérdidas estimadas en torno al 70% de la producción en la región. Aunque parte de esta reducción se atribuyó a factores de estrés abiótico como la sequía extrema de 2022 que afectó a los castaños – una especie particularmente vulnerable al estrés hídrico en suelos pobres y con baja disponibilidad de agua (CONEDERA *et al.*, 2021) –, el principal responsable identificado fue el hongo *G. smithogilvyi*.

El desarrollo y optimización de técnicas para la producción, conservación y manejo de plagas en castaños es de vital importancia para productores, empresas, investigadores y consumidores. Garantizar la calidad del fruto requiere pasos fundamentales como la detección e identificación precisa de *G. smithogilvyi*, lo cual es esencial para comprender y controlar el proceso de infección (LEMA *et al.*, 2023). Gran parte de los métodos de detección descritos para *G. smithogilvyi* dependen del aislamiento del hongo a partir de tejidos infectados, como frutos, agallas originadas por *D. kuriphilus*, ramas, yemas o flores del castaño. Si bien el cultivo en medios selectivos permite su identificación morfológica, este enfoque no es concluyente debido a las similitudes entre las estructuras vegetativas y reproductivas de *G. smithogilvyi* y otras especies estrechamente relacionadas que también colonizan estos tejidos vegetales (LEMA *et al.*, 2023). Por esta razón, se ha vuelto imprescindible recurrir a técnicas moleculares para una identificación precisa (LIONE *et al.*, 2019). Entre estas técnicas, la PCR cuantitativa (qPCR), también conocida como PCR en tiempo real, ha demostrado ser una herramienta eficaz para la detección y cuantificación de *G. smithogilvyi*. Estudios previos han empleado el gen diana EF1- α (factor de elongación de traducción 1-alfa) para desarrollar ensayos de qPCR dirigidos a este patógeno (TURCO *et al.*, 2021; VETTRAINO *et al.*, 2021). Aunque EF1- α , al ser un gen de copia única, confiere alta especificidad a la prueba, su sensibilidad es limitada, incluso bajo condiciones de amplificación optimizadas. VETTRAINO *et al.* (2021) reportaron un límite de detección (LoD) de 128 fg/ μ l de ADN puro de *G. smithogilvyi*, lo que reduce la utilidad de la técnica como herramienta para la detección temprana del patógeno. Por el contrario, el uso de la región ITS (espaciador transcrito interno), un gen de copia múltiple, incrementa la sensibilidad de la qPCR. Esto es especialmente efectivo cuando se combina con un método eficiente de extracción de ADN y un diseño adecuado de cebadores y sondas. Sin embargo, hasta la fecha no se ha desarrollado un ensayo molecular específico basado en ITS que permita detectar y cuantificar *G. smithogilvyi* de forma temprana y precisa. Por ese motivo, nos propusimos desarrollar una prueba de diagnóstico de *G. smithogilvyi* basada en qPCR, lo que agiliza y simplifica el control y diagnóstico de la enfermedad que este patógeno ocasiona, reduciendo el tiempo y los recursos necesarios para analizar muestras.

2. **Objetivos** Diseñar y optimizar las condiciones experimentales para la detección temprana y específica del hongo *G. smithogilvyi* mediante qPCR, así como validar la técnica con muestras de campo.

3. Metodología

Cepas fúngicas utilizadas y condiciones de cultivo



Para la puesta a punto de la técnica se empleó la cepa *G. smithogilvyi* C10, que forma parte de la colección de Cesefor, aislada a partir de castañas infectadas durante la campaña de 2021. La identificación se llevó a cabo mediante análisis morfológico y secuenciación del espaciador transcrito interno (ITS), utilizando los cebadores universales ITS1 e ITS4 (WHITE *et al.*, 1990). Para los estudios de especificidad de PCR y qPCR, se emplearon 27 cepas adicionales de hongos aislados de castañas infectadas, identificadas igualmente mediante la secuenciación de la región ITS. Las cepas corresponden a las especies *G. smithogilvyi* (A2-b, B1-a, C3-a, A11-a, B11-c, B14-a, C11-a, C22-a), *Cryphonectria parasitica* (A14-c), *Penicillium bialowiezense* (C1-a, B12-b, B12-c, A22-a, B24-c), *Penicillium glabrum* (A14-a), *Penicillium manginii* (B12-a), *Penicillium sublectaticum* (B12-d), *Penicillium canescens* (B24-a), *Quambalaria cyanescens* (A14-d, C23-b), *Talaromyces coalescens* (C4-a), *Jattaea ribicola* (A12-a), *Neocucurbitaria cava* (A14-e), *Mucor fragilis* (B11-a), *Mucor racemosus* (B11-b), *Aureobasidium pullulans* (A24-c) y *Trichoderma gamsii* (A24-d). Todas las cepas se cultivaron en placas de 90 mm de diámetro con medio PDA (Potato Dextrose Agar, Condalab) y se incubaron en una estufa a 25 °C.

Diseño del muestreo de material vegetal

Se tomaron 60 puntos de muestreo, elegidos aleatoriamente dentro de un muestreo sistemático dentro del área de distribución del castaño en El Bierzo (León). Se consideró que con esa cantidad de muestras el tamaño de la muestra para un nivel de confianza del 95% tenía un error del 14 %, que, al tratarse de masas homogéneas, está dentro del margen de error representativo (con un error máximo para este tipo de muestreo del 20 % en rodales de menos de 20 ha). Las parcelas de muestreo fueron circulares para evitar direcciones privilegiadas y sus dimensiones dependieron de la heterogeneidad y densidad de la masa de castaño presente en la parcela.

Para la generación de los puntos de muestreo se utilizó la distribución actual del castaño como especie principal del último inventario forestal español (IFN4). El replanteo de las parcelas de muestreo consistió en situar sobre el terreno estas parcelas. Se definieron las coordenadas geográficas del centro de la parcela y para ello se generaron mediante herramientas de GIS puntos aleatorios en polígonos de distribución del castaño, limitando a los 60 puntos con los que cuenta el muestreo, con una separación mínima entre puntos de muestreo de 60 metros y una distancia de no más de 200 metros de radio a una carretera o pista (para facilitar el acceso al muestreo). Los 60 puntos finalmente generados se muestran en la Figura 1.

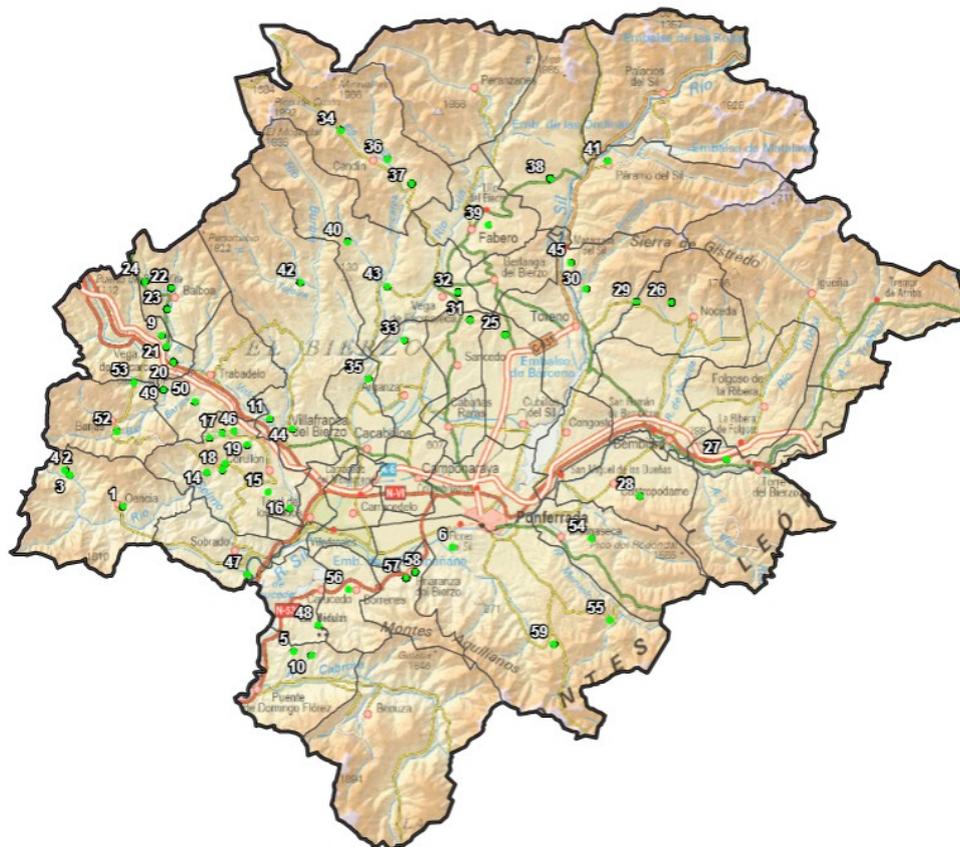


Figura 1. Localización de los 60 puntos de muestreo en la región leonesa de El Bierzo.

Material vegetal

Durante el mes de octubre de 2023 se recogieron 100 castañas por punto de muestreo (10 castañas de 10 castaños diferentes), siguiendo la siguiente metodología: el primer castaño fue el más cercano a la coordenada del punto de muestreo, el segundo fue el siguiente castaño orientado al norte y los siguientes se escogieron siguiendo el recorrido de las agujas del reloj (de izquierda a derecha haciendo un círculo). Así se recogieron 10 castañas por castaño hasta llegar a completar los 10 castaños de la muestra. Las 10 submuestras de los 10 castaños se mezclaron en la misma bolsa para formar una única muestra compuesta por parcela. Las bolsas fueron etiquetadas con la parcela y la fecha de recolección. Para evitar el crecimiento de los hongos u otros microorganismos y que se alterase la representatividad de las muestras, estas se mantuvieron en lo posible refrigeradas (entre 0 y 4 °C) desde su recogida hasta la entrega en el laboratorio.

Con el fin de validar la técnica de qPCR como herramienta de diagnóstico, en 2024 el muestreo se realizó en los mismos 60 puntos durante el mes de septiembre, recogiendo erizos inmaduros antes de comenzar la campaña propiamente dicha. En este caso se seleccionaron únicamente 3 árboles por punto de muestreo, recogiendo 3 erizos por árbol. Igualmente, las muestras se mantuvieron refrigeradas hasta su procesamiento.

Procesado de las muestras

En el caso de las castañas, una vez recibidas en el laboratorio se seleccionaron 10 frutos de cada muestra compuesta, se lavaron para eliminar restos de suciedad y se esterilizaron superficialmente con etanol al 96 %. Posteriormente, la cáscara fue retirada con una navaja esterilizada a la llama, y se empleó un bisturí esterilizado para extraer fragmentos del fruto. Los fragmentos se tomaron de zonas internas de las castañas donde se apreciaran posibles lesiones debidas al hongo, y en caso de no observarse, se tomaron de la zona basal (Figura 2A). Estos fragmentos se almacenaron en tubos tipo Eppendorf de 2 ml a -20 °C hasta el momento de la extracción de ADN. Los 9 erizos recogidos por punto de muestreo en la precampaña de 2024 se abrieron igualmente con un bisturí estéril y el material se extrajo tanto de la zona de inserción del pedúnculo (posible punto de entrada del hongo proveniente de la flor) como de la parte basal de la castaña central (la más cerca al pedúnculo del erizo) (Figura 2B). El material también se conservó a -20 °C hasta el momento de la extracción de ADN.



Figura 2. Zonas seleccionadas para la extracción de ADN tanto de castañas durante la campaña de 2023 (A) como de los erizos de la precampaña de 2024 (B).

Extracción de ADN

Para la extracción de ADN se empleó el kit comercial *DNeasy Plant Pro Kit* (Qiagen) siguiendo las recomendaciones del fabricante. Se empleó el mismo kit tanto para extraer ADN de un cultivo puro del hongo empleado como control como de las muestras (castañas y erizos) analizadas. Cuando se extrajo ADN a partir del cultivo puro del hongo, se recogieron entre 50 y 100 mg de micelio procedente de cultivos de entre 5 y 7 días de crecimiento, utilizando una espátula esterilizada. La rotura del micelio se hizo con un homogeneizador FastPrep-24™ (MP Biomedicals) a una velocidad de 4 m/s durante 20 segundos, antes de proceder a la extracción propiamente dicha. Para la extracción de ADN de castaña se pesaron unos 70 mg del material conservado a -20 °C, mientras que para el material proveniente de los erizos se pesaron conjuntamente unos 40 mg de la zona del pedúnculo y otros 40 mg de la castaña central. En todos los casos, la rotura del material vegetal se hizo con el equipo FastPrep-24™ aplicando 3 ciclos a una velocidad de 6,5 m/s durante 20 segundos, manteniendo las muestras en hielo durante 5 minutos entre ciclo y ciclo. La concentración de ADN extraído se analizó utilizando un espectrofotómetro NanoDrop® ND-1000 (ThermoFisher Scientific).

*Detección de *G. smithogilyvi* mediante PCR convencional*

Para la detección de *G. smithogilyvi* mediante PCR se utilizaron los cebadores previamente descritos por SILVA-CAMPOS *et al.* (2022). Estos cebadores están



diseñados para amplificar secuencias de ADN del factor de elongación de la traducción (TEF); el espaciador transcrito interno (ITS) y la β -tubulina (TUB) del hongo. Durante el desarrollo de verificación de la técnica en nuestro laboratorio se observó cierta inespecificidad con los cebadores TUB, por lo que fueron descartados para el análisis. La reacción final se realizó con una desnaturalización inicial a 95 °C durante 2 min, seguida de 35 ciclos que consistían en 30 segundos a 95 °C, 30 segundos a 59 °C y 1 min a 72 °C, acabando con un paso de 72 °C durante 10 min. La mezcla de reacción estaba formada por el tampón *Green GoTaq Reaction Buffer* (Promega) a una concentración final de 1X, $MgCl_2$ a 2,5 mM, dNTPs a 0,2 mM cada uno, los cebadores del TEF a 0,25 μ M cada uno y los del ITS a 0,15 μ M cada uno, y la enzima *GoTaq G2 DNA polymerase* (Promega) a 0,025 U/ μ l. La cantidad de ADN se ajustó a una concentración inferior a 10 ng/ μ l para llevar las reacciones a un volumen final de 20 μ l. El límite de detección establecido en nuestro laboratorio fue de 1 pg de ADN de *G. smithogilyvi* en 20 μ l.

Detección de G. smithogilyvi mediante qPCR

Con el fin de diseñar una prueba de diagnóstico molecular específica para *G. smithogilyvi*, se llevó a cabo un análisis bioinformático de la región ITS del ADN de esta especie empleando como referencia la secuencia MK554867.1, depositada en las bases de datos. Para localizar las áreas con mayor variabilidad en nucleótidos, se empleó el programa MEGA 7.0.26 para alinear y comparar con las secuencias de la región ITS de otros hongos patógenos del castaño, con el fin de poder compatibilizar la detección futura de varios hongos en una misma reacción. Estas regiones fueron seleccionadas para diseñar los cebadores y la sonda específicos para *G. smithogilyvi* con la herramienta *Custom TaqMan Gene Expression Assay Tool* (ThermoFisher Scientific). Las sondas finalmente seleccionadas amplifican un fragmento de 54 pb y su secuencia, así como la de la sonda TaqMan, se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1. Secuencia de las sondas diseñadas para la detección de G. smithogilyvi mediante qPCR.

Sonda	Secuencia (5' 3')
Gs-F	GGCATGGACTGGCTTCCT
Gs-R	CGACCTGCTCCGCTTCC
Gs-M	FAM-ATGGAAGTCCCTCTTCTTC-NFQ

Las reacciones de qPCR se llevaron a cabo en un volumen de 15 μ l empleando el reactivo *TaqMan™ Multiplex Master Mix* (Applied Biosystems) y las sondas correspondientes, proporcionadas en formato *TaqMan Expression Assays* (Applied Biosystems). Las condiciones de amplificación fueron de 1 ciclo a 95 °C durante 20 s, 40 ciclos a 95 °C durante 3 s y 60 °C durante 30 s. Para ello se empleó un equipo Mx3005P (Agilent Technologies), con medición de la fluorescencia en duplicado al final de cada ciclo. Para la detección del fluoróforo de referencia incluido en el

reactivo (MUSTANG PURPLE) se empleó el canal compatible de Cy5. Los datos obtenidos fueron procesados mediante el Software MxPro QPCR (versión 4.10), diseñado para este equipo. Los datos corregidos se generaron en función de la fluorescencia inicial (R) y la línea base (dR). Los valores de Cq (ciclo límite de detección) se calcularon usando la fluorescencia normalizada corregida (dRn) y un algoritmo que establece el umbral según la amplificación detectada (*Amplification-Based Threshold*). Las curvas estándar se generaron mediante el algoritmo de ajuste de mínimos cuadrados, que minimiza la dispersión general de la desviación estándar del Cq para todas las réplicas.

4. Resultados

Optimización de la reacción de qPCR específica de G. smithogilvyi

Para comprobar la validez del diseño experimental de qPCR, se realizó una curva de calibración con ADN puro de *G. smithogilvyi*. Los resultados mostraron una amplificación proporcional a la cantidad de ADN en un rango dinámico lineal de 5 órdenes de magnitud (Figura 3), desde 1000 pg hasta 0,1 pg, siendo este último valor el límite de detección. Asimismo, la curva de calibración presentó muy buenos resultados de eficiencia (101,31 %), coeficiente de correlación ($R^2 = 0,995$) y valores de Cq bajos (desde $18,88 \pm 0,20$ hasta $32,19 \pm 0,12$ para los extremos de la recta de calibrado).

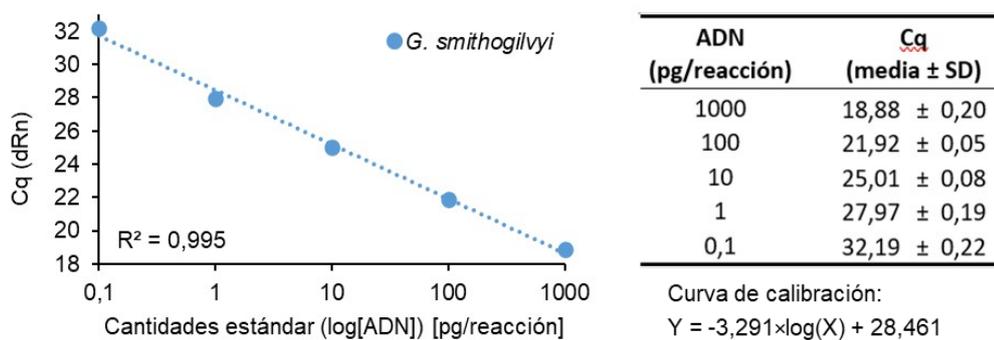


Figura 3. Curva estándar obtenida con triplicados de diluciones seriadas decimales de ADN extraído de la cepa *G. smithogilvyi* C10 y estadísticas relacionadas.

Tanto el rango dinámico lineal como los coeficientes de correlación y eficiencias de la reacción se ajustan al rango de valores establecido por BROEDERS *et al.* (2014). El análisis de los valores de los estándares de ADN realizados por triplicado demuestra que la prueba es repetible, puesto que la desviación estándar entre los valores medios de Cq para cada concentración es inferior a 0,5 Cq.

Para determinar el límite de detección (LoD) y el límite de cuantificación (LoQ) de la prueba de qPCR, se siguieron las directrices establecidas en el Documento de orientación de la Red Europea de Laboratorios de OMG (HOUGS *et al.*, 2017). Cada

dilución fue analizada utilizando un conjunto de datos compuesto por 9 mediciones, obtenidas al realizar tres réplicas por dilución y repitiendo este procedimiento en tres experimentos independientes. Se consideró como valor aproximado del LoD la dilución más baja (es decir, la cantidad mínima de ADN, medida en picogramos) en la que todas las réplicas resultaron positivas. Por otro lado, el LoQ fue estimado como la cantidad mínima de ADN que puede ser cuantificada con precisión aceptable y de manera reproducible. Las cantidades de ADN entre 1000 y 0,1 pg se amplificaron en el 100 % de los casos de todas las pruebas de qPCR con valores correctos de desviación típica, mientras que no se logró detectar cantidades inferiores a 0,1 pg. En consecuencia, se establece tanto el LoD relativo como el LoQ relativo en este último valor. El procedimiento de qPCR demostró ser altamente sensible, siendo capaz de detectar 100 fg de ADN puro en reacciones de 15 µl, es decir, 6,67 fg/µl, una cantidad muy inferior a los 128 fg/µl descrito por otros autores (VETTRAINO et al., 2021). El ensayo de qPCR confirmó su elevada especificidad mediante la validación con ADN de los 27 hongos (*G. smithogilvyi* y otros) aislados de castañas. Los valores de C_q (dRn) obtenidos para especies de hongos distintas a la diana, *G. smithogilvyi*, fueron equivalentes a los de los controles negativos sin ADN molde.

Detección de G. smithogilvyi durante la campaña de 2023

Durante la campaña de 2023 únicamente disponíamos de la técnica de PCR convencional para detectar la presencia del hongo en castañas. Con esta herramienta de análisis para los marcadores TEF y TUF, se analizaron 600 castañas (10 castañas por punto de muestreo) de distintas variedades y localidades de El Bierzo con el fin de determinar la incidencia de la enfermedad entre los castaños de la región. De este modo, se pudo determinar una incidencia ligeramente superior al 35 % para toda la comarca, aunque con claras diferencias entre unas localidades y otras, variando entre el 0 y el 90 % (Figura 4). Al analizar por variedades, también se detectaron importantes variaciones, entre el 28,4 % en el caso de Parede y el 80 % en el caso de Navia. Sin embargo, de esta variedad se disponía únicamente de un lote, por lo que no puede considerarse representativo de toda la variedad.

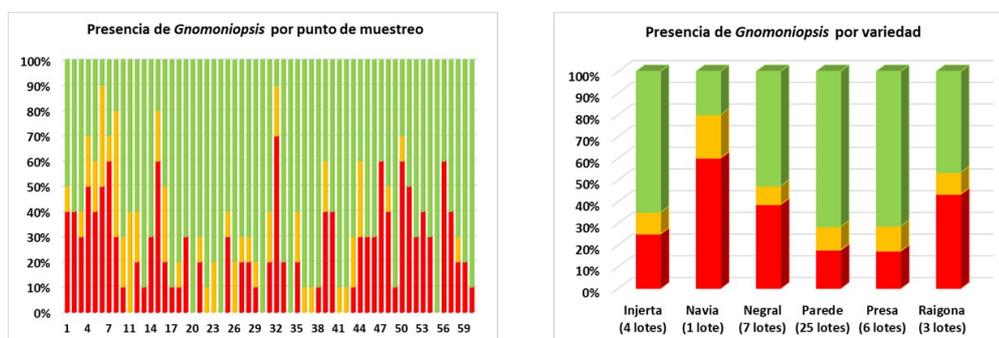


Figura 4. Incidencia de *Gnomoniopsis* en El Bierzo durante la campaña de 2023 en función del punto de muestreo (izquierda) y la variedad de castaña analizada (derecha). En rojo se muestran los casos de PCR positiva en castañas con síntomas aparentes de enfermedad, en amarillo los resultados positivos en castañas

aparentemente sanas y en verde los resultados negativos. El número de lotes con variedad asignada es inferior al total de lotes ya que en algunos casos no se pudo confirmar la variedad presente en el soto analizado.

*Detección de *G. smithogilvyi* durante la precampaña de 2024*

En el año 2024 ya se disponía de la técnica de detección del hongo mediante qPCR, por lo que se decidió validar su utilidad analizando muestras de erizos con castañas todavía inmaduras, sin síntomas de enfermedad salvo en muy contados casos en los que al abrir el erizo ya se apreciaba el desarrollo de la pudrición. Como ya se ha comentado, el límite de detección de la técnica es muy bajo, de tan solo 100 fg de ADN en los 15 µl de reacción. Lo que en otras circunstancias sería una gran ventaja, en este caso es algo a tener en cuenta en el momento de valorar los resultados, ya que *Gnomoniopsis* es un hongo que puede estar de forma endófito sin llegar a ser patógeno, y la técnica puede dar positivo cuando realmente la muestra está sana.

Para determinar un posible valor límite de Cq a partir del cual se considera que la muestra está sana, se decidió representar la supuesta incidencia en función del Cq determinado para cada una de ellas (Figura 5). Como se puede observar, se obtuvo un valor de Cq para el 55 % de las muestras, lo que implica que el 45 % restante de las muestras dio negativo, al no poder asignarle un Cq, a pesar de realizar una amplificación de 40 ciclos.

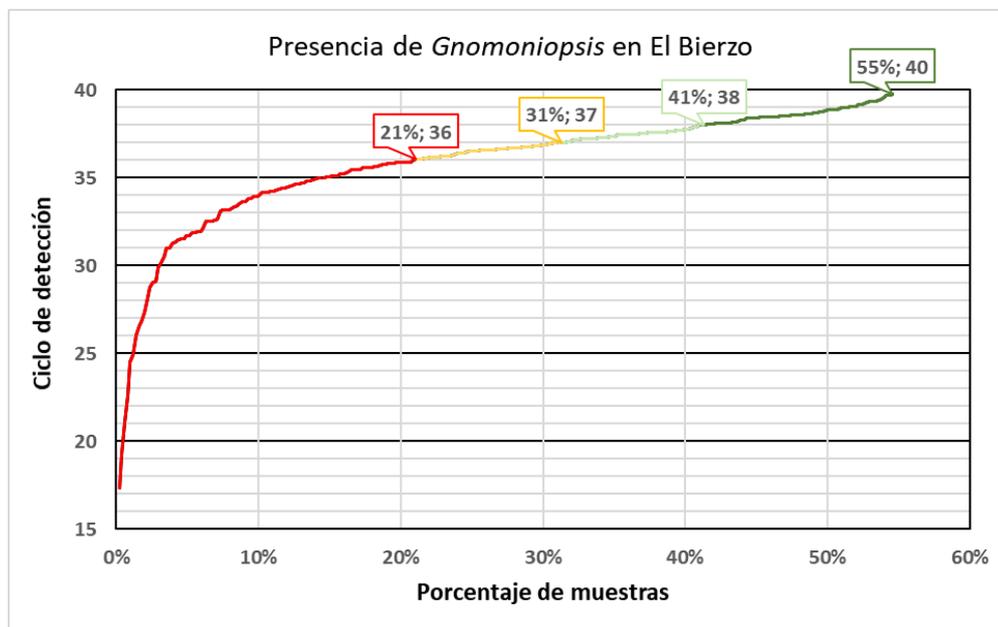


Figura 5. Relación del porcentaje de muestras frente al ciclo de detección. Se indica el porcentaje de muestras que quedan por debajo de un número determinado de ciclos.

Teniendo en cuenta que algunos erizos con claros síntomas de enfermedad dieron un valor de Cq cercano a 36, se consideró que todas las muestras con un valor

inferior a 36 estaban realmente infectadas por el hongo. Por otro lado, y teniendo en cuenta la posibilidad de la presencia del hongo de manera endófito, todas las muestras por encima de 38 se consideraron negativas. Finalmente, todas las muestras comprendidas entre 36 y 38 se consideraron inicialmente sospechosas. Sin embargo, una vez finalizada la cosecha y teniendo constancia por parte de los castañicultores de que la incidencia de *Gnomoniopsis* en 2024 fue bastante inferior a la de 2023, se determinó como valor límite para considerar positiva una muestra un valor de ciclo de detección de 36, con una incidencia total en El Bierzo del 21 %. Si se hubiera considerado como valor límite de detección el ciclo 37, los valores de incidencia hubieran sido similares a los de 2023 (31 % frente al 35 % de 2024), y con un valor de 38, la incidencia hubiera sido incluso mayor que la de 2023 (un 41 %).

Finalmente, fijando como límite dicho valor de 36, los valores de incidencia de la *Gnomoniopsis* en 2024 se representan en la Figura 6, con un valor promedio ya citado del 21 %, pero de nuevo con claras oscilaciones entre puntos de muestreo, desde el 0 % en algunos casos hasta el 100 % de positivos en uno de los sotos. Es de destacar que no hay una gran relación entre la incidencia de un año y otro en los distintos puntos de muestreo. En cuanto a la incidencia por variedades, los valores oscilaron entre el 7 % de positivos en la variedad Negral y el 25 % en la de Presa (Figura 6). Cabe señalar que la variedad Parede, que en 2023 fue la menos afectada, en este caso estuvo por encima de la media con un 24 % de incidencia, próxima al 25 % de la variedad de Presa.

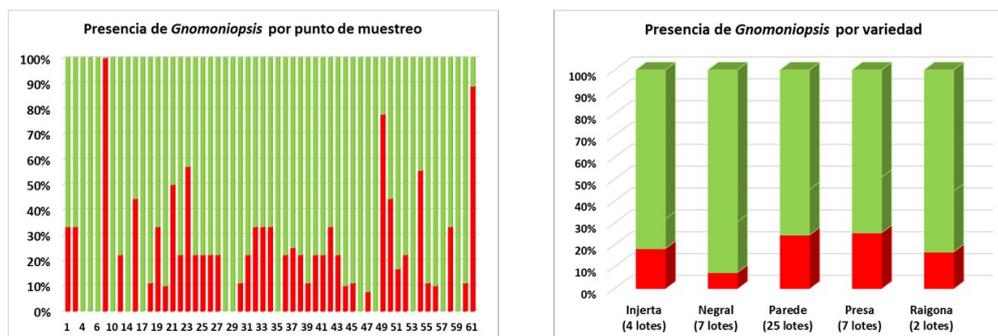


Figura 6. Incidencia de *Gnomoniopsis* en El Bierzo durante la campaña de 2024 en función del punto de muestreo (izquierda) y la variedad de castaña analizada (derecha). En rojo se muestran los casos de qPCR positiva con un valor de detección por debajo de 36 y en verde los resultados por encima de dicho valor.

5. Discusión

En el presente trabajo se ha puesto a punto una técnica de qPCR que permite identificar la presencia del hongo *G. smithogilyyi* con una sensibilidad de 0,1 pg de ADN por reacción. El proceso de amplificación mostró una eficiencia cercana al



ideal de duplicar el ADN en cada ciclo, con valores comprendidos entre el 90 y el 110 % (BROEDERS *et al.*, 2014). La técnica demostró una respuesta lineal en un rango de concentraciones que abarcaba cinco órdenes de magnitud, con un coeficiente de correlación elevado ($R^2 \geq 0,99$). Además, la baja desviación estándar en los valores de Cq de las réplicas, tanto dentro de un mismo ensayo como entre ensayos independientes, confirmó la alta reproducibilidad intra e interensayo de esta metodología (BUSTIN *et al.*, 2009). Los límites de detección (LoD) y cuantificación (LoQ) establecidos a partir de las curvas de calibración fueron de 100 fg por reacción, lo que representa una mejora significativa frente a la qPCR dirigida a la secuencia EF1- α de *G. smithogilvyi* descrita por VETTRAINO *et al.* (2021), quienes reportaron un LoD de 128 fg/ μ l de ADN puro. Adicionalmente, la especificidad de la qPCR quedó validada por la concordancia en los valores de Cq obtenidos en muestras identificadas previamente como *G. smithogilvyi* frente a sus controles positivos, así como por la similitud de los valores de Cq en muestras correspondientes a otras especies de hongos con los controles negativos.

Mediante el uso de herramientas moleculares se ha podido hacer un seguimiento de la incidencia de la *Gnomoniopsis* en la región de El Bierzo durante las dos últimas campañas. La ventaja de la qPCR desarrollada en este trabajo es que se ha podido aplicar incluso antes de la maduración de los frutos, cuando la carga fúngica es muy baja, lo cual nos ha permitido estimar la incidencia de la enfermedad en los sotos analizados antes de realizarse la cosecha. En el futuro, la aplicación de esta herramienta permitirá evaluar la presencia del hongo en todo tipo de muestras, sirviendo de método de diagnóstico en próximas campañas, permitiendo implementar medidas preventivas y correctivas de manera oportuna, minimizando tanto los daños en los castaños como las pérdidas económicas asociadas a esta infección. Igualmente servirá de soporte en procesos de gestión forestal e implementación de medidas de saneamiento con el fin de controlar la dispersión de esta plaga.

6. Conclusiones

Se ha desarrollado una prueba de diagnóstico específica para *Gnomoniopsis smithogilvyi* basada en la técnica de qPCR, que sirve como herramienta para detectar la presencia temprana de este hongo. La técnica implementada ha sido validada con muestras de campo, demostrando su capacidad para identificar el fitopatógeno incluso en muestras sin síntomas evidentes de infección. La sensibilidad de la qPCR permite evaluar la propagación de *G. smithogilvyi* tanto en su forma latente (endófito) como en su fase patógena, lo que resulta útil para medir la efectividad de las estrategias de control y los tratamientos aplicados.

7. Agradecimientos

El Grupo Operativo YesWeCast para la conservación y recuperación del genoma ancestral del castaño para la producción de fruto mejorando su resiliencia frente al cambio climático y amenazas fitosanitarias.



Comisión Europea:
https://agriculture.ec.europa.eu/common-agricultural-policy/rural-development_es

El grupo operativo GO YesWeCast ha recibido para su proyecto de innovación una subvención de 599.791,52 €. El importe del proyecto es financiado al 80% con fondos procedentes del Fondo Europeo Agrícola de Desarrollo Rural (FEADER) y 20 % por el Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, tal como se establece en el Real Decreto 366/2023, de 17 de mayo.

El organismo responsable del contenido es el GO YesWeCast.

La Dirección General de Desarrollo Rural, Innovación y Formación Agroalimentaria (DGDRIFA) es la autoridad de gestión encargada de la aplicación de la ayuda del FEADER y nacional correspondiente.

«Fondo Europeo Agrícola de Desarrollo Rural: Europa invierte en las zonas rurales»

8. Bibliografía

BROEDERS, S.; HUBER, I.; GROHMANN, L.; BERBEN, G.; TAVERNIERS, I.; MAZZARA, M.; ROOSENS, N.; MORISSET, D.; 2014. Guidelines for validation of qualitative real-time PCR methods. *Trends Food Sci Technol* 37(2), 115-126.

BUSTIN, S.A.; BENES, V.; GARSON, J.A.; HELLEMANS, J.; HUGGETT, J.; KUBISTA, M.; MUELLER, R.; NOLAN, T.; PFAFFL, M.W.; SHIPLEY, G.L.; VANDESOMPELE, J.; WITTEW, C.T.; 2009. The MIQE guidelines: Minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem* 55(4), 611-622.

CONEDERA, M.; KREBS, P.; GEHRING, E.; WUNDER, J.; HÜLSMANN, L.; ABEGG, M.; MARINGER, J.; 2021. How future-proof is Sweet chestnut (*Castanea sativa*) in a global change context? *For Ecol Manag* 494, 119320.

DAR, M.A.; RAI, M.; 2015. *Gnomoniopsis smithogilvyi*, a canker causing pathogen on *Castanea sativa*: First report. *Mycosphere*, 6(3), 327-336.

DOBRY, E.; CAMPBELL, M.; 2023. *Gnomoniopsis castaneae*: An emerging plant pathogen and global threat to chestnut systems. *Plant Pathol* 72, 218–231.

Food and Agricultural Organization of the United Nations (FAO); 2024. Crops and livestock FAOSTAT. Recuperado 24 de noviembre de 2024, de <https://www.fao.org/faostat/en/#data/QCL>



HOUGS, L.; GATTO, F.; GOERLICH, O.; GROHMANN, L.; LIESKE, K.; MAZZARA, M.; NARENDIA, F.; OVESNA, J.; PAPAHOYA, N.; SCHOLTENS, I.M.J.; Zel, J.; 2017. Verification of Analytical Methods for GMO Testing When Implementing Interlaboratory Validated Methods. *Testing and Analysis of GMO-containing Foods and Feed*, 245-266.

LEMA, F.; BAPTISTA, P.; OLIVEIRA, C.; RAMALHOSA, E.; 2023. Brown Rot Caused by *Gnomoniopsis smithogilvyi* (syn. *Gnomoniopsis castaneae*) at the Level of the Chestnut Tree (*Castanea sativa* Mill.). *Appl Sci* (Switzerland), 13(6), 1-17.

LIONE, G.; DANTI, R.; FERNANDEZ-CONRADI, P.; FERREIRA-CARDOSO, J.V.; LEFORT, F.; MARQUES, G.; MEYER, J.B.; PROSPERO, S.; RADÓCZ, L.; ROBIN, C.; TURCHETTI, T.; VETTRAINO, A.M.; GONTHIER, P.; 2019. The emerging pathogen of chestnut *Gnomoniopsis castaneae*: the challenge posed by a versatile fungus. *European Journal of Plant Pathol* 153(3), 671-685.

LIONE, G.; GIORDANO, L.; SILLO, F.; GONTHIER, P.; 2015. Testing and modelling the effects of climate on the incidence of the emergent nut rot agent of chestnut *Gnomoniopsis castanea*. *Plant Pathol* 64(4), 852-863.

NICOLETTI, R.; BECCARO, G.L.; SEKARA, A.; CIRILLO, C.; DI VAIO, C.; 2021. Endophytic fungi and ecological fitness of chestnuts. *Plants*, 10(3), 1-16.

RIGLING, D.; PROSPERO, S.; 2018. *Cryphonectria parasitica*, the causal agent of chestnut blight: Invasion history, population biology and disease control. *Molecular Plant Pathol* 19(1), 7-20.

SHUTTLEWORTH, L.A.; LIEW, E.C.Y.; GUEST, D.I.; 2012. *Gnomoniopsis smithogilvyi* sp. nov. Fungal Planet Description Sheet 108. *Fungal planet description sheets. Persoonia* 28:107-127

SHUTTLEWORTH, L.A.; WALKER, D.M.; GUEST, D.I.; 2015. The chestnut pathogen *Gnomoniopsis smithogilvyi* (*Gnomoniaceae*, *Diaporthales*) and its synonyms. *Mycotaxon* 130(4), 929-940.

SHUTTLEWORTH, L.A.; GUEST, D.I.; 2017. The infection process of chestnut rot, an important disease caused by *Gnomoniopsis smithogilvyi* (*Gnomoniaceae*, *Diaporthales*) in Oceania and Europe. *Australas Plant Pathol*, 46(5), 397-405.

SHUTTLEWORTH, L.A.; GUEST, D.I.; WALKER, D.M.; 2018. The fungus, the Code and the mysterious publication date: Why *Gnomoniopsis smithogilvyi* is still the correct name for the chestnut rot fungus. *IMA Fungus*, 9(2), 78-79.



SILVA-CAMPOS, M.; NADIMINTI, P.; CAHILL, D.; 2022. Rapid and Accurate Detection of *Gnomoniopsis smithogilvyi* the Causal Agent of Chestnut Rot, through an Internally Controlled Multiplex PCR Assay. *Pathogens* 11(8).

TRAPIELLO, E.; FEITO, I.; GONZÁLEZ, A.J.; 2018. First report of *Gnomoniopsis castaneae* causing canker on hybrid plants of *Castanea sativa* x *C. crenata* in Spain. *Plant Dis* 102(5), 1040.

TURCO, S.; BASTIANELLI, G.; MORALES-RODRIGUEZ, C.; VANNINI, A.; MAZZAGLIA, A.; 2021. Development of a TaqMan qPCR assay for the detection and quantification of *Gnomoniopsis castaneae* in chestnut tissues. *For Pathol* 51(4), 1-10.

VANNINI, A.; VETTRAINO, A.M.; MARTIGNONI, D.; MORALES-RODRIGUEZ, C.; CONTARINI, M.; CACCIA, R.; PAPANATTI, B.; SPERANZA, S.; 2017. Does *Gnomoniopsis castanea* contribute to the natural biological control of chestnut gall wasp? *Fungal Biol* 121(1), 44-52.

VETTRAINO, A.M.; LUCHI, N.; RIZZO, D.; PEPORI, A.L.; PECORI, F.; SANTINI, A.; 2021. Rapid diagnostics for *Gnomoniopsis smithogilvyi* (syn. *Gnomoniopsis castaneae*) in chestnut nuts: new challenges by using LAMP and real-time PCR methods. *AMB Express* 11(1).

VISENTIN, I.; GENTILE, S.; VALENTINO, D.; GONTHIER, P.; TAMIETTI, G.; CARDINALE, F.; 2012. *Gnomoniopsis castanea* sp. nov. (*Gnomoniaceae*, *Diaporthales*) As the Causal Agent of Nut Rot in Sweet Chestnut. *J Plant Pathol* 94(2), 411-419.

WHITE, T.J.; BRUNS, T.D.; LEE, S.B.; 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *PCR protocols: a guide to methods and applications*, 18(1), 315-322.