

Boletín informativo

Número 61 Marzo 2008

Actividades de los socios

Carlos Garrido Crespo defendió el 17 de diciembre de 2007 en la Universidad de Cádiz la Tesis Doctoral titulada "*Caracterización microbiológica y molecular de cepas de Colletotrichum responsables de la antracnosis en fresas*" obteniendo la calificación de Sobresaliente *Cum Laude* por unanimidad. La tesis fue realizada en el Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias del Mar y Ambientales, Universidad de Cádiz, y dirigida por el Dr. Jesús Manuel Cantoral Fernández y la Dra. María Carbú Espinosa de los Monteros.

Laura Cortada recibió el Premio Claudi Barberá al mejor trabajo presentado por un estudiante durante las VIII Jornadas de Protección Vegetal. El título del trabajo premiado fue "*Evaluación de patrones de tomate para el control de Meloidogyne javanica*" firmado por L. Cortada, F. J. Sorribas, C. Ornat, I. Kaloshian y S. Verdejo-Lucas. La jornada estuvo organizada por la Institució Catalana d'Estudis Agraris y se desarrolló en Barcelona el 22 febrero 2008".

Libros

Pratylenchus (Nematoda: Pratylenchidae): Diagnosis, Biology, Pathogenicity and Management. P. Castillo, N. Vovlas. 2007. Brill Academic Publishers, Leiden. ISBN: 978-90-04-15564-0. 150,00 €.

Secondary Metabolites in Soil Ecology. Karlovsky P. (Ed.). 2008. Springer. ISBN: 978-3-540-74542-6. 129,95 €.

Integrated Management and Biocontrol of Vegetable and Grain Crops Nematodes. Ciancio A.; Mukerji K.G. (Eds.). 2008. Springer. ISBN: 978-1-4020-6062-5. 144,95 €

Westcott's Plant Disease Handbook. 7ª edición. Horst R. K. (Ed.). 2008. Springer. ISBN: 978-1-4020-4584-4. 249,00 €.

Plant Virus Evolution. Roossinck M.J. (Ed.). 2008. Springer. ISBN: 978-3-540-75762-7. 109,95 €.

Plant pathology: Concepts and laboratory exercises. 2ª edición. Trigiano R.N., Windham M.T., Windham A.S. (Eds.). 2008. CRC Press. ISBN: 978-1-4200-4669-1. 74,08 €.

Management of Nematode and Insect-Borne Diseases. Mukerji K.G., Saxena G. 2008. CRC Press. ISBN: 978-1-5602-2134-0. 60,00 €.

Mineral Nutrition and Plant Disease. Datnoff L.E., Elmer W.H., Huber D.M. (Eds.) 2007. APS Press. ISBN: 978-0-89054-346-7. 60,00 €.

Mycotoxins in fruits and vegetables. Barkai-Golan R., Nachman Pastor G. (Eds.). 2008. Elsevier Academic Press. ISBN: 978-0-12-374126-4. 91,95 €.

Mushroom pest and disease control. Gaze R., Fletcher J. 2007. Elsevier Academic Press. ISBN: 978-0-12-373984-1. 57,00 €.

Publicaciones de la Sociedad Española de Fitopatología

PATOLOGÍA VEGETAL (2 Volúmenes). G. Llácer, M.M. López, A. Trapero, A. Bello (Editores). 1996. Mundi Prensa Libros S.A. - Phytoma España. 58.90 €.

ENFERMEDADES DE LAS CUCURBITÁCEAS EN ESPAÑA Monografía N° 1. Sociedad Española de Fitopatología. J.R. Díaz Ruíz, J. García-Jiménez (Editores). 1994. Phytoma-España. 37.60 €.

ENFERMEDADES DE LOS CÍTRICOS Monografía N° 2. Sociedad Española de Fitopatología. N. Duran-Vila, P. Moreno (Editores). 2000. Mundi Prensa Libros S.A. 28.85 €.

ENFERMEDADES DE LOS FRUTALES DE PEPITA Y HUESO Monografía N° 3. Sociedad Española de Fitopatología. E. Montesinos, P. Melgarejo, M.A. Cambra, J. Pinochet (Editores). 2000. Mundi Prensa Libros S.A. 28.85 €.

HERRAMIENTAS BIOTECNOLÓGICAS EN FITOPATOLOGÍA. Pallás V., Escobar C., Rodríguez Palenzuela P., Marcos J.F. (Editores) 2007. Mundi Prensa Libros S.A. 49,00 €.

Más información en:

www.sef.es/sef/index.jsp?pag=publicaciones

Congresos

Third International Late Blight Conference. Pekín, China. 3-6 Abril 2008.
<http://research.cip.cgiar.org/typo3/web/index.php?id=1925>

ISTA Seed Health Testing Workshop. Pretoria, Sudáfrica. 7-11 Abril 2008.
<https://www.seedtest.org/en/workshopdetail--1--1113--211--61.html>

6th Seed Health Symposium of the International Seed Testing Association. Parque Nacional Kruger, Sudáfrica. 14-18 Abril 2008.
<http://www.up.ac.za/conferences/ielc/>

International Symposium of Virus Diseases in Ornamentals. Haarlem, Holanda. 20-24 Abril 2008.
<http://www.plantenvirologie.nl/ISVDOP12/>

IOBC/WPRS Working Group "Integrated Control in Protected Crops, Temperate Climate". Sint Michielsgestel, Holanda. 21-25 Abril 2008.
<http://www.iobcgreenhouse2008.com/UK>

VIII Symposium on Plant Biotechnology. Santa Clara, Cuba. 23-25 Abril 2008.
<http://simposio.ibp.co.cu/>

X Reunión Mundial de *Trichoderma*, VII Congreso Nacional de Fitopatología y II Congreso Nacional de Fitoprotección. San José, Costa Rica. 21-23 Mayo 2008.
<http://trichoderma-world-congress.com/default.aspx>

Plant-Microbial Interactions 2008. Cracovia, Polonia. 2-6 Julio 2008.
<http://www.pmi2008.org/>

17th Triennial Conference of the European Association for Potato Research. Brasov, Rumanía. 6-10 Julio 2008.
<http://www.eapr2008-brasov.com/>

5th International Congress on Nematology. Brisbane, Australia. 13-18 Julio 2008.
<http://www.5icn.org/>

X Congreso Internacional / XXXV Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de Fitopatología. Monterrey, México. 20-24 Julio 2008. <http://www.sociedad.cjb.net/>

XII International Congress of Bacteriology and Applied Microbiology, XII International Congress of Mycology and XIV Congress of Virology. Estambul, Turquía. 5-15 Agosto 2008. <http://www.iums2008.org/>

3rd International *Phytophthora* and *Pythium* workshop. Turín, Italia, 23-24 Agosto 2008. http://www.aphis.usda.gov/plant_health/identification/phytophthora/

10th International *Fusarium* Workshop and *Fusarium* Genomics Workshop. Cerdeña, Italia. 30 Agosto – 2 Septiembre 2008. <http://www.ars.usda.gov/Main/docs.htm?docid=9850>

9th International Congress of Plant Pathology. Turín, Italia., 24-29 Agosto 2008. <http://www.icpp2008.org>

Fourth International Symposium on *Rhizoctonia*. Berlin, Alemania. 20-22 Agosto 2008. <http://www.rhizoctonia.org/>

First International Symposium on Biotechnology of Fruit Species. Dresden, Alemania. 1-5 Septiembre 2008. <http://www.biotechfruit2008.bafz.de>

IOBC/WPRS Working Group "Biological control of fungal and bacterial plant pathogens". Wädenswil, Suiza. 9-12 Septiembre 2008. <http://www.iobc-wprs.org/events/>

VI International Scientific Seminar on Plant Health. La Habana, Cuba. 22-26 Septiembre 2008. <http://www.censa.edu.cu/Default.aspx?tabid=57>

Patata 2008 - III Congreso Iberoamericano sobre Investigación y Desarrollo en Patata. Vitoria-Gasteiz. 5-9 Octubre 2008. <http://www.patata2008.com>

Diversifying crop protection. Montpellier, Francia. 13-15 Octubre 2008. http://www.endure-network.eu/international_conference_2008

3rd European Whitefly Symposium. Aguadulce, Almería. 20-24 Octubre 2008. <http://www.ews3.org/>

International conference on genetic control of plant pathogenic viruses and their vectors: towards new resistance strategies. Puerto de Santa María, Cádiz. 23-27, Noviembre 2008. <http://www.richalia.es/congreso/index.html>.

2nd International Symposium on Biological Control of Bacterial Plant Diseases. Orlando, EE.UU. 4-7 Noviembre 2008. JBjones@ufl.edu

XV Congreso Latinoamericano y XVIII Congreso Chileno de Fitopatología. Santiago, Chile. 12-16 Enero 2009. <http://www.puc.cl/agronomia/congresoalf>

International Forest Biosecurity Conference, 6th International Forest Vegetation Management Conference. Rotorua, Nueva Zelanda. 16-20 Marzo 2009. www.ensisjv.com/forestbiosecurity

BOLETÍN DE LA SEF

Publicación trimestral ISSN: 1998-513X

Íñigo Zabalgoitia, IRNA-CSIC (Salamanca), izabalgo@usal.es
Jose Luis Palomo, C.R. Diagnóstico (Salamanca), jlp@usal.es

Interacción *Verticillium dahliae* Kleb.-*Capsicum annuum* L.: respuesta fisiológica e inducción de resistencia

José Díaz Varela, Federico Pomar Barbeito y Fuencisla Merino de Cáceres

Área de Fisiología Vegetal, Departamento de Biología Animal, Biología Vegetal y Ecología, Universidad de A Coruña Campus de A Zapateira, 15071 A Coruña

Verticillium dahliae es un patógeno de distribución mundial que provoca graves enfermedades vasculares en más de 160 especies de interés agronómico, incluyendo pimiento, tomate, algodón, alfalfa, patata, fresa y girasol. Las verticilosis causan importantes pérdidas económicas, y en muchos de los cultivos su control tiene poco éxito a pesar de la combinación de métodos químicos, culturales y biológicos.

Pocos hongos fitopatógenos exhiben una capacidad tan extraordinaria de infección y un rango tan amplio de huéspedes, que se revisa continuamente para incluir a cultivos que no eran considerados como tales. El hongo penetra en la planta a través de heridas o pequeños poros de las raíces, y aprovecha la corriente transpiratoria del xilema para distribuirse rápidamente a lo largo del todo el eje del vegetal. En el xilema puede producir la oclusión debido a la acumulación de diferentes materiales como tilosas o geles, hecho al que se le ha atribuido un papel fundamental en la aparición del marchitamiento típico de la enfermedad. Además de este síntoma, la verticilosis puede provocar epinastia, clorosis, necrosis, oscurecimiento vascular, abscisión foliar y enanismo. Mientras la planta permanece viva el hongo suele colonizar únicamente los vasos del xilema, compitiendo por los nutrientes con los tejidos del vegetal. Sólo después de la muerte del huésped el hongo coloniza los tejidos senescentes.

En el caso del pimiento (*Capsicum annuum* L.) no existen variedades resistentes al hongo, incluso la especie *Capsicum chinense* L., que se consideraba resistente, recientemente se ha caracterizado como susceptible (Gayoso et al., 2007). En consecuencia, es importante avanzar en el conocimiento de esta interacción, no sólo por su interés científico sino también porque puede servir de base para el futuro manejo de la enfermedad. Las estrategias para controlar o reducir el daño causado por el hongo pueden ser muy diversas, pero su desarrollo precisa de un mejor conocimiento de la fisiología de la

respuesta de *Capsicum annuum* a *Verticillium dahliae*. En este artículo se muestran los resultados de la investigación de varias de esas respuestas del huésped ante la infección por el hongo, que dan una idea de los mecanismos fisiológicos que gobiernan esta interacción, así como los estudios enfocados a inducir resistencia frente al hongo y caracterizar ese fenómeno.

Modificaciones en las ligninas y la actividad peroxidasa están relacionados con el mantenimiento de la capacidad fotosintética en distintos cultivares de pimiento infectadas con V. dahliae

La inoculación con *V. dahliae* de tres cultivares de *C. annuum*, Padrón, Yolo Wonder y Luesia, provocó un cambio generalizado en el metabolismo fenólico de las plantas y un menor desarrollo global de las mismas (Pomar et al., 2004). La cuantificación de parámetros como el peso fresco y la superficie foliar, nos permitieron comprobar como el cultivar Padrón era más tolerante que el cultivar Luesia, comportándose el cultivar Yolo Wonder de forma intermedia. Los cambios en el cultivar Padrón que le permiten este comportamiento ante la infección, incluyen aumento en los compuestos fenilpropanoides, incremento de la actividad peroxidasa y profundos cambios en la cantidad y estructura de las ligninas. Durante la infección con *V. dahliae* se produjo un aumento en la cantidad total de fenoles libres, aunque la concentración de ácido clorogénico, el principal compuesto fenólico identificado, no sufrió cambios. En el caso de fenoles ligados a la pared celular, se observó un aumento significativo en los niveles de ácido ferúlico (un compuesto C₆C₃) y de vanillina (un compuesto C₆C₁). Este tipo de compuestos fenólicos podrían actuar como barreras físico-químicas ante la colonización del hongo, o como señales en la inducción de genes de resistencia tanto de forma local como sistémica.

La inoculación con *V. dahliae* provocó también un cambio muy importante en la cantidad de

lignina total de los tallos analizados mediante el método del bromuro de acetilo; en este caso, también los niveles de lignificación alcanzados en las plantas inoculadas del cultivar Padrón fueron superiores que en cualquiera de los otros dos cultivares. Esta acumulación de ligninas podría suponer un mecanismo por el cual las plantas del cultivar Padrón restringiesen el crecimiento de las hifas del hongo en el xilema. Esta respuesta de lignificación fue estudiada más en profundidad mediante dos métodos degradativos, la oxidación con nitrobenzono (NBO) y la tioacidolisis. La oxidación con nitrobenzono solubiliza tanto las fracciones de las ligninas condensadas como no condensadas presentes en las paredes primarias y secundarias, mientras que en el caso de la tioacidolisis se solubiliza sólo la fracción no condensada de las ligninas, concretamente las cadenas lineales β -O-4, que mayoritariamente se localizan en las paredes secundarias. Los resultados obtenidos por la NBO, nos muestran que el contenido en monómeros hidroxifenilo, guayacilo y siringilo (H+G+S) de las plantas inoculadas es 1,15 veces mayor que en las plantas control (hecho coincidente con la cuantificación de ligninas totales). Sin embargo, la información más importante que nos proporciona este análisis son las variaciones en la proporción de cada uno de los monómeros, así en las plantas control las proporciones (H:G:S) son de (6:60:34) y en las plantas inoculadas pasan a ser de (55:34:11). Este aumento en los grupos hidroxifenilo, hacen a las ligninas de las plantas inoculadas potencialmente más entrecruzadas, ya que el aumento en grupos H podría provenir de una mayor cantidad de alcohol *p*-cumárico, o incluso del ácido *p*-cumárico que actuaría de puente entre las ligninas y los carbohidratos de la pared. Los resultados obtenidos por tioacidolisis aportan dos nuevos hechos, por una parte se observa que los niveles de monómeros β -O-4 de las ligninas en las plantas inoculadas se reducen significativamente lo que nos indica una naturaleza mucho más condensada en estas ligninas. Por otra parte, estos resultados indican que los niveles de los *p*-hidroxibenzaldehídos, vanillina y siringaldehído aumentan, lo cual es especialmente importante ya que los grupos carbonilo de estos aldehídos podrían formar bases de Schiff con los grupos amino de las proteínas, inactivando su capacidad enzimática. Esta acumulación de grupos carbonilo se confirma a través de los estudios por espectroscopia de infrarrojos, con un aumento de 6,6 veces en la magnitud del pico correspondiente a este grupo funcional en las ligninas de plantas inoculadas. Por este mecanismo las plantas podrían

retardar el crecimiento del patógeno en el xilema inactivando actividades de tipo hidrolasa.

La inoculación provocó también un aumento importante en la actividad peroxidasa de los tres cultivares. Este aumento se comenzaba a manifestar de manera significativa a partir de los 7 días post inoculación, y a los 21 días los valores de actividad peroxidasa eran de 10 a 12 veces superiores en los tallos de las plantas inoculadas. Todos los cambios mostrados en las ligninas y en la actividad peroxidasa parecen corresponderse con la mayor tolerancia de los cultivares Padrón y Yolo Wonder frente al cultivar Luesia.

Al analizar el comportamiento del sistema fotosintético de los diferentes cultivares tras la inoculación mediante el estudio de la fluorescencia de las clorofilas, se ha observado que los dos cultivares tolerantes (Padrón y Yolo Wonder), muestran niveles de Φ_{PSII} (rendimiento cuántico del fotosistema II) y de ETR (tasa de transferencia de electrones) significativamente más altos cuando se aplican valores de radiación fotosintéticamente activa saturantes. Este comportamiento, sin embargo, no se observa en el caso del cultivar Luesia, en el cual existe un descenso significativo en ambos parámetros como consecuencia de la inoculación. Asimismo, se produce una caída de la capacidad de disipar calor, como se observa en los valores de NPQ (“nonphotochemical quenching”). Estos datos demuestran que la maquinaria fotosintética, en este cultivar, se encuentra gravemente dañada a consecuencia de la inoculación.

Acumulación de azufre elemental en pimiento como fitoalexina inorgánica en respuesta a la infección con V. dahliae

Las fitoalexinas son compuestos de bajo peso molecular y con actividad antimicrobiana que son sintetizados y acumulados por las plantas tras la exposición a un microorganismo. Entre todas las fitoalexinas descubiertas hasta el momento, probablemente la más sencilla sea el azufre elemental. Nuestro grupo de investigación ha estudiado la presencia de este azufre elemental en el sistema vascular de dos variedades de pimiento (Yolo Wonder y Luesia) en respuesta a la inoculación con el patógeno *V. dahliae* (Novo et al., 2007). Mediante el análisis por cromatografía de gases acoplada a espectroscopia de masas pudimos detectar una acumulación de este elemento en tallos de los dos cultivares tras ser inoculados con el hongo, mientras que en ninguna de las muestras control se detectó este azufre elemental. En el caso del cultivar Yolo Wonder a 10 días de la inoculación se empezaba a detectar la

presencia de azufre, mientras que en el cultivar Luesia era necesario llegar a los 15 días para alcanzar niveles de azufre detectables. Asimismo, en el caso de Yolo Wonder los niveles del elemento en la etapa final del experimento alcanzaron valores de 12,95 $\mu\text{g g}^{-1}$, mucho mayores que los alcanzados en el cultivar Luesia (3,6 $\mu\text{g g}^{-1}$). La presencia de una concentración de azufre más elevada en el cultivar Yolo Wonder puede jugar un importante papel en la mayor tolerancia que muestra frente a la verticilosis.

Los estudios complementarios realizados mediante microscopía electrónica de barrido acoplada a microanálisis de dispersión de rayos X, permitieron detectar el azufre elemental en los haces vasculares de ambos cultivares, pero su localización era dispersa y no parecía estar localizada preferentemente en las inmediaciones del hongo (Fig. 1).

Resistencia inducida en pimiento a V. dahliae

Ya que la verticilosis del pimiento (*Capsicum annuum* L.) no se controla por medios químicos, ni se dispone de cultivares resistentes, la lucha biológica y la resistencia inducida son opciones reales de lucha contra esta enfermedad. En cuanto a la resistencia inducida, existen numerosos estudios que describen ese fenómeno y su habitual sistemicidad en otras plantas, estando bien caracterizados dos tipos: la SAR (Resistencia sistémica adquirida) y la PGPR-ISR (Resistencia sistémica inducida por rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal, a menudo referida simplemente como ISR). Los estudios más profundos sobre sus mecanismos se han realizado en la planta modelo *Arabidopsis thaliana*, pero es interesante saber si las especies de interés agronómico se comportan igual. En nuestro laboratorio hemos realizado varios estudios acerca de este fenómeno en pimiento, usando entre otros patógenos *Verticillium dahliae*. Una aproximación ha sido la inducción de resistencia mediante señales químicas bien conocidas como salicilato y jasmonato. En un estudio comparativo observamos que ambas fitohormonas inducen resistencia en pimiento frente a *Verticillium dahliae*, y *Phytophthora capsici*, mientras que frente a *Botrytis cinerea* sólo funciona el jasmonato. Diferentes parámetros bioquímicos relacionados con la defensa (peroxidasas, β -1,3-glucanasas, quitinasas y fenoles ligados a pared) fueron inducidos de igual modo por jasmonato y salicilato, algo que contrasta con el hecho de que cada una de estas señales participa en diferentes rutas. Sólo los fenoles solubles mostraron una inducción

diferencial, aumentando solamente en respuesta a salicilato, probablemente como efecto inductor de su propia síntesis en la planta. También hemos ensayado como agente inductor la capsicina (metabolito fenólico del fruto de pimiento) y su análogo sintético la vanillilnonanamida. Ambos muestran un importante efecto fungistático, que parece ser responsable en buena medida del efecto protector frente a la verticilosis obtenido en nuestros ensayos, aunque también existen evidencias de una inducción de resistencia, tales como un aumento de la actividad quitinasa, y un moderado incremento en la expresión de genes relacionados con la defensa).

Otra estrategia de inducción de resistencia que hemos desarrollado es la preinoculación con aislados de *Fusarium oxysporum*. Hemos ensayado un aislado patógeno de tomate pero no de pimiento (*Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* FOL) y un aislado no patógeno (*Fusarium oxysporum* Fo47) obtenido en Francia a partir de suelos supresivos. FOL, al ser patógeno de tomate, no es aplicable en biocontrol, pero es una herramienta útil para estudiar la interacción con la planta y compararla con un aislado no patógeno como Fo47. Los resultados con ambos aislados son positivos en cuanto al nivel de protección conseguido, con una reducción apreciable de los síntomas de la verticilosis tanto usando FOL como Fo47. Sin embargo, los mecanismos subyacentes a ese control no parecen ser los mismos (Tabla 1). FOL no parece competir o antagonizar a *Verticillium dahliae* (Díaz et al., 2005), mientras que Fo47 inhibe su crecimiento, aparentemente por competición. Ambos, FOL y Fo47, estimulan la expresión de varios genes de *Capsicum annuum* relacionados con la defensa, que codifican para una PR1, una quitinasa, una peroxidasa y una sesquiterpeno ciclasa. Sin embargo, FOL induce la expresión de estos genes en el tallo de la planta entre 5 y 20 veces, según el gen considerado, con respecto a los valores del control y sólo unas dos veces en la raíz, mientras que la inducción por Fo47 es más modesta en el tallo (1,5 a 2,5 veces) y mayor en la raíz, donde oscila entre 2,5 y 6 veces. Según estos resultados, FOL actuaría exclusivamente por inducción de resistencia y Fo47 por una combinación de competición e inducción de resistencia.

Fig. 1.- Sección longitudinal de tallo del cv. Luesia inoculado con UDC53Vd. (A) zona intermedia del tallo, (B) espectro obtenido del microanálisis de rayos x de la muestra y (C y D) mapa del azufre sobre la zona del tejido analizada. La barra equivale a 10 μ m.

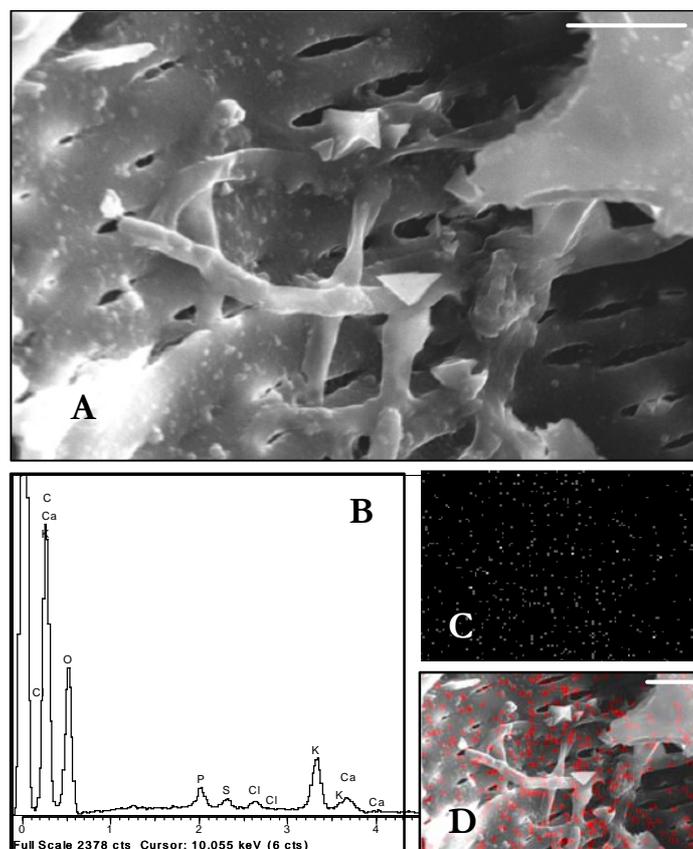


Tabla 1. Comparativa entre FOL y Fo47 como agentes de biocontrol en pimiento.

Agente inductor	Protección frente a verticilosis	Competición a in vitro con <i>V. dahliae</i>	Inducción de expresión génica asociada a resistencia	Protección frente a <i>B. cinerea</i>	Señalización por etileno
FOL	Si	Si	Si	Si	Si
Fo47	Si	No	Si	No	no determinada

Díaz J, Silvar C, Varela MM, Bernal A, Merino F. 2005. *Fusarium* confers protection against several mycelial pathogens in pepper plants. *Plant Pathology* 54: 773-780.

Gayoso C, Martínez de Ilárduya O, Pomar F, Merino F. 2007. Assessment of real-time PCR as a method to determine the presence of *Verticillium dahliae* Kleb in different *Solanaceae* cultivars. *European Journal of Plant Pathology* 118: 199-209.

Novo Novo M, Gayoso C, Pomar F, Lucas M, Ros Barceló A, Merino F. 2007. Sulphur accumulation after *Verticillium dahliae* infection in pepper cultivars differing in degree of resistance to this pathogen, *Plant Pathology* 56: 998-1004.

Pomar F, Novo M, Bernal MA, Merino F, Ros Barceló A. 2004. Changes in stem lignins (monomer composition and cross-linking) and peroxidase are related with the maintenance of leaf photosynthetic integrity during *Verticillium* wilt in *Capsicum annuum*. *The New Phytologist* 163: 111-123.