



## FUSARIOSIS VASCULARES Y VERTICILOSIS: SITUACIÓN ACTUAL Y PERSPECTIVAS PARA SU CONTROL

JIMÉNEZ-DÍAZ, R.M.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>ETSIAM, Universidad de Córdoba, Apdo. 3048, 14080 Córdoba.

<sup>2</sup>Instituto de Agricultura Sostenible, CSIC, Apdo. 4084, 14080 Córdoba.

Las fusariosis vasculares (cuyos agentes son poblaciones con patogenicidad especie-específica *-formae speciales-* del complejo de especies *Fusarium oxysporum*) y verticilosis (causadas fundamentalmente por *Verticillium albo-atrum* y *V. dahliae*) interfieren el uso eficiente del agua por la planta, y continúan siendo consideradas entre las enfermedades causadas por hongos de suelo más importantes por la severidad de sus ataques y la dificultad de su control eficiente. Esto último deriva de características biológicas y ecológicas compartidas por dichos patógenos y enfermedades: i) el confinamiento del patógeno en el tejido xilemático de la planta durante la patogénesis; ii) la capacidad de sobrevivir prolongadamente en el suelo mediante clamidosporas (*F. oxysporum*), microesclerocios (*V. dahliae*), o micelio melanizado (*V. albo-atrum*) y la infección de plantas no susceptibles; y iii) la diversidad genética y patogénica existente en las poblaciones de los patógenos. La utilización de cultivares resistentes es la estrategia de control más económicamente eficiente, practicable, y ambientalmente respetuosa de Fusariosis Vasculares y Verticilosis, pero su uso óptimo depende del potencial evolutivo de los patógenos, reflejado por la estructura genética de sus poblaciones. Durante la última década, estudios de compatibilidad vegetativa, de diversos marcadores moleculares, y de secuencias génicas, indican que las poblaciones de dichos patógenos tienen estructura clonal pero la diversidad genética en ellas es mayor que la presumiblemente asignable a su reproducción estrictamente asexual. Así, aunque algunas *forma specialis* de *F. oxysporum* son monofiléticas (p.ej., *albedinis*, *canariensis*, *ciceris*), la gran mayoría son polifiléticas, i.e., han adquirido la patogenicidad en eventos independientes y múltiples (p.ej., *asparagi*, *cubense*, *dianthi*, *lycopersici*, *melonis*, *vasinfectum*), de manera que los linajes clonales que la componen contienen uno o más grupos de compatibilidad vegetativa (VCG) y una o más razas patogénicas. Limitados estudios sobre la evolución de la virulencia indican que en el caso de monofilia las razas pueden derivar unas de otras mediante cambios discretos de ganancia o pérdida de virulencia (p.ej., *ciceris*) en ausencia de resistencia del huésped. Por el contrario, entre las *formae speciales* polifiléticas: a) las razas patogénicas pueden derivar de poblaciones parasíticas no patogénicas (p.ej., *vasinfectum*); b) unas razas pueden estar relacionadas filogenéticamente pero otras tienen orígenes independientes (p.ej., *cubense*); y c) una misma raza puede tener origen independiente en unos casos y en otros derivar de otra raza preexistente (p.ej., *lycopersici*). A diferencia de *F. oxysporum*, las poblaciones de *V. dahliae* no presentan patogenicidad especie-específica pero están patogénicamente adaptadas a huéspedes determinados y se caracterizan por un continuum de virulencia entre los aislados. Sin embargo, estudios recientes indican la existencia de patogenicidad cultivar-específica en lechuga y tomate, con dos razas patogénicas en cada caso que han evolucionado de forma independiente, y al menos en un caso sin presión de selección por resistencia. Además del uso de cultivares resistentes, en el control de fusariosis vasculares y verticilosis se ha producido notable progreso en la utilización de tecnología para la certificación de material vegetal libre de inóculo, enmiendas orgánicas, y agentes de biocontrol, que pueden facilitar la práctica de estrategias de control integrado.

## **CARACTERÍSTICAS Y CONTROL DE LOS ATAQUES POR NEMATODOS NODULADORES (*Meloidogyne* spp.) Y LESIONADORES DE LAS RAÍCES (*Pratylenchus* spp.) EN CULTIVOS HORTÍCOLAS Y FRUTALES**

**CASTILLO, P.**

*Instituto de Agricultura Sostenible, CSIC, Apdo. 4084, 14080 Córdoba. E-mail: ag1cascp@uco.es*

Los nematodos causan enfermedades de gran significación en la producción agrícola por la magnitud de las pérdidas que ocasionan y la dificultad para combatirlos eficientemente. Sin embargo, las infecciones del sistema radical vegetal por nematodos generalmente no causan síntomas específicos en la parte aérea de los cultivos agrícolas, por lo que suelen pasar desapercibidas al observador inexperto y sus efectos perjudiciales son atribuidos a diversos estreses abióticos. Por ello, los nematodos fitoparásitos se han denominado como los '*enemigos ocultos*' de la agricultura. Sin embargo, los nódulos radicales inducidos por diversas especies de *Meloidogyne*, y las lesiones necróticas del sistema radical causadas por especies de *Pratylenchus*, constituyen síntomas diagnósticos de estas enfermedades que afectan severamente cultivos hortícolas y frutales en España. En cultivos hortícolas, los principales problemas nematológicos son causados por infecciones de *Meloidogyne arenaria*, *M. incognita* y *M. javanica*, que causan una nodulación severa en la raíz y pérdidas de producción que pueden oscilar entre el 15 y el 60%. Aunque las condiciones ambientales prevalentes en España facilitan que dichas infecciones ocurran en cultivos al aire libre, los cultivos bajo plástico (berenjena, calabacín, melón, pepino, sandía, tomate, etc.) son afectados con mayor intensidad debido a que los intervalos de temperatura y humedad que se producen en los invernaderos son condiciones favorables tanto para el desarrollo de los cultivos como para el desarrollo de estos nematodos. En frutales, los principales problemas nematológicos se deben a infecciones por las especies de *Meloidogyne* anteriormente referidas y *M. hispanica* en melocotonero, e infecciones por lesionadores de raíz, especialmente *Pratylenchus vulnus* cuyas pérdidas pueden estimarse cercanas al 10-15%. La complejidad de las enfermedades que afectan al sistema radical de la planta dificulta el control eficiente de éstas y determinan que las acciones y medidas más adecuadas para ello deban ser de naturaleza preventiva y requieran la aplicación de estrategias de control integrado. En ambos casos, la toma de decisiones debe estar basada en el conocimiento e información disponibles acerca de las características del patosistema en cuestión. En esta ponencia se analizará la eficacia de determinadas prácticas de control de dichas enfermedades, incluyendo prácticas culturales, desinfestación de sustratos, utilización de cultivares resistentes, protección con micorrizas arbusculares, control biológico, etc., aplicadas individualmente o mediante estrategias de control integrado.

## COLAPSO DE PLANTAS HORTÍCOLAS DE ETIOLOGÍA COMPLEJA

**GARCÍA-JIMÉNEZ, J.**

*Instituto Agroforestal Mediterráneo. Universidad Politécnica de Valencia*

### INTRODUCCIÓN

El título de esta ponencia ya define en sí la problemática del tema abordado y las controversias que en algunos casos ha suscitado su etiología.

Bajo los ambiguos términos “colapso” o “muerte súbita” (en inglés, “collapse”, “sudden death”, “vine decline”, etc.) se engloban una serie de afecciones cuya expresión final es la muerte rápida de la planta, generalmente en estados avanzados de su desarrollo, provocada por un desequilibrio patente entre las necesidades hídricas de la parte aérea y la cantidad real de agua que llega a dicha parte aérea.

En el contexto español se han descrito colapsos en dos tipos de plantas: tomate y cucurbitáceas.

El colapso del tomate es una afección localizada en el sureste peninsular y en Canarias que, en sus primeros estadios, se caracteriza por una ligera flaccidez transitoria de las plantas en las horas centrales del día que posteriormente progresa hasta que éstas acaban marchitándose y muriendo. Se trata de una enfermedad asociada al Virus del mosaico del pepino dulce (PepMV), no existiendo actualmente consenso en si únicamente la presencia del virus es la desencadenante del síndrome o si resulta necesaria la actuación conjunta del chitridiomyceto *Oidium brassicae*.

En cucurbitáceas, el colapso se ha descrito principalmente en melón y, de forma más esporádica, en sandía y pepino. A diferencia del tomate, el colapso de cucurbitáceas es conocido desde hace bastantes años y su problemática desde un punto de vista etiológico resulta más compleja, por lo que puede servir de modelo de estudio de este tipo de afecciones. Dado que el tema es muy amplio y ha generado mucha literatura científica que no se podría abordar en el espacio de esta ponencia, aquí sólo serán tratados algunos temas relativos a su etiología y diagnóstico.

Un primer aspecto que debe ser aclarado (y que posiblemente haya sido el causante de las discusiones sobre la etiología) es que al referirse al colapso no se está hablando de una única enfermedad. Ésta viene definida por el bien conocido triángulo, en el que interaccionan un agente patógeno y una planta hospedante en unas condiciones ambientales adecuadas para que se establezca una relación de patogénesis. En el colapso de cucurbitáceas se da una situación compleja (más propiamente se debería hablar de “colapsos”) que se podría definir, en unos casos, como un conjunto de enfermedades (cuando actúa cada patógeno individualmente) y, en otros, como una enfermedad de etiología compleja (cuando actúan varios agentes patógenos simultáneamente).

Otra circunstancia que ha contribuido a la controversia ha sido confundir síntoma final con enfermedad. Para diagnosticar correctamente una enfermedad resulta fundamental el estudio completo de su síndrome y no ceñirse a la aparición de los síntomas finales. Un estudio cuidadoso de la evolución de los síntomas aéreos y subterráneos (que en algunos casos puede extenderse hasta los primeros estadios del desarrollo de la planta) permitiría delimitar los diferentes tipos de colapso y sus agentes implicados. Un estudio que se limite exclusivamente al análisis en el momento en que se desencadena el síndrome de colapso puede llevar a conclusiones erróneas.

## COLAPSO DE CUCURBITÁCEAS: AGENTES IMPLICADOS

Son numerosos los agentes que se han descrito en la bibliografía asociados a colapso de cucurbitáceas, entre los que están virus (virus del cribado o MNSV), bacterias (*Erwinia tracheiphila* y *Serratia marcescens*) y hongos. A continuación se presenta una perspectiva global de todos ellos.

El virus del cribado fue descrito a finales de la década de los setenta, siendo detectado pocos años después en España sobre cultivos de melón en Almería y Aragón, habiéndose extendido posteriormente por otras zonas productoras. Se transmite por *Olpidium bornovanus*, chitridiomyceto que infecta las raíces. En condiciones de campo, el colapso causado por MNSV siempre está asociado a la presencia de este hongo, que, por sí solo, no es capaz de desencadenar el síndrome. Antes del colapso de las plantas se observan diferentes síntomas como manchas cloróticas en hojas que posteriormente se necrosan, necrosis de los nervios de las hojas (enrejado), zonas acorchadas en tallos, manchas necróticas en frutos, etc. Su diagnóstico se realiza mediante serología y PCR.

*E. tracheiphila* es la causante de la marchitez bacteriana, encontrada principalmente en Norteamérica afectando, sobre todo, a pepino y melón. Esta bacteria afecta al xilema y es transmitida por escarabajos de los géneros *Acalymma* y *Diabrotica*.

*S. marcescens* es la causante de una enfermedad conocida como “cucurbit yellow vine decline”, encontrada en diversas zonas de Estados Unidos a finales de la década de los ochenta. Originalmente detectada sobre calabaza, posteriormente se ha observado también sobre melón y sandía. La bacteria invade el floema de las plantas provocando su pardeamiento y las plantas afectadas amarillean y mueren rápidamente.

Entendido el colapso en un sentido amplio, de marchitez de las plantas de forma rápida en estados avanzados de su desarrollo, son numerosos los hongos que pueden provocarlo; entre ellos están los causantes de enfermedades vasculares (*Verticillium dahliae*, *V. alboatrum* y formas especializadas de *Fusarium oxysporum*), de afecciones de cuello (*Didymella bryoniae*, *F. solani* f.sp. *cucurbitae*, *Lasiodyplodia theobromae*, *Macrophomina phaseolina*, *Myrothecium roridum*, *Phomopsis cucurbitae*, *P. sclerotioides*, *Rhizoctonia solani*) y de raíz (*Acremonium cucurbitacearum*, *Monosporascus cannonballus*, *Nodulisporium melonis*, *Plectosphaerella cucumerina*, *Rhizopycnis vagum*). No obstante, dado que tanto las enfermedades vasculares como las podredumbres de cuello tienen unos síntomas aéreos específicos en vasos y cuello fácilmente identificables, el término “colapso” se aplica específicamente para los hongos que atacan a la raíz. En lo que sigue se abordan estos patógenos por orden de importancia en lo que respecta a su patogenicidad, incidencia en España y distribución mundial. Todos ellos se detectan mediante aislamiento en medio de cultivo y PCR, utilizando cebadores específicos.

*Monosporascus cannonballus* es, de todos ellos, el que se ha descrito con una más amplia distribución mundial. Se trata de un patógeno monocíclico que produce necrosis y podredumbre de raíces y que es fácilmente identificable por los peritecios que en forma de puntos negros aparecen sobre raíces en estados avanzados de colonización.

*Acremonium cucurbitacearum* fue descrito originalmente en España y posteriormente se ha detectado en Estados Unidos (California, Oklahoma y Texas) e Italia. Se trata de un patógeno con una alta capacidad competitiva en suelo, donde puede sobrevivir en ausencia de hospedantes (cucurbitáceas) durante largos períodos de tiempo. Provoca pardeamiento de raíces y necrosis de raicillas en un proceso ininterrumpido que comienza en los primeros estados de desarrollo de la planta.

*Nodulisporium melonis* fue descrito en 1995 en Japón afectando a melón. Aunque la morfología de los conidióforos es diferente a la de *A. cucurbitacearum*, el resto de sus características culturales y morfológicas así como la sintomatología que produce en plantas son idénticas a la de este patógeno. Asimismo, es reconocido por PCR mediante los mismos cebadores específicos y las secuencias de la región ITS del ADNr son idénticas en ambos hongos.

*Plectosphaerella cucumerina* (anamorfo: *Plectosporium tabacinum*) es otro agente implicado en colapso del melón detectado en España, Italia, Guatemala y Estados Unidos. Sus síntomas en raíz de melón son similares a los de *A. cucurbitacearum*, aunque se aísla con menor frecuencia, considerándose un hongo de importancia menor.

*Rhizopycnis vagum* ha sido detectado en raíces de melón con síntomas de colapso en diversos países de América Central, Italia y España. En raíces provoca coloraciones rosadas, necrosis y podredumbres, apareciendo microesclerocios y picnidios del hongo sobre las zonas afectadas. Al igual que el anterior, está considerado como un patógeno menor.

## ESTUDIOS DE PATOGENICIDAD

Un problema adicional que plantean los estudios de colapso es la reproducción del síndrome en los ensayos de patogenicidad.

Acerca del desencadenamiento final del síndrome de colapso se han propuesto dos hipótesis: una hace referencia a las altas necesidades hídricas de las plantas en el momento del engorde de los frutos, necesidades que no pueden ser cubiertas por las raíces afectadas. La otra hipótesis apunta a la redistribución de carbohidratos de las raíces hacia los frutos en formación, lo que provocaría una grave alteración del metabolismo de aquellas que se sumaría a su fuerte estado de deterioro. Estas hipótesis no son contrapuestas entre sí y, con gran probabilidad, el colapso aparece como suma de ambas.

En cualquier caso, la dificultad estriba en conseguir plantas que fructifiquen para que se produzca el estrés hídrico. Esto resulta muy difícil de conseguir en condiciones controladas: ensayos llevados a cabo en grandes contenedores de 150 l. de capacidad daban lugar a plantas de escaso desarrollo vegetativo y frutos de pequeño tamaño. Lo ideal sería la realización de los ensayos de patogenicidad en parcelas no infestadas con agentes patógenos, aspecto muy difícil de asegurar con hongos de amplia distribución en suelos. Junto a éste, otro problema es la erraticidad en el desencadenamiento de los síntomas finales de colapso muy condicionado por los factores ambientales (altas temperaturas, vientos cálidos, etc.) poco controlables.

Todo ello ha hecho que, a nivel mundial, todos los ensayos de patogenicidad se hayan realizado en macetas de tamaño medio en invernadero, con suelo esterilizado al que se añade el inóculo del patógeno y evaluando los daños en las raíces a los 30-45 días de la inoculación, carácter que ha resultado más discriminante que el de desarrollo de la parte aérea.

## SITUACIÓN ACTUAL DEL COLAPSO DE CUCURBITÁCEAS EN ESPAÑA

El colapso de cucurbitáceas es conocido en España desde la década de los ochenta, habiéndose experimentado una evolución en la incidencia de los agentes implicados en estos años.

En principio, *A. cucurbitacearum* era el principal agente implicado, habiéndose detectado en la práctica totalidad de zonas españolas con cultivo de melón. Junto a él aparecía

## *SIMPOSIO*

también el MNSV en zonas del sureste de Andalucía y, de forma muy esporádica, *M. cannonballus*. Este último hongo ha ido cobrando cada vez más importancia, hasta el punto de que, en estudios realizados recientemente en diversas zonas productoras de melón de la Comunidad Valenciana, se ha detectado en todas las parcelas muestreadas.

A lo largo de estos años también el MNSV se ha ido extendiendo a otras zonas productoras, con lo que actualmente es frecuente encontrar infecciones conjuntas del virus junto a estos hongos y los patógenos fúngicos menores descritos anteriormente. En consecuencia, podría afirmarse que, en líneas generales, el colapso del melón ha pasado de ser un complejo de enfermedades a una enfermedad de etiología compleja.

## THE MOLECULAR BASIS OF NON-HOST RESISTANCE TO INVASIVE FUNGI

BEDNAREK, P.<sup>1</sup>, LIPKA, V.<sup>2</sup>, STEIN, M.<sup>3</sup>, CONSONNI, C.<sup>1</sup>, HUMPHRY, M.<sup>1</sup>, SOMERVILLE, S.<sup>3</sup>, PANSTRUGA, R.<sup>1</sup>, SCHULZE-LEFERT, P.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Max-Planck-Institute for Plant Breeding Research, Carl von Linné Weg 10, 50829 Köln.

<sup>2</sup>University of Tübingen, Tübingen, Germany.

<sup>3</sup>Carnegie Institution of Washington, San Francisco, USA.

Non-host resistance describes the immunity of an entire plant species against non-adapted pathogens. Although this form of resistance is widespread in nature, it is still poorly understood at the molecular level. We have begun to dissect the molecular basis of non-host resistance by searching for *Arabidopsis* mutants that exhibit altered infection phenotypes to two ascomycete powdery mildew fungi that in nature colonize grass or pea species. The non-adapted fungi almost always fail to enter attacked leaf epidermal cells of wild-type *Arabidopsis*. The underlying resistance mechanisms involve specific isoforms of a plasma membrane resident syntaxin (PEN1) and ABC transporter (PEN3) as well as a peroxisomal glycosyl hydrolase (PEN2). PEN genes act as components of at least two separate and inducible resistance mechanisms. Each of the three PEN proteins become recruited to fungal entry sites. I will provide evidence suggesting functions of PEN proteins in secretory processes at the cell periphery that terminate fungal pathogenesis. Interestingly, adapted host powdery mildews of *Arabidopsis* appear to have evolved mechanisms to subvert PEN-dependent immune responses against fungal entry. Finally, whilst the basic machinery of the PEN secretory machinery evolved before the divergence of dicots and monocots, some components appear to be recent innovations of *Arabidopsis*/dicotyledonous plants.

## **IN PLANTA SUPPRESSIVENESS: IMPLICATIONS FOR THE BIOLOGICAL ENHANCEMENT OF CROPS AND A HEALTHY ROOT SYSTEM**

**SIKORA, R.A.**

*University Professor and Head, Soil Ecosystem Phytopathology and Nematology Unit, Institute for Crop Science and Ressource Conservation. Department of Plant Health, University of Bonn, Nussallee 9, D-53115 Bonn, Germany. E-mail: rsikora@uni-bonn.de*

Effective and economically acceptable biological control in horticultural crops requires not only detection of effective antagonists, but more importantly, site-specific application leading to high levels of control. Biological enhancement of transplants is an economically sound alternative to standard inundative treatment of 2500 tons of rhizosphere soil per hectare. To be effective, root health management must target the pathozone or the highly sensitive root zone present during early plant development. The “inside-out” concept using biological enhancement of seedlings, takes advantage of mutualistic endophytic microorganisms present in the endorhiza to establish *in-planta* suppressiveness in the root system. Recent results have shown that highly effective endophytes can be found in plants growing in normal as well as in fields suppressive to nematodes. The existence of suppressiveness often goes unnoticed, because pesticides applications often mask their existence. Mutualistic endophytes isolated from the endorhiza of plants growing in nematode infested fields have been used effectively to biologically enhance transplants and significantly reduce nematode damage. They have been effective in inducing *in-planta* suppressiveness to the root-knot nematode *Meloidogyne incognita* on tomato and *Radopholus similis* on banana. Greenhouse and field trials yielded significant increases in plant growth and yield, coupled with significant reductions in nematode infection. Investigations on the mode-of-action revealed novel “non-kill” mechanisms that are based on: disruption of attraction, recognition and penetration of the root. Split-root studies demonstrated systemic transmission of these mechanisms. Altered gene expression affecting root exudates is now being analysed. The results of these studies will be presented.



## **NATURAL SELECTION IN PLANT-PATHOGEN INTERACTIONS: FROM MODELS TO LABORATORY TO FIELD**

**BROWN, J.K.M.<sup>1</sup>, ATKINSON, M.A.<sup>1</sup>, RIDOUT, C.J.<sup>1</sup>, SACRISTAN, S.<sup>1,2</sup>, TELLIER, A.<sup>1</sup>, WYAND, R.A.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>*Department of Disease and Stress Biology, John Innes Centre, Norwich, NR4 7UH, England. E-mail: james.brown@bbsrc.ac.uk.*

<sup>2</sup>*Departamento de Biotecnología, Universidad Politécnica de Madrid. E-mail: solsacristan@hotmail.com.*

It is widely assumed that fitness costs of host disease resistance and pathogen virulence generate polymorphism at the respective loci. In theoretical models, however, fitness costs are necessary for polymorphism to exist but they are not sufficient, because the stability of polymorphism also depends on the epidemiology of the disease.

In models which include multiple loci, the stability of polymorphism is also determined by the relationship of costs to the number of resistance or virulence alleles. Polymorphism is most likely when the marginal cost of each additional resistance allele declines but that of additional virulence alleles increases. This conclusion is supported by emerging data on the organisation and evolution of resistance and avirulence genes.

It is also widely assumed that fitness costs are fixed. However, costs of resistances to strobilurin and triazole fungicides vary with environment conditions, both being more costly in situations which are sub-optimal for the fungus. Costs of different virulences vary and may also be affected by the environment.

Knowledge about fitness costs allows predictions to be made about the evolution of virulence and fungicide resistance in the agricultural environment and thus their responses to crop protection measures. Costs are generally small, however, implying that the dynamics of a pathogen's population structure may be dominated by other factors, such as linkage disequilibrium, rather than fitness costs.

## OC-1

**ANÁLISIS TRANSCRIPTÓMICO Y PROTEÓMICO EN *Erwinia chrysanthemi*: POSIBLE RELACIÓN CON PATOGENICIDAD Y SUPERVIVENCIA EN EL APOPLASTO**

**LÓPEZ-SOLANILLA, E., LLAMA-PALACIOS, A., CUARTAS, R., ROJAS, C., RODRÍGUEZ-PALENZUELA, P.**

*Centro de Biotecnología y Genómica de Plantas. Dpto. Biotecnología, Universidad Politécnica de Madrid. E.T.S.I Agrónomos, Ciudad Universitaria, 28040 Madrid. E-mail: pablo.rpalenzuela@upm.es*

La mayoría de las bacterias fitopatógenas colonizan el apoplasto de la planta. Este nicho es ácido (pH 4.5-6.5), pobre en nutrientes y posee diversas sustancias antimicrobianas. *Erwinia chrysanthemi* es un agente causal de podredumbres blandas en diversas especies vegetales. Su comportamiento patológico está caracterizado por una rápida necrosis de los tejidos parenquimáticos, debido a la secreción de enzimas pectolíticas. Se sabe que este proceso conduce a la muerte de la célula vegetal, a la liberación de los contenidos celulares al apoplasto vegetal y a la alcanización del apoplasto. Esto favorece el crecimiento bacteriano y la actividad de enzimas pectolíticas, abriendo un proceso que eventualmente produce la maceración de áreas más grandes. No obstante, diversos estudios han puesto de manifiesto la naturaleza multifactorial de la virulencia en esta bacteria, y en particular la importancia de los mecanismos bacterianos de resistencia a factores de defensa de la planta tales como, péptidos antimicrobianos, estrés oxidativo, pH ácido y otros. El objetivo esencial de este trabajo ha sido analizar la identificación de genes/proteínas que se expresan diferencialmente en medio ácido y en presencia de péptidos antimicrobianos.

Se ha empleado la técnica de electroforesis bidimensional Ettan-DIGE para analizar la expresión diferencial de proteínas bacterianas en presencia de péptidos y en condiciones de pH ácido. Las proteínas identificadas como diferenciales por este método han sido purificadas del gel, digeridas y sometidas a posterior análisis mediante espectroscopia de masas (MALDI-TOF), con objeto de lograr su identificación empleando el sistema MASCOT. Al mismo tiempo, se ha realizado un análisis transcriptómico mediante microarray en las dos condiciones citadas.

Los genes expresados diferencialmente en condiciones de pH ácido incluyen: transportadores de aminoácidos, proteínas de la membrana externa, así como enzimas implicadas en la resistencia a diversos tipos de estrés, tales como alcohol deshidrogenasas y peroxidasas. Los genes expresados diferencialmente por presencia de péptidos incluyen: reguladores transcripcionales, canales iónicos y enzimas implicadas en el metabolismo de azúcares o energético. Este tipo de análisis global nos está permitiendo identificar nuevos genes candidatos y nuevas redes de regulación posiblemente implicadas en procesos clave para la supervivencia de la bacteria en la planta.

## OC-2

**BASES MOLECULARES DE LA RESISTENCIA A FUNGICIDAS QoI EN *Podosphaera fusca*****FERNÁNDEZ-ORTUÑO, D.<sup>1</sup>, TORÉS, J.A.<sup>1</sup>, DE VICENTE, A.<sup>2</sup>, PÉREZ-GARCÍA, A.<sup>2</sup>**<sup>1</sup>Estación Experimental "La Mayora" (CSIC). Algarrobo-Costa, 29750 Málaga. E-mail: tores@eelm.csic.es<sup>2</sup>Grupo de Microbiología y Patología Vegetal-Unidad Asociada a CSIC. Departamento de Microbiología. Universidad de Málaga, 29071 Málaga. E-mail: aperez@uma.es

El principal método de control de *Podosphaera fusca*, agente causal del oídio de las cucurbitáceas, consiste en el empleo de fungicidas, aunque conlleva el grave problema de la aparición de resistencias. Entre los fungicidas más utilizados destacan las estrobilurinas, inhibidores de la respiración mitocondrial con diana en el centro Qo del complejo proteico citocromo bc<sub>1</sub> (complejo III), por lo que son también llamadas inhibidores Qo (QoI). En estudios recientes de nuestro grupo se ha demostrado una elevada frecuencia de resistencia a QoI en poblaciones de *P. fusca* de diferentes áreas productoras de cucurbitáceas de nuestro país. La resistencia a QoI está normalmente asociada a mutaciones puntuales en el gen citocromo b (*cyt b*) que codifica la proteína diana de estos fungicidas, siendo los cambios más frecuentes las sustituciones G143A o F129L. Tras analizar 12 aislados sensibles y 10 resistentes a QoI de diversa procedencia, no se detectó ninguna de estas dos sustituciones, sin embargo, se observaron dos nuevos cambios, S108A y V205A, en todos los aislados resistentes analizados. Para corroborar este hecho, se están analizando nuevos aislados sensibles y resistentes a QoI mediante PCR específica de alelo.

La resistencia a QoI también puede estar mediada por la inducción de una respiración alternativa en la que está implicada la enzima oxidasa alternativa (AOX) que provoca un "bypass" en la cadena de transporte de electrones a nivel del complejo succinato-deshidrogenasa (complejo II). Para comprobar la implicación de esta proteína en la resistencia a QoI, se ha estudiado la actividad respiratoria mediante el ensayo de reducción de la sal de tetrazolio INT que actúa, al igual que los QoI, a nivel del complejo III. La elevada actividad respiratoria, evaluada como producción de INT-formazano, observada en 5 cepas resistentes en presencia de pyraclostrobin (QoI) y ácido salicilhidroxámico (SHAM), un inhibidor de AOX, sugiere que este segundo mecanismo no parece estar implicado en la resistencia a QoI en *P. fusca*. Además, las cepas resistentes resultaron ser más sensibles a antimicina A, un inhibidor Qi. El papel de las nuevas mutaciones observadas en *cyt b* en la resistencia a QoI y la sensibilidad a Qi será discutido.

## OC-3

**ESTUDIO MEDIANTE MICROSCOPIA CONFOCAL DE LA INFECCIÓN DE JUDÍA POR *Fusarium oxysporum***

**MARTÍN-RODRIGUES, N., DE VEGA, J.J., GARCÍA-SÁNCHEZ, M.A., RAMOS, B., ESLAVA, A.P., DÍAZ-MÍNGUEZ, J.M.**

*Area de Genética, Centro Hispano-Luso de Investigaciones Agrarias (CIALE). Universidad de Salamanca, 37007 Salamanca. Teléfono y Fax: 923 294663. E-mail: josediaz@usal.es*

*Fusarium oxysporum* Schlechtend:Fr. es un hongo ubicuo del suelo de considerable importancia agrícola por su capacidad para causar enfermedades vasculares y podredumbres de raíz. La especie presenta un elevado rango de especificidad con más de 120 formas especiales descritas capaces de infectar una especie o género vegetal determinado. Esta combinación de amplio rango de infección y de especificidad de hospedador convierten a *F. oxysporum* en un modelo muy atractivo para el estudio de las interacciones moleculares determinantes de la patogenicidad y/o virulencia.

Hemos aislado y caracterizado aislados de *F. oxysporum* f.sp. *phaseoli* que muestran distintos grados de virulencia en la infección de judía (*Phaseolus vulgaris* L.). Las estirpes muy virulentas inducen síntomas severos en las plantas susceptibles y éstas mueren en dos o tres semanas. Las estirpes poco virulentas inducen síntomas poco severos y las plantas infectadas se mantienen vivas cuatro o cinco semanas después de la inoculación. Una cuestión interesante acerca de estos dos tipos de estirpes es si existe alguna diferencia entre ellas respecto al progreso dentro de los haces vasculares de la planta infectada. Una técnica idónea para este tipo de estudios es el análisis *in vivo* mediante microscopía confocal de plantas inoculadas con las estirpes patógenas a analizar. Con dicho fin se obtuvieron transformantes de estirpes muy virulentas, poco virulentas y no patógenas que portan la región estructural del gen GFP bajo el control de señales que permiten su expresión en *F.oxysporum*. Se comprobó que tanto el ADN transformante como la expresión de la proteína GFP son estables, y que la capacidad infectiva y virulencia de los transformantes no se habían visto afectadas. Para el análisis del proceso de infección mediante microscopía confocal se analizó el avance del micelio en haces vasculares y la producción de conidios, y se correlacionaron estos datos con el progreso de la enfermedad. Los resultados obtenidos indican que las estirpes muy virulentas son más eficientes que las poco virulentas en la colonización de las plantas infectadas.

**OC-4****IMPLICACIÓN DE PEQUEÑOS ARNs ENDÓGENOS EN PROCESOS DE PATOGÉNESIS VIRAL****MARTÍNEZ-PRIEGO, LL, DONAIRE, L., LLAVE, C.**

*Centro de Investigaciones Biológicas (CSIC), Biología de Plantas, c/ Ramiro de Maeztu 9, 28040 Madrid. E-mail: llucimarpri@cib.csic.es*

Las infecciones virales producen alteraciones en el metabolismo de las plantas y afectan a gran variedad de procesos. Los mecanismos moleculares responsables de estas alteraciones resultan desconocidos por el momento. Recientemente el descubrimiento de proteínas virales capaces de modular el transcriptoma de la planta provocando alteraciones en el sistema de procesamiento y actuación de pequeños ARNs, ha puesto de manifiesto la importancia de estos pequeños ARNs en las relaciones de compatibilidad y defensa entre plantas y virus. Para profundizar en el papel que juegan estos ácidos ribonucleicos de pequeño tamaño en las interacciones planta-virus, este trabajo aborda su estudio desde dos puntos de vista complementarios: determinando la posibilidad de que la planta regule la infección viral a través de sus pequeños ARNs endógenos, y estudiando en el caso concreto del virus de cascabeleo de tabaco (TRV) la existencia de proteínas supresoras del silenciamiento génico.

Los microARNs son moléculas de 21 nucleótidos que regulan la expresión génica. La actividad reguladora de estas moléculas se realiza mediante un complejo de silenciamiento, por reconocimiento de secuencias altamente complementarias entre los microARNs y los mensajeros diana, los cuales son al final del proceso, cortados por una nucleasa. Al ser estas moléculas de pequeño tamaño y la complementariedad necesaria para la unión con la diana imperfecta, es plausible pensar que algunos microARNs de la planta sean capaces de reconocer secuencias en genomas virales. Realizamos un estudio bioinformático de los pares microARNs-genes dianas validados en la literatura con el fin de establecer los requerimientos mínimos de apareamiento entre ellos. Siguiendo dichos parámetros seleccionamos algunos pares microARN- secuencia viral y procedimos a estudiar la posible interacción funcional entre ambos. Para lo cual diseñamos un sistema sensor de la actividad del microARN sobre la posible diana, acoplado ésta a continuación de una proteína delatora como la GFP. En alguna de las parejas estudiadas el microARN actuó tanto sobre su diana validada como sobre la posible diana viral observando una reducción en la fluorescencia y en la expresión del mensajero GFP.

El estudio de la existencia de posibles sARNs de la planta capaces de unirse a secuencias virales se ha ampliado mediante experimentos de hibridación de fragmentos del virus TRV con pequeños sARNs de plantas susceptibles de ser infectadas. Finalmente, hemos analizado la capacidad de interferencia de este virus en el silenciamiento génico, e intentado localizar en que zona de su genoma se encuentra la proteína o proteínas responsables de la interferencia.

## OC-5

**FACTORES QUE DETERMINAN LA EVOLUCIÓN DE LA VIRULENCIA: ANÁLISIS EN EL SISTEMA MODELO VIRUS DEL MOSAICO DEL PEPINO (CMV)-*Arabidopsis thaliana*****PAGÁN, I.<sup>1</sup>, ALONSO-BLANCO, C.<sup>2</sup>, GARCÍA-ARENAL, F.<sup>1</sup>**<sup>1</sup>Departamento de Biotecnología, E.T.S.I. Agrónomos, Universidad Politécnica de Madrid, 28040 Madrid.<sup>2</sup>Departamento de Genética Molecular de Plantas, Centro Nacional de Biotecnología, Campus Universidad Autónoma, Cantoblanco, 28049 Madrid.

La virulencia es una propiedad intrínseca de los patógenos. Definida como el efecto de un parásito sobre la eficacia biológica de su huésped condiciona la dinámica poblacional de este y la coevolución entre huésped y patógeno. El conocimiento de los factores implicados en la evolución de la virulencia supone una herramienta para su predicción y por extensión para el diseño de estrategias de control de las enfermedades infecciosas. En los últimos años ha tenido lugar un desarrollo teórico importante para predecir la evolución de la virulencia. La mayoría de los modelos están basados en el concepto de que la virulencia es una consecuencia inevitable de la multiplicación del patógeno, y que a mayor multiplicación mayor virulencia. Estos modelos predicen un nivel de virulencia en el equilibrio que optimice la multiplicación dentro de un huésped y la transmisión entre huéspedes, es decir una relación entre virulencia y transmisión. El apoyo experimental de estos supuestos es escaso. Trabajos previos con el virus del mosaico del pepino (CMV) cuestionan estos supuestos, pero la interpretación de la virulencia en los cultivos es complicada.

Usando el patosistema formado por CMV y la planta *Arabidopsis thaliana*, hemos abordado el estudio de la relación entre la virulencia y la multiplicación del virus y su transmisión. Para ello, se analizó la respuesta de 20 accesiones de *Arabidopsis* frente a la infección por tres aislados de CMV pertenecientes tanto al subgrupo I (aislados CMV-Fny y CMV-De72) como al subgrupo II (CMV-LS). En todas las plantas infectadas se cuantificó la acumulación viral y distintos parámetros relacionados con el efecto del virus en el huésped: crecimiento, distribución de recursos entre parte vegetativa y reproductora, duración del periodo juvenil y duración total del ciclo. Estos parámetros dependen del aislado de CMV y de la accesión de *Arabidopsis*. Las accesiones variaban diferencialmente en su resistencia a los distintos aislados, y había asimismo variación respecto a tolerancia. Cuando la infección afectaba al ciclo vital causó siempre un alargamiento del mismo. Los datos obtenidos muestran que no hay correlación entre acumulación viral, virulencia, y parámetros del ciclo vital del huésped. Se analizó también el porcentaje de transmisión del virus por la semilla que, de nuevo, no se correlacionó con la acumulación viral ni con la virulencia. Este resultado contradice la predicción de una correlación inversa entre virulencia y transmisión vertical.

Por tanto los dos supuestos básicos de los modelos teóricos de la evolución de la virulencia no son aplicables a CMV, y nuestros resultados ponen en duda la validez general de los modelos teóricos.

## OC-6

**ANÁLISIS PROTEÓMICO DE LAS PROTEÍNAS DE PULGÓN QUE INTERACCIONAN CON EL FACTOR DE TRANSMISIÓN HC-PRO DEL VIRUS TEV**

**FERNÁNDEZ-CALVINO, L.<sup>1</sup>, MARTÍNEZ-GARCÍA, B.<sup>1,3</sup>, GOYTIA, E.<sup>1</sup>, LÓPEZ-ABELLA, D.<sup>1</sup>, LÓPEZ-MOYA, J.J.<sup>1,2</sup>**

<sup>1</sup>*Departamento de Biología de Plantas, Centro de Investigaciones Biológicas (CIB, CSIC), c/ Ramiro de Maeztu 9, 28040 Madrid.*

<sup>2</sup>*Laboratorio de Genética Molecular Vegetal, Consorcio CSIC-IRTA, Instituto de Biología Molecular de Barcelona (IBMB, CSIC), c/ Jordi Girona, 18-26, 08034 Barcelona.*

<sup>3</sup>*Laboratorio de Regulación de la expresión génica, Instituto de Biología Molecular de Barcelona (IBMB, CSIC), c/ Jordi Girona, 18-26, 08034 Barcelona.*

Los potyvirus son patógenos de plantas transmitidos por pulgones de forma no persistente. Durante el proceso de transmisión las partículas virales se asocian específicamente al estilete del vector con la ayuda de un factor viral denominado HC-Pro. Esta proteína actúa a modo de puente molecular interaccionando con los viriones y con componentes desconocidos del canal alimenticio del estilete del vector. Aunque se ha confirmado experimentalmente la interacción entre la proteína y la partícula viral, no se conocen los posibles receptores del pulgón implicados en el proceso de transmisión no persistente.

Para identificar componentes del pulgón que interaccionan con la proteína HC-Pro del virus del grabado del tabaco (TEV), se extrajeron las proteínas de la cabeza del pulgón *Myzus persicae* (Sulzer). Este pulgón es un vector muy eficiente de la transmisión del virus TEV. Se realizó una separación por electroforesis bidimensional y transferencia de las proteínas extraídas del insecto, para posteriormente realizar un ensayo de interacción utilizando como proteína de incubación a la proteína HC-Pro de TEV purificada. Este ensayo permitió detectar nueve proteínas del pulgón que interaccionaron específicamente con la proteína HC-Pro. Mediante análisis por espectrometría de masas y secuenciación *de novo* se pudieron identificar siete de las nueve proteínas detectadas, utilizando la secuencia de péptidos pertenecientes a estas proteínas para realizar búsquedas en una base de datos de secuencias de pulgones. Estas búsquedas permitieron asignar posibles secuencias aminoacídicas completas y funciones hipotéticas a las proteínas identificadas. La posible implicación de las proteínas seleccionadas en la capacidad vectorial del pulgón se estudió por comparación con los resultados obtenidos en ensayos paralelos con proteínas extraídas de cabezas del pulgón *Lipaphis erysimi* (Kaltenbach), una especie no vector del virus TEV. *L. erysimi* mostró un patrón diferente de interacción en el que únicamente cinco proteínas se unían al HC-Pro de TEV.

## OC-7

**MICROBIOTA ENDOFÍTICA ASOCIADA A *Dactylis glomerata*****SÁNCHEZ MÁRQUEZ, S.<sup>1</sup>, **BILLS, G.F.**<sup>2</sup>, **ZABALGOGEAZCOA, I.**<sup>1</sup>**<sup>1</sup>*Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología, CSIC, Salamanca.*<sup>2</sup>*Centro de Investigación Básica de España, Merck, Sharp & Dohme, Madrid.*

Los hongos endofíticos infectan plantas sin causar síntomas. El objetivo de este trabajo era identificar la microbiota endofítica asociada a *Dactylis glomerata*, una gramínea adaptada a hábitats muy diversos. Para elaborar este trabajo se muestrearon 120 plantas asintomáticas en diversas zonas de España. Los hongos se aislaron de fragmentos de hojas, tallos y raíces previamente desinfectados superficialmente. La identificación de los hongos se basó en caracteres morfológicos y moleculares, mediante la secuenciación de la región ITS1-5.8S rDNA-ITS2. Se identificaron un total de 110 especies de hongos, 23 de las cuales son potencialmente especies desconocidas. La mayoría de los hongos aislados pertenece al grupo de los Ascomycetes. Un estudio de curvas de acumulación de especies demostró que la mayoría de las especies aisladas más de una vez de plantas de *Dactylis* han sido identificadas, sin embargo, el número de especies aisladas en una sola ocasión es altamente probable que crezca si se incrementa el número de muestras analizadas. En base a los datos obtenidos, se estima que el número total de especies endofíticas asociadas a *Dactylis* puede ser superior a 250. Únicamente diez de los 54 géneros identificados eran conocidos como patógenos de esta gramínea: *Epichloë*, *Phaeosphaeria*, *Drechslera*, *Fusarium*, *Periconia*, *Ascochyta*, *Colletotrichum*, *Phoma*, *Stagonospora*, y *Ustilago*. Varios de los géneros aislados de plantas asintomáticas contienen especies que son patógenos de cereales: *Alternaria*, *Acremonium*, *Ascochyta*, *Aureobasidium*, *Cladosporium*, *Colletotrichum*, *Cryptococcus*, *Drechslera*, *Epicoccum*, *Fusarium*, *Helgardia*, *Leptosphaeria*, *Microdochium*, *Phoma*, *Stagonospora*, *Trichoderma*, *Ulocladium*, y *Ustilago*. Este estudio muestra que *Dactylis glomerata* contiene una riqueza endofítica muy amplia, y que esta planta puede ser un potencial hospedador alternativo y asintomático de varios patógenos de cereales.



## OC-8

## NECROSIS DE LA JUDÍA: ENFERMEDAD DE ETIOLOGÍA COMPLEJA

**JORDÁ, C.<sup>1</sup>, ZANÓN, M.<sup>1</sup>, FONT, M.I.<sup>1</sup>, CEBRIÁN, M.C.<sup>1</sup>, GARCÍA, A.<sup>1</sup>, JANSSEN, D.<sup>2</sup>, GONZÁLEZ, A.J.<sup>3</sup>, DE CARA, M.<sup>4</sup>, TELLO, J.C.<sup>4</sup>**

<sup>1</sup>Universidad Politécnica de Valencia. E-mail: mjordag@eaf.upv.es

<sup>2</sup>CIFA-La Mojonera. IFAPA, CICE. E-mail: dirkjanssen@telefonica.net

<sup>3</sup>Laboratorio de Fitopatología, SERIDA, Asturias. E-mail: anagf@serida.org

<sup>4</sup>Escuela Politécnica Superior, Universidad de Almería. E-mail: jtello@ual.es

Desde Noviembre de 2003 se viene observando en los cultivos de judía (*Phaseolus vulgaris* L.) del Sureste Español (Málaga, Granada y Almería) amarilleos iniciales internerviales en hojas que evolucionan a manchas cloróticas definidas y zonas necrosadas. En un último estado de evolución de la enfermedad éstas adquieren tonalidades marrones manteniendo los nervios verdes. Las plantas presentan poca masa foliar y un pobre desarrollo que puede llevarlas a la muerte. En vainas se observan manchas acuosas, el grano marcado y con forma de “gancho” o “anzuelo”. Las pérdidas ocasionadas por esta enfermedad se han acercado al 30% en el 2005 y al 50% en el 2006 suponiendo, en algunos casos, la pérdida total de la plantación. En una primera aproximación al diagnóstico se ha realizado una prospección que engloba las áreas productoras de judía afectadas del Sureste Español de aproximadamente 100 ha, analizándose más del 10% de la superficie cultivada. En este estudio se han analizado un total de 303 muestras de judía identificándose hasta la fecha tres agentes implicados en el complejo etiológico que desarrolla el síndrome de la enfermedad: en el 50,5% de las muestras analizadas se detectó el *Bean yellow disorder virus*, BnYDV, un crinivirus identificado recientemente y transmitido por *Bemisia tabaci*, en el 7,0% la bacteria *Erwinia persicina*, en el 3,3% la bacteria *Curtobacterium flaccumfaciens* pv *flaccumfaciens* (Hedges) Dowson y en el 8,25% infecciones mixtas de BnYDV y *E. persicina*. *E. persicina* ya había sido citada en Nebraska afectando a judía con la misma sintomatología, pero esta sería la primera cita de esta bacteria en España. La información bibliográfica sobre *E. persicina* despierta un principio de preocupación ineludible ya que ha sido diagnosticada en vías urinarias de humanos y en hígado de atún; y por ser los restos de cosecha de este cultivo utilizados como ración de volumen en la alimentación del ganado ovino y caprino de la zona, pudiendo suponer un riesgo potencial para el ser humano. En cuanto a *C. flaccumfaciens* España se encuentra incluida como zona protegida dentro de la Unión Europea en lo concerniente a la producción de semillas. En este estudio se está trabajando en la puesta a punto de métodos de diagnóstico (serológicos y moleculares) que nos permitan una rápida, eficaz y sensible identificación de los agentes implicados. La detección de tres diferentes agentes causales en el síndrome descrito manifiesta la complejidad de la misma.

**OC-9****CONTROL DE LA VERTICILOSIS DE LA ALCACHOFA MEDIANTE INCORPORACIÓN DE RESIDUOS DE COLIFLOR COMBINADA CON SOLARIZACIÓN Y METAM SODIO****BERBEGAL, M., GARCÍA-JIMÉNEZ, J., ARMENGOL, J.***Instituto Agroforestal Mediterráneo, Universidad Politécnica de Valencia, Camino de Vera s/n, 46022 Valencia. E-mail: mobermar@etsia.upv.es*

La verticilosis de la alcachofa, causada por el hongo *Verticillium dahliae* Kleb., es una enfermedad de difícil control que se ha convertido en un problema importante en muchas zonas productoras. En este estudio se evaluaron nuevas estrategias de control de la enfermedad en dos campos naturalmente infestados bajo rotación coliflor-alcachofa situados en Benicarló (Castellón). Los objetivos fueron determinar si la incorporación del residuo fresco de coliflor reduce de forma efectiva la densidad de inóculo del hongo en el suelo y la incidencia de la enfermedad y, paralelamente, comprobar si la solarización y/o la aplicación de metam sodio (Me-Na) aumenta la eficacia de la incorporación de estos residuos.

Se realizaron los siguientes tratamientos: control, incorporación de residuo de coliflor (2 kg/m<sup>2</sup>), residuo de coliflor con Me-Na (770 L/ha al 50%), todos ellos con y sin plástico. Los plásticos permanecieron en el campo 35 días durante los meses de junio-julio. La plantación con zuecas sanas de alcachofa cv. Blanca de Tudela se realizó una semana después de eliminar los plásticos. Para evaluar el efecto de los tratamientos, secuencialmente durante todo el ciclo de cultivo (julio-mayo) se determinó la densidad de inóculo (DI) de *V. dahliae* expresada como microesclerocios por g de suelo, la incidencia de la enfermedad (IE), el porcentaje de aislamiento del patógeno (PA) y la cosecha.

En los dos campos, independientemente de la aplicación de Me-Na, sólo en los tratamientos con residuo de coliflor y plástico, la DI se mantuvo baja hasta el final del ciclo de cultivo. También en estos tratamientos y en ambos campos, se obtuvieron los valores significativamente más bajos de IE y PA.

Este estudio demuestra el potencial de la incorporación de los residuos del cultivo de coliflor combinado con la solarización para el control de la verticilosis de la alcachofa. Plantear rotaciones con coliflor para aplicar este tipo de estrategias durante los meses de verano en preplantación sería compatible con las prácticas habituales de cultivo y podría reducir la aplicación de productos químicos al suelo que no resultan tan efectivos, como también sugieren los resultados obtenidos.

**OC-10****CARACTERIZACIÓN DE *Heterobasidion annosum* AGENTE CAUSAL DE LA PODREDUMBRE RADICAL DEL PINSAPO**

**JIMÉNEZ, J.J., DE VITA, P., TRAPERO, A., SÁNCHEZ, M.E.**

Dpto. Agronomía, Universidad de Córdoba, Campus de Rabanales, Edif. Celestino Mutis, 14071 Córdoba. E-mail: ag1sahem@uco.es

Los últimos trabajos realizados sobre la podredumbre radical que afecta a *Abies pinsapo* en Andalucía han identificado al agente causal como *Heterobasidion annosum sensu lato*. Surge la necesidad de caracterizar estas poblaciones, identificando el grupo de intersterilidad al que pertenecen, conociendo el sistema de compatibilidad sexual y determinando la distribución de los distintos genotipos en los focos de árboles afectados.

En noviembre de 2004 se realizó una prospección de basidiocarpos en la Sierra de las Nieves (Málaga), para obtener aislados monobasidiospóricos. Estos aislados se confrontaron en placas de MA (agar-malta) al 1,5% con aislados escogidos de grupo interestéril ya conocido (testers). Tras el examen microscópico (búsqueda de uniones en fíbula) y macroscópico (presencia de barreras de reacción) se concluyó que la población estudiada corresponde al grupo de *Heterobasidion abietinum*.

Se eligieron seis homocariones procedentes del mismo basidiocarpo y se realizaron cruzamientos dobles en placas de MA al 1,5%. La presencia de compatibilidad sexual se determinó por la existencia de fíbulas. Sólo uno de los aislados homocariones fue capaz de aparearse con los cinco restantes, que resultaron estériles entre sí. Estos resultados indican que los aislados procedentes de pinsapo presentan un sistema de reproducción sexual heterotálico y bipolar.

Para determinar la distribución de distintos genotipos en los focos afectados se muestrearon todos los árboles de dos parcelas con focos de distinto tamaño. Los aislados heterocarióticos obtenidos de cada árbol infectado se cruzaron entre sí en placas de MA. Se evaluó la presencia de barreras de incompatibilidad vegetativa y se estableció el número de genotipos distintos presentes en cada foco y el número de árboles infectados por cada genotipo. De este modo se puede determinar si la infección se produce principalmente vía basidiosporas o por contactos radicales.

**OC-11****VIABILIDAD DE UN CHIP DE DIAGNÓSTICO DE ENFERMEDADES DE LA PATATA**

**LLOP, P.<sup>1</sup>, TOMLINSON, J.<sup>2</sup>, ABDULLAHI, I.<sup>3</sup>, WINTER, S.<sup>3</sup>, GRAHAM, I.<sup>4</sup>, CASTAGNONE, P.<sup>5</sup>, LÓPEZ, M.M.<sup>1</sup>, BOONHAM, N.<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>IVIA, España.

<sup>2</sup>CSL, Reino Unido.

<sup>3</sup>DSMZ, Alemania.

<sup>4</sup>U. de York, Reino Unido.

<sup>5</sup>INRA, Francia. E-mail: pllop@ivia.es

La Directiva 2000/29/EC contempla 23 organismos de cuarentena (virus, bacterias, hongos, nematodos e insectos) que afectan a la patata, y que causan o podrían causar importantes daños en dicho cultivo respecto a la producción, calidad y/o potencial exportador.

Dado que no existe un único método para analizar todos los patógenos de este cultivo, se han desarrollado protocolos de análisis de forma específica para cada uno de ellos, empleando técnicas muy diversas (aislamiento, microscopía, ELISA, electroforesis, PCR, RT-PCR, hibridación de ácidos nucleicos, inoculación en planta, etc). Por ello, el objetivo ha sido desarrollar y evaluar un sistema de detección único para 19 de los 23 patógenos de cuarentena de la patata (nematodos, virus, hongos y bacterias), empleando la tecnología de microchips. Esto permitiría estandarizar los análisis que se llevan a cabo en la UE y realizarlos simultáneamente frente a estos patógenos.

Las etapas del proyecto fueron: 1) generar sondas específicas para los 19 organismos de cuarentena de la Directiva 2000/29/EC, excepto 3 hongos y un insecto; 2) construir chips con las sondas obtenidas; 3) desarrollar protocolos de extracción, marcaje e hibridación para la detección simultánea de organismos de ADN y ARN en tejido de patata infectada; 4) determinar la sensibilidad, comparada con los sistemas de análisis actuales, y la especificidad (falsos positivos, falsos negativos, reacciones cruzadas, determinación de patovar); 5) construir un chip con las sondas óptimas obtenidas en los ensayos anteriores para su valoración y la validación en un ring test con la participación de 7 laboratorios de la UE.

En los análisis de 42 muestras el chip desarrollado presentó una especificidad del 100% y una sensibilidad de diagnóstico del 68%. La detección de organismos basada en ARN (virus) fue más problemática que la basada en ADN, aunque en el caso de bacterias aparecieron algunas reacciones cruzadas con otras sondas del chip. La baja sensibilidad alcanzada indica que el trabajo futuro deberá incidir en introducir metodologías de amplificación en diferentes etapas del protocolo.

**OC-12****DISTRIBUCIÓN DE *Verticillium dahliae* A TRAVÉS DEL AGUA DE RIEGO****GARCÍA-CABELLO, S., LÓPEZ-ESCUDERO, F.J., BLANCO-LÓPEZ, M.A.***Departamento de Agronomía, ETSIAM, Universidad de Córdoba, Apdo. 3048, 14080 Córdoba.*

Los microesclerocios (ME) de *Verticillium dahliae* son las principales estructuras de supervivencia e infección, estando incluidas en su mayor parte en un rango de tamaño de 35 a 150  $\mu\text{m}$ . Los ME pueden dispersarse libremente o adheridos a partículas vegetales o de suelo por diversos medios. Aunque existen evidencias de su dispersión asociados a escorrentía o por la acción del viento, no se ha documentado la importancia epidemiológica del agua de riego en la distribución del patógeno. Por ello, se ha planteado este trabajo con el objetivo de determinar la presencia y cuantificar los propágulos de *Verticillium dahliae* en el agua de riego de la Comunidad de Regantes del Genil-Cabra (Córdoba), que abastece a 16.150 ha pertenecientes a 584 agricultores, a lo largo de sus distintas infraestructuras de recepción, transporte y distribución de agua: desde el Pantano de Cordobilla, a lo largo del canal principal de distribución, en la principal estación de bombeo de Pata Mulo, en el agua que recibe el agricultor y en los filtros que utiliza. Los resultados han puesto de manifiesto que en todos los puntos y estructuras mencionados se han encontrado ME de *V. dahliae* con niveles variados de inóculo en los sedimentos de las diferentes zonas que han llegado a alcanzar niveles de hasta 2,24 ME por gramo de sedimento.

Adicionalmente, para determinar la cantidad de patógeno que llegaba finalmente a los cultivos a través de los goteros, se reprodujo una situación equivalente en las instalaciones de la estación de bombeo. Para ello se interpuso en la tubería principal de abastecimiento un sistema de filtrado que permitía extraer el residuo suspendido en el agua y comprendido entre 35 y 120  $\mu\text{m}$  de tamaño, y que hacía posible muestrear elevados volúmenes de agua. Los análisis mensuales realizados sobre volúmenes medios de 20  $\text{m}^3$  agua, desde Agosto de 2005 a Mayo de 2006, han permitido detectar al hongo en cantidades que variaron entre 0,041 y 0,94 ME/ $\text{m}^3$  de agua. Los resultados demuestran que *V. dahliae* se dispersa en el agua a través de los sistemas de riego, que existe una distribución a gran distancia y afectando a zonas cultivadas extensas, pudiendo además contribuir a aumentar la variabilidad en las poblaciones del agente, dada la variabilidad geográfica y de huésped del origen del inóculo.

**OS-1****EFFECTO DE LA TEMPERATURA Y EL ENCHARCAMIENTO DEL SUELO EN LA PODREDUMBRE RADICAL DE LA ENCINA CAUSADA POR *Phytophthora cinnamomi*****CAETANO, P.<sup>1</sup>, SÁNCHEZ, M.E.<sup>2</sup>, TRAPERO, A.<sup>2</sup>**<sup>1</sup>Fac. Engenharia de Recursos Naturais, Univ. del Algarve, Portugal.<sup>2</sup>Dpto. Agronomía, Universidad de Córdoba, Campus de Rabanales, Edif. Celestino Mutis, 14071 Córdoba. E-mail: ag1sahem@uco.es.

Se ha estudiado la influencia de la temperatura y el encharcamiento del suelo en la infección y desarrollo de síntomas de la podredumbre radical de la encina causada por el oomiceto *Phytophthora cinnamomi*.

En un primer ensayo, las plantas de 18 meses de edad, se inocularon con dos aislados distintos del patógeno, añadiendo al cepellón de cada planta 100 ml de una suspensión acuosa de micelio y clamidosporas. Las plantas infestadas y sus correspondientes testigos se dividieron en dos lotes y se sometieron a dos regímenes hídricos, encharcamiento del sustrato y riego normal, en condiciones de invernadero. Al cabo de 4 semanas ya se observaron los síntomas foliares de la enfermedad en las plantas infectadas y encharcadas: amarillez y marchitez foliar y defoliación. Los síntomas radicales consistieron en podredumbres extensas de las raicillas absorbentes. Estos síntomas no aparecieron en las plantas sometidas a riego normal hasta 6 meses después de la inoculación. En ambos casos la severidad de los síntomas, tanto foliares como radicales, se evaluó mediante una escala 0-4, en función del porcentaje de parte aérea o raíz sintomática. Los valores medios de severidad de síntomas se compararon entre sí y con los testigos mediante el test LSD protegido de Fisher ( $P < 0,05$ ).

El efecto de la temperatura se estudió en plantas de encina de 18 meses creciendo en vermiculita con solución nutritiva de Hoagland (1/2). Las plantas se inocularon añadiendo al medio de crecimiento una suspensión acuosa de zoosporas del patógeno ( $32 \times 10^3$  zoosporas/ml). Cada lote de plantas (6 inoculadas y 6 testigo) se colocó en el interior de incubadores con 12 h de luz/día a 10, 15, 20, 25, y 30 °C. La evaluación de síntomas foliares y radicales, así como el tratamiento estadístico de los datos se realizaron de igual manera que en el experimento anterior.

Los resultados obtenidos indican que el exceso de agua en el suelo es crucial para la infección y el desarrollo de los síntomas de la enfermedad, mientras que la temperatura no ha resultado ser un factor limitante.

## OS-2

**ANÁLISIS RAPD EN POBLACIONES DE MILDIO DE GIRASOL (*Plasmopara halstedii*) RESISTENTES A MEFENOXAM****CORDÓN-TORRES, M.M.<sup>1</sup>, MELERO-VARA, J.M.<sup>1</sup>, MOLINERO-RUIZ, M.L.<sup>1</sup>**<sup>1</sup>Instituto de Agricultura Sostenible (IAS), CSIC, Apdo. 4084, 14080 Córdoba. E-mail: ag2morum@uco.es

El mildio del girasol, causado por el oomiceto *Plasmopara halstedii*, puede afectar a más del 50% de las plantas si las condiciones para el desarrollo de la enfermedad son favorables (primaveras lluviosas con temperaturas frescas, humedad elevada en el suelo durante la nascencia). Los métodos habituales de lucha contra la enfermedad son la incorporación de genes de resistencia en el huésped, obteniéndose así híbridos genéticamente resistentes, y el tratamiento de semillas con fenilamidas. En España es obligatorio el tratamiento de todo el girasol que no sea resistente a mildio con mefenoxam. No obstante, nuestro grupo ha identificado poblaciones del patógeno procedentes de distintas zonas de cultivo que presentan resistencia a la dosis comercial del fungicida (0.2 g m.a./100 g semilla). Además, los niveles de resistencia varían entre las poblaciones, y alguna de ellas presenta dosis efectivas al 50% (DE50) de 0.7. Sin embargo, como la resistencia a un fungicida es un carácter cualitativo, diferentes niveles de dicha resistencia deben de estar asociados a una diversidad genética intrapoblacional. Con el objetivo de demostrar dicha diversidad, se seleccionaron tres poblaciones con distintas DE50 y, en cada una de ellas, se obtuvieron tres subpoblaciones resistentes a tres dosis de mefenoxam. Las nueve muestras se amplificaron con 100 cebadores RAPD, de los que se seleccionaron 43 para una segunda amplificación. En función de la consistencia y nitidez de polimorfismos, se seleccionaron tres cebadores que se utilizaron para generar una matriz binaria combinada. Las similitudes genéticas entre muestras se calcularon con el coeficiente de similitud de Jaccard y se elaboró un dendograma de distancias matriciales con el método UPGMA. La fuerza de cada nodo del dendograma se calculó generando 100 repeticiones *bootstrap* de los datos. Los cebadores seleccionados amplificaron un total de 37 bandas polimórficas intensas y reproducibles. El dendograma resultado del análisis UPGMA diferenció dos grupos de muestras con un 20% de similitud entre ellos. En uno de ellos se agruparon todas las muestras obtenidas en plantas de girasol tratadas con las dos dosis más bajas de mefenoxam.

## OS-3

**SUSCEPTIBILIDAD DE ESPECIES ARBÓREAS DEL MEDITERRANEO AL OOMICETO *Phytophthora ramorum*****GARCÍA-MUÑOZ, J.A., MORALEJO, E., DESCALS, E.**

*Instituto Mediterráneo de Estudios Avanzados, IMEDEA (CSIC-UIB), Miquel Marqués 21, 07190 Esporles (Illes Balears). Email: vieajgm4@uib.es*

*Phytophthora ramorum* es una especie patógena exótica posiblemente introducida en Europa a través del comercio de plantas ornamentales. Una variante de este mismo hongo lleva produciendo la mortalidad de miles de árboles en California desde 1995. Este hecho, junto con la fuerte afinidad existente con el Mediterráneo tanto en términos climáticos como ecológicos, hace que sea muy alto el interés por estudiar cuál es el riesgo de que este oomiceto pueda establecerse en nuestros ecosistemas. Por esta razón la Unión Europea financia el proyecto europeo RAPRA, en el cual participa el IMEDEA. Dentro de este proyecto, uno de los trabajos realizados en nuestro laboratorio es estudiar la susceptibilidad de los troncos de especies arbóreas mediterráneas. El objeto principal es probar la capacidad de *P. ramorum* de colonizar el cambium una vez facilitada su entrada a través de heridas. El estudio se realizó sobre una muestra de ocho troncos por cada una de las 18 especies de árboles inoculadas. Los árboles procedían de tres localizaciones diferentes, Mallorca (Islas Baleares), Parque Natural de Poblet, y sierra del Montseny (Cataluña). Como inóculo se utilizaron cinco aislamientos de *P. ramorum*, dos de origen estadounidense y tres de origen europeo. Cada tronco se inoculó con las cepas mencionadas más un control negativo y dos controles positivos, *P. cinnamomi* y *P. syringae*. Posteriormente, los troncos fueron envueltos en plástico e incubados en posición vertical a 20 °C en la oscuridad, dentro de una cámara de cuarentena. El área de las lesiones se midió tras descortezar los troncos al cabo de 40 días. Todas las coníferas (p. ej. *P. sylvestris*, *P. nigra* y *P. pinaster*), excepto *P. halepensis* fueron inmunes o altamente resistentes a *P. ramorum*. En *P. halepensis* se observaron lesiones necróticas alargadas. La mayoría de quercíneas de la península ibérica fueron susceptibles, en distinto grado, a *P. ramorum*; *Q. pyrenaica* fue excepcionalmente susceptible, mostrando consistentemente lesiones de dimensiones comparables a las especies más susceptibles conocidas; *Q. humilis* (= *pubescens*) y *Q. canariensis* mostraron lesiones considerables, y en menor medida *Q. ilex* y *Q. faginea*.



## OS-4

**ESTUDIO QUÍMICO Y BIOLÓGICO DE HONGOS PATÓGENOS DE LA MADERA DE LA VID DEL GÉNERO *Botryosphaeria***

**MARTOS, S.<sup>1</sup>, EVIDENTE, A.<sup>2</sup>, FIORE, M.<sup>2</sup>, SURICO, G.<sup>3</sup>, MUGNAI, L.<sup>3</sup>, PEDUTO, F.<sup>3</sup>, LUQUE, J.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Dep. Protecció Vegetal, Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentàries (IRTA), Centre de Cabrils. Ctra. de Cabrils s.n., 08348 Cabrils (Barcelona). E-mail: tmp2102@irta.es

<sup>2</sup>Dip. Scienze del Suolo, della Pianta e dell'Ambiente, Università di Napoli Federico II, Via Università 100, 80055 Portici, Italia.

<sup>3</sup>Dip. Biotechnologie Agrarie - Patologia Vegetale, Università di Firenze, P.le delle Cascine 28, 50144 Florencia, Italia.

Identificar la naturaleza y estructura química de las moléculas fitotóxicas de *Botryosphaeria* permitiría conocer con mayor detalle el proceso infectivo de estos hongos patógenos de la vid. El objetivo del trabajo ha consistido en optimizar el cultivo líquido de cinco especies de *Botryosphaeria* aisladas de vid (*B. dothidea*, *B. lutea*, *B. parva*, *B. obtusa* y *B. viticola*) para la obtención de filtrados con actividad fitotóxica manifiesta. Se procedió además a la purificación y la caracterización química y biológica de los metabolitos responsables de la fitotoxicidad.

Los hongos se cultivaron en medio Czapeck líquido a temperatura ambiente y se recuperó el medio filtrado en el período de máxima toxicidad, lo que se determinó realizando infiltraciones semanales sobre hoja de tabaco. *Botryosphaeria obtusa* y *B. parva* manifestaron la mayor toxicidad a las dos semanas de incubación mientras que *B. dothidea*, *B. lutea* y *B. viticola* lo hicieron a las tres semanas. La extracción de toxinas a partir de los filtrados se llevó a cabo a tres pHs diferentes: ácido (2), básico (10) y en el pH del propio filtrado. La extracción se realizó con acetato de etilo y se efectuaron cuatro extracciones por pH. Se reunió el volumen resultante de las tres primeras extracciones para formar la fase orgánica y se conservó aparte la fase acuosa. Para determinar el peso del residuo extraído, las fases orgánicas se desecaron y las fases acuosas se liofilizaron. Para las cinco especies, la fase acuosa presentó los mayores residuos en todos los pHs ensayados mientras que para la fase orgánica esto sólo ocurrió a pH ácido.

La capacidad fitotóxica de las distintas fases se evaluó sobre planta de tomate, observándose una toxicidad diferencial en tallo y hoja de acuerdo con la naturaleza química de las fases. Así, las fases orgánicas de las especies *B. dothidea*, *B. lutea* y *B. viticola* afectaron de forma importante al tallo, mientras que en hoja la mayor toxicidad correspondió a las fases acuosas de *B. lutea* y *B. obtusa*.

## OS-5

**INFLUENCIA DE LAS CONDICIONES AMBIENTALES SOBRE *Fusarium* spp. Y LA PODREDUMBRE DE RIZOMAS Y RAÍCES EN ESPÁRRAGO**

**CORPAS, C.<sup>1</sup>, RUBIO, M.E.<sup>1</sup>, PRADOS-LIGERO, A.M.<sup>2</sup>, MELERO-VARA, J.M.<sup>3</sup>, BASALLOTE, M.J.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>CIFA "Las Torres-Tomejil"-IFAPA, Apdo. Oficial, 41200 Alcalá del Río (Sevilla). E-mail: mariaj.basallote@juntadeandalucia.es

<sup>2</sup>CIFA "Alameda del Obispo"-IFAPA, Apdo. 3092, Córdoba.

E-mail: anam.prados.ext@juntadeandalucia.es

<sup>3</sup>IAS-CSIC. Apdo. 4084, Córdoba. E-mail: cs9mevaj@uco.es

En la fusariosis del espárrago hay implicadas hasta 12 especies de *Fusarium* cuya preponderancia varía con las zonas productoras, con el momento del año en que se realizan las prospecciones y con otros factores bióticos y abióticos. Sin embargo, la información acerca de las condiciones ambientales que favorecen el crecimiento de *Fusarium* spp., y el desarrollo de la podredumbre de rizomas y raíces es prácticamente inexistente. El efecto de la temperatura sobre el crecimiento radial y la esporulación de seis aislados de *Fusarium* spp. patógenos de espárrago se evaluó en el rango de 5-35 °C, en placa petri sobre PDA. La tasa de crecimiento de las colonias se determinó entre los días 3º y 8º de incubación y la esporulación se midió tras 10 días de incubación. Se estudió la influencia de la temperatura y de la humedad sobre el desarrollo de la enfermedad en cámara de ambiente controlado combinando tres temperaturas de incubación con dos humedades relativas. Los aislados de *Fusarium* utilizados (5 de *F. oxysporum*, 4 de *F. proliferatum* y 2 de *F. solani*) se recuperaron de plantas de espárrago afectadas por la fusariosis. Las evaluaciones realizadas incluyeron la incidencia (%) y la severidad de los síntomas aéreos y subterráneos conforme a una escala 1-5. La temperatura óptima para el crecimiento radial fue 25 °C, aunque todos los aislados crecieron bien a 20-30 °C. Los aislados de *F. oxysporum* fueron los que alcanzaron mayor diámetro. La expansión radial a lo largo del tiempo tuvo un buen ajuste lineal para todos los aislados estudiados. La temperatura más favorable para la esporulación fue la de 30 °C para todos los aislados, excepto para uno de *F. proliferatum*. Los síntomas observados fueron similares para todos los aislados y condiciones de incubación investigadas, pero la severidad de síntomas difirió significativamente en función del aislado. Uno de los aislados de *F. oxysporum* fue el más virulento a las temperaturas de 20 y 25 °C, y otro de *F. solani* mostró mayor virulencia a 25 y 30 °C. La HR ≥90% determinó los valores de severidad más elevados. Los aislados más virulentos ocasionaron las mayores pérdidas de peso seco en la parte aérea y en el sistema radical, respecto al testigo no inoculado. En general la temperatura de 25 °C fue la que resultó en una mayor biomasa, independientemente de la HR.

**OS-6****IDENTIFICACION Y CARACTERIZACION DE *Fusicladium eriobotryae*: PATÓGENO FÚNGICO RESPONSABLE DEL MOTEADO DEL NÍSPERO EN EL MEDITERRÁNEO****SÁNCHEZ-TORRES, P., HINAREJOS, R., TUSET, J.J.**

*Laboratorio de Micología, Departamento de Protección Vegetal y Biotecnología, Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA), Ctra Moncada-Náquera Km 4,5, 46113 Valencia. E-mail: palomas@ivia.es*

El níspero (*Eriobotrya japonica* Lindl.) se cultiva de forma amplia en las regiones subtropicales del sur de China, Japón, el norte de la India, Israel y en el Mediterráneo. Aunque el moteado es una enfermedad bien conocida se sabe muy poco a cerca del principal patógeno fúngico responsable de la misma. Los síntomas aparecen a lo largo del todo desarrollo en flores y frutos, si bien el más importante es el daño que parece en las hojas y en los frutos. Los daños de los frutos pueden ser tan severos que producen la pérdida del cultivo. Hoy en día existe una enorme controversia en la identificación del patógeno fúngico responsable de esta enfermedad puesto que muchos autores la atribuyen al género *Spilocaea* y otros al género *Fusicladium*. Ambos corresponden al anamorfo del género *Venturia* bien conocido puesto que *Venturia inaequalis* es el causante del moteado en manzana. Hemos sido capaces de aislar al patógeno fúngico que provoca el moteado en níspero del Mediterráneo y lo hemos identificado como *Fusicladium eriobotryae* de acuerdo a sus caracteres morfológicos y genéticos. Los síntomas del moteado del níspero en la región Mediterránea son generalmente más acusados y severos en ambos lados de las hojas y en el fruto aparece en forma de manchas verdes o parduzcas. La lesión es normalmente circular y su tamaño aumenta a medida que avanza la enfermedad volviéndose olivácea y aterciopelada debido a la presencia de esporas. Hemos sido capaces de reproducir los síntomas del moteado desarrollando un sistema de infección *in vitro*. Siguiendo esta metodología hemos comparado nuestros aislados *F. eriobotryae* (NSH y NCH) con aislados muy relacionados como son *V. inaequalis*, *Venturia pyrina*, *Spilocaea pomi*, *Spilocaea eriobotryae*, *Fusicladium carpophilum* estudiando tanto los síntomas como el proceso de infección. Además se ha llevado a cabo la caracterización molecular comparando la región D1/D2 y la región ITS entre todas las especies con el fin de establecer su relación filogenética.

El estudio del proceso de infección junto con la puesta a punto de un sistema biológico *in vitro* está siendo utilizado en la selección de variedades de níspero que sean tolerantes o resistentes al moteado, con la importancia económica que eso conlleva.

**OS-7****ANÁLISIS DE INTERACCIONES PROTEÍNA-PROTEÍNA IMPLICADAS EN EL MOVIMIENTO CÉLULA A CÉLULA DE LOS ILARVIRUS MEDIANTE COMPLEMENTACIÓN BIMOLECULAR FLUORESCENTE****APARICIO, F., SÁNCHEZ-NAVARRO, J.A., PALLÁS, V.***Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas (IBMCP), Av. de los Naranjos s/n, 46022 Valencia.*

La importancia de una determinada virosis viene condicionada por la capacidad del virus de invadir las células vecinas mediante el movimiento célula a célula. Este movimiento se realiza a través de los plasmodesmos, en un proceso activo que requiere de la participación de una o más proteínas de movimiento (MP) que deben ser capaces de interactuar con otros factores virales y/o proteínas celulares. Entre las diferentes propiedades descritas para las MPs cabe destacar la capacidad de formar oligómeros así como de interactuar con su proteína de cubierta (CP) y/o diferentes proteínas de la planta. El hecho de que el movimiento célula a célula sea un componente determinante de la patogenicidad y virulencia de la infección, hace a las MPs buenos candidatos para abordar estrategias de control antiviral. Además, la observación de que las MPs virales utilizan los plasmodesmos para el transporte viral permite augurar la existencia de factores celulares comunes entre diferentes géneros virales, que pueden ser utilizados para el diseño de resistencias de amplio espectro. Para ello es esencial la identificación de las diferentes interacciones MP-proteínas virales/celulares implicadas en el transporte viral.

La complementación bimolecular fluorescente (BiFC) es una técnica muy útil para determinar interacciones proteína-proteína en células vivas. Esta aproximación se basa en la utilización de una proteína fluorescente (Proteína de Fluorescencia Amarilla; *Yellow Fluorescent Protein*, YFP), fragmentada en dos partes (fragmentos N-terminal y C-terminal) incapaces por si mismas de emitir fluorescencia, que se fusionan a las proteínas de interés. La interacción entre estas proteínas de interés permitirá la reorganización de los dos fragmentos de YFP y la recuperación de la fluorescencia, dando lugar a la visualización en tiempo real del complejo proteico.

En este trabajo se presenta el uso de BiFC para la identificación de factores del huésped y virales que interactúen con la MP del Ilarvirus de los anillos necróticos de los prunus (PNRSV) (familia *Bromoviridae*), tanto en bacteria como en planta. Mediante la técnica BiFC hemos caracterizado en planta el dominio de dimerización de la MP y la CP del PNRSV, así como la capacidad de interacción entre las dos proteínas. Que sepamos, es la primera aplicación de esta metodología en el estudio de interacciones de proteínas de virus de plantas.

## OS-8

**EXPRESIÓN HETERÓLOGA Y LOCALIZACIÓN DIFERENCIAL DE DOS PROTEÍNAS DE *Lettuce infectious yellows virus* (LIYV): P26 Y P34****STEWART, L.<sup>1</sup>, MEDINA, V.<sup>2</sup>, FALK, B.<sup>1</sup>**<sup>1</sup>*Plant Pathology Dept., University of California, Davis, USA*<sup>2</sup>*Dept. Producción Vegetal i C. Forestal, Universitat de Lleida, España*

El virus del amarilleo infeccioso de la lechuga (*Lettuce infectious yellows virus*, LIYV), virus transmitido por moscas blancas y de ARN de sentido positivo, es el miembro tipo del género *Crinivirus* (fam. *Closteroviridae*). Tiene un genoma bipartido con 9 ORFs. Como parte de una investigación encaminada a conocer la función de dos de las proteínas codificadas por su genoma, las proteínas P26 y P34, se ha evaluado su localización usando proteínas nativas o que incorporan GFP expresadas en un vector heterólogo, el virus del mosaico del tabaco (TMV). Los efectos celulares han sido también estudiados mediante microscopía de fluorescencia o microscopía electrónica de transmisión.

P34 es codificado por el ORF2 del ARN1 de LIYV (el ORF1a/1b incluye la MTR, la HEL, y los motivos de la RdRp), y se ha demostrado que es necesario para la replicación eficiente del ARN2, pero no del ARN1. P34:GFP expresado mediante TMV se localiza en el espacio perinuclear de las células de tabaco infectadas. La agregación perinuclear también se observa en células de tabaco infectadas con el ARN1 de LIYV expresando GFP asociado al retículo endoplásmico (ER), indicando que el reordenamiento del ER, descrito para muchos otros virus de ARN, también es inducido por el ARN1 de LIYV. La capacidad de reorganización del ER se conserva en un mutante del ARN1 cuando un codón stop doble se inserta en el extremo 5' del ORF de la P34. La importancia funcional de localización perinuclear de P34:GFP está por dilucidar, pero P34 puede co-localizar o contribuir a la formación de los complejos de replicación que derivan del ER.

P26 es codificada por el ORF7 del ARN2, y se ha demostrado, mediante inmunolocalización, que está asociada con los llamados depósitos del plasmalema (PLDs). Los PLDs son estructuras inducidas por LIYV que se encuentran en el plasmalema cerca de los plasmodesmos. Proteínas de fusión con GFP en los extremos C- o N- de la P26 localizan diferencialmente, exhibiendo cada una localizaciones parciales en comparación con proteínas sin fusionar. Mediante inmunolocalización, la GFP:P26 se localiza en la periferia de las células infectadas, la P26:GFP se agrega en el interior de las células, y la P26 nativa se observa en la periferia celular. Los análisis al TEM de células infectadas con TMV expresando P26 sin fusionar demuestran que la P26 no está sólo asociada con, sino que además es suficiente para inducir los llamados PLDs en ausencia de otras proteínas de LIYV. Los viriones de LIYV pero no los de TMV se asocian con los PLDs que se forman en las células infectadas con, respectivamente, LIYV y TMV expresando P26.

**OS-9****LA PROTEINA N DEL *Tomato spotted wilt virus* (TSWV): POSIBLE RESPONSABLE DE LA INDUCCIÓN DE RESPUESTA DE HIPERSENSIBILIDAD (HR) EN *Capsicum chinense***

LOVATO, F.A.<sup>1</sup>, INOUE-NAGATA, A.K.<sup>2</sup>, NAGATA, T.<sup>3</sup>, ÁVILA, A.C.<sup>2</sup>, PEREIRA, L.A.R.<sup>1</sup>, RESENDE, R.O.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Instituto de Biologia, Universidade de Brasília, 70.910-900, Brasília, DF, Brasil. E-mail: rresende@unb.br

<sup>2</sup>Embrapa Hortaliças, Brasília, DF, Brasil. E-mail: alicenag@cnph.embrapa.br

<sup>3</sup>Universidade Católica de Brasília, Brasília, DF, Brasil. E-mail: tatsuya@pos.ucb.br

*Tomato spotted wilt virus* (TSWV) es el patógeno causante de una grave enfermedad en pimiento en todo el mundo. El genoma tripartito del virus codifica tres proteínas estructurales (L, G1/G2 y N) y dos no estructurales (NS<sub>M</sub> y NS<sub>S</sub>). Reacciones a la infección de TSWV del tipo hipersensibilidad han sido reportadas en *Capsicum chinense* 'PI152225' y 'PI159236'. El objetivo de esta investigación fue la identificación de la(s) proteína(s) de TSWV responsable(s) de la reacción de hipersensibilidad (respuesta-HR) en *C. chinense*. Para ello, los genes N, NS<sub>M</sub> y NS<sub>S</sub> del TSWV fueron clonados en el vector binario pgR107, basado en el vector de expresión *Potato virus X* (PVX) vía agroinoculación. Colonias de agrobacteria recombinantes transformadas con los genes N, NS<sub>M</sub> y NS<sub>S</sub> han sido inoculadas en *C. chinense* 'PI159236'. Después de 10-15 días se observaron síntomas típicos del PVX en las hojas superiores de las plantas inoculadas con las construcciones PVX+N, PVX+NS<sub>M</sub> y PVX+NS<sub>S</sub>. La expresión de las proteínas N, NS<sub>M</sub> y NS<sub>S</sub> ha sido confirmada por ELISA y *Western blot*. Lesiones necróticas típicas de HR fueron observadas solamente en PI159236 infectadas con la construcción PVX+N. En las hojas sintomáticas se observó una abscisión típica de la HR, a los 30-35 días después de la inoculación. Este resultado indicó que el gene N de TSWV es el posible responsable de la inducción de la respuesta de HR en *C. chinense*. Estudios histopatológicos usando hibridación *in situ* confirmarán esta hipótesis, una vez que, hojas de *C. chinense* 'PI159236' infectadas con PVX+N<sub>s</sub> mostraron un gran número de células apoptóticas asociadas a la respuesta de hipersensibilidad. Además, hojas de *C. chinense*, *D. stramonium* y *N. benthamiana* inoculadas con la construcción PVX+NS<sub>S</sub> mostraron síntomas severos de necrosis, sugiriendo un incremento en los síntomas causados por PVX decurrente del posible sinergismo del PVX con la proteína NS<sub>S</sub>, que recientemente ha sido caracterizada como la proteína supresora del silenciamiento génico del TSWV.

Financiación: CNPq, Embrapa, UnB.

**OS-10****LA REGIÓN QUE CODIFICA LA PROTEÍNA 126K DEL VIRUS DEL MOTEADO SUAVE DEL PIMIENTO (PMMoV) DETERMINA LA ACUMULACIÓN VIRAL EN PLANTAS DE *Capsicum chinense* CULTIVADAS A 32 °C****MOLINA-GALDEANO, M., GARCÍA-LUQUE, I., SERRA-YOLDI, M.T.**

*Centro de Investigaciones Biológicas, CSIC, c/ Ramiro de Maeztu 9, 28040 Madrid. E-mail: mserra@cib.csic.es*

El virus del moteado suave del pimiento (PMMoV) pertenece al género *Tobamovirus*, cuyo miembro tipo es el virus del mosaico del tabaco (TMV). En *Capsicum* spp., la resistencia frente a tobamovirus es de tipo hipersensible y está conferida por los genes  $L^1$ - $L^4$ . En base a su interacción con el gen  $L^3$  de *Capsicum chinense*, la cepa española de PMMoV (PMMoV-S) se ha caracterizado como un patotipo  $P_{1,2}$ , y la cepa italiana (PMMoV-I), como un patotipo  $P_{1,2,3}$ . Nuestros resultados anteriores mostraron que a la temperatura de 32 °C, la resistencia mediada por el gen  $L^3$  de *C. chinense* no es activa frente a PMMoV-S, y que, a esta temperatura, los niveles de acumulación de PMMoV-S se incrementaban con respecto a los de PMMoV-I. Asimismo, se observó que la temperatura de 32 °C ejerce un efecto negativo sobre la acumulación de PMMoV-I en hojas superiores no inoculadas a tiempos tardíos de la infección viral.

En este trabajo hemos determinado que no existen diferencias en la replicación a nivel celular de ambas cepas de PMMoV a una misma temperatura de cultivo, tal y como se observó en el análisis de la acumulación de la proteína de la cápsida (CP) de ambas cepas de PMMoV en protoplastos de *C. chinense*, incubados a 25 °C y 32 °C.

Para analizar qué regiones del genoma de PMMoV-S estaban implicadas en las diferencias de acumulación viral observadas, hemos utilizado los virus quimeras THI-1, THI-3 y THI-5 (Berzal-Herranz *et al.*, 1995. *Virology* 209:498), en las que distintas regiones del genoma de PMMoV-S han sido sustituidas por las correspondientes del genoma de PMMoV-I. Los resultados de acumulación viral, a distintos tiempos postinoculación y a las dos temperaturas de cultivo, indicaron que la región que codifica la proteína 126K de PMMoV-S determina la acumulación de este virus a 32 °C en *C. chinense* y su introducción en los virus quimeras, revierte el efecto negativo que la temperatura ejerce sobre la acumulación de PMMoV-I a tiempos tardíos de la infección. La secuencia que codifica la proteína 126K parece ser suficiente para ello, y no se observaron diferencias significativas derivadas de la introducción de más regiones del genoma de PMMoV-S en los virus quimeras.

## OS-11

**UNA PEQUEÑA REGIÓN DEL EXTREMO 3' NO-CODIFICANTE DEL RNA DE MNSV ACTÚA COMO DETERMINANTE DE AVIRULENCIA EN MELÓN****TRUNIGER, V.<sup>1</sup>, NIETO, C.<sup>1</sup>, BENDAHMANE, A.<sup>2</sup>, ARANDA M.A.<sup>1</sup>**<sup>1</sup>Centro de Edafología y Biología Aplicada del Segura (CEBAS)-CSIC, Apdo. correos 164. 30100 Murcia. E-mail: m.aranda@cebas.csic.es<sup>2</sup>INRA-URGV. 2 Rue Gaston Crémieux CP 5708. 91057 EVRY Cedex (Francia). E-mail: bendahm@evry.inra.fr

El virus de las manchas necróticas del melón (*Melon necrotic spot virus*, MNSV; familia Tombusviridae) es un virus de RNA de cadena sencilla de polaridad positiva endémico en cultivos de cucurbitáceas. Se ha descrito solamente una resistencia monogénica a MNSV y ésta es recesiva, controlada por el gen *nsv* de melón (*Cucumis melo*). Mediante ensayos de complementación realizados sobre plantas de melón de genotipo resistente hemos verificado que *nsv* codifica el factor eucariótico de iniciación de la traducción 4E (*Cm-eIF4E*). Asimismo, hemos demostrado que el cambio de un solo aminoácido en la posición 228 de *Cm-eIF4E* es responsable de la resistencia del melón a MNSV.

El gen *nsv* confiere resistencia a todos los aislados de MNSV menos a MNSV-264. Localizamos el determinante de virulencia de MNSV-264 en la región 3'-terminal del genoma viral e identificamos, mediante la generación de mutantes puntuales, que se trataba de una región no codificante. El mapeo fino del determinante de virulencia, mediante mutantes quiméricos entre MNSV-264 y MNSV-Mα5 (otra cepa del virus no capaz de superar la resistencia), mostró que éste consistía en una estructura tallo/bucle del RNA de menos de 50 nucleótidos. Notablemente, el determinante genético de virulencia sobre melones resistentes coincidió con el determinante de la capacidad de MNSV-264 para infectar *Nicotiana benthamiana* y *Gomphrena globosa*, especies normalmente no huéspedes de MNSV. La secuenciación del cDNA de *eIF4E* de *N. benthamiana* (*Nb-eIF4E*) mostró que *Nb-eIF4E* contiene un aminoácido apolar y neutro en la posición polimórfica 228, como el factor *eIF4E* de melón resistente y al contrario que el factor *eIF4E* de melón susceptible, que contiene un aminoácido cargado positivamente. Por otra parte, hemos estudiado el efecto de los extremos 5'- y 3'-no traducidos (5'- y 3'-UTRs) de MNSV-264 y de MNSV-Mα5 sobre la eficiencia de la traducción de un gen delator. Nuestros resultados preliminares indican que el extremo 3'-UTR de MNSV-264, junto con cualquier extremo 5'-UTR de MNSV, confiere una alta eficiencia traduccional (independiente de 5'-cap) en extractos de germen de trigo. Por el contrario, el extremo 3'-UTR de MNSV-Mα5 no confiere esa capacidad. Todos estos resultados nos han permitido proponer un modelo para el funcionamiento de la resistencia a MNSV que se presentará durante el congreso.



**OS-12****INTERFERENCIA FRENTE A RNAs VIROIDALES MEDIADA POR RNAs BICATENARIOS ESPECÍFICOS****CARBONELL, A., FLORES, R., GAGO, S.**

*Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas (IBMCP), Universidad Politécnica de Valencia-Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Avenida de los Naranjos s/n, 46022 Valencia. E-mail: alcarol@ibmcp.upv.es*

Los viroides son pequeños RNAs circulares altamente estructurados y sin capacidad de codificar proteínas. Son los agentes infecciosos más simples y muchos de ellos causan enfermedades en plantas. Se clasifican en dos familias, *Pospiviroidae* y *Avsunviroidae*, cuyos miembros se replican y acumulan en el núcleo y el cloroplasto respectivamente.

La recientemente descubierta interferencia mediada por RNA (RNAi) empieza a ser empleada como una herramienta para controlar infecciones virales pero se desconoce si también podría servir para las viroidales. Esta tecnología permite explotar el mecanismo de defensa natural basado en el silenciamiento génico post-transcripcional (PTGS) con que cuentan las plantas. Dicho mecanismo les permite digerir RNAs bicatenarios (dsRNAs) exógenos, como los resultantes de la replicación de ribovirus, en pequeños RNAs interferentes (siRNAs) que posteriormente son incorporados en un complejo enzimático capaz de degradar los correspondientes RNAs homólogos. Puesto que las infecciones por viroides vienen acompañadas por la aparición de siRNAs específicos (los marcadores de PTGS), en el presente trabajo hemos explorado el efecto de coinocular, junto al viroide, dsRNAs que actúen como activadores del PTGS.

Nuestros resultados muestran que la presencia en el inóculo de dsRNAs homólogos retrasa la aparición de síntomas y/o protege a las plantas frente a la infección por viroides de ambas familias. Estos resultados han sido obtenidos con los sistemas tomate-viroide del tubérculo fusiforme de la patata (PSTVd, de localización nucleolar), *Gynura aurantiaca*-viroide de la exocortis de los cítricos (CEVd, de localización nucleolar) y crisantemo-viroide del moteado clorótico del crisantemo (CChMVd, de localización cloroplástica). En algunos casos las plantas no muestran síntomas durante semanas y no se detecta el RNA viroidal por hibridación molecular. Por otra parte, hemos comprobado que la coinoculación con dsRNAs heterólogos no provoca retraso alguno en la aparición de síntomas, lo que muestra que la resistencia obtenida es específica. En los dos viroides de replicación nucleolar el grado de protección mejora al crecer las plantas a temperaturas inferiores (20-25°C) a las óptimas para la infección viroidal (30 °C). Finalmente, con el sistema *Gynura aurantiaca*-CEVd, la coinoculación de dicho viroide con siRNAs obtenidos mediante digestión de dsRNAs homólogos por la RNasa III de *E.coli* confiere un efecto protector similar al observado con los dsRNAs.

**OS-13****ESTUDIO COMPARADO DE LA ACTIVIDAD Y MODO DE ACCIÓN DE DISTINTOS PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS FRENTE A HONGOS FITOPATÓGENOS****MUÑOZ, A., MARCOS, J.F.**

*Laboratorio de Fisiología y Biotecnología Postcosecha, Instituto de Agroquímica y Tecnología de los Alimentos (IATA)-CSIC, Apartado de Correos 73, Burjassot, 46100 Valencia. E-mail: albertomr@iata.csic.es*

Actualmente se está investigando con intensidad la utilización de péptidos antimicrobianos (AMP) en el control de enfermedades vegetales, como alternativa potencial al uso clásico de fungicidas y antibióticos. El éxito de estos AMP frente a los muy diversos fitopatógenos existentes depende en gran medida de sus propiedades de especificidad y potencia antimicrobiana, las cuales difieren entre los distintos grupos y clases de AMP existentes.

Mediante el ensayo de una biblioteca combinatorial dirigido frente al hongo *P.digitatum* (principal patógeno postcosecha de frutos cítricos) nuestro laboratorio ha diseñado una serie de hexapéptidos llamados PAF, activos frente a diversos hongos fitopatógenos. El péptido PAF26 mostró las mejores propiedades de potencia y especificidad antifúngica. La similitud de secuencia que presentan los PAF con determinados AMP naturales motivó el estudio en profundidad y comparación de sus propiedades antimicrobianas con las de otros AMP de orígenes distintos. En este trabajo se ha abordado un estudio comparado de PAF26 y del dominio antibacteriano de la lactoferricina bovina (LfcinB<sub>20-25</sub>), de una versión extendida del mismo descrita como antifúngico frente a *Candida* spp. (LfcinB<sub>17-31</sub>), y del péptido citotóxico de insectos Melitina.

Estos péptidos se ensayaron frente a una colección de hongos y otros microorganismos de interés. Un análisis más detallado se realizó con el hongo fitopatógeno *P.digitatum*, comparándose en los péptidos sus propiedades fungiestáticas, fungicidas, de permeabilización celular, toxicidad inespecífica, e inhibición de la podredumbre de frutos cítricos en ensayos *in vivo*. Los distintos péptidos presentan distintos perfiles de actividad sobre microorganismos, así como diferencias en su modo de acción y toxicidad inespecífica. PAF26 presenta una notable especificidad y a concentraciones sub-inhibitorias interacciona con la membrana celular del micelio de *P.digitatum* y es rápidamente trasladado al interior celular. En ensayos *in vitro* hemos demostrado que PAF26 interacciona inespecíficamente con ARN. El estudio de los determinantes de estas características nos ayudará a comprender y mejorar las propiedades antimicrobianas específicas de pequeños AMP.

## OS-14

**PROTECCIÓN DE GERANIO FRENTE A *Botrytis* Y *Xanthomonas* POR DISTINTAS OXILIPINAS**

**RAMOS-SOLANO, B.<sup>1</sup>, GUTIERREZ-MAÑERO, F.J.<sup>1</sup>, HAMBERG, M.<sup>2</sup>, MENÉNDEZ, E.<sup>3</sup>, BORJA, M.<sup>3</sup>**

<sup>1</sup>Universidad San Pablo CEU. Facultad de Farmacia. PO Box 67. 28668 Boadilla del Monte (Madrid). E-mail: bramsol@ceu.es

<sup>2</sup>Karolinska Institute Institutionen för Medicinsk Biokemi och Biofysik (MBB), Avdelningen för medicinsk kemi II. Suecia. E-mail: Mats.Hamberg@ki.se

<sup>3</sup>Fundación Promiva. Finca La Veguilla, Villaviciosa de Odón (Madrid). E-mail: imasd@promiva.com

Las epidemias de *Botrytis* en invernaderos de producción de planta ornamental resultan en fuertes pérdidas económicas. Este factor junto con la legislación europea restrictiva en el uso de pesticidas químicos de impacto ambiental contaminante hace necesario probar nuevos productos naturales que puedan conferir cierta protección a las plantas. Las oxilipinas aparecen como una alternativa atractiva puesto que son compuestos naturales que están implicados en la estimulación de las vías defensivas de las plantas. Un *screening* in vitro de 43 oxilipinas naturales frente a 13 microorganismos fitopatógenos (Prost *et al.*, Plant Physiology, December 2005, Vol. 139, pp. 1902–1913) identificó cuales eran las que tenían mayor potencial de aplicación práctica. El inconveniente es la baja estabilidad que presentan naturalmente ya que son fotosensibles.

En este trabajo se ha evaluado la capacidad de distintas oxilipinas (naturales y sintéticas) de conferir protección frente a *Botrytis cinerea* y a *Xanthomonas campestris* en geranio (cv. Boda Gitana). Los experimentos se han llevado a cabo realizando una incisión en la hoja, que se inoculaba en primer lugar con el patógeno y enseguida se añadía la oxilipina. Cada oxilipina se ensaya en dos concentraciones (2 mM y 0,2 mM), y el patógeno en dos concentraciones (10E8 y 10E4). La evaluación de los síntomas se realizó a los 4 y 7 días, tomando datos a los 7 días. En el caso de *Botrytis* se evalúa el diámetro de la lesión; en el caso de *Xanthomonas*, la superficie afectada con síntomas de clorosis. Los experimentos se han repetido al menos tres veces con resultados similares.

Como resultados más relevantes destacan el ácido anacárdico y el ácido vernólico que son efectivas tanto frente a *Xanthomonas* como a *Botrytis*. En cuanto a las sintéticas el ácido 13(S)-Hydroxy-9(Z),11(E),15(Z)-octadecatrienoico (13-HOT) es efectivo frente a *Botrytis* mientras que el ácido 10,13-Epoxy-10,2-octadecadienoico es efectivo frente a *Xanthomonas*. Además, son más efectivas a una concentración de oxilipina menor (0,2 mM) hecho ya registrado para otras moléculas naturales.

## OS-15

***Trichoderma asperellum* (T34): REDUCCIÓN DE LAS ENFERMEDADES PRODUCIDAS POR *Fusarium oxysporum* Y *Rhizoctonia solani*****TRILLAS, M.I.<sup>1</sup>, CASANOVA, E.<sup>1</sup>, SANT, M.D.<sup>1</sup>, SEGARRA, G.<sup>1</sup>, BORRERO, C.<sup>2</sup>, AVILÉS, M.<sup>2</sup>**<sup>1</sup>Departament de Biologia Vegetal, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona, Avda. Diagonal, 645, 08028 Barcelona. E-mail: mtrillas@ub.edu<sup>2</sup>Departamento de Ciencias Agroforestales, EUITA Universidad de Sevilla, Ctra. Utrera, Km. 1, 41013 Sevilla. E-mail: aviles@us.es

*Trichoderma asperellum*, cepa T34 (depositada en la C.E.C.T. 20417 y con patente número PCT-ES02-00311) actúa como agente de control biológico al reducir de manera significativa las enfermedades producidas por *Fusarium oxysporum* y *Rhizoctonia solani*. T34 (103 ufc/ml) incorporado a sustratos de cultivo formulados a base de composts reduce en plantas de tomate un 80% (en comparación con la turba) la incidencia de enfermedad producida por *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* (105 ufc/ml). T34 incorporado a las raíces de clavel y en el sustrato de cultivo (turba) en la concentración de 104 ufc/ml reduce en un 90% la severidad ocasionada por *F. oxysporum* f.sp. *dianthi* (105 ufc/ml). T34 (103 ufc/ml) incorporado a la turba o a compost de corcho reduce en un 50% las podreduras de semillas ocasionadas por *R. solani* en plantas de pepino. Las poblaciones de T34 aumentan en presencia de *F. oxysporum*, mientras que las del patógeno resultan reducidas. T34 coloniza diversos sustratos de cultivo (turba de *Sphagnum*, compost de residuos sólidos urbanos, formulado con turba y perlita [2:1:1 v/v], compost de corcho, compost de orujo, compost de alperujo y compost de residuo agotado de champiñón), con distintos niveles de supresividad natural. T34 incorporado en ellos mejora de manera consistente y significativa el control de las enfermedades objeto de estudio. T34 coloniza la parte externa de las raíces de plantas y crece asociado a ellas, confiriéndole protección física y facilitándole la absorción de algunos nutrientes. Se está estudiando el papel de T34 en la inducción de respuestas de resistencia en las plantas y según resultados preliminares obtenidos, podría actuar a través de la ruta del ácido salicílico, ya que los niveles de esta hormona aumentan, así como la actividad peroxidasa y quitinasa.

**OS-16****MODO DE ACCIÓN DEL AGENTE DE BIOCONTROL *Penicillium oxalicum* FRENTE A LA FUSARIOSIS DEL TOMATE****SABUQUILLO, P., CUBERO, J., SZTEJNBERG, A., DE CAL, A., MELGAREJO, P.**

*Dpto. Protección Vegetal, Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria, SGIT-INIA, Ctra. de la Coruña, Km. 7,5, 28040 Madrid. E-mail: mpsc@inia.es*

*Penicillium oxalicum* (PO) es un agente de biocontrol que induce resistencia frente a *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*, causante de la marchitez vascular del tomate. El biocontrol de la enfermedad está basado en la aplicación de conidias de PO a semilleros de plántulas de tomate siete días antes del transplante. Para controlar la enfermedad, la rizosfera de las plantas tratadas debe mantener al menos  $10^6$ - $10^7$  conidia de PO/g en el momento del transplante.

Se ha estudiado el proceso de adhesión de las conidias de PO con las raíces de las plántulas de tomate tras su aplicación y su evolución a lo largo del tiempo, antes y después del transplante; así como la expresión de proteínas relacionadas con patogenicidad (PR).

Para ello se estimó la población de PO en la rizosfera (cfu/g) de plantas de tomate (cv. San Pedro) regadas con una suspensión de  $10^7$  conidia de PO/g de sustrato, en presencia y en ausencia de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*. Simultáneamente se realizó un estudio sobre la interacción entre PO y la raíz de tomate mediante microscopía electrónica de barrido (SEM). Se comprueba que inmediatamente después de la aplicación de PO, las conidias se depositan sobre las raíces y la población se mantiene constante durante 30 días. El micelio de PO aparece 15 días después del tratamiento, y las conidias desaparecen a los 60 días, momento en que se observa un descenso significativo de la población.

Para el estudio de los mecanismos de respuesta de la planta a la colonización de PO se diseñaron cebadores y sondas basados en las secuencias de los genes de las proteínas PR-1 y PR-2 para determinar, mediante RT-PCR en tiempo real, la acumulación de ARNm de estas dos proteínas en plantas tratadas y no tratadas con PO. Los resultados obtenidos muestran que entre los mecanismos de defensa que se activan en la planta después del tratamiento con PO están aquellos correspondientes a una respuesta sistémica adquirida (SAR).

El conocimiento tanto de la colonización de PO en raíces de tomate así como de los mecanismos moleculares de la respuesta de la planta al tratamiento con este agente de biocontrol nos ayudará a clarificar su modo de acción contra la fusariosis del tomate.

**OS-17****MEJORA DE *Pantoea agglomerans* CPA-2 PARA SU APLICACIÓN EN CAMPO EN EL CONTROL DE LAS PRINCIPALES PODREDUMBRES DE POSTCOSECHA DE CITRICOS**

**USALL, J., CAÑAMÁS, T., CASALS, C., SOLSONA, C., VIÑAS, I., TEIXIDÓ, N.**

Area Postcollita. Centro UdL-IRTA, Avd. Rovira Roure 191, 25198 Lleida. E-mail: josep.usall@irta.es

La sociedad actual muestra un interés especial por la salubridad de los alimentos y existe una tendencia a reducir o eliminar la presencia de residuos químicos en frutas y hortalizas. El control biológico se presenta como una de las alternativas más viables a los productos químicos de síntesis. Sin embargo, el control biológico en campo se ve limitado por las condiciones fluctuantes del medio y por el estrecho margen de condiciones ambientales bajo las cuales los agentes de biocontrol son capaces de establecerse y controlar de forma efectiva plagas y enfermedades.

Los microorganismos en general son capaces de superar condiciones de estrés ambiental mediante la inducción de mecanismos de protección, como la acumulación de reservas endógenas en el citoplasma. Para ello, en este estudio se hizo crecer a *P. agglomerans* en un medio de cultivo, modificando su actividad de agua ( $a_w$ ) con diferentes concentraciones de NaCl. Posteriormente se aplicaron estas cepas mejoradas en campo para el control de *P. digitatum* y *P. italicum* en cítricos. Ambos patógenos se manifiestan principalmente en postcosecha aunque su origen se encuentra en el campo.

*P. agglomerans* CPA-2 ha demostrado ser un agente de biocontrol efectivo en el control de enfermedades de postcosecha en cítricos, pero nunca había sido aplicado en precosecha.

Se llevaron a cabo ensayos durante dos campañas consecutivas: en la primera se vio que el agente de biocontrol, tanto el modificado, como el sin modificar, mostraba problemas de supervivencia en la superficie de naranjas en condiciones de campo y que consecuentemente el tratamiento realizado en precosecha no presentaba efectividad.

En la siguiente campaña se estudió la posibilidad de mejorar la supervivencia de *P. agglomerans* mediante su formulación y la adición de diferentes sustancias como son aceites de verano, aditivos alimentarios, etc. Los mejores resultados de supervivencia se obtuvieron con el recubrimiento alimentario llamado *Food Coat*. Se comprobó que el agente de biocontrol crecido a bajas  $a_w$ , formulado y aplicado en campo junto con *Food Coat* presentaba una mejor supervivencia en la superficie de las naranjas y que además se obtenía una buena efectividad en el control de ambos patógenos en postcosecha, tanto inoculados a nivel natural como artificial. Estos resultados demuestran el potencial de esta estrategia.

**OS-18****INDUCCIÓN DE RESISTENCIA FRENTE A LA INFECCIÓN POR *Penicillium digitatum* DURANTE LA POSTCOSECHA DE LOS FRUTOS CÍTRICOS: BASES MOLECULARES Y METABOLISMO DE FENILPROPANOIDES**

**BALLESTER, A.R.<sup>1</sup>, LAFUENTE, M.T.<sup>1</sup>, GADEA, J.<sup>2</sup>, FORMENT, J.<sup>2</sup>, GONZÁLEZ-CANDELAS, L.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>*Grupo de Fisiología y Biotecnología de Postcosecha, Instituto de Agroquímica y Tecnología de los Alimentos (IATA-CSIC), Apdo. Correos 73, Burjassot, 46100 Valencia. E-mail: aballester@iata.csic.es*

<sup>2</sup>*Laboratorio de Genómica, Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas (IBMCP, UPV-CSIC), Avda. de los Naranjos s/n, 46022 Valencia.*

La inoculación de *Penicillium digitatum* en frutos cítricos seguida de un tratamiento de calor induce en el fruto resistencia frente a un ataque posterior por este patógeno. Con el fin de conocer los mecanismos moleculares subyacentes a esta resistencia inducida, hemos empleado una micromatriz de cDNAs elaborada en el marco del Proyecto de Genómica Funcional de Cítricos que contiene clones procedentes de diversas genotecas construidas a partir de tejidos de cítricos en diferentes estados fisiológicos y en respuesta a diversos estreses. A partir de las hibridaciones con muestras de frutos cítricos sometidos al tratamiento inductor se llevó a cabo la identificación de genes con expresión diferencial, observándose una variación significativa en el nivel de expresión de varios genes destacando aquellos que codifican ACC oxidasas, O-metiltransferasas, una L-fenilalanina amonio-liasa (PAL) y la proteína taumatina. Asimismo, algunos de los procesos biológicos que se inducen de forma más significativa son el metabolismo de la metionina, el de fenilpropanoides y la biosíntesis de compuestos aromáticos.

Teniendo en cuenta que el metabolismo de fenilpropanoides parece implicado en la inducción de resistencia de los frutos cítricos, se ha profundizado en el estudio de esta ruta metabólica utilizando el análisis de la expresión génica mediante hibridación *Northern* y el análisis de fenoles por HPLC. A partir del análisis del patrón de expresión de 17 genes del metabolismo de compuestos fenólicos se observó que el sistema inductor incrementó la acumulación del transcrito de genes que codifican una PAL, varias O-metiltransferasas, una sinapil alcohol deshidrogenasa, una cinamoil alcohol deshidrogenasa y una peroxidasa. El estudio se completó con el análisis de fenoles mediante HPLC, observándose que de 35 compuestos fenólicos mayoritarios detectados en los frutos cítricos, 14 correspondieron a compuestos inducidos por el tratamiento. El cambio más relevante se observó en la escoparona y en dos furanocumarinas, no observándose cambios en compuestos mayoritarios como la hesperidina o la narirutina.

## OS-19

**FILOGENIA MOLECULAR Y SISTEMÁTICA DE HONGOS OPHIOSTOMATALES (ASCOMYCETES: OPHIOSTOMATALES) ASOCIADOS AL COMPLEJO DEL AZULADO DE LA MADERA DE *Pinus radiata* EN EL NORTE DE ESPAÑA****ROMÓN, P., GOLDARAZENA, A.***NEIKER, Instituto Vasco de Investigación y Desarrollo Agrario, Departamento de Producción y Protección Vegetal, Centro de Arkaute, Apdo. 46, Vitoria-Gasteiz.*

Los hongos ophiostomatoides (*Ceratocystis sensu lato* Ell. & Halst.) representan un agrupamiento artificial de géneros morfológicamente similares pero filogenéticamente distanciados, tales como *Ophiostoma*, *Grossmania*, *Ceratocystiopsis* y *Ceratocystis*. Entre los géneros de anamorfo asociados con dichos telomorfos se encuentran *Pesotum*, *Sporothrix*, *Leptographium*, *Hyalorhinocladia*, *Thielaviopsis*, *Knoxdaviesia* y *Chalara*. Los miembros con anamorfos que presentan desarrollo conidial apical se dividen filogenéticamente en dos géneros telomórficos: *Ophiostoma* (*Pesotum*, *Sporothrix* y *Hyalorhinocladia*) y *Grossmania* (*Leptographium*). Tanto estos taxones como las especies incluidas en *Ceratocystis sensu stricto*, así como numerosas especies del orden Microascales, son ascomycetes que forman ascomas periteciales y conidióforos sinemáticos muy adaptados a la dispersión por insectos. Esta convergencia evolutiva, unida a la frecuente sinanamorfía, supone que aún exista una considerable confusión taxonómica en cuanto a los numerosos ascomycetes dispersados por insectos.

En el País Vasco, el azulado de la madera altera sus propiedades tecnológicas y causa una reducción del 50% en el precio de la madera destinada a la industria del mueble, provocando pérdidas anuales de unos 184 millones de euros. El conocimiento de los hongos implicados en este complejo fitopatológico en la Península Ibérica es muy limitado. Además, se estima un alto riesgo de introducción en Europa de hongos del azulado de cuarentena EPPO A1 (*Ophiostoma wagneri*, *Ceratocystis virescens*) de forma que el objetivo inicial fue determinar la biodiversidad específica presente, así como dilucidar los insectos involucrados en la epidemiología de la enfermedad. Para ello, se realizaron aislamientos a partir de: *Hylurgops palliatus*, *Hylastes attenuatus*, *Ips sexdentatus*, *Dryocoetes autographus*, *Orthotomicus erosus*, *Tomicus piniperda*, *Hylastes ater* (Coleoptera: Scolytidae) y *Brachyderes incanus* (Coleoptera: Curculionidae). Mediante análisis canónico de correspondencias, se analizó la variación en la detección de cada hongo en función del vector, su nicho ecológico, el tiempo, y las respectivas interacciones.

Se amplificaron mediante PCR la región ITS1-5.8S-ITS2 del rDNA y el gen de la  $\beta$ -tubulina, y mediante alineamiento y comparación de homología de secuencias usando SequenceNavigator, MAFFT, MEGA3 y PAUP, se determinaron las relaciones filogenéticas. Se identificaron 16 especies fúngicas comunes, así como 6 especies nuevas que fueron sometidas a análisis morfométrico. Este trabajo puede ser valioso en un futuro para desarrollar herramientas de diagnóstico molecular rápido y simultáneo para la certificación sanitaria de la madera de importación.



**OS-20****MEJORA DE LA RESISTENCIA DEL TABACO A PATÓGENOS FÚNGICOS Y A ESTRÉS ABIÓTICO MEDIANTE LA EXPRESIÓN DE UNA  $\beta$ -1,3-GLUCANASA DE *Trichoderma harzianum*****RINCÓN, A.M., MORENO-MATEOS, M.A., CODÓN, A.C., BENÍTEZ, T.***Departamento de Genética, Facultad de Biología, Universidad de Sevilla, Avda. Reina Mercedes s/n, 41012 Sevilla.*

*Trichoderma* es un hongo filamentoso que se emplea como agente de control biológico de enfermedades de plantas. Su capacidad antagonista contra diversos patógenos se ha relacionado con la competencia por los nutrientes y el espacio, la inactivación de los sistemas de ataque del patógeno, el ataque directo al mismo o la estimulación de los mecanismos de defensa de las plantas. En el ataque directo a otros patógenos, en concreto a otros hongos, *Trichoderma* excreta una batería de enzimas hidrolíticas degradadoras de pared celular entre las que se encuentran las  $\beta$ -1,3-glucanasas. Los genes que codifican para estas enzimas se han convertido en potentes herramientas de control biológico, sobre todo su expresión en plantas para potenciar los sistemas de defensa de las mismas.

En este trabajo se muestran los resultados de la expresión del gen *bgn13.1* que codifica una endo- $\beta$ -1,3-glucanasa extracelular de *Trichoderma harzianum*, en *Nicotiana tabacum*. El 60% de las plantas F0 mostró una reducción en el vigor y la fertilidad, mientras el 40% restantes eran fenotípicamente indistinguibles de la línea silvestre. Las alteraciones fenotípicas observadas, sin embargo, no estaban relacionadas ni con el número de copias del transgen inserto en el genoma ni con los niveles de actividad  $\beta$ -1,3-glucanasa detectados en los extractos de las plantas, indicando que el producto de dicho gen no interfería con el desarrollo de las mismas. En comparación con la línea silvestre, todas las líneas homocigóticas que poseían una única inserción del gen *bgn13.1* mostraron un incremento del 40-60% en la supervivencia al ataque por el hongo *Rhizoctonia solani*. Las líneas transgénicas también eran más resistentes a otras condiciones de estrés como la presencia de NaCl, de sorbitol o de CdCl<sub>2</sub> en el medio. Algunas de estas líneas tenían potenciadas actividades enzimáticas como la quitinasa, la peroxidasa y la actividad fenilalanina amonio liasa (PAL), indicando que la proteína BGN13.1 podría actuar como elicitador de la respuesta SAR, preparando a la planta para una respuesta más rápida y efectiva en condiciones de estrés tanto biótico como abiótico.

**OS-21****SELECCIÓN DE FUNGICIDAS ALTERNATIVOS AL BENOMILO PARA EL CONTROL DEL CHANCRO DE *Diplodia* EN ALCORNOQUE**

**LUQUE, J., PERA, J., PARLADÉ, X.**

*Dep. Protecció Vegetal, Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentàries (IRTA), Centre de Cabrils, Ctra. de Cabrils s/n, 08348 Cabrils (Barcelona). E-mail: jordi.luque@irta.es*

Hasta el año 2003, el benomilo se venía utilizando en Cataluña para el control del chancro de *Diplodia* en el alcornoque, una enfermedad causada por el hongo *Botryosphaeria corticola* (anamorfo: *Diplodia corticola*). Debido a la supresión de este fungicida del registro de productos fitosanitarios, ha sido necesario encontrar otros productos alternativos para el control de esta enfermedad.

En una primera fase llevada a cabo en el laboratorio, se estudió la capacidad de 14 fungicidas para inhibir el crecimiento del hongo en placa y establecer así una primera clasificación de los productos de acuerdo con este criterio. Los fungicidas más eficaces se probaron posteriormente en campo, en dos ensayos independientes y bajo condiciones reales de descorche. En estas pruebas, realizadas entre 2003 y 2005, se emplearon siete fungicidas: benomilo (usado como referencia), carbendazima, ciprodinilo, metiltiofanato, tiabendazol y dos productos con un principio activo cúprico (sulfato e hidróxido). Los productos se aplicaron en un diseño experimental de bloques al azar, con cuatro repeticiones, y con un mínimo de 150 árboles tratados por producto y repetición, de los que el 20% fueron árboles no tratados (control). A los seis meses de haber efectuado los tratamientos se evaluaron todos los árboles, estimándose la superficie media de los chancros y el porcentaje de la superficie descorchada que había sido afectada. Para examinar la eficacia protectora de los fungicidas se elaboraron índices de eficacia de Abbott a partir de las variables anteriores y se compararon los distintos tratamientos entre sí y con los controles respectivos.

Carbendazima y metiltiofanato, éste último habiéndose ensayado en los dos experimentos de campo, fueron los fungicidas que mostraron una mayor eficacia protectora frente a la enfermedad. El índice de eficacia de la carbendazima osciló entre 80 y 85% mientras que el del metiltiofanato se situó entre 40 y 70%, ambos estadísticamente significativos. En el otro extremo, los fungicidas de base cúprica mostraron una eficacia protectora nula o moderada (entre 0 y 25%).

## OS-22

**MODELOS DE PREDICCIÓN PARA EL MANEJO INTEGRADO DE *Meloidogyne* EN CULTIVO DE TOMATE**

**SORRIBAS, F.J.<sup>1</sup>, ORNAT, C.<sup>1</sup>, VERDEJO-LUCAS, S.<sup>2</sup>, TALAVERA, M.<sup>3</sup>, TORRES, J.<sup>4</sup>, CORTADA, L.<sup>2</sup>, VALERO, J.<sup>5</sup>**

<sup>1</sup>Dep. Enginyeria Agroalimentària i Biotecnologia. UPC, Av Canal Olímpic s/n, 08860 Castelldefels (Barcelona). E-mail: francesc.xavier.sorribas@upc.edu.

<sup>2</sup>IRTA, Protecció Vegetal.

<sup>3</sup>Centro de Investigación y Formación Agraria, Junta de Andalucía.

<sup>4</sup>Consell Insular d'Eivissa i Formentera.

<sup>5</sup>Dep. Matemàtica Aplicada III, UPC.

El desarrollo de programas de manejo integrado requiere de modelos de predicción que ayuden a la toma de decisiones. En 1999 iniciamos ensayos para generar una base de datos suficiente para elaborar modelos de predicción de i) pérdidas de producción, ii) desarrollo del nematodo, iii) tasa de multiplicación, y iv) supervivencia. Los ensayos se llevan a cabo en invernadero y en cámaras climáticas. En invernadero, las parcelas son muestreadas en febrero-marzo, en pretransplante de tomate (Pi), para seleccionar gradientes de población, y al final del cultivo (Pf) para calcular la tasa de multiplicación (Pf/Pi) y la tasa de supervivencia durante períodos de descanso entre cultivos. Cada muestra se compone de ocho submuestras de los primeros 30 cm del suelo. La extracción de los nematodos se realiza mediante bandejas de Baermann a partir de 500 ml de suelo. La producción se evalúa a partir del peso de tomates de los 6 primeros pomos de las 8 plantas centrales de la parcela. En cámara climática, se realizan ensayos para desarrollar modelos fenológicos de *Meloidogyne* en tomate, y modelos de supervivencia. Tomateras cv. Durinta se trasplantan en viales de 100 ml de capacidad, se inoculan con 50 juveniles y se incuban a 15, 20, 25 y 30 °C de temperatura. Periódicamente se extraen 3 plantas de cada cámara, se tiñen los nematodos en las raíces con fucsina ácida y se determina su estadio de desarrollo. Los ensayos de supervivencia se realizan con las muestras de suelo tomadas al final del cultivo en invernadero. El suelo se incuba en viales de 50 ml de capacidad a 15, 20, 25 y 30 °C de temperatura. De cada cámara se extraen los nematodos de tres viales mediante las bandejas de Baermann modificadas y se contabilizan los nematodos supervivientes. La duración del ensayo es de ocho meses. Los resultados de estos estudios han permitido estimar las pérdidas de producción de tomate cultivado de marzo a julio en un 36% según el modelo de pérdidas de producción de Seinhorst ( $R^2 = 0,971$ ). El nematodo completa tres generaciones durante el cultivo de tomate en invernadero según se desprende del modelo fenológico elaborado para *Meloidogyne* en tomate en cámara climática. La tasa máxima de reproducción del nematodo (Pf/Pi) es de 490 y sigue una relación potencial inversa respecto la Pi ( $R^2 = 0.8476$ ). Esta relación permite estimar la población del nematodo al final del cultivo en relación a la Pi. La supervivencia del nematodo en suelo es inversamente proporcional a los grados día acumulados durante los períodos sin cultivo ( $R^2 = 0,359$ ), así como la viabilidad del inóculo superviviente ( $R^2 = 0,5151$ ).

## OS-23

**IDENTIFICACIÓN DE LOS PATÓGENOS QUE OCASIONAN LA BACTERIOSIS DEL GUISANTE EN CASTILLA Y LEÓN****MARTÍN, A.<sup>1</sup>, PALOMO, J.L.<sup>2</sup>, GARCÍA C.A.<sup>1</sup>, CAMINERO, C.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Departamento de Producción Vegetal y Agronomía. Instituto Tecnológico Agrario de Castilla y León (ITACyL), Ctr. Burgos–Portugal, Km 119, Finca Zamadueñas, 47071 Valladolid. E-mail: camsalco@itacyl.es

<sup>2</sup>Área de Bacteriología, Centro Regional de Diagnóstico (Junta de Castilla y León), Apdo. 61, 37080 Salamanca.

El cultivo del guisante proteaginoso (*Pisum sativum* L) está experimentado un gran incremento en Castilla y León, siendo en la actualidad la leguminosa grano más cultivada en España. Se han demostrado los beneficios de la realización de siembras otoño – invernales, permitiendo un notable aumento en el rendimiento. Bajo esta situación se está observando una elevada incidencia de los ataques de bacteriosis en los secanos castellano-leoneses. La bacteriosis del guisante está ocasionada, fundamentalmente, por *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* (Pss) y *Pseudomonas syringae* pv. *psii* (Psp). En este trabajo presentamos los resultados de la identificación de los patógenos que están originando la bacteriosis en Castilla y León en las campañas 2004, 2005 y 2006. Para la identificación se han utilizado pruebas bioquímicas y nutricionales, diagnóstico molecular basado en PCR con cebadores específicos para Pss y Psp, y pruebas de patogénesis en un conjunto de variedades diferenciales y en las variedades de origen de cada cepa. Las pruebas bioquímicas y nutricionales han identificado perfectamente los aislados de *P. syringae*, pero no se han mostrado fiables para diferenciar los patovares encontrados de esta especie, ya que la prueba de la homoserina, que clásicamente se ha utilizado para diferenciar entre Pss y Psp, ha presentado discordancia con las otras metodologías empleadas. El resultado de las pruebas moleculares y de patogénesis ha coincidido plenamente, por lo que se han utilizado finalmente para la distinción entre patovares. De las campañas 2004 y 2005 se han obtenido 28 cepas de Pss y 52 de Psp. Las cepas aisladas en el año 2006 están siendo identificadas actualmente. Dentro de Psp se han encontrado, predominantemente, las razas 4 y 6, aunque también aparecieron las razas 2 y 5, y una cepa que no se ha podido asignar a alguna las razas conocidas hasta el momento. Con los aislados clasificados como Pss, no se ha encontrado variabilidad patogénica. Asimismo, se han identificado aislados de *P. viridiflava* que se han mostrado patógenos en cámara de ambiente controlado, estando actualmente, comprobándose su poder patógeno en condiciones de campo. Las evaluaciones realizadas en los cultivares utilizados en Castilla y León revelan que ninguno es resistente a la raza 6 de *Psp* y muy pocos a la 4. El presente estudio ha sido financiado por el proyecto ITACyL 2004/845. Alberto Martín agradece al INIA la concesión de una beca predoctoral.

**OS-24****PUESTA A PUNTO DEL MICROINJERTO DE ÁPICES CAULINARES *IN VITRO* PARA LA INTRODUCCIÓN Y CUARENTENA DE FRUTALES DE HUESO LIBRES DE VIRUS Y VIROIDES****CONEJERO, A., ROMERO, C., MARTÍNEZ-CALVO, J., LLÁCER, G.**

*Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA), Ctra. Moncada a Náquera, Km 5, 46113 Moncada (Valencia). E-mail: gllacer@ivia.es*

A mediados de los años 70 se puso a punto en el IVIA la técnica del microinjerto de ápices caulinares *in vitro* (MAC) para la obtención de plantas de cítricos libres de virus y viroides. Posteriormente, en los años 80, se puso a punto la misma técnica, que se utiliza rutinariamente desde entonces, para la introducción y cuarentena de cítricos. También en los años 80 se ensayó el MAC para el saneamiento de melocotoneros y almendros con buenos resultados. Se trata ahora de poner a punto esta técnica para la introducción y cuarentena de frutales de hueso, particularmente para variedades de melocotonero y ciruelo japonés, que son las que se importan del extranjero en mayor medida. El primer paso consistió en determinar la mejor época de recepción de varetas y la duración del período de frío artificial para obtener brotes adecuados para el aislamiento de los ápices caulinares. Para las dos especies, la mejor época fue el final del invierno, ya que se obtuvieron buenos brotes para el aislamiento de ápices en cualquiera de las condiciones estudiadas. A continuación se procedió a realizar los microinjertos *in vitro* de ápices procedentes de árboles infectados por uno o más de los siguientes patógenos: *Prunus necrotic ring spot virus* (PNRSV), *prune dwarf virus* (PDV), *apple chlorotic leaf spot virus* (ACLSV) y *peach latent mosaic viroid* (PLMVd). El portainjerto normalmente utilizado fue el melocotonero cv. Nemaguard y el tamaño de ápices más frecuente fue de 1-1,5 mm. Con este tamaño de ápices, el porcentaje de prendimientos osciló entre el 4,3% y el 38,5%, según variedades, con una media del 16,4%. Ápices más pequeños de 1 mm son muy difíciles de injertar con éxito cuando se trabaja con las especies citadas, mientras que ápices más grandes de 1,5 mm dan porcentajes de prendimiento muy altos pero las plantas resultantes siguen infectadas. La comprobación de la eliminación de los virus se realizó mediante ELISA-DAS y en el caso del viroide mediante hibridación molecular con sonda marcada con digoxigenina. Los resultados preliminares alcanzados son los siguientes: ACLSV se eliminó en 17 plantas de las 20 analizadas (85%), PNRSV en 3 de 17 (18%), mientras que PLMVd no se pudo eliminar de ninguna de las 18 examinadas. Los resultados con PDV fueron dudosos. Se han obtenido dos plantas libres de virus de ciruelo cv. Methley, que presentaba una doble infección por PNRSV y ACLSV, y que no se había podido encontrar sano en ningún vivero.

**OS-25****INMUNOMODULACIÓN DE LA INFECCIÓN DEL VIRUS DE LA SHARKA MEDIANTE EXPRESIÓN ESTABLE Y TRANSITORIA DE ANTICUERPOS RECOMBINANTES EN *Nicotiana benthamiana*****GIL, M.<sup>1</sup>, ESTEBAN, O.<sup>1</sup>, GARCÍA, J.A.<sup>2</sup>, PEÑA, L.<sup>1</sup>, CAMBRA, M.<sup>1</sup>**<sup>1</sup>*Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA), Ctra. Moncada-Náquera, Km 5, 46113 Moncada (Valencia). E-mail: maitegil@ivia.es.*<sup>2</sup>*Centro Nacional de Biotecnología (CNB), Campus de la Universidad Autónoma, CSIC, 28049 Cantoblanco (Madrid). E-mail: jagarcia@cnb.uam.es*

*Plum pox virus* (PPV) es el agente causal de la *sharka*, enfermedad que afecta a frutales de hueso y es uno de los factores limitantes del cultivo de frutales en las zonas afectadas.

La expresión constitutiva de fragmentos de anticuerpos recombinantes (rAbs) contra proteínas virales ha demostrado que puede inmunomodular o interferir con la infección viral. La expresión constitutiva de un rAb, en formato de cadena simple de fragmentos variables (scFv), específico de la NIb RNA replicasa de PPV (scFv2A) en plantas transgénicas de *Nicotiana benthamiana* ha demostrado, en experimentos de desafío con PPV, una reducción significativa del número de plantas infectadas con respecto a plantas control no transgénicas. Así pues, la inmunomodulación es una estrategia prometedora, y sin los riesgos de la transformación con secuencias virales, para producir plantas resistentes a PPV.

Con el fin de tener más información sobre la manera cómo los fragmentos scFvs actúan sobre la infección viral, se realizaron experimentos de agroinfiltración con un co-cultivo de *Agrobacterium tumefaciens* recombinante portador de un clon agroinfectivo de PPV fusionado a GFP (PPV-GFP) y de diferentes construcciones de fragmentos scFv. Se agroinfiltró, en plantas transgénicas que expresaban el fragmento scFv2A y plantas no transgénicas, una hoja por planta con el clon PPV-GFP junto con construcciones de fragmentos scFv2A o con construcciones de fragmentos scFv no específicos de PPV como control. A los dos días se cortó la hoja agroinfiltrada, se evaluó el nivel de infección mediante ELISA-DASI y se cuantificó el número y área de los focos fluorescentes producidos por la GFP en estas hojas. Posteriormente y también por observación de fluorescencia se determinó en qué momento se establece la infección sistémica en las diferentes plantas agroinfiltradas. Según los resultados observados, solamente se bloqueó totalmente la infección sistémica del virus en plantas transgénicas y co-agroinfiltradas con el clon PPV-GFP y la construcción scFv2A.

La principal ventaja de este sistema es que permite obtener información sobre la evolución de la infección mucho antes de que aparezcan los síntomas. Además se trata de un sistema menos costoso y más rápido para comprobar *in situ* si un fragmento scFv puede ser un buen candidato para generar resistencia.

**OS-26****CARACTERIZACIÓN BIOLÓGICA DE UN NUEVO VIROIDE EN CÍTRICOS****SERRA, P., DURÁN-VILA, N.**

*Departamento de Protección Vegetal y Biotecnología, Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias, Apartado Oficial, 46113 Moncada (Valencia). E-mail: nduran@ivia.es*

La inoculación de una serie de genotipos de cítricos y especies de géneros afines con una mezcla artificial de viroides permitió identificar en *Atlantia citroides*, especie que acumula en bajo título la mayoría de viroides inoculados, un nuevo viroide no descrito previamente. La secuenciación de dicho viroide ha permitido establecer que tiene un tamaño de 294 nucleótidos y contiene las regiones conservadas (CCR y TCH) características de las especies del género *Apscaviroide*.

Mediante análisis por SSCP y secuenciación de una selección de clones, se eligió la variante de secuencia mas frecuente para construir clones diméricos y obtener transcritos a partir de los mismos. La inoculación de estos transcritos en plántulas de cidro Etrog permitió demostrar la infectividad de este nuevo viroide y recuperarlo a partir de las plantas inoculadas. Las plantas no mostraron ningún tipo de síntomas a lo largo de periodo de incubación 6 meses que utiliza habitualmente para el indexing de viroides de cítricos, por lo que tentativamente se le denominó *Viroide latente de los cítricos* (CiLVd). Sin embargo después de un periodo de incubación mas largo, las plantas infectadas desarrollaron pequeñas pústulas con exudaciones de goma.

Para determinar si existen interacciones entre este viroide y otros dos viroides, CBLVd y CVd-III, ambos también del género *Apscaviroide*, se propagaron por injerto en limón rugoso, yemas de cidro infectado con CiLVd y se inocularon con CBLVd y CVd-III. Como controles se utilizaron propagaciones de yemas infectadas con CiLVd que no se inocularon, y propagaciones de yemas libres de viroides que se inocularon con CBLVd o con CVd-III. Las plantas infectadas con CBLVd, con CVd-III o CiLVd desarrollaron los síntomas características de cada uno de estos viroides, mientras que las plantas infectadas con dos viroides, CiLVd + CBLVd, y CiLVd + CVd-III desarrollaron síntomas muy acusados de enanismo y epinastia. Estos resultados, demuestran la existencia de sinergismo entre el CiLVd y los dos viroides del mismo género. Ello, unido a la baja identidad de secuencia entre CiLVd y CBLVd (59,86%) y entre CiLVd y CVd-III (62,59%), refuerza la propuesta de que CiLVd es un nuevo viroide y no una variante o raza de las otras especies del mismo género.

**OS-27****AMPLIFICACIÓN ISOTERMA POR NASBA ASOCIADA A HIBRIDACIÓN DE FLUJO A TRAVÉS DE MEMBRANAS PARA LA DETECCIÓN DEL VIRUS DE LA SHARKA****OLMOS, A., BERTOLINI, E., CAPOTE, N., CAMBRA, M.**

*Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA), Departamento de Protección Vegetal y Biotecnología, 46113 Moncada (Valencia). E-mail: aolmos@ivia.es*

*Plum pox virus* (PPV) causa la enfermedad de la *sharka* considerada como la virosis más grave de los frutales de hueso y produce graves daños en la producción e importantes pérdidas económicas. Cualquier estrategia de control requiere en algún momento de sistemas de detección sensibles y fiables para una detección temprana y fiable del virus, para evitar su dispersión. Con esta finalidad se ha desarrollado un método de amplificación isoterma basada en la secuencia de ácidos nucleicos (NASBA), con una novedosa hibridación de flujo a través de membranas (FH). Este método ha sido validado para su uso con muestras de 193 árboles adultos de distintos frutales de hueso. Se realizaron extractos, se purificó ARN total (Qiagen) y se analizaron los extractos y los purificados mediante los métodos recomendados por la Organización Europea y Mediterránea para la Protección de Plantas (DASI-ELISA con el anticuerpo monoclonal 5B-IVIA, RT-PCR y Co-PCR). Los resultados se compararon con los obtenidos con la nueva técnica NASBA-FH. El diagnóstico de PPV por ELISA y NASBA-FH coincidieron en un 94% ( $k=0.80\pm0.07$ ) y los métodos basado en PCR y NASBA-FH en un 98% ( $k=0.91\pm0.07$ ). Los resultados confirman NASBA-FH como un método apropiado para la detección rutinaria de PPV. Además, la rápida hibridación de flujo a través de membranas, que tiene lugar en unos 10 minutos, abre nuevas posibilidades para el diagnóstico rutinario de otros patógenos cuya detección incluya en alguna etapa la hibridación molecular.



## OS-28

**COMPETENCIA ENTRE *Caulimovirus* Y *Potyvirus* POR EL MISMO LUGAR DE RETENCION EN EL VECTOR****MORENO, A.<sup>1</sup>, FERERES, A.<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA), 46113 Moncada (Valencia). E-mail: [azmoreno@ivia.es](mailto:azmoreno@ivia.es)

<sup>2</sup>Centro de Ciencias Medioambientales. Instituto de Ciencias Agrarias (ICA)-CSIC. c/ Serrano, 115 Dpdo, 28006 Madrid. E-mail: [afereres@ccma.csic.es](mailto:afereres@ccma.csic.es)

La mayoría de los virus vegetales transmitidos por insectos vectores, lo hacen de forma no circulativa, diferenciándose entre virus no persistentes y semipersistentes. Dentro de los virus no persistentes, el Virus del mosaico del nabo (TuMV), al igual que el resto de los *Potyvirus*, es transmitido por pulgones gracias a una proteína viral no estructural ("Componente de ayuda o HC") que actúa de puente entre la proteína de cubierta viral (CP) y los receptores presentes en el aparato bucal del vector. Por otro lado, el Virus del mosaico de la coliflor (CaMV), perteneciente al género *Caulimovirus*, es transmitido de modo semipersistente por pulgones requiriendo otras dos proteínas virales no estructurales, denominadas P2 y P3, para su retención en el vector. Ambos virus son capaces de transmitirse mediante un mecanismo de ingestión-salivación lo que indica que las partículas virales pueden quedar retenidas en la parte distal del estilete del pulgón. Sin embargo, se desconoce si su unión al vector se realiza por un receptor común o receptores específicos para cada uno de ellos. En este trabajo se realizaron distintos ensayos de transmisión con CaMV y TuMV empleando *Brevicoryne brassicae* L. como vector, con el fin de comprobar si la adquisición del primer virus influía en la transmisión del segundo. Tras una hora de ayuno los pulgones fueron expuestos a plantas de nabo (*Brassica rapa* cv. Just Right) infectadas con CaMV o TuMV durante periodos variables de adquisición, tras los cuales fueron transferidos de forma individual a plantas de nabo receptoras, donde permanecieron 24 horas. Posteriormente las plantas fueron tratadas con Confidor®. La infección de las plantas receptoras se analizó a las cinco semanas mediante ELISA. Los distintos periodos de adquisición realizados fueron: I) CaMV (5min) + TuMV (5min), II) Sano (5min) + TuMV (5min), III) TuMV (5min), IV) CaMV (5 min), V) CaMV (8h) + TuMV (5min) y VI) CaMV (8h). Tras periodos cortos de adquisición de CaMV previos a la de TuMV, la presencia en el vector de CaMV no modificó la tasa de transmisión de TuMV pudiéndose dar incluso la transmisión de ambos virus por un único pulgón. Al aumentar el tiempo de adquisición de CaMV la tasa de transmisión de TuMV disminuye notoriamente, haciéndolo también la proporción de plantas infectadas con ambos virus. Los resultados obtenidos parecen indicar que ambos virus comparten la localización de sus sitios de unión a la cutícula del pulgón y que el fenómeno de interferencia del virus CaMV en la transmisión subsiguiente de TuMV radica en la fase de retención, y no en la de inoculación.

**OS-29****DETECCIÓN DEL GLRAV-3 EN GLÁNDULAS SALIVALES DEL VECTOR *Planococcus citri*****CID, M.<sup>1</sup>, PEREIRA, S.<sup>1</sup>, CABALEIRO, C.<sup>2</sup>, SEGURA, A.<sup>1</sup>**<sup>1</sup>Dpto de Fisiología Vexetal, Universidade de Santiago de Compostela, 15782 Santiago de Compostela. E-mail: ghuises@usc.es<sup>2</sup>Dpto de Producción Vexetal, Universidade de Santiago de Compostela, 27071 Lugo.

El virus del enrollado de la vid 3 (*Grapevine leafroll associated virus 3*, GLRaV-3) está descrito como de transmisión semipersistente mediada por cochinillas. El análisis de la presencia del virus órgano a órgano en *Planococcus citri* (Risso), cochinilla algodonosa vector del virus, mediante IC-RT-PCR tras la disección del insecto permite conocer la distribución del virus en la cochinilla. Mediante este método se detectó de modo consistente la presencia del virus en las glándulas salivales de cochinillas alimentadas durante 7 días en hojas de vid infectada con GLRaV-3, así como también en el intestino y los tubos de Malpighi. No se detectó, sin embargo, en el aparato bucal y el primer tramo del tubo digestivo hasta el esófago.

El análisis mediante microscopía electrónica de las glándulas salivales primarias de *P. citri* adultas alimentadas en hojas de vid infectada con GLRaV-3 durante 5 días mostró la presencia del virus en determinadas células de dicha glándula. La distribución del marcaje en esas células, especialmente fuerte en vesículas de secreción, hace pensar en que la transmisión del GLRaV-3 mediante *P. citri* sea de tipo circulativo.

El GLRaV-1, otro ampelovirus próximo filogenéticamente al GLRaV-3, que no es transmitido mediante *P. citri*, en el análisis órgano a órgano no es detectado en las glándulas salivales aunque sí en el intestino y los tubos de Malpighi. Esto refuerza la teoría de que la transmisión sea circulativa y demuestra que la detección de virus en el análisis de insectos potencialmente transmisores no está relacionada con la transmisividad del virus por el insecto.

Los tiempos de retención de la infectividad potencial determinados para *P. citri* (de 72 horas analizando individuos completos), así como la no detección en las células de las glándulas salivales primarias de acúmulos virales ni vesiculaciones en las mitocondrias (indicativos de replicación del virus en las células vegetales) eliminan la posibilidad de que el virus se replique en la cochinilla.

**OS-30****CARACTERIZACIÓN DE FAGOS LÍTICOS DE *Ralstonia solanacearum* AISLADOS DE AGUA DE RÍO: USO POTENCIAL EN BIOCONTROL****ÁLVAREZ, B.<sup>1</sup>, BIOSCA, E.G.<sup>2</sup>, LÓPEZ, M.M.<sup>1</sup>**<sup>1</sup>*Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA), Carretera Moncada-Náquera, Km 4,5, 46113 Moncada (Valencia). E-mail: mlopez@ivia.es*<sup>2</sup>*Departamento de Microbiología y Ecología, Universidad de Valencia, Avda. Dr. Moliner, 50, 46100 Burjasot (Valencia). E-mail: elena.biosca@uv.es*

*Ralstonia solanacearum* biovar 2 afecta a varias especies de solanáceas, siendo los cursos de agua una de sus principales vías de diseminación en Europa. En España, esta bacteria se ha detectado en varios ríos y en estudios recientes se ha comprobado que su supervivencia en agua natural de río con distintas fracciones bióticas, se ha visto negativamente afectada. Se ha demostrado que los principales responsables de su desaparición han sido los bacteriófagos líticos. Varios fagos se han aislado, purificado y caracterizado mediante varias técnicas. Los ensayos de actividad lítica se han realizado con un fago seleccionado, mezclando suspensiones 5:1 (v/v) de *R. solanacearum* ( $10^9$  ufc/ml) y fago ( $10^6$  ufc/ml). Los resultados han revelado actividad frente a una cepa de referencia española, a temperaturas entre 14 y 31 °C, siendo negativa a 9 °C y de 32 a 39 °C. También se ha observado la lisis de 30 cepas de *R. solanacearum* de diferentes orígenes y la falta de actividad frente a 14 aislados bacterianos de agua de río y 11 cepas de otras bacterias fitopatógenas, sugiriendo la especificidad de este fago por *R. solanacearum*. Además, la lisis se verificó a 14 °C, 20 °C y 29 °C en distintas aguas naturales de riego, a pHs que oscilaban entre 6,5 y 8,2. La observación por microscopía electrónica de transmisión reveló que el fago seleccionado mostraba la morfología característica de otros bacteriófagos, con cabeza y cola.

Asimismo, se ha ensayado la capacidad de este fago como agente de biocontrol en agua contaminada con *R. solanacearum*, simulada mediante el riego de plantas de tomate con una mezcla 5:1 (v/v) de la bacteria y el fago. Se observó marchitez en el 50 y 25% de las plantas regadas sólo con el patógeno ( $10^5$  ufc/ml), en dos experimentos independientes. La incidencia de la enfermedad disminuyó hasta el 0 y 5% en plantas regadas con distintas proporciones de *R. solanacearum* y el fago, en ambos experimentos. Estos resultados abren nuevas y prometedoras perspectivas sobre el uso de bacteriófagos en el agua de riego para el control de la marchitez bacteriana.

## OS-31

**DISEÑO, SÍNTESIS Y MEJORA DE PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS PARA EL CONTROL DE BACTERIAS FITOPATÓGENAS**

**BADOSA, E.<sup>1</sup>, FERRE, R.<sup>2</sup>, MONROC, S.<sup>2</sup>, BESALÚ, E.<sup>3</sup>, PLANAS, M.<sup>2</sup>, FELIU, L.<sup>2</sup>, BARDAJÍ, E.<sup>2</sup>, MONTESINOS, E.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Laboratorio de Patología Vegetal, Instituto de Tecnología Agroalimentaria, CIDSAB-CeRTA

<sup>2</sup>Laboratorio de Innovación en Procesos y Productos de Síntesis Orgánica (LIPPSO), Departamento de Química

<sup>3</sup>Instituto de Química Computacional, Universidad de Girona, Campus Montilivi, 17071 Girona

La búsqueda de nuevos compuestos antimicrobianos para su utilización en el control de bacteriosis, frente a los cuales sea difícil que el patógeno desarrolle resistencias, ha experimentado un importante auge en los últimos años en el campo de los péptidos antimicrobianos. Estos péptidos incluyen una gran variedad de secuencias y estructuras con carácter catiónico y con una cierta anfipaticidad. Con el objetivo de obtener nuevos péptidos con elevada actividad bactericida frente a *Erwinia amylovora*, *Xanthomonas vesicatoria* y *Pseudomonas syringae* y baja citotoxicidad y sensibilidad a proteasas, se siguieron dos estrategias distintas. Estas consistieron en la síntesis de péptidos lineales híbridos de cecropina A-melitina, así como de nuevos péptidos cíclicos.

A partir del undecapéptido lineal WKLFKKILKVL-NH<sub>2</sub>, descrito con anterioridad como Pep3, se prepararon 22 análogos reemplazando individualmente o conjuntamente los residuos de Trp y Val por distintos aminoácidos que presentan diversos grados de hidrofobicidad e hidrofiliidad. Pep3 y varios de los análogos sintetizados inhiben el crecimiento de los tres patógenos mostrando un efecto bactericida a bajas concentraciones (DE<sub>50</sub> de 1,3 a 7,3 µM). El análogo en el que se reemplazó Trp y Val por Lys y Phe, respectivamente, mostró mejor actividad, menor citotoxicidad y superior estabilidad frente a proteasas que Pep3. Se diseñaron y sintetizaron péptidos cíclicos de 4 a 10 residuos alternando aminoácidos catiónicos e hidrofóbicos con fórmula general (X<sub>n</sub>-Y-X<sub>m</sub>-Gln), siendo X = Lys o Leu; Y = L-Phe o D-Phe; m=n= 1, o m= 3 y n= 0-5. A partir del decapeptido más activo, se preparó mediante química combinatoria una quimioteca de 56 decapeptidos entre los que se identificaron secuencias con mejores propiedades biológicas. Una segunda quimioteca, basada en la estructura c(X<sup>1</sup>X<sup>2</sup>X<sup>3</sup>X<sup>4</sup>LysPheLysLysLysLeuGln) donde X es Lys o Leu, fue analizada mediante un diseño de experimentos (DOE) que permitió definir reglas para obtener nuevos decapeptidos cíclicos con mayor actividad antimicrobiana y menor citotoxicidad. Tanto los péptidos lineales como los cíclicos optimizados son bactericidas, con valores de CMI comparables a las de antibióticos como la estreptomicina, pudiendo considerarse como buenos candidatos para el desarrollo de nuevos productos fitosanitarios bactericidas.

**OS-32****FITOPLASMOSIS EN PLANTAS LEÑOSAS EN CATALUÑA: 10 AÑOS DE PROSPECCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LOS FITOPLASMAS ASOCIADOS.**

**TORRES, E.<sup>1</sup>, VALLEJO, R.<sup>1</sup>, BARRIOS, G.<sup>2</sup>, REYES, J.<sup>2</sup>, RAHOLA, J.<sup>2</sup>, CELADA, B.<sup>2</sup>, ALTABELLA, J.<sup>2</sup>, GARCÍA, F.<sup>1</sup>, MONTÓN, C.<sup>1</sup>, VIVES, J.M.<sup>2</sup>, BOTTI, S.<sup>3</sup>, BERTACCINI, A.<sup>3</sup>, MARTÍN, M.P.<sup>4</sup>**

<sup>1</sup>Laboratori de Sanitat Vegetal. DARP, Generalitat de Catalunya, Via Circulació Nord, Tram 6, 08040 Barcelona. E-mail: ester.torres@gencat.net

<sup>2</sup>Servicios Centrales o Territoriales del Servei de Sanitat Vegetal, DARP, Generalitat de Catalunya.

<sup>3</sup>DiSTA, Universidad de Bologna, Italia.

<sup>4</sup>Real Jardín Botánico, CSIC, Madrid.

Los fitoplasmas están asociados a enfermedades en un elevado número de especies de plantas. El conocimiento que se tenía hace una década sobre la diversidad de fitoplasmas que podían afectar a las plantas leñosas en Cataluña era prácticamente nulo. Los objetivos de este trabajo fueron establecer la correlación entre sintomatología y presencia de fitoplasmas en plantas leñosas y su caracterización molecular.

Para ello se analizaron más de 1300 muestras de 37 especies con síntomas asociados a enfermedades causadas por fitoplasmas. Principalmente los métodos han consistido en extracción de DNA con EZNA Plant MiniPrep Kit (Omega Bio-tek); amplificaciones mediante PCR o nested-PCR, con iniciadores generales o específicos de la región ribosomal, con Ready-to-Go PCR Beads (Amersham Biosciences); secuenciación de productos amplificados, en ocasiones clonados; y análisis de las secuencias mediante búsqueda de secuencias homólogas y análisis filogenético mediante análisis de Máxima Parsimonia y aproximación Bayesiana. Los fitoplasmas caracterizados en Cataluña están 'relacionados' con:

-las especies descritas de *Candidatus*: 'Ca. Phytoplasma pyri', 'Ca. Phytoplasma prunorum', 'Ca. Phytoplasma spartii' y 'Ca. Phytoplasma pini'.

-*flavescence dorée phytoplasma*, *bois noir phytoplasma* y *poinsettia branch-inducing phytoplasma*.

Distintos aislados de fitoplasmas de vid de Cataluña, *flavescencia dorada* y *bois noir*, se caracterizaron a partir de amplificaciones de regiones no ribosomales para detectar diferencias poblacionales.

## OS-33

**CARACTERIZACION MOLECULAR Y FISIOLÓGICA DE AISLADOS DE *Fusarium oxysporum* DE PLANTA DE TABACO**

**ALVES-SANTOS, F.M.<sup>1</sup>, MARTÍNEZ-BERMEJO, D.<sup>1</sup>, RODRÍGUEZ-MOLINA, M.C.<sup>2</sup>, GARCÍA-BARRADO, J.A.<sup>3</sup>, DÍAZ-MÍNGUEZ, J.M.<sup>4</sup>, ESLAVA, A.P.<sup>4</sup>, Díez, J.J.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Dpto. Producción Vegetal y Recursos Forestales, ETSIIAA de Palencia, Campus "La Yutera", Avda. Madrid 57, 34071 Palencia. E-mail: fmalvess@pvs.uva.es

<sup>2</sup>Centro de Investigación de la Finca "La Orden" y "Valdesequera", Consejería de Infraestructuras y Desarrollo Tecnológico, 06187 Guadajira (Badajoz). E-mail: carmen.rodriguez@juntaextremadura.net

<sup>3</sup>Centro Tecnológico Agroalimentario de Extremadura (CTAEX), 06195 Villafranco del Gadiana (Badajoz).

<sup>4</sup>Dpto. de Microbiología y Genética, Universidad de Salamanca, Edif. Departamental, Avda. Campo Charro s/n, 37007 Salamanca

*Fusarium oxysporum* es un patógeno del suelo que se caracteriza por producir traqueomicosis y marchitez que pueden llegar a la muerte de las plantas enfermas. El rango de hospedadores es muy amplio. Sin embargo, los distintos aislados presentan una elevada especificidad de hospedador. En el caso del cultivo del tabaco, existen varias formas cuyos rangos de hospedadores se solapan como son *F. o. f. sp. nicotianae*, *F. o. f. sp. batatas* y *F. o. f. sp. vasinfectum*. Además, las formas patógenas y no patógenas de *F. oxysporum* conviven de forma saprofítica en el suelo. Ante el complejo análisis de las poblaciones de *F. oxysporum*, se pretende evaluar la variabilidad genética y fisiológica del mismo. Para ello hemos utilizado un total de 14 aislados obtenidos de distintas campañas y en distintos laboratorios, procedentes todos ellos de plantas de tabaco enfermas y con síntomas de micosis vascular. Se han probado en ensayos de patogenicidad y se han evaluado la capacidad de crecimiento en medio artificial PDA, así como su capacidad de esporulación. Simultáneamente se ha obtenido su ADN y se ha amplificado mediante PCR. Por un lado se ha amplificado el espaciador intergénico (IGS) del ADN ribosómico y se ha analizado mediante restricción (RFLP), y por otro se han analizado marcadores RAPD.

Tras el análisis filogenético de los marcadores RAPD y la síntesis de los distintos ensayos podemos afirmar que los aislados analizados tienden a agruparse en dos poblaciones más o menos definidas. Una de ellas presenta aislados de virulencia media-alta, gran esporulación y un patrón único de restricción con la endonucleasa *XhoI*, y la otra población más homogénea en cuanto a marcadores RAPD presenta virulencia variable (baja, media y alta), esporulación media-baja y patrones propios con las endonucleasas *AvaI* y *XhoI*.

## OS-34

**ETIOLOGÍA Y CICLO BIOLÓGICO DE LA NECROSIS DE BROTES Y MOMIFICADO DE FRUTOS JÓVENES DEL MEMBRILLERO****BENÍTEZ, M.J.<sup>1</sup>, LOVERA, M.<sup>2</sup>, MORAL, J.<sup>3</sup>, ARQUERO, O.<sup>2</sup>, TRAPERO, A.<sup>3</sup>**<sup>1</sup>Coop. Virgen del Castillo, Crta. Estepa-Guadix, 14810 Carcabuey (Córdoba).<sup>2</sup>Dpto. Fruticultura, IFAPA "Alameda del Obispo". Apdo. 3092, 14080 Córdoba.<sup>3</sup>Dto. Agronomía, ETSIAM, Universidad de Córdoba, Campus de Rabanales, Edif. Celestino Mutis, 14071 Córdoba. E-mail: trapero@uco.es

El cultivo del membrillero (*Cydonia oblonga*) en la sierra Subbética cordobesa es afectado gravemente por una enfermedad, conocida desde antiguo con el nombre de "el hongo", que se desarrolla al principio de la primavera dando lugar a la desecación de brotes y de los frutos jóvenes. Las observaciones de campo realizadas durante 2004-2006 han determinado una elevada variación de la incidencia de la enfermedad entre años y entre campos. La incidencia media en campos individuales osciló entre el 2% y el 95%, dependiendo principalmente de la lluvia al final del invierno y principio de la primavera, de la fecha de brotación de los campos, de la densidad de árboles y del sistema de manejo del suelo.

El hongo consistentemente asociado con la necrosis de hojas, brotes y frutos jóvenes fue identificado como el Hifomiceto *Monilia cydoniae*, una especie del grupo Disjunctoriae. La esporulación del hongo en las hojas afectadas estuvo asociada con un olor característico, posiblemente relacionado con la transmisión de los conidios por insectos desde las hojas hasta las flores. El estado sexual del hongo, el Discomiceto *Monilinia linhartiana*, se observó únicamente en los frutos jóvenes momificados (momias) que habían pasado el invierno en la superficie del suelo protegidos por la hojarasca. La maduración de los apotecios se produjo al final del invierno, coincidiendo con el comienzo de la brotación del membrillero, perdiendo su viabilidad en 3-4 semanas. La densidad de momias fértiles (2-8 apotecios / momia) en el suelo se estimó en muestreos realizados bajo la copa de los árboles (4 m<sup>2</sup> / árbol y 5 árboles / campo). Dicha densidad varió marcadamente entre campos y árboles (0-22 momias / m<sup>2</sup>) y estuvo correlacionada positivamente con la incidencia de la enfermedad.

Estos resultados demuestran que el inóculo primario para las epidemias de la moniliasis del membrillero son las ascosporas producidas en los apotecios que se desarrollan en los frutos momificados del suelo. Ello permite diseñar nuevas estrategias de control con fungicidas o agentes biológicos, tratamientos que hasta ahora han resultado ineficaces.

## OS-35

**DINÁMICA ESPACIO-TEMPORAL DE EPIDEMIAS DE PODREDUMBRE BLANCA (*Sclerotium rolfsii*) Y EFECTO SOBRE EL PRODUCTO COSECHADO EN REMOLACHA AZUCARERA DE SIEMBRA OTOÑAL****JORDÁN-RAMÍREZ, R.<sup>1</sup>, JIMÉNEZ-DÍAZ, R.M.<sup>1,2</sup>, NAVAS-CORTÉS, J.A.<sup>1</sup>**<sup>1</sup>Instituto de Agricultura Sostenible, CSIC, Apdo. 4084, 14080 Córdoba.<sup>2</sup>ETSIAM, Universidad de Córdoba, Edif.C4-Celestino Mutis, Crtra. Madrid Km 396, Campus de Rabanales, 14071 Córdoba. E-mail: ag1nacoj@uco.es

La podredumbre blanca (PB) de la remolacha azucarera (*Beta vulgaris*), causada por *Sclerotium rolfsii*, es la enfermedad de suelo de etiología fúngica más importante en cultivos de siembra otoñal del Sur de España, Cuenca Mediterránea y Sudamérica. La incidencia de PB se incrementa rápidamente cuando coinciden en el suelo temperatura y humedad elevadas, habituales al final del ciclo en cultivos de regadío. La variabilidad espacial inherente en las epidemias de PB hace necesaria su caracterización espacio-temporal, así como considerar la componente espacial al evaluar el efecto de éstas en parámetros de producción y calidad industrial de la remolacha.

La incidencia y severidad de PB se evaluó en cinco parcelas experimentales en las provincias de Córdoba y Cádiz durante las campañas agrícolas 2003/04 y 2004/05. En cada parcela se determinó la incidencia de PB (6.000 plantas por parcela) a intervalos de 2-4 semanas durante todo el ciclo del cultivo. Se ha analizado la dinámica espacio-temporal de las epidemias de PB en distintos niveles de jerarquía espacial, incluyendo secuencias ordinarias, división en cuadrantes (Índices de Dispersión e Intraclases, y Ley de Taylor), superficies isópatas e índice de distancia (SADIE). Adicionalmente, en el momento de la recolección se determinó la severidad de PB así como diversos parámetros de cosecha, incluyendo producción, polarización, Na, K, N  $\alpha$ -amino, azúcares reductores y valor tecnológico industrial (VTIR), determinándose la correlación y asociación espacial de éstos con parámetros epidémicos.

Los resultados muestran un patrón agregado de la incidencia de PB en todos los casos, con incremento del número y principalmente tamaño de focos de enfermedad en el tiempo, así como una asociación espacio-temporal significativa, sugiriendo que tienen lugar ciclos secundarios de patogénesis. Producción, polarización y VTIR estuvieron espacial y negativamente correlacionadas con la incidencia de PB; mientras que los componentes no-azúcares (Na, K y N  $\alpha$ -amino) lo estuvieron positivamente. Ello supone reducción del rendimiento, así como perjuicio en el proceso industrial de extracción de azúcar. Una mejor comprensión de la componente espacial de las epidemias, así como de sus relaciones con el rendimiento-calidad tecnológica, contribuirá a diseñar estrategias adecuadas para el manejo de la PB que minimicen las pérdidas económicas que origina.

(Investigación subvencionada por los proyectos AGL2002-01418, AGL2005-00751 [CICYT-MEC] y apoyo técnico de AIMCRA)



## OS-36

**FACTORES QUE AFECTAN AL DESARROLLO DE LAS INFECCIONES LATENTES PRODUCIDAS POR *Monilinia laxa* EN MELOCOTON****GELL, I.<sup>1</sup>, DE CAL, A.<sup>1</sup>, TORRES, R.<sup>2</sup>, USALL, J.<sup>2</sup>, MELGAREJO, P.<sup>1</sup>**<sup>1</sup>Dpto. Protección Vegetal, Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria, SGIT-INIA, Crta. de La Coruña, Km. 7,5, 28040 Madrid. E-mail: gell@inia.es.<sup>2</sup>UdL-IRTA, Av.Rovira Roure 191, 25198 Lleida.

La podredumbre parda del melocotonero está causada principalmente en España por *Monilinia laxa* (85-90%), y en menor medida por *M. fructigena* (15-10%). La enfermedad causa importantes pérdidas antes y después de la recolección, pero cuando las condiciones no son favorables las infecciones del patógeno pueden permanecer latentes en el interior del fruto hasta que se dan las condiciones para su desarrollo, generalmente en cosecha y post-cosecha. Las infecciones latentes se pueden producir desde la floración hasta la recolección del fruto.

Para determinar la relación entre la incidencia de las infecciones latentes, las condiciones ambientales y el estado de desarrollo del huésped, se realizaron dos ensayos en el laboratorio y 5 en huertos comerciales de la provincia de Lleida, de los que se registraron sus datos climáticos. Los ensayos de laboratorio se llevaron a cabo con flores y frutos de nectarinas (cv. Autumn Free) procedentes de un huerto comercial de la provincia de Lleida, en seis estados fenológicos (botón rosa, cuajado, endurecimiento del embrión, crecimiento del embrión, 30 y 7 días antes de cosecha) en los años 2004 y 2005. Se pulverizaban 10 flores ó 10 frutos (repetición) con dos suspensiones de conidias de *M. laxa* de distinta concentración ( $10^4$  y  $10^6$  conidias/ml), y se incubaban a diferentes  $T^a$  (10 y 23 °C) y periodos de humectación (phh) (0, 4, 6, 8, 12, 18 h) en cámara de cultivo con 16 horas de fotoperiodo. Se ensayaron 3 repeticiones por  $T^a$ , phh, y estado fenológico. Los ensayos en huertos comerciales se llevaron a cabo con melocotones (cv. Rojo de Albesa) y nectarinas (cv. Caldesi 2020) en 4 estados fenológicos (botón rosa, endurecimiento del embrión, crecimiento del embrión, 30 y 7 días antes de cosecha) durante los años 2000, 2001 y 2002. Se tomaron 10 flores ó 10 frutos por árbol y 10 árboles por huerto en cada época de muestreo. Existe una correlación significativa entre la incidencia de infecciones latentes y la podredumbre parda de los frutos. En todos los ensayos, las condiciones óptimas para el desarrollo de infecciones latentes está significativamente relacionada con el estado fenológico, la concentración del inóculo del patógeno, la  $T^a$  y el phh. Las condiciones óptimas en la zona de estudio se producen durante el crecimiento del embrión y antes de la cosecha, a  $T^a > 20^\circ\text{C}$  y  $\text{phh} > 6$  h. El desarrollo temporal de la incidencia de infecciones latentes en los huertos se ajustó al modelo Gompertz. La tasa aparente de infección de las epidemias está significativamente relacionada con la  $T^a$  y el phh. Se ha desarrollado un modelo de regresión múltiple que describe el efecto de la  $T^a$  y del phh sobre el desarrollo de infecciones latentes.

**OS-37****CARACTERIZACIÓN DE AISLADOS DE *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli* OBTENIDOS DE JUDIÓN**

**DE VEGA, J.J., STEFANSKA, A., MARTÍN-DOMÍNGUEZ, R., MARTÍN-RODRIGUES, N., GARCÍA-SÁNCHEZ, M.A., RAMOS, B., ESLAVA, A.P., DÍAZ-MÍNGUEZ, J.M.**

*Area de Genética, Centro Hispano-Luso de Investigaciones Agrarias (CIALE), Universidad de Salamanca, 37007 Salamanca. Teléfono y Fax: 923 294663. E-mail: josejavier@usal.es*

*Fusarium oxysporum* Schlechtend:Fr. es un hongo ubicuo del suelo de considerable importancia agrícola por su capacidad para causar enfermedades vasculares y podredumbres de raíz en un rango muy amplio de plantas cultivadas. Las judías y judiones cultivados en la zona de El Barco de Ávila (Ávila) están acreditados con denominación específica, gozan de una excelente reputación y presentan como problema endémico la fusariosis. En este trabajo se describe la caracterización fisiológica y genética de aislados de *F. oxysporum* f.sp. *phaseoli* obtenidos de plantas de judión (*Phaseolus coccineus* L.) con síntomas de fusariosis vascular.

Estos aislados fueron caracterizados mediante ensayos de patogenicidad, grupos de compatibilidad vegetativa (VCG), polimorfismos del espaciador intergénico (IGS) del ADN ribosómico y distribución de los *loci* idiomorfos para el apareamiento (MAT). Los resultados se compararon con los obtenidos anteriormente en aislados de judía (*P. vulgaris* L.). En éstos se habían descrito previamente dos grupos de virulencia (aislados muy virulentos y poco virulentos). Los aislados de judión resultaron ser todos muy virulentos cuando se inocularon en plantas de judía; sin embargo, los ensayos de patogenicidad realizados en judión evidenciaron un nuevo grupo con virulencia acrecentada, que denominamos supervirulentos. Todos los aislados obtenidos mostraron genotipo MAT1-2 para el tipo de apareamiento, y la mayoría mostraron un polimorfismo del IGS del tipo A (el grupo al que pertenecen los patógenos obtenidos en judía). Sin embargo, la distribución en VCGs muestra cuatro grupos de compatibilidad vegetativa distintos a los obtenidos previamente en aislados de judía. Asimismo todos los aislados resultaron positivos para el SCAR de diagnóstico (SCAR A310B280).

En conjunto, los resultados indican que en la población estudiada no hay una correlación clara entre las características genéticas y patogénicas, lo cual sugiere que las variaciones en virulencia pueden suceder en cada linaje clonal. Además, el muestreo exclusivo de aislados con idiomorfo MAT1-2 refuerza la hipótesis de la ausencia de reproducción sexual aparente en campo para *F. oxysporum*.

**OS-38****DIVERSIDAD Y EVOLUCION DE GENES DE AVIRULENCIA EN OIDIOS****SACRISTAN, S., BROWN, J.K.M., RIDOUT, C.J.**

*Department of Disease and Stress Biology, John Innes Centre, Norwich Research Park, Colney, Norwich, NR4 7UH, U.K. E-mail: solsacristan@hotmail.com*

El hongo *Blumeria graminis* f.sp. *hordei* (*Bgh*) es un patógeno biotrofo obligado causante del oidio en cebada, enfermedad que puede producir grandes pérdidas en condiciones favorables al patógeno. Las interacciones con el huésped son del tipo gen a gen: cada variedad de cebada sólo es resistente a los genotipos de *Bgh* que contengan determinados genes de avirulencia (*Avr*). La resistencia del huésped es rápidamente superada por nuevos genotipos del patógeno, que dejan de ser reconocidos por los correspondientes genes de resistencia. Esta rápida evolución se produce además sin ningún coste aparente para el patógeno.

Actualmente hay descritos 25 genes *Avr* independientes en *Bgh*, aunque ninguno había sido aislado hasta ahora. Recientemente, nuestro grupo ha aislado los genes *AVR<sub>a10</sub>* y *AVR<sub>k1</sub>*. Ambos actúan como elicitores en reacciones incompatibles, pero también como efectores, incrementando la infectividad del hongo en reacciones compatibles. *AVR<sub>a10</sub>* y *AVR<sub>k1</sub>* son genes homólogos y pertenecen a una gran familia génica, con un número estimado de más de 30 miembros, en el genoma de *Bgh*. Según estos datos, *Bgh* podría tener todo un repertorio de genes de avirulencia, con una función real como efectores, contribuyendo a la virulencia del patógeno. Poseer múltiples copias de genes *Avr*/efectores permitiría a las poblaciones de *Bgh* superar rápidamente los genes de resistencia sin ningún coste biológico.

Hemos analizado secuencias de tipo AVR tanto genómicas como expresadas, en diferentes aislados, y hemos ensayado su cosegregación con diferentes fenotipos de avirulencia. El análisis de secuencias nos ha dado información sobre los constreñimientos funcionales en la evolución de estos genes, es decir: qué regiones están conservadas, y por tanto serían esenciales para la función del gen, y qué regiones están sujetas a selección diversificante y probablemente por ello implicadas en interacciones específicas con los genotipos del huésped.

Hemos detectado secuencias homologas a *AVR<sub>a10</sub>* y *AVR<sub>k1</sub>* en formas especiales (ff. spp) de *Blumeria graminis* que infectan otros cereales. No las hemos detectado sin embargo en otras ff. spp más distantes que infectan gramíneas silvestres, ni tampoco en otras especies de oidios. La filogenia de estas secuencias es coherente con la de la región ITS de las diferentes ff. spp. Las implicaciones de esta familia génica en la especialización de *Blumeria graminis* y su posible relación con la evolución de los cereales como cultivos serán discutidas en esta comunicación.

**OS-39****FACTORES IMPLICADOS EN LA EVOLUCIÓN DE LA VIRULENCIA DEL VIRUS DEL MOSAICO DEL PEPINO Y SUS RNAs SATÉLITES EN MELÓN****BETANCOURT, M., FRAILE, A., GARCÍA-ARENAL, F.***Departamento de Biotecnología, E.T.S.I. Agrónomos de Madrid, Ciudad Universitaria s/n., 28040 Madrid.*

El virus del mosaico del pepino (CMV) es uno de los principales virus de los cultivos hortícolas al aire libre en España. CMV es virus auxiliar de un RNA satélite (CMV-RNAsat), que actúa como un hiperparásito y modula los síntomas y la acumulación de CMV. Existen variantes de CMV-RNAsat que causan en tomate necrosis sistémicas (satélites necrogénicos) pero que no alteran, o atenúan, los síntomas de CMV en otros huéspedes. Las epidemias de necrosis de tomate causadas por CMV y CMV-RNAsats han sido escasas y de corta duración, pero devastadoras, y se desconoce las condiciones que las favorecen. El estudio de una de esas epidemias, desarrollada en España entre 1988 y 1992, y la estima de los parámetros de eficacia biológica y de virulencia en tomate de las cepas de CMV con y sin RNAsat, indican que un factor principal en la emergencia de la necrosis del tomate es la densidad de la población de pulgones (Escriu y col. 2003. Evolution). Sin embargo CMV tiene una amplia gama de huéspedes, que pudieran tener un papel en la emergencia de las epidemias de necrosis de tomate, lo que no se ha analizado hasta ahora.

Para analizar el papel en la dinámica de la población de los RNAsat de huéspedes de CMV en los que los RNAsat necrogénicos para tomate son atenuantes, se han determinado los parámetros de su eficacia biológica en otro de los huéspedes principales de CMV, el melón. Se diseñó un ensayo con 10 variantes de RNAs satélites necrogénicos y 10 no necrogénicos para tomate, en los que estimar la acumulación de CMV con o sin los dos tipos de RNAsat, la acumulación de los dos tipos de RNAsat, la tasa de transmisión de los RNAsat y su capacidad para competir en infecciones mixtas. Además, se ha aproximado la estima de la virulencia mediante la cuantificación del efecto de los distintos tratamientos en el crecimiento vegetativo del huésped.

Los resultados muestran que a pesar de no tener distinto fenotipo en melón, las variantes necrogénicas de RNAsat, se acumulan, encapsidan y transmiten mejor que las no necrogénicas, con las que compiten favorablemente en infecciones mixtas, y deprimen más que éstas la acumulación del virus auxiliar. Por tanto, el comportamiento de los distintos CMV-RNAsat es similar en melón y en tomate, salvo que melón es peor huésped para todos ellos. Sin embargo, el efecto de la infección por CMV con o sin RNAsat necrogénicos y atenuantes es distinto en tomate y en melón, donde la presencia de ambos tipos de satélite agrava el efecto de la infección por CMV de forma similar. Por ello, un modelo que prediga la emergencia de cepas de CMV con RNA satélite debe considerar los distintos huéspedes.

**OS-40****CONTRIBUCIÓN DE LA RECOMBINACIÓN A LA DIFERENCIACIÓN GENÉTICA DE LAS POBLACIONES DE *Begomovirus***

**GARCÍA-ANDRÉS, S., TOMÁS-GARCÍA, D., SÁNCHEZ-CAMPOS, S., NAVAS-CASTILLO, J., MORIONES, E.**

*Lab. Virología Vegetal, Estación Experimental "La Mayora", C.S.I.C., 29750 Algarrobo-Costa (Málaga). E-mail: moriones@eelm.csic.es*

La recombinación es un fenómeno ampliamente extendido en virus de DNA y parece contribuir a la diversificación genética de las poblaciones virales de especies del género *Begomovirus* (familia *Geminiviridae*). Sin embargo, se desconoce si los eventos de recombinación representan un fenómeno frecuente durante el ciclo de vida de estos virus. Este aspecto se ha estudiado en este trabajo utilizando como modelo begomovirus monopartitos. Para ello, se ha analizado el resultado de co-inoculaciones experimentales en plantas de tomate, empleando dos begomovirus monopartitos (*Tomato yellow leaf curl Sardinia virus*, TYLCSV y *Tomato yellow leaf curl virus*, TYLCV) asociados con la enfermedad del rizado amarillo del tomate (TYLCD). De esta manera, se han simulado infecciones mixtas en una misma planta similares a las que pueden ocurrir en la naturaleza y se ha analizado la aparición de recombinantes a lo largo del tiempo.

Los resultados obtenidos indican que la recombinación es un fenómeno frecuente en las infecciones mixtas de begomovirus asociados a TYLCD, de forma que tras un solo ciclo de co-infección de TYLCSV y TYLCV en plantas de tomate, alrededor de la mitad de los genomas presentes en la población pueden ser recombinantes. Se han generado distintos tipos de recombinantes y los sitios de recombinación no parecen distribuidos al azar, sino que hay puntos calientes de recombinación. Uno de los puntos se encuentra localizado en todos los casos en la región intergénica. El otro punto de recombinación se encuentra casi exclusivamente localizado en el marco abierto de lectura de la proteína *REn*. En todos los casos las recombinaciones detectadas son homólogas. Nuestros datos sugieren que la recombinación está asociada a la presencia de estructuras secundarias estables. Se ha observado que las poblaciones derivadas de un proceso de recombinación pueden ver alterada su estructura genética por cuellos de botella asociados con la transmisión por el vector natural (la mosca blanca *Bemisia tabaci*) o el cambio de huésped vegetal. Se concluye por tanto que la recombinación puede ser una fuente importante de diversidad genética en la población de begomovirus, y puede explicar el éxito de estos virus para adaptarse rápidamente a condiciones ambientales cambiantes. Se está estudiando el posible efecto de la presencia de genes de resistencia en los fenómenos de recombinación.

## OS-41

**DIVERSIDAD GENÉTICA DEL VIRUS DEL AMARILLEO DEL TOMATE, *Tomato chlorosis virus* (ToCV)****LOZANO, G.<sup>1</sup>, GRANDE-PÉREZ, A.<sup>2</sup>, FORTES, I.M.<sup>1</sup>, LOURO, D.<sup>3</sup>, NAVAS-CASTILLO, J.<sup>1</sup>**<sup>1</sup>Estación Experimental "La Mayora", CSIC, 29750 Algarrobo-Costa (Málaga). E-mail: jnavas@eelm.csic.es<sup>2</sup>Departamento de Biología Celular, Genética y Fisiología, Universidad de Málaga, 29071 Málaga. E-mail: agrande@uma.es<sup>3</sup>Estação Agronómica Nacional, INIAP, 2784-505 Oeiras, Portugal. E-mail: diamantinalouro@oninetspeed.pt

El virus del amarilleo del tomate, *Tomato chlorosis virus* (ToCV, género *Crinivirus*, familia *Closteroviridae*) causa una enfermedad de importancia que en España está presente en el sur y sudeste peninsular e Islas Canarias desde finales de los años 90. ToCV está también ampliamente distribuido en la mayor parte de los países de la cuenca mediterránea y otras zonas templadas del mundo. Asimismo, recientemente, se ha demostrado que infecta de forma natural al cultivo de pimiento en las provincias de Almería y Málaga. Desde el comienzo de las epidemias de amarilleo en España, hemos realizado muestreos sistemáticos en algunas de las principales zonas afectadas y recientemente hemos obtenido la secuencia completa de un aislado español de ToCV. En este trabajo, hemos llevado a cabo un estudio sobre la variabilidad del genoma de ToCV en las poblaciones naturales de ToCV que infectan a tomate en el sur y sudeste peninsular (provincias de Murcia, Almería y Málaga) desde 1997 a 2004 y comparado con aislados procedentes de las Islas Canarias, Portugal y Marruecos, así como con aislados obtenidos de pimiento. Las zonas del genoma analizadas corresponden a los genes que codifican las proteínas *Hsp70h*, capsida y duplicada de ésta en el RNA2 y la RNA polimerasa dependiente de RNA en el RNA1. Además, se ha incluido la región no codificante del extremo 5' del RNA1. Se discuten los resultados obtenidos en comparación con los disponibles sobre otros miembros de la familia *Closteroviridae*.

**OS-42****VARIABILIDAD GENÉTICA DEL VIRUS DEL AMARILLAMIENTO NECRÓTICO DEL HABA (FBNYV)****NAVARRO, E., ROMERO, J.**

*Departamento de Protección Vegetal, INIA, Carretera de La Coruña, Km. 7,5, 28040 Madrid.  
E-mail: romero@inia.es*

El virus del amarillamiento necrótico del haba (*Faba bean necrotic yellows virus*, FBNYV) es un miembro del género *Nanovirus* que afecta principalmente leguminosas y ha sido descrito ocasionando importantes pérdidas económicas en Oriente medio y norte de África. En trabajos anteriores lo hemos detectado infectando cultivos de haba en Murcia, donde se transmite mediante pulgones. Su genoma está compuesto por múltiples componentes circulares de DNAs, cada uno de 1 Kb de tamaño. Treinta y tres aislados del FBNYV fueron recolectados de diferentes campos de haba en Murcia en los años 2002-2004. Los aislados fueron identificados mediante Elisa-TAS utilizando un antisuero policlonal y una mezcla de antisueros monoclonales capaz de reconocer un amplio espectro de aislados del FBNYV. Los diversos componentes del FBNYV fueron obtenidos mediante amplificación de los círculos de DNA por PCR utilizando cebadores solapantes en la región conservada del origen de replicación. El clonaje y secuenciación de los diferentes círculos nos permitió diseñar cebadores específicos para cada componente, lo que nos sirvió para discriminar los diversos componentes en cada aislado. Ocho componentes de once aislados fueron clonados y secuenciados y sus secuencias de nucleótidos utilizados para analizar su variabilidad genética frente a las secuencias de los aislados de Siria y Egipto, que son las únicas secuencias de este virus disponibles en el banco de genes. De nuestros análisis podemos concluir que la recombinación genética no parece haber jugado un papel importante en la evolución de la población analizada de los aislados españoles, los cuales formaron un grupo homogéneo que se diferencia de los aislados de Siria y Egipto. La variabilidad de la población española parece asociada a la distancia geográfica y no en función de las características serológicas, ni las campañas de muestreo. El análisis mayoritario de los aislados españoles del FBNYV, muestra una correlación positiva entre los distintos componentes genómicos en los huéspedes, que sugiere una tendencia a la absorción o asociación entre componentes indicando la posible existencia de una población viral establecida en la región. La detección de un nuevo componente C13 del genoma del FBNYV, solo presente en los aislados españoles, parece indicar que la composición genómica de los Nanovirus es una característica no solamente de especie sino también poblacional.

**OS-43****MODELIZACIÓN EPIDEMIOLÓGICA EN DISTINTAS MEZCLAS DE GENOTIPOS.****SEGARRA, J.<sup>1</sup>, VAN DEN BOSCH, F.<sup>2</sup>, JEGER, M.J.<sup>3</sup>**

<sup>1</sup>*Departament de Producció Vegetal i Ciència Forestal, Universitat de Lleida, Av. Alcalde Rovira Roure 191, 25198 Lleida. E-mail: segarra@pvcf.udl.es*

<sup>2</sup>*Department of Statistics, IACR-Rothamsted, Harpenden, Hertfordshire AL5 2JQ, United Kingdom.*

<sup>3</sup>*T.H. Huxley School, Imperial College at Wye, University of London, Wye, Ashford, Kent TN25 5AH, United Kingdom.*

La heterogeneidad espacial y temporal de la población huésped reduce el riesgo epidémico. Dicha hipótesis fundamenta, por ejemplo, la utilización de variedades multilínea o/y de mezclas de cultivares, y la implementación de esquemas de diversificación varietal para el control de determinadas enfermedades de los cultivos. Mediante la simulación y el contraste experimental, diversos patrones epidémicos emergen con el uso de la mezcla de cultivares: (i) la existencia de una relación curvilínea entre la severidad de la enfermedad y la proporción de plantas susceptibles y (ii) una relación lineal negativa entre el efecto de la diversidad del huésped y la proporción de plantas susceptibles. Para una mezcla de un genotipo susceptible con uno resistente, Leonard obtuvo que la tasa de infección decrecería logarítmicamente con el aumento de la proporción de plantas resistentes. Posteriormente, Jeger concluyó que, en las mezclas de genotipos con distinta resistencia raza no-específica, la severidad final de la mezcla es la misma aunque normalmente reduzca el desarrollo inicial de la enfermedad. Con estos antecedentes nos planteamos formular un modelo epidemiológico que permitiera integrar los distintos escenarios y evaluar si reproducía los patrones epidémicos observados. A partir de un modelo epidemiológico básico con tres variables: los tejidos susceptible e infeccioso y el inóculo libre, se incorporó la heterogeneidad de la población huésped y de la población patógeno. Mediante el análisis y simulación del modelo se evaluó el efecto epidemiológico en distintos escenarios: a) que la población patógeno esté o no compuesta por distintas razas, y b) que el cultivo esté compuesto por una mezcla de variedades con distinta resistencia raza específica o bien con distinta resistencia raza no específica. Para cada situación se ha obtenido la tasa reproductiva básica  $R_0$ , la tasa de infección inicial  $r$  y la severidad final  $y_\infty$ . Las mezclas de cultivares más efectivas para el control de la enfermedad son aquellas que están compuestas por variedades con distinta resistencia raza-específica. Dicho efecto epidemiológico es aún mayor cuando no hay razas complejas en la población del patógeno.



**OS-44****DISEMINACIÓN NATURAL DE *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* Y DE LA TUBERCULOSIS DEL OLIVO EN UNA PLANTACIÓN EXPERIMENTAL**

**QUESADA, J.M., PEÑALVER, R., SALCEDO, C.I., PIQUER, J., LÓPEZ, M.M.**

*Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA), Carretera Moncada-Náquera, Km 4,5, 46113 Moncada (Valencia). E-mail: jquesada@ivia.es*

La tuberculosis del olivo causada por *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* (Pss) es una enfermedad muy frecuente en España, pero cuyo patrón de diseminación natural en las plantaciones es prácticamente desconocido. Para el estudio de la diseminación de las poblaciones epífitas de la bacteria y de la enfermedad, se estableció una plantación experimental con olivos de las variedades Picudo y Arbequina y las plantas se inocularon con una cepa de Pss, o se mantuvieron como control, sin inocular. Estos dos tratamientos se asignaron mediante un diseño en grupos al azar con 2 repeticiones y 10 árboles por combinación tratamiento-repetición. Se cuantificaron las poblaciones epífitas de la bacteria en tallos y hojas asintomáticos de 5 olivos de cada tratamiento, estacionalmente durante 4 años y también se evaluó el número de tumores por planta, el vigor, la producción y la calidad del aceite de cada tratamiento.

En las dos variedades, en los dos tipos de material vegetal y en cada estación, se observó que el número de muestras donde se aisló la bacteria y el tamaño medio de las poblaciones de Pss aisladas fueron significativamente más altas en las plantas inoculadas, que en las plantas control. Pss se aisló de los árboles control, antes de la aparición del primer síntoma de la enfermedad, en 3 olivos de Picudo y en 1 de Arbequina en el primer año. La bacteria también se aisló de hojas en las plantas inoculadas, antes de la aparición del primer tumor en las ramas no inoculadas, en 7 olivos de Picudo y en 2 de Arbequina en el primer año. En ambas variedades, la incidencia de la enfermedad fue significativamente mayor en las plantas inoculadas que en las plantas control y también fue significativamente mayor cada año comparado con el anterior. El número de olivos control en los que se observó al menos un tumor el primer año fue de 18 en Picudo y 15 en Arbequina, presentando síntomas los 20 olivos de cada variedad el cuarto año. El vigor de los olivos control fue mayor que el de los inoculados. Además, la producción del control fue significativamente superior a la de las plantas inoculadas, únicamente en Picudo, pero no se observaron diferencias destacables entre la calidad del aceite de los controles y de las plantas inoculadas, en ambas variedades.

**OS-45****MECANISMO DE BIOCONTROL DE HONGOS PATÓGENOS DE POSCOSECHA EN EL BIOFUNGICIDA *Pantoea agglomerans* EPS125**

**MORENO, M.C., BADOSA, E., RODRÍGUEZ-PALENZUELA, P., LÓPEZ-SOLANILLA, E., PEÑALVER, R., MONTESINOS, E.**

*Instituto de Tecnología Agroalimentaria-CeRTA-CIDSAV, Universitat de Girona, Campus de Montilivi, 17071 Girona. E-mail: carme.moreno@udg.es*

*Pantoea agglomerans* EPS125 es un eficiente biofungicida desarrollado en nuestro laboratorio activo en el control de importantes patógenos de poscosecha donde se incluyen *Penicillium expansum*, *Monilinia laxa* y *Rhizopus stolonifer* en diversos frutos. En el presente trabajo se estudió el mecanismo de biocontrol utilizado por la cepa EPS125 en la inhibición de la infección causada por *P. expansum*. Los resultados obtenidos a partir de la caracterización fenotípica mostraron que la interacción directa entre células del biofungicida y del patógeno era indispensable para lograr la inhibición de la germinación de las esporas y la consecuente infección por parte del patógeno. Además, dicha interacción está relacionada con la formación de un tapete microbiano o biofilm por parte de la cepa EPS125, en donde están involucradas estructuras semejantes a los pili de tipo IV y microcolonias envueltas por una capa de alginato o sinplasma.

Para demostrar qué mecanismo es responsable de la inhibición se recurrió al análisis genético de mutantes defectivos en biocontrol de *P. expansum* en manzana obtenidos mediante mutagénesis aleatoria con el minitransposón GUS. De este modo los mutantes m40, m2002, m2126 y m4015 fueron seleccionados de un total de 4.035 mutantes no auxotróficos. Las secuencias nucleotídicas de las regiones adyacentes al punto de inserción del transposón mostraron homología con dihidrodipicolinato sintasas, secuencias de inserción IS1222, proteínas de la familia de la luciferasa, lisina/ornitina N-monooxigenasa y otras de función desconocida. De acuerdo con la información genética y los fenotipos mostrados por los mutantes seleccionados, todo parece indicar que diferentes procesos donde se incluyen la producción de pilis, alginato y sideróforos, así como la regulación de determinados genes vía *quorum sensing* participan en la formación del biofilm de *P. agglomerans* EPS125, pudiendo desempeñar a su vez un papel importante en la inhibición de la germinación de las esporas fúngicas. No obstante el papel específico de cada componente será estudiado en particular para comprobar y determinar el peso específico de cada mecanismo en el biocontrol de la enfermedad.

**OS-46****EFFECTO DE LA COMBINACIÓN DE *Trichoderma* Y SOLARIZACIÓN SOBRE *Colletotrichum* spp. Y *Phytophthora cactorum* EN CAMPOS DE FRESA**

**PORRAS, M., BARRAU, C., ROMERO, F.**

IFAPA, Centro de Investigación y Formación Agraria (CIFA) Las Torres, Apdo. Correos Oficial, 41200 Alcalá del Río (Sevilla). E-mail: maria.porras.ext@juntadeandalucia.es

La antracnosis (*Colletotrichum* spp.) y la podredumbre de corona (*Phytophthora cactorum* (Lebert & Cohn) Schröter) son dos enfermedades que afectan al cultivo de la fresa originando importantes pérdidas de producción. Para su control se testaron alternativas no químicas, concretamente la solarización y la aplicación de *Trichoderma* spp. Los experimentos de campo se realizaron en la finca experimental El Cebollar, en Moguer (Huelva), durante tres años consecutivos, en parcelas que nunca habían sido tratadas con bromuro de metilo. El diseño fue factorial en bloques completos al azar, con cuatro repeticiones. La solarización se realizó durante el verano, con polietileno transparente de 50 µm de grosor. *Trichoderma* spp. se aplicó mediante fondo e inmersión, añadiéndose al suelo, a través de la cinta de riego por goteo ( $10^8$  conidios/m<sup>2</sup>), siete días antes de la plantación; y sumergiendo las raíces de las plantas en una solución acuosa ( $10^6$  conidios/ml), previo a la plantación.

La solarización redujo la población de *P. cactorum* hasta el 100% el primer año, 47%, el segundo, y 55%, el tercero, con respecto al control. Las aplicaciones de *Trichoderma* produjeron la reducción de *P. cactorum* en suelo en un 70%, 74% y 95%, en los tres años estudiados, en relación al control. La combinación de solarización y *Trichoderma* fue la más efectiva, ya que redujo la población de *P. cactorum* en suelo el 89%, 98% y 99%, respectivamente. En todos los casos las diferencias fueron estadísticamente significativas respecto al testigo.

Por otra parte, el segundo año se detectó un 16% de plantas infectadas con *Colletotrichum* en los aislamientos pre-plantación. Con frecuencia, la antracnosis de corona se inicia en los viveros, pudiendo permanecer latente hasta el transplante a los campos de producción. A lo largo de esta campaña la incidencia de mortalidad por antracnosis de corona fue del 53% en las parcelas control. La enfermedad se extendió rápidamente bajo condiciones ambientales favorables (temperatura superior a 20 °C y humedad relativa cercana al 100%). Registramos dos periodos de mayor mortalidad coincidentes con las temperaturas más altas registradas a lo largo de la campaña. La aplicación de *Trichoderma* redujo significativamente la mortalidad respecto al testigo.

**OS-47****EFICACIA DE UN NUEVO ANTIOIDIO NATURAL SOBRE HORTALIZAS BAJO ABRIGO EN ESPAÑA**

**GALEANO, M.<sup>1</sup>, BELDA, J.E.<sup>1</sup>, COLOMER, J.I.<sup>3</sup>, GARCÍA, A.<sup>3</sup>, RAVENSBERG, W.<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Dpto. I+D Koppert Biological Systems S.L., Apdo. Correos 38, 04738 Vícar (Almería). E-mail: mgaleano@koppert.es

<sup>2</sup>Dpto. R&D Microbiology, Koppert Biological Systems, B.V., Veilingweg 17, 2651 BE Berkel en Rodenrijs, Holanda.

<sup>3</sup>Fitotest, S.L. Ingeniería Agrícola, c/ Sagunto 8, 6º 5, 04004 Almería.

Se ha desarrollado un nuevo producto para el control de hongos patógenos en plantas, basado en la actividad de la lactoperoxidasa (LP), un sistema antimicrobiano activo en la leche. La extensa investigación de Koppert se ha centrado principalmente en la formulación de un preparado para combatir hongos patógenos, siendo una de ellas contra oídio.

Se presentan por primera vez datos de eficacia de este producto contra oídio en cultivos hortícolas en España (*Leveillula taurica*, *Sphaerotheca fuliginosa*, *Erysiphe cichoracearum*, *Erysiphe* spp). En cada uno de los ensayos se llevaron a cabo tres evaluaciones (previa al tratamiento, 3 y 10 días después de la aplicación) consistentes en valorar el porcentaje de colonización del hongo en hojas marcadas de cada bloque o repetición. Se comparó la eficacia del producto en dos dosis diferentes (dosis recomendada de 1,5 g/L y doble dosis de 3,0 g/L) con los bloques no tratados y con un tratamiento fungicida químico estándar (myclobutanil 12,5% EC) a la dosis recomendada.

En pepino el oídio fue bien controlado por el nuevo antioídio natural, obteniéndose porcentajes de control después de 10 días del tratamiento del 94,7% y del 92,8% en la campaña del 2003, y del 94,3% y 93,9% en la del 2004. Mientras el fungicida químico mostró un control del 97,6% y 86,4% en el 2003, y del 77,9% y 79,6% en el 2004.

En tomate se obtuvo también buen control de la enfermedad con un 96,2% y un 96,3% en la campaña del 2003, y un 94,3% y un 94,3% en la del 2004. Frente al 93,9% y 87,7% en el caso del fungicida químico para la primera campaña, y del 85,9% y el 92,3% para la segunda.

En pimiento el control fué del 85,5% y 79,2% en el 2003, y del 91,0% y el 89,0% en el segundo año. Mientras que el fungicida químico controló un 87,2% y un 86,7% en el 2003, y un 77,8% y un 77,2% en el 2004.

Las reducciones de la enfermedad en todos los ensayos fueron siempre estadísticamente significativas (ANOVA; P=0,05) respecto al control pero no respecto al tratamiento químico que se comportó con similar eficacia, por lo que se puede concluir que el producto posee una eficacia comparable al fungicida químico, proporcionando una importante herramienta a los programas de manejo integrado de plagas por su escasa toxicidad sobre enemigos naturales y en el manejo de resistencias.

**OS-48****IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DEL AGENTE DE CONTROL BIOLÓGICO  
*Penicillium oxalicum*****LARENA, I., DE CAL, A., SABUQUILLO, P., MELGAREJO, P.**

*Dpto. Protección Vegetal, CIT-INIA, Carretera de La Coruña Km 7,5, 28040 Madrid. E-mail: ilarena@inia.es*

Actualmente la demanda social dentro de la Unión Europea se dirige hacia una producción agrícola de alta calidad con ninguna o mínima presencia de residuos químicos. El control biológico empleando hongos antagonistas se presenta como una de las alternativas más prometedoras, aunque también ha de conocerse su persistencia y efecto sobre el medio ambiente y la salud humana. Para ello los agentes de biocontrol han de ser identificados y no sólo para cumplir los requisitos legales de registro sino también para realizar estudios que favorezcan su eficacia como fijar el número y momento óptimo de aplicaciones, etc...

La cepa 212 de *P. oxalicum* (ATCC nº 201888) ha demostrado ser un prometedor agente de control biológico frente a *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (FOL) raza 2 y *Verticillium dahliae* (VD). Con objeto de diferenciar este aislado de otros aislados de la misma especie y de otros hongos presentes en la superficie vegetal, se ha procedido a su identificación molecular mediante la amplificación específica de secuencias extragénicas repetidas (rep-PCR). Se ha partido de una colección de 28 aislados procedentes de distintas localizaciones. Se han observado diferencias en el patrón de bandas entre los aislados españoles procedentes de suelo (incluida la cepa de biocontrol) y los aislados procedentes de otras regiones del mundo, tanto para rep-PCR como para BOX-PCR. Además en los patrones de bandas de BOX-PCR se ha visto un polimorfismo en el patrón correspondiente a los aislados españoles. Se ha aislado el DNA de la banda polimórfica, reamplificándose y secuenciándose. También han sido secuenciadas las regiones del ADN ribosómico que incluye las regiones intergénicas (ITS1 y 2) incluyendo el 5.8S. Los resultados confirman los resultados obtenidos con las secuencias rep-PCR.

Adicionalmente, con todos los aislados de *P. oxalicum* se han realizado ensayos de biocontrol *in vitro* sobre plantas de tomate inoculadas artificialmente con FOL cuyos resultados serán discutidos.

## OS-49

**EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTAGONISTA DE FILTRADOS DE HONGOS FRENTE AL NEMATODO DE LOS CÍTRICOS *Tylenchulus semipenetrans*****VIERA, A.<sup>1</sup>, STCHIGEL, A.M.<sup>2</sup>, SORRIBAS, F.J.<sup>3</sup>, VERDEJO-LUCAS, S.<sup>1</sup>**<sup>1</sup>Protecció Vegetal, IRTA, Carretera de Cabrils s/n, 08348 Cabrils (Barcelona)<sup>2</sup>Unitat de Microbiologia, Universitat Rovira i Virgili, 43201 Reus (Tarragona)<sup>3</sup>Departament d'Enginyeria Agroalimentària i Biotecnologia, Universitat Politècnica de Catalunya, Campus Castelfells, Barcelona.

Se evaluó la actividad antagonista de 20 filtrados de hongos procedentes de suelo de parcelas cítricas frente a *T. semipenetrans* *in vitro* y en planta. Los bioensayos *in vitro* se realizaron en placas multipocillo donde los juveniles de segundo estadio del nematodo se exponían a tres concentraciones del filtrado que contenían 100%, 50% o 25% del filtrado original durante 24 horas a 24°C. Pocillos con agua destilada estéril se utilizaron como controles de referencia. Nueve de los 20 filtrados mostraron actividad inhibitoria de la movilidad del nematodo y el porcentaje de individuos inmovilizados oscilaba entre un 17% y 94% dependiendo de la concentración del filtrado y de la especie fúngica de la cual se obtuvo el mismo. Los filtrados de *Talaromyces cyanescens* aislados 2-4 y 2-5, *Paecilomyces lilacinus*, *Chaetomium robustum*, *Acremonium strictum*, *Engyodontium album*, *Myrothecium verrucaria*, *Emericella rugulosa*, y *Tarracomycetes gigaspora* consistentemente inmovilizaban los juveniles del nematodo a una o varias concentraciones del filtrado. La actividad de los filtrados de *P. lilacinus*, *C. robustum* y *A. strictum* se relacionaba con los modelos de dosis-respuesta probit, logit y gompit, respectivamente. El filtrado de *P. lilacinus* mostró la máxima actividad con una CI50 del 58% que difería de la del filtrado de *C. robustum* (CI50 = 68%) y *A. strictum* (CI50 = 82%). La actividad de los filtrados de *P. lilacinus*, *E. album*, and *T. cyanescens* 2-5 permanecía inalterada después de ser autoclavados a 120°C durante 20 minutos e inhibían la movilidad del nematodo a las mismas concentraciones que los filtrados sin autoclavar. Sin embargo, la actividad de los restantes filtrados se modificaba tras ser autoclavados. Así, el filtrado original de *T. cyanescens* 2-4 mostraba actividad cuando se autoclavaba pero era inactivo sin autoclavar. Este filtrado inmovilizaba a más de un 80% de los juveniles cuando se diluía al 50% tanto si se autoclavaba previamente o no. El filtrado de *T. cyanescens* 2-4 a concentraciones del 100% y 50% reducía significativamente la eclosión de los huevos de *T. semipenetrans* en ensayos repetidos y ésta no revertía tras la incubación de los mismos en agua durante 6 días. Los ensayos en planta corroboraron la actividad antagonista del filtrado de *T. cyanescens* 2-4 detectada *in vitro* ya que el número de huevos por gramo de raíz en plántulas de Citrange Carrizo se redujo entre un 60% y un 84% respecto al control cuando el inóculo de juveniles se incubaba en el filtrado autoclavado del hongo durante 24 y 48 horas, respectivamente.

**OS-50****BIOCONTROL DE LA PODREDUMBRE BLANCA DEL AGUACATE CON AISLADOS NO-PATOGÉNICOS DE *Rosellinia necatrix*****RUANO-ROSA, D., LÓPEZ-HERRERA, C.J.***Instituto de Agricultura Sostenible, C.S.I.C., Apdo. 4084, Córdoba.*

Entre los métodos de control biológico de la podredumbre blanca (PB) del aguacate causada *Rosellinia necatrix* Prill., destaca el uso de aislados de *Trichoderma* spp. En los últimos años se ha propuesto también el uso de aislados de *R. necatrix* con baja capacidad infectiva como agentes de control biológico (ACB).

Es de esperar que aislados no-patogénicos (NP) de la misma especie (o género) tengan las mismas características que los aislados patogénicos, exceptuando la capacidad de infección de las plantas, teniendo el mismo éxito en otros aspectos como colonización, ocupación y competencia, ya que comparten el mismo nicho ecológico en la planta. Por lo tanto, es posible que muchos de estos aislados tengan capacidad potencial de proteger a las plantas frente a infecciones causadas por aislados patogénicos de la misma especie o especies cercanas, por diversos mecanismos.

En anteriores estudios de patogenicidad de los aislados de nuestra colección, se determinó la existencia de aislados NP (NP1 y NP2). Actualmente se ha llevado a cabo experimentos de biocontrol con estos NP sobre la PB, en plantas de aguacate de 5 meses de edad, obtenidas por cultivo de embriones *in vitro*, plantadas en sustrato Laura en macetas de 1,15 L de capacidad. El inóculo de los aislados NP, en semillas de trigo colonizadas, se aplicó a razón de 2 g/L de sustrato mientras que el aislado muy virulento Rn 400 se aplicó a 0,5 g/L, utilizando ocho repeticiones por tratamiento. Aunque las plantas inoculadas con NP+Rn400 presentaron: un peso seco de raíces, un porcentaje de raíz necrosada y un porcentaje de aislamiento del patógeno en raíz no significativamente diferentes al testigo inoculado solo con Rn 400, el control de la enfermedad con los NP fue efectivo, presentando un nulo progreso epidémico de la enfermedad significativamente diferente en las plantas inoculadas sólo con el aislado patogénico (Rn 400). El aislamiento positivo de *R. necatrix* en las plantas tratadas con Rn 400 y en los tratamientos Rn400+NP, y negativo en las tratadas tan solo con los aislados NP al finalizar el experimento, sugieren que los aislados NP1 y NP2, ejercen una buena acción de control de la enfermedad, aunque tienen mermada la capacidad de colonización del tejido vivo, por lo que la acción de control ejercida se debería a otras razones como competencia por nutrientes, micoparasitismo, etc., distintas a la ocupación de los lugares de infección en la raíz.

**OS-51****EVALUACIÓN DE LA TECNOLOGÍA DE INTERFERENCIA POR RNA (RNAi) PARA EL CONTROL DE LAS ENFERMEDADES VIRALES EN CULTIVOS**

**CAHANA, A.<sup>1</sup>, MARTIÁNEZ, J.<sup>2</sup>, VARGAS, M.<sup>2</sup>, TUGENTMAN, M.<sup>1</sup>, YARDEN, G.<sup>1</sup>, PALDI, N.<sup>1</sup>, TENLLADO, F.<sup>2</sup>, DÍAZ-RUIZ, J.R.<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Bio-Oz Biotechnologies Ltd., [www.bio-oz.co.il](http://www.bio-oz.co.il), Yad Mordechai, Israel.

<sup>2</sup>Departamento de Biología de Plantas, Centro de Investigaciones Biológicas, CSIC. c/ Ramiro de Maeztu, 9, 28040 Madrid. E-mail: [tenllado@cib.csic.es](mailto:tenllado@cib.csic.es)

El silenciamiento génico post-transcripcional es un mecanismo de degradación de RNA específico de secuencia, que constituye un sistema natural de defensa frente a infecciones virales en plantas. El RNA bicatenario (dsRNA) correspondiente a secuencias virales es un potente inductor de esta respuesta en diversos grupos de organismos. Previamente hemos demostrado que la aplicación directa de dsRNA en tejido foliar, conjuntamente con el inóculo viral, confiere resistencia frente al virus homólogo. Es más, extractos crudos de dsRNA producidos de manera eficiente y a bajo coste mediante un sistema de expresión inducible en bacterias, presentan esta misma propiedad antiviral. Con vistas a conseguir que esta tecnología de interferencia por RNA (RNAi) constituya un método preventivo para el control de las enfermedades virales en cultivos, se requiere un método de aplicación del dsRNA versátil a escala agronómica. Recientemente, se ha desarrollado un aparato de inoculación por bombardeo de micropartículas que permite introducir en tejidos vegetales diferentes tipos de ácidos nucleicos bajo condiciones de presión y distancia variables. En esta comunicación se presentan resultados preliminares de la evaluación en condiciones agronómicas de la tecnología RNAi frente a dos potyvirus que provocan importantes pérdidas en cultivos de tomate y calabacín.

Se analizó la capacidad de extractos bacterianos conteniendo dsRNA correspondientes al gen de la CP del virus Y de la patata (PVY) o al gen HC-Pro del virus del mosaico amarillo del calabacín (ZYMV) para interferir con la infección de su virus homólogo en condiciones de cultivo en invernadero. Se ensayaron aplicaciones únicas o múltiples del agente interferente, realizadas al unísono o sucesivamente a la inoculación viral, con objeto de definir el régimen de tratamiento más efectivo para cada par virus/huésped. La inoculación conjunta con ZYMV y HC-Pro dsRNA, seguida por el tratamiento con dsRNA a 2 y 4 días, consiguió la protección absoluta del 40% de las plantas y una reducción del título viral en las restantes. Cuando la inoculación con PVY de plantas de tomate tratadas con CP dsRNA se realizó a través de su vector natural, *Mizus persicae*, se observó un porcentaje significativo de protección comparado con el grupo control tratado con HC-Pro dsRNA.



**OS-52****OBTENCIÓN DE UN CLON INFECCIOSO DEL VIRUS DEL MANCHADO FOLIAR DE LOS CÍTRICOS**

**VIVES, M.C., MARTÍN, S., AMBRÓS, S., RENOVELL, A., NAVARRO, L., MORENO, P., GUERRI, J.**

*Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias, Apartado Oficial, 46113 Moncada (Valencia). E-mail: cvives@ivia.es.*

El virus del manchado foliar de los cítricos (CLBV) posee un genoma de RNA monocatenario de polaridad positiva. El RNA genómico contiene 8.747 nt y está organizado en tres marcos de lectura abierta. El virus infecta a todas las especies y variedades de cítricos ensayadas sin inducir síntomas en la mayoría de ellas y se transmite mecánicamente a cítricos. CLBV se multiplica en todos los tejidos de la planta, al contrario de otros virus de cítricos como tristeza, que está limitado a las células asociadas al floema.

Con el objetivo de desarrollar un vector viral para cítricos se ha obtenido un clon de cDNA del genoma completo de CLBV. Para ello se realizaron tres tipos de construcciones: una bajo el promotor T7 de la RNA polimerasa del fago lambda que permite obtener transcritos de RNA equivalentes al genoma de CLBV, para ensayar la inoculación directa de RNA en plantas. Las otras dos construcciones, clonadas bajo el promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor, seguido de la señal de terminación del gen de la nopalina sintasa (tNOS), se emplearon para ensayar la inoculación de cDNA en plantas de *Nicotiana occidentalis* y *N. benthamiana* mediante agroinoculación. En una de estas construcciones se añadió la ribozima del virus delta de la hepatitis entre el extremo 3' del virus y el terminador tNOS. Ambas construcciones se subclonaron en los vectores binarios pBIN 19 y BiBAC 2.

La inoculación mecánica de transcritos de RNA del genoma completo a cítricos o a *N. occidentalis* no dio lugar a infección, a pesar de que estas especies son huéspedes de CLBV. Sin embargo, todos los clones de las construcciones obtenidas bajo el promotor 35S dieron lugar a una infección sistémica al agroinocular plantas de *N. occidentalis* y *N. benthamiana*. La construcción que contenía la ribozima del virus delta de la hepatitis seguido del tNOS clonada en el vector binario pBIN 19 dio lugar a una infección más temprana (8 días post inoculación (dpi) en infección local y 15 dpi en infección sistémica) y a una acumulación de viriones más alta. A partir de estas plantas agroinoculadas se obtuvieron preparaciones semipurificadas de viriones, que se utilizaron para inocular mecánicamente plantas de cítricos mediante cortes en la corteza. En estas plantas se detectó la presencia del virus un mes después de su inoculación.

**OS-53****PATOGENICIDAD DE VARIANTES VIRALES QUE SOBREPASAN LA RESISTENCIA DESENCADENADA POR LOS GENES *Tm-2<sup>2</sup>* Y *Sw-5* EN TOMATE****ARAMBURU, J.<sup>1</sup>, GALIPIENSO, L.<sup>1</sup>, SOLER-ALEIXANDRE, S.<sup>2</sup>, LOPEZ, C.<sup>2</sup>**<sup>1</sup>IRTA, Crta. de Cabrils s/n, 08348 Cabrils (Barcelona).<sup>2</sup>UPV-COMAV, Camino de Vera s/n, 46022 Valencia.

Los genes de resistencia *Tm-1*, *Tm-2* y *Tm-2<sup>2</sup>* han sido introducidos en la inmensa mayoría de los cultivares de tomate para prevenir las pérdidas ocasionadas por el virus del mosaico del tabaco (TMV) y el virus del mosaico del tomate (ToMV). Mas recientemente se ha incorporado el gen *Sw-5* que confiere resistencia al virus del bronceado del tomate (TSWV). No obstante, en ambos casos se han descrito variantes virales que son capaces de superar dichas resistencias.

Utilizando extractos de hojas de tomate de una muestra infectada con el virus Y de la patata (PVY) se infectaron sistémicamente plantas de pimiento que poseían el gen de resistencia a este virus y el gen *L1* que produce resistencia al TMV. Ensayos de detección serológicos y ensayos biológicos de transmisión confirmaron que esta infección era debida a la presencia adicional, detectada por primera vez en España, de una variante del ToMV capaz de superar las resistencias conocidas a este virus. El análisis de la secuencia de la amplificación obtenida mediante RT-PCR, utilizando iniciadores específicos para la proteína del virus, mostró una analogía superior al 99% con el aislado L11A, que ha sido descrito como capaz de superar la resistencia producida por el gen *Tm2<sup>2</sup>* en tomate. La presencia de esta variante del virus se confirmó en algunas de las muestras infectadas con PVY procedentes del mismo campo de prospección. No obstante, el virus no se volvió a detectar en prospecciones realizadas en el mismo campo de tomate en la siguiente temporada de cultivo, lo cual no parecía previsible teniendo en cuenta la facilidad con que se transmite este virus.

En este trabajo se presentan los resultados obtenidos en ensayos de infectividad realizados con esta variante del ToMV en diferentes huéspedes en relación con los aislados convencionales y se establecen las analogías y diferencias desde el punto de vista epidemiológico encontradas respecto de los resultados obtenidos con otras variantes del TSWV que superan la resistencia producida por el gen *Sw-5* en tomate.

**OS-54****OBTENCIÓN DE CLONES DE cDNA DEL GENOMA DEL VIRUS DE LA TRISTEZA DE LOS CÍTRICOS (CTV) INFECCIOSOS MEDIANTE AGROINOCULACIÓN****AMBRÓS, S., RUIZ-RUIZ, S., GUERRI, J., MORENO, P.**

*Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA), Ctra Moncada a Náquera, Km 4,5, 46113 Moncada (Valencia). E-mail: sambros@ivia.es*

El control de los daños causados por los aislados más virulentos del virus de la tristeza de los cítricos (CTV) requiere el conocimiento previo de los determinantes específicos de patogenicidad. Para la identificación de éstos se requiere un sistema genético adecuado. En la actualidad, el único disponible se basa en la inoculación de transcritos de RNA en protoplastos de *N. benthamiana* para producir viriones, cuya concentración se incrementa mediante sucesivos pases a nuevos lotes de protoplastos, hasta que ésta es suficiente para hacer una inoculación mecánica a plantas de cítricos. Nuestro objetivo es establecer un sistema genético alternativo que permita ensayar construcciones quiméricas de CTV en planta sin pasar por protoplastos. Para ello, se obtuvieron construcciones de cDNA del genoma completo del aislado T36 bajo el control del promotor 35S, seguido de una ribozima y un terminador, en un vector pUC. Inicialmente, éstos cassettes de expresión de CTV se subclonaron en plásmidos binarios de tipo pBIN que resultaron poco estables y difíciles de mantener en bacterias. Para reducir la toxicidad que produce la zona 5' terminal de CTV en bacterias: i) se insertó un intrón de patata en dicha zona, y ii) se utilizó un vector binario de tipo mixto (BIBAC). Con estas construcciones se transformaron diversas cepas de *A. tumefaciens* con las que se agroinfiltraron plantas de *N. benthamiana* y de varias especies de cítricos para optimizar el ensayo. Los clones resultaron agroinfecciosos en *N. benthamiana* (huésped no sistémico del virus), en cuyas hojas se detectó expresión transitoria y replicación de CTV. Mediante análisis de RT-PCR convencional, hibridación *Northern* y ELISA se confirmó la correcta escisión del intrón en las plantas agroinfiltradas, la expresión de RNAs genómico y subgenómicos de CTV y la acumulación de proteína de la cápsida. La acumulación de RNAs y proteína de CTV aumentó durante al menos 3 semanas postinfiltración, co-infiltrando con un supresor del silenciamiento génico y utilizando el vector BIBAC. La agroinoculación de cítricos no fue exitosa y actualmente se están realizando nuevos ensayos. Como alternativa se está estudiando la cinética de acumulación de CTV en hojas de *N. benthamiana* mediante RT-PCR cuantitativa a tiempo real por si hubiese que utilizar estos viriones para la inoculación mecánica de cítricos.

**OS-55****CAMBIOS INDUCIDOS POR EL *Plum pox virus* (PPV) A NIVEL SUBCELULAR EN EL METABOLISMO ANTIOXIDATIVO DE PLANTAS DE GUISANTE**

**DÍAZ-VIVANCOS, P.<sup>1</sup>, RUBIO, M.<sup>1</sup>, OLMOS, E.<sup>2</sup>, GARCÍA, J.A.<sup>3</sup>, MARTÍNEZ-GÓMEZ, P.<sup>1</sup>, HERNÁNDEZ, J.A.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Departamento de Mejora Vegetal. <sup>2</sup>Departamento de Nutrición Vegetal, Centro de Edafología y Biología Aplicada del Segura (CEBAS)-CSIC, Apdo. Correos 164, 30100 (Espinardo) Murcia.

<sup>3</sup>Departamento de Genética Molecular de Plantas, Centro Nacional de Biotecnología (CNB)-CSIC, Campus de Cantoblanco, 28049 Madrid. E-mail: jahernan@cebas.csic.es

En estudios previos se ha descrito que la infección del PPV a largo plazo produce un estrés oxidativo en plantas susceptibles de albaricoquero y melocotonero. Sin embargo, debido a diferentes factores como el carácter leñosos del material, la forma de inoculación mediante injerto de chapa o la necesidad de aplicar a las plantas un invierno artificial en cámara fría antes del estudio de los síntomas del virus, hace muy difícil el estudio de la respuesta al virus a corto plazo en estas especies frutales. En este sentido, en el presente trabajo se han ensayado plantas de guisante cv. Alaska que muestra una gran susceptibilidad a la infección por PPV. Estas plantas se inocularon con el aislado PPV14 marcado con la proteína GFP. En estas plantas los síntomas aparecieron 15 días después de la inoculación (dpi) y consistieron en anillos cloróticos y lesiones necróticas en hoja. Después de 3 dpi no se observaron cambios en la peroxidación de lípidos, en la oxidación de proteínas ni en los contenidos de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Por otro lado, se observó un aumento en la actividad POX y un descenso de la actividad APX de Clase I en fracción soluble mientras que en los cloroplastos se observó una reducción de APX de Clase I y POX y un aumento en la actividad G6PDH. Después de 15 dpi la infección por PPV producía un estrés oxidativo, que se manifestó por un incremento en los niveles foliares de peroxidación de lípidos, de los contenidos de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en cloroplastos y una alteración de la fotosíntesis (reducción del parámetro NPQ). El aumento de los contenidos de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en la fracción cloroplastídica estuvo correlacionado con una disminución de las actividades APX de Clase I, GR, GST y SOD. De forma sorprendente, la infección no producía cambios en los contenidos de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en la fracción soluble, que podría ser debido a un aumento de las actividades APX de Clase I, APX de Clase III y del POX (eliminadoras de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Además también se observó una reducción de las actividades catalasa y GST. Los resultados parecen indicar que los síntomas de PPV observados en plantas de guisante 15 dpi pueden ser debidos a un desequilibrio en los sistemas antioxidantes de las plantas y a una mayor generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) similar a lo descrito en la respuesta a largo plazo en especies frutales como albaricoquero o melocotonero.

## OS-56

**EL SILENCIAMIENTO GÉNICO POST-TRANSCRIPCIONAL DEL SUPRESOR DE SILENCIAMIENTO p23 DEL VIRUS DE LA TRISTEZA DE LOS CÍTRICOS (CTV) CONFIERE RESISTENCIA AL VIRUS EN PLANTAS TRANSGÉNICAS DE LIMA MEXICANA**

**FAGOAGA, C.<sup>1</sup>, LÓPEZ, C.<sup>2</sup>, HERMOSO DE MENDOZA, A.<sup>1</sup>, MORENO, P.<sup>1</sup>, NAVARRO, L.<sup>1</sup>, FLORES, R.<sup>2</sup>, PEÑA, L.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA), Apdo. Oficial, 46113 Moncada (Valencia). E-mail: lpenya@ivia.es

<sup>2</sup>Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas (UPV-CSIC), Universidad Politécnica de Valencia, Avenida de los Naranjos, 46022 Valencia.

El virus de la tristeza de los cítricos (CTV) es el causante de la enfermedad viral más importante de este cultivo. Su genoma es una molécula de RNA de cadena sencilla y polaridad positiva de casi 20 kb. Contiguo al extremo 3' UTR se encuentra la ORF que codifica una proteína de 23 KDa que no tiene homólogas en otros Closterovirus. La proteína p23 se une *in vitro* al RNA y está implicada en el control del balance de cadenas de ambas polaridades del RNA viral durante su replicación. Además, p23 actúa como supresor de silenciamiento génico post-transcripcional (PTGS) en *Nicotiana tabacum* y *N. benthamiana*. Previamente, hemos demostrado que líneas transgénicas de lima Mexicana (*Citrus aurantifolia* (Christm.) Swing.) que sobreexpresaban p23 mostraban fenotipos aberrantes semejantes a los que se dan en limas infectadas con CTV. Además, la intensidad de las aberraciones se correlacionaba con la acumulación de la proteína p23 en dichas plantas. Por otra parte, se han obtenido líneas transgénicas p23 independientes que presentan un fenotipo normal. El análisis detallado de las mismas ha mostrado que el transgén p23 presenta características típicas de silenciamiento génico post-transcripcional: alto número de copias, bajos niveles del correspondiente RNA mensajero, metilación y acumulación de RNA pequeños interferentes específicos de p23 (siRNAs). Cuando propagaciones de estas líneas transgénicas silenciadas se han inoculado con CTV, se ha observado tres tipos de respuesta diferente dentro de una misma línea: algunas propagaciones han resultado inmunes, otras presentan una resistencia moderada, y un tercer grupo corresponde a propagaciones susceptibles, que se comportan como las plantas control. Esta respuesta variable entre transformantes clonales indica que otros factores, además del fondo genético, desempeñan un papel clave en la resistencia mediada por silenciamiento génico post-transcripcional frente a CTV en lima Mexicana.

**OS-57****TÉCNICA BASADA EN LA PCR PARA LA DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN DE ESPECIES DE *Phaeoacremonium* EN MADERA DE VID****AROCA, A., RAPOSO, R.***CIFOR-INIA, Ctra. La Coruña Km 7,5, 28040 Madrid.*

Varias especies de *Phaeoacremonium* junto con *Phaeomoniella chlamidospora* son los principales hongos causantes de la enfermedad de Petri en la vid, que afecta a plantas jóvenes de hasta 5 años de edad. Los síntomas externos incluyen crecimiento reducido, decaimiento y clorosis foliar; internamente, se observa un oscurecimiento de los vasos del xilema. Resultados previos sugieren que el modo principal de dispersión de estos hongos es a través del material de propagación infectado, principalmente en los portainjertos. El objetivo de este trabajo es desarrollar un procedimiento basado en la técnica de la PCR que permita primero, detectar cualquier especie de *Phaeoacremonium* presente en madera de vid, y segundo, identificar la especie mediante RFLP-PCR. Se diseñaron cebadores específicos para la amplificación del ADN de 10 especies de *Phaeoacremonium*, basados en la secuencia del fragmento ITS1, 5,8S e ITS2 del ADN ribosómico utilizando los cebadores universales ITS1F/ITS4. Después de realizar un alineamiento múltiple de las secuencias con el programa CLUSTALX, se eligieron 2 cebadores que no compartían homología con otras secuencias conocidas. Las condiciones para la amplificación se optimizaron y se aumentó la sensibilidad de la detección con una PCR anidada ("Nested-PCR"), realizando una primera amplificación con los primers ITS1F/ITS4. De esta forma se detectó hasta 1 fg de ADN del hongo. Se comprobó la funcionalidad de los cebadores sobre los cultivos tipo de las especies de *Phaeoacremonium* y otros aislados españoles, demostrando que no amplificaban ADN de otros hongos o de vid. Los cebadores diseñados fueron utilizados para detectar *Phaeoacremonium* spp. directamente en madera de vid. La identificación de la especie detectada de *Phaeoacremonium* se realizó de acuerdo al patrón de bandas obtenido de la digestión con enzimas de restricción del fragmento de ADN amplificado previamente con los cebadores.

**OS-58****DETECCIÓN MOLECULAR DE *Phaeomoniella chlamydospora* A PARTIR DE MICELIO, MADERA DE VID Y MUESTRAS DE SUELO MEDIANTE UN ÚNICO MÉTODO****GAFORIO, L., GÓMEZ A., TELLO, M.L.**

*Instituto Madrileño de Investigación y Desarrollo Rural Agrario y Alimentario (IMIDRA), Finca "El Encín", Autovía A-2, Km 38,2, 28800 Alcalá de Henares (Madrid). E-mail: marisa.tello@madrid.org*

La enfermedad de Petri en vid provoca el decaimiento y muerte en planta joven. Su diagnóstico supone la detección de los patógenos implicados, especialmente *Phaeomoniella chlamydospora* (Pch), identificado como agente causal. Las distintas vías posibles para la dispersión de Pch hacen necesaria la extracción de su ADN a partir de distintos tipos de muestras: tejidos vegetales, suelo y cultivos fúngicos. En este trabajo se evaluaron diferentes protocolos de detección molecular a partir de distintos tipos de muestras: (i) micelio crecido en dos medios de cultivo: PDA y PDB; (ii) suelo, en suspensión acuosa o triturado con molino y (iii) fragmentos de madera con síntomas de necrosis y asintomáticos. La extracción de ADN se realizó con un kit comercial y con buffer CTAB. La cuantificación del ADN aislado se midió mediante espectrofotometría, utilizándose cantidad y calidad del ADN como parámetros de comparación de ambos métodos de extracción. Se observó que el medio PDB fue más apropiado que el PDA para el cultivo de Pch, no habiéndose obtenido en el segundo caso ninguna amplificación debido a la presencia del agar como inhibidor de la PCR. Con ambos protocolos de extracción se obtuvo una elevada cantidad de ADN de óptima pureza para la PCR, alcanzándose un nivel de detección de 1 pg del ADN molde. Tanto el acondicionamiento de la muestra como el método de extracción influyeron en la eficiencia de la PCR para detectar el patógeno en suelo. Se obtuvo suficiente cantidad de ADN con ambos protocolos de extracción, pero tan sólo en el caso de las muestras pulverizadas en molino, y únicamente se obtuvieron las amplificaciones esperadas a partir del ADN aislado con CTAB. Este método permitió detectar Pch en una concentración de 100 conidias por gramo de suelo seco y fue validado mediante el análisis de diversas muestras de sustratos inoculados, confirmándose mediante reisolamiento en medio de cultivo. Cuando se analizaron las muestras de madera, sólo se obtuvieron resultados positivos en la PCR cuando el ADN fue extraído con CTAB, detectándose Pch no sólo a partir de los tejidos necrosados, sino también a partir de algunas muestras asintomáticas. En conclusión, el buffer CTAB puede utilizarse como un único método para la extracción de ADN a partir de madera de vid, suelo y micelio, de una forma eficiente y precisa, resultando además un procedimiento más económico y sencillo que muchas técnicas convencionales.

**OS-59****CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA Y MOLECULAR DE AISLADOS DE *Cylindrocarpon* DE VID EN ESPAÑA**

**ALANIZ, S., LEÓN, M., VICENT, A., GARCÍA-JIMÉNEZ, J., ABAD-CAMPOS, P., ARMENGOL, J.**

*Instituto Agroforestal Mediterráneo, Universidad Politécnica de Valencia, Camino de Vera s/n, 46022 Valencia. E-mail:alfersa3@doctor.upv.es*

*Cylindrocarpon* spp. se aíslan frecuentemente de plantas jóvenes de vid con síntomas de decaimiento en España y en las principales zonas vitícolas en todo el mundo. Hasta la fecha, en nuestro país, no se han realizado estudios de caracterización de aislados de *Cylindrocarpon* de vid, así como la determinación de las especies que están presentes. En este trabajo, se estudiaron las características fenotípicas y moleculares de una colección de 82 aislados que se obtuvieron a partir de plantas con síntomas de decaimiento, procedentes de las diferentes regiones productoras de vid en España. Estos aislados se hicieron crecer en los medios de cultivo Spezieller nährstoffarmer agar (SNA) y Patata dextrosa agar (PDA). Se observaron características de las colonias tales como textura, color y naturaleza del margen de crecimiento. A su vez, se evaluó la capacidad de esporulación de los aislados, y se midió el tamaño de microconidios, macroconidios y clamidosporas. Para determinar el efecto de la temperatura en el crecimiento, los aislados se incubaron a 5, 10, 15, 20, 25, 30 y 35 °C. Adicionalmente, se amplificó una región parcial del gen de la beta tubulina (BT1) utilizando los primers BT1a/BT1b. En 56 de los aislados se encontró una inserción conservada de 52 pares de bases en la secuencia de la BT1 que ha sido descrita como un marcador específico para la identificación de *C. macrodydimum*. El resto de los aislados (26) fueron identificados como *C. destructans*. Los datos de la caracterización fenotípica se sometieron a un análisis factorial multivariante cuyos resultados mostraron claramente la separación de los aislados en dos grupos, que coincidieron exactamente con las especies identificadas mediante el estudio de la beta tubulina. Los aislados pertenecientes a la especie *C. macrodydimum* se diferenciaron fenotípicamente de los de *C. destructans* por producir menos conidios, presentar macroconidios de dos y tres tabiques más largos y tener un ratio de crecimiento menor a las temperaturas de 5, 10 y 30 °C. Estos resultados suponen la confirmación de la presencia de ambas especies afectando a vid en España, encontrándose presentes en todas las regiones productoras.



**OS-60****CARACTERIZACIÓN DE LAS SUBPOBLACIONES *transposa* Y *vacuma* DE *Botrytis cinerea* EN CATALUÑA****MUÑOZ, Z., MORET, A.**

*Departament de Biologia Vegetal, Facultat de Biologia, Avgda. Diagonal 645, 08028 Barcelona. Fax. (34) 411 28 42. E-mail: zmunoz@ub.edu*

La podredumbre gris de la vid (*Vitis vinifera* L.), enfermedad producida por el hongo *Botrytis cinerea* Pers.:Fr. (teleomorfo *Botryotinia fuckeliana* [de Bary] Whetzel), es una de las principales causas de la infección de la vid de la región del Penedès (Catalunya), donde ocasiona elevadas pérdidas económicas. Un elevado número de estudios muestran la elevada diversidad fenotípica de este hongo, diversidad que puede ser explicada por la presencia de elementos transponibles, causantes de inestabilidad genética. Analizando la estructura poblacional de aislados de *B. cinerea* procedentes de Francia y California se ha descrito recientemente la existencia de dos subpoblaciones: *transposa* y *vacuma* que vienen determinadas por la presencia (tipo *transposa*) o ausencia (tipo *vacuma*) de dos elementos transponibles: *Boty*, una secuencia terminal repetida larga (LTR's) de aproximadamente 6 kb y *Flipper* un elemento móvil de tipo Fot-1 de 1.842 pb. Por otra parte, se han descrito aislados en los que tan solo el elemento *Boty* está presente (tipo *Boty*). Fenotípicamente algunos aislados del tipo *vacuma* se han mostrado resistentes al fenhexamid hecho que determina que el estudio genético de este hongo sea fundamental para desarrollar estrategias de control eficaces. Dada la escasa información existente sobre la estructura poblacional de *B. cinerea* en Cataluña el objetivo del presente trabajo ha sido caracterizar genéticamente la población de dicho hongo para determinar la presencia o ausencia de los transposones *Boty* y *Flipper*.

Entre 2004 y 2005 se recolectaron sobre *V. vinifera* 96 aislados de la región vinícola del Penedès así como 18 aislados procedentes de otras especies vegetales. Se extrajo el ADN de 90 aislados a partir del micelio y se analizó la presencia de los transposones mediante el uso de cebadores específicos. El 74,45% de los aislados analizados presentaron ambos elementos transponibles, *Boty* y *Flipper* (tipo *transposa*) mientras que en un 20% solo se encontró el elemento *Boty* (tipo *Boty*). Cuatro de los aislados no presentaron ninguno de los dos elementos (tipo *vacuma*) y en un solo caso, el aislado BC55, presentó únicamente el elemento *Flipper*.

Hasta el momento no se ha descrito la presencia de este último tipo (*Flipper*) en ninguno de los estudios realizados. Los resultados obtenidos señalan una predominancia de la subpoblación tipo *transposa* sobre el resto de subpoblaciones de *B. cinerea* en Cataluña.

**OS-61****CARACTERIZACIÓN DE *Fusarium circinatum* AFECTANDO A *Pinus* spp. EN ESPAÑA**

**PÉREZ-SIERRA, A.<sup>1</sup>, LANDERAS, E.<sup>2</sup>, LEÓN, M.<sup>1</sup>, BERBEGAL, M.<sup>1</sup>, GARCÍA, P.<sup>2</sup>, GARCÍA-JIMÉNEZ, J.<sup>1</sup>, ARMENGOL, J.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Instituto Agroforestal Mediterráneo, Universidad Politécnica de Valencia, Camino de Vera s/n, 46022 Valencia. Email: [aperesi@eaf.upv.es](mailto:aperesi@eaf.upv.es)

<sup>2</sup>Laboratorio de Sanidad Vegetal, Consejería de Medio Rural y Pesca del Principado de Asturias, c/ Lucas Rodríguez, 4 bajo, 33011 Oviedo.

La presencia del chancro resinoso del pino causado por *Fusarium circinatum*, detectado recientemente en España, supone una grave amenaza para la producción forestal de *Pinus* spp. En este trabajo se ha abordado el estudio de una colección de 150 aislados de semillas, plántulas en viveros y árboles en plantaciones, obtenidos de diferentes hospedantes y orígenes geográficos. El objetivo principal fue determinar las características de la población de este patógeno en nuestro país.

Para la identificación de los aislados se realizó su caracterización morfológica en los medios de cultivo Spezieller Nährstoffarmer agar (SNA) y Patata dextrosa agar (PDA). La identificación molecular se realizó mediante dos técnicas: PCR-RFLP del gen de la histona 3 y mediante la amplificación de la región IGS con los cebadores específicos CIRC1A y CIRC4A. Adicionalmente, se estudió el efecto de la temperatura en el crecimiento de los aislados a 20, 25 y 30 °C en medio de cultivo PDA.

Posteriormente se determinaron molecularmente los grupos de apareamiento presentes en la población. Para ello se utilizaron los cebadores GcHMG1, GcHMG2, MAT1p2 y MAT1p3 que permiten identificar los grupos de apareamiento *MAT-1* y *MAT-2*. Para confirmar la correcta identificación de estos grupos, se seleccionaron 29 aislados representativos, con los que se realizaron pruebas de apareamiento en medio de cultivo Agar zanahoria para comprobar y estudiar la producción del teleomorfo, *Gibberella circinata*.

Asimismo, se llevaron a cabo pruebas de patogenicidad a las especies *Pinus radiata*, *P. pinaster*, *P. nigra*, *P. sylvestris* y *Pseudotsuga menziesii* con aislados representativos de los grupos de apareamiento, diferentes hospedantes y orígenes.

Los resultados obtenidos muestran que *F. circinatum* se aísla de semillas, de plántulas afectadas en viveros y de árboles adultos, comprobándose su patogenicidad a las especies ensayadas. Se ha confirmado la presencia en España de los dos grupos de apareamiento del patógeno. Se discute la distribución geográfica del patógeno y los grupos de apareamiento.

**OS-62****INFLUENCIA DE LA CANTIDAD DE COBRE DEPOSITADO EN HOJAS DE OLIVO SOBRE LA INFECCIÓN POR *Spilocaea oleagina*****ROCA, L.F., MARCHAL, F., CHMITI, A., TRAPERO, A.**

Dpto. de Agronomía, ETSIAM, Universidad de Córdoba, Campus de Rabanales, Edif. Celestino Mutis, 14071 Córdoba. E-mail: trapero@uco.es

La aplicación de fungicidas cúpricos, caracterizados por su eficacia y elevada persistencia, es la medida más extendida de control del Repilo del olivo causado por *Spilocaea oleagina*, siendo de gran importancia la aplicación homogénea en la copa del árbol, especialmente en las hojas interiores y de ramas bajas, donde mayormente se desarrolla la enfermedad. La reducción del volumen de líquido fitosanitario por hectárea es un objetivo deseable por criterios económicos y ecológicos. Los productos cúpricos se aplican en campo a dosis muy superiores a las que inhiben *in vitro* la germinación de los conidios, por lo que es de gran importancia conocer la relación existente entre la cantidad de cobre depositada en las hojas y la inhibición de la infección por el patógeno. En este trabajo, hojas separadas y plantones de olivo se trataron con concentraciones crecientes de dos productos cúpricos. Se midió la cantidad de cobre depositada en las hojas mediante inmersión de las mismas en CIH 0,1N y posterior cuantificación del cobre presente en la solución por espectrofotometría de absorción atómica. Posteriormente, se inocularon con una suspensión conidial preparada mediante inmersión de hojas con lesiones esporuladas en agua destilada, ajustándose la concentración a  $1-1,5 \times 10^5$  conidios/ml. La evaluación de la enfermedad se realizó atendiendo a la incidencia de la enfermedad, calculada como el número de hojas con síntomas de la enfermedad, y a la severidad, calculada según el porcentaje de superficie foliar afectada. Se realizó un ensayo en campo en el que se evaluó la influencia de la dosis del producto aplicado y de la velocidad de la maquinaria de aplicación sobre la cantidad de cobre depositado en las hojas. Las dosis del caldo fueron 2.000 y 4.000 mg Cu/l, aplicadas a una velocidad de 6 Km/h y una dosis de 2.000 aplicada a 3 Km/h. La medición de cobre se realizó por espectrofotometría de absorción atómica, realizando un muestreo zonificado de las hojas, distinguiendo entre altura de la copa (alta y baja), profundidad de la copa (interior y exterior) y orientación (frontal y lateral) respecto a la salida del atomizador. Se observó una elevada correlación entre la dosis aplicada de los productos y la cantidad de cobre depositada en las hojas, así como la existencia de una relación logarítmica entre el contenido de cobre en hoja y la inhibición de la infección. La distribución del cobre en la copa del árbol no resultó homogénea, existiendo menor cantidad de cobre depositado en las hojas interiores, de la parte alta de la copa y en las situadas lateralmente a la salida del atomizador.

**OS-63****APLICACIÓN DE LA PCR A TIEMPO REAL Y EL RECuento DE CÉLULAS CULTIVABLES EN ESTUDIOS DE COLONIZACIÓN Y SUPERVIVENCIA DE *Pseudomonas fluorescens* EPS62e, AGENTE DE CONTROL BIOLÓGICO DEL FUEGO BACTERIANO****PUJOL, M., BADOSA, E., MONTESINOS, E.**

*Instituto de Tecnología Agroalimentaria-CerTA-CIDSAV, Universitat de Girona, Campus Montilivi, 17071 Girona. E-mail: marta.pujol@udg.es*

*Pseudomonas fluorescens* EPS62e es un eficaz agente de control biológico del fuego bacteriano, enfermedad causada por *Erwinia amylovora* que afecta gravemente a especies de la familia de las rosáceas como el peral, manzano y diversas ornamentales. Con el fin de desarrollar un método de trazabilidad específico para EPS62e, la cepa fue caracterizada molecularmente mediante las técnicas de amplificación múltiple arbitraria (RAPD) y PCR inespecífica (U-PCR), obteniéndose productos de amplificación que la diferenciaron de otras cepas de la misma especie. De los fragmentos diferenciales se obtuvieron dos marcadores moleculares SCAR (Sequence Characterized Amplified Region) que permitieron la detección específica de EPS62e mediante PCR convencional frente a 161 cepas de la misma especie, 75 cepas de especies próximas, y 61 muestras vegetales de fincas comerciales. Las dos secuencias SCAR fueron utilizadas para el diseño de una PCR a tiempo real mediante una sonda de hidrólisis tipo TaqMan®, que además de facilitar la amplificación específica de EPS62e permitió su cuantificación.

Con el fin de estudiar la capacidad de colonización epifítica de EPS62e, la cepa se inoculó en flores y hojas de peral y manzano en condiciones de ambiente controlado y campo; y se determinaron sus niveles poblacionales mediante PCR a tiempo real y recuento de células cultivables. Los resultados mostraron que EPS62e coloniza eficientemente la superficie de flores, alcanzando niveles poblacionales de  $10^7$ - $10^8$  ufc/corimbo. La cepa EPS62e fue capaz de dominar la microbiota de flores, representando el 100% de la población, y mostró tener una capacidad de dispersión moderada, siendo detectada en flores no tratadas situadas a más de 10 m de distancia. Sin embargo, en hojas la población disminuyó progresivamente hasta no ser detectada. En los ensayos de colonización de flores, no se observaron diferencias significativas entre ambas técnicas. No obstante, en los ensayos realizados en hojas, los resultados difirieron significativamente, obteniéndose niveles poblacionales de hasta 4 log superiores mediante PCR a tiempo real que por recuento de células cultivables, indicando una posible entrada en el estado de viable no cultivable o la presencia de DNA no degradado de células muertas. Estos resultados confirmaron la necesidad de utilizar conjuntamente más de un método de trazabilidad para evaluar el estado fisiológico de la cepa EPS62e y de otros agentes de biocontrol después de su aplicación en campo.

## OS-64

**EXOPOLISACÁRIDOS DE *Erwinia amylovora*: PAPEL EN LA SUPERVIVENCIA EN PRESENCIA DE COBRE****ORDAX, M.<sup>1</sup>, MARCO-NOALES, E.<sup>1</sup>, GEIDER, K.E.<sup>2</sup>, LÓPEZ, M.M.<sup>1</sup>, BIOSCA, E.G.<sup>3</sup>**<sup>1</sup>Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA), Apdo. Oficial, 46113 Moncada (Valencia).<sup>2</sup>Max-Planck-Institut für Zellbiologie, BBA Institut für Pflanzenschutz im Obstbau, Schwabenheimer Strasse 101, 69221, Dossenheim, Germany.<sup>3</sup>Dpto. Microbiología y Ecología, Universidad de Valencia, 46100 Burjassot (Valencia). E-mail: ordax@ivia.es

Los tratamientos cúpricos se utilizan para el control de las bacteriosis en agricultura. Sin embargo, algunas bacterias fitopatógenas, como *Erwinia amylovora*, adoptan el estado “viable no cultivable” (VNC) en presencia de cobre, perdiendo su cultivabilidad en medio sólido pero manteniendo su viabilidad. Otra estrategia frente a condiciones adversas es un incremento en la síntesis de exopolisacáridos (EPS) capsulares. Se ha descrito que el cobre produce un incremento del amilovorano, EPS mayoritario de *E. amylovora*, pero se desconoce su papel y el del levano (otro de sus EPS) en la supervivencia frente a este metal y en la inducción del estado VNC. Por ello, se ha estudiado la supervivencia de mutantes de *E. amylovora* deficientes en la producción de amilovorano y/o levano en medio mineral con o sin cobre, realizándose recuentos periódicos a lo largo de 6 meses, empleando cepas salvajes como control. En presencia de cobre, el mutante que más rápidamente entró en el estado VNC (12 días) fue el afectado en la síntesis de levano, seguido del mutante en amilovorano (36 días), mientras que las cepas salvajes entraron más tarde (49 días). Con respecto a la síntesis de EPS, la de amilovorano se incrementó durante los primeros 14 días en las cepas salvajes, pero no en los mutantes, disminuyendo después por debajo de los niveles iniciales. La de levano también aumentó en las cepas salvajes, pero sólo cuando empezó a disminuir la síntesis de amilovorano y se mantuvo muy por encima de los niveles iniciales. La dinámica de síntesis de cada EPS fue la misma con y sin cobre, aunque con valores más altos en presencia del metal. Además, se evidenció la capacidad de ambos EPS, en mayor medida el amilovorano, para acomplejar los iones  $\text{Cu}^{2+}$  durante los 6 meses de estudio. Los resultados demuestran que los dos EPS mayoritarios de *E. amylovora* tienen una función protectora frente al efecto del cobre, y que su carencia o disminución acelera la entrada en el estado VNC. Cabe destacar, por primera vez, el notable papel del levano en la supervivencia del patógeno en presencia de cobre, desconocido hasta el momento.

**OS-65****EVALUACIÓN DE LA SEPARACIÓN INMUNOMAGNÉTICA EN LA DETECCIÓN DE *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* EN SEMILLAS DE TOMATE****DE LEÓN, L.<sup>1</sup>, SIVERIO, F.<sup>2</sup>, RODRÍGUEZ, A.<sup>1,3</sup>**

<sup>1</sup>Dpto. Protección Vegetal, Instituto Canario de Investigaciones Agrarias (ICIA), Apdo. 60, 38200 La Laguna (Tenerife).

<sup>2</sup>Sección de laboratorio de Sanidad Vegetal de la Consejería de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentación del Gobierno de Canarias.

<sup>3</sup>Dpto. Microbiología y Biología Celular, Facultad de Farmacia, Universidad de La Laguna, 38207 La Laguna (Tenerife).

El chancro bacteriano del tomate causado por *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* es una de las bacteriosis más graves de este cultivo. La dispersión del patógeno se realiza fundamentalmente por semilla por lo que el análisis de este material vegetal es una de las principales estrategias de control de la enfermedad. El aislamiento de la bacteria, indispensable para confirmar el diagnóstico, es difícil cuando ésta se encuentra a bajas concentraciones y/o si otros microorganismos de crecimiento más rápido están presentes en la muestra. La separación inmunomagnética (IMS) es una técnica poco utilizada en la detección de fitopatógenos y no se había evaluado en el diagnóstico de *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*. En la IMS, microesferas magnéticas (IMBs) tapizadas con anticuerpos específicos capturan de forma selectiva las células diana, que posteriormente pueden ser sembradas en medio sólido no selectivo. En este trabajo, esta técnica fue optimizada para el aislamiento de *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* en suspensiones de la bacteria, extractos de semilla inoculados con el patógeno y extractos de semillas infectadas de forma natural. Se evaluaron dos antisueros comerciales así como diferentes concentraciones de IMBs y antisuero. Una concentración de  $10^6$  IMBs/ml recubiertas con una dilución del antisuero de 1/3.200 permitió recuperar más del 50% de células del patógeno en todas las muestras contaminadas que se analizaron. El rendimiento de esta técnica fue superior al obtenido mediante siembra en medio semiselectivo en todos los casos, ya que el tiempo de incubación se redujo considerablemente y la sensibilidad de la detección fue inferior a 10 UFC/ml.

**OS-66****PAPEL DE LA MOTILIDAD EN LA PATOGÉNESIS DE *Erwinia chrysanthemi***

**ANTÚNEZ-LAMAS, M., CABRERA-ORDOÑEZ, E., LÓPEZ-SOLANILLA, E., RODRÍGUEZ-PALENZUELA, P.**

*Centro de Biotecnología y Genómica de Plantas, Dpto. Biotecnología, Universidad Politécnica de Madrid, E.T.S.I Agrónomos, Ciudad Universitaria, 28040 Madrid. E-mail: pablo.rpalenzuela@upm.es*

*Erwinia chrysanthemi* es agente causal de la podredumbre blanda de los vegetales, una enfermedad que causa importantes pérdidas económicas en todo el mundo. Los principales factores de virulencia que se han identificado hasta la fecha en esta bacteria incluyen enzimas hidrolíticas, sideróforos y sistemas de detoxificación. El objetivo fundamental de este trabajo ha sido evaluar la importancia de los fenómenos de motilidad y quimiotaxis en el proceso de patogénesis de esta bacteria.

Previamente, se comprobó la capacidad de *E. chrysanthemi* 3937 para realizar “swimming” y “swarming” en placas de agar al 0,7% y 0,3% respectivamente. Posteriormente se identificaron por métodos bioinformáticos diversos genes posiblemente relacionados con el sistema de quimiotaxis (*cheW*, *cheB*, *cheY* and *cheZ*) así como un gen esencial del motor flagelar (*motA*). Los genes correspondientes se amplificaron mediante PCR, se clonaron y se generaron los mutantes mediante “marker-exchange”. Se comprobó que los mutantes tenían un crecimiento normal tanto en medio rico como en medio mínimo, y presentaban una motilidad reducida en placa. Asimismo, se analizó el comportamiento de la bacteria en medio líquido mediante microscopía óptica, comprobándose que las alteraciones de la motilidad de los mutantes (carreras y tumbos) eran congruentes con las observaciones publicadas en otras especies de bacterias.

Se realizaron ensayos de virulencia en diferentes huéspedes. En endivia y violeta africana los mutantes *cheW*, *cheB*, *cheY* *cheZ* y *motA* mostraron una drástica reducción de la virulencia. Sin embargo, en tubérculo de patata sólo el mutante *cheY* mostró una disminución significativa respecto al tipo silvestre. Estos resultados ponen de manifiesto que los fenómenos de motilidad / quimiotaxis juegan un papel esencial en la virulencia de esta bacteria.

En la actualidad se está procediendo a una investigación detallada del fenómeno y en particular, a la identificación de las moléculas que pueden actuar como quimio-atrayentes o quimio-repelentes en la patogénesis.

## OS-67

**AGRESIVIDAD EN *Erwinia amylovora*: ANÁLISIS MEDIANTE RELACIONES DOSIS-TIEMPO-ENFERMEDAD****CABREFIGA, J., MONTESINOS, E.***Instituto de Tecnología Agroalimentaria-CIDSAV-CeRTA, Universidad de Girona, Campus Montilivi, 17071 Girona.*

En este trabajo se analizó la agresividad de una extensa colección de cepas de *E. amylovora* utilizando ensayos en frutos inmaduros y flores en condiciones de ambiente controlado. El análisis fue llevado a cabo mediante una aproximación cuantitativa basada en el ajuste de los datos experimentales a modelos matemáticos que relacionan la incidencia de infecciones con la dosis de patógeno y el tiempo. El modelo de saturación hiperbólica fue el utilizado para las relaciones dosis-efecto y proporcionó información sobre la dosis efectiva mediana ( $ED_{50}$ ) de cada cepa. Los valores  $ED_{50}$  observados se situaron entre  $10^3$  y  $10^6$  CFU/ml (10 a  $10^4$  CFU por punto de inoculación). El modelo Gompertz modificado fue utilizado para el análisis de las relaciones enfermedad-tiempo y proporcionó información sobre la tasa de progresión de la infección ( $r_g$ ) y el tiempo de retardo en el inicio de la curva de progresión de la infección ( $t_0$ ). Los valores de  $r_g$  se situaron entre 0 y 1,90, y los de  $t_0$  variaron entre 1,3 a más de 10 días. Las cepas más agresivas mostraron valores elevados de  $r_g$  y bajos de  $ED_{50}$  y de  $t_0$ , mientras que las cepas con baja agresividad presentaron valores bajos de  $r_g$  y elevados de  $ED_{50}$  y de  $t_0$ . La agresividad dependió del tipo de material vegetal y de la variedad de peral y fue significativamente diferente entre cepas de *E. amylovora*. Además de los parámetros obtenidos a partir de los dos modelos se calculó un índice combinado de agresividad que fue computado para cada cepa como la suma de los niveles de agresividad para cada parámetro de ambos modelos ( $ED_{50}$ ,  $r_g$ ,  $t_0$ ). Los niveles de cada parámetro variaban de 1 a 4, siendo 1 el valor más bajo de agresividad y 4 el valor más alto. Finalmente, se obtuvo un escala de 4 niveles con el índice de agresividad combinado ( $CI$ ): 1, no virulenta o muy poca agresiva ( $CI \leq 3$ ); 2, poco agresiva ( $3 < CI \leq 6$ ); 3, medianamente agresiva ( $6 < CI \leq 9$ ); y 4, muy agresiva ( $9 < CI \leq 12$ ). A partir de los resultados obtenidos se propone realizar curvas dosis-efecto y cinéticas de progresión de la infección para calcular el índice de agresividad combinado como herramienta objetiva y cuantitativa para la evaluar la agresividad de las cepas. Se discuten las implicaciones de  $r_g$ ,  $ED_{50}$ , y  $t_0$  en la epidemiología y manejo del fuego bacteriano, particularmente el rango de agresividad entre cepas, grado de especificidad por el huésped en los aislados de peral, el alto potencial infectivo de este patógeno, la acción independiente de las células del patógeno durante el proceso de infección y las posibles ventajas de incluir los parámetros de agresividad del patógeno en los sistemas de predicción de riesgo del fuego bacteriano.



## OS-68

**GENÓMICA COMPARATIVA DE PLÁSMIDOS DE *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*****PÉREZ-MARTÍNEZ, I.<sup>1</sup>, ZHAO, Y.<sup>2</sup>, MURILLO, J.<sup>3</sup>, SUNDIN, G.W.<sup>2</sup>, RAMOS, C.<sup>1</sup>**<sup>1</sup>Área de Genética, Universidad de Málaga, 29071 Málaga. E-mail: crr@uma.es<sup>2</sup>Department of Plant Pathology, 103 CIPS, Michigan State University, East Lansing MI 48824 (EEUU). E-mail: sundin@msu.edu<sup>3</sup>Departamento de Producción Agraria, Universidad Pública de Navarra, 31006 Pamplona. E-mail: jesus@unavarra.es

La mayoría de las cepas pertenecientes a los patovares de *Pseudomonas syringae* y patógenos relacionados, entre los que se encuentra *P. savastanoi* pv. *savastanoi* (Pss, agente causal de la tuberculosis del olivo), contienen entre 2 y 7 plásmidos nativos de tamaño variable (1 a >100 kb). Un gran número de estos plásmidos pertenecen a la llamada familia del plásmido pPT23A (PFP), cuyos miembros contienen el gen de replicación *repA*. En la actualidad, se dispone de la secuencia completa de varios de estos plásmidos procedentes de cepas de *P. syringae* y, para algunos de ellos, se ha demostrado su implicación en virulencia y/o supervivencia epifítica. Aunque se ha comprobado que algunos de los plásmidos de Pss contienen genes implicados en la biosíntesis de fitohormonas (ácido indol-3-acético y citoquininas), hasta la fecha no se dispone de la secuencia completa de ninguno de ellos. Dos plásmidos de Pss de aproximadamente 73 (pPss48A) y 46 Kb (pPss416B) se aislaron de las cepas NCPPB-3335 (Francia) y CFBP-1670 (Serbia), respectivamente. El análisis de la secuencia de estos plásmidos reveló que ambos contienen genes implicados en conjugación aunque pertenecientes a sistemas diferentes. Mientras que pPss48A codifica genes pertenecientes al sistema de secreción tipo IVB (sistema conjugativo *tra*) y el gen *virB9*, pPss416B porta el sistema de tipo IVA (sistema *VirB-VirD4*). Además, se han encontrado secuencias homólogas a otros genes relacionados con la replicación y la estabilidad de plásmidos. Por otro lado, pPss48A contiene varias copias de las secuencias de inserción IS801 e ISPsy y varios determinantes putativos de virulencia, p. ej. aquellos implicados en la biosíntesis de citoquininas, las secuencias codificantes de la enzima shikimate kinasa, del efector del sistema de secreción tipo III HopAF1 y de varias proteínas de función desconocida también codificadas en otros miembros de la PFP. Basados en estos resultados y en las secuencias codificadas en otros PFPs [Zhao et al. 2005, J. Bacteriol. 187,6: 2113-26] se ha construido un macroarray compuesto por fragmentos de ADN pertenecientes 135 ORFs. Actualmente estamos utilizando este macroarray para llevar a cabo un análisis genómico comparativo de una colección de 30 plásmidos de Pss aislados de 10 cepas procedentes de diferentes localizaciones geográficas. Tres de estas cepas proceden de cultivares españoles.

**H-1****INCREMENTO DE LA TOLERANCIA A *Verticillium dahliae* DE OLIVOS CV. CORNICABRA MEDIANTE SU INJERTO EN PATRONES TOLERANTES**

**PORRAS-SORIANO, A., MARCILLA-GOLDARACENA, I., LAÍN-DUQUE R., PORRAS-SORIANO, R., LEÓN-EGIDO M., PORRAS-PIEDRA A., SORIANO-MARTÍN, M.L.**

*Universidad de Castilla-La Mancha, c/ Ronda de Calatrava, 7, 13071 Ciudad Real. E-mail: luisa.soriano@uclm.es*

La verticilosis es una enfermedad fúngica del sistema vascular de las plantas, ampliamente extendida en todo el mundo, que ha aparecido recientemente en los olivos cultivados en Castilla-La Mancha (España). Los métodos tradicionales de control son poco eficaces, por lo que el desarrollo de nuevas técnicas que reduzcan la susceptibilidad de los olivos a esta enfermedad, resultan altamente interesantes.

En trabajos anteriores realizados por los autores, se comprobó que los plantones obtenidos del injerto de púas de olivos Cornicabra sobre patrones de cultivares tolerantes a *Verticillium dahliae*, presentan una mayor tolerancia a dicho hongo que la que tiene dicha variedad enraizada a pie franco. En dichos ensayos, las plantas se obtuvieron mediante el injerto y enraizamiento simultáneos de las estaquillas semileñosas de olivo bajo nebulización, la cual es una técnica difícil de aplicar.

Para facilitar la obtención de plantones de olivo formados por púas de 'Cornicabra' injertadas sobre patrones tolerantes a dicho patógeno, y para comprobar que las características obtenidas con el injerto y enraizamiento simultáneos se seguían manteniendo, se han injertado púas de Cornicabra sobre plantas tolerantes a *V. dahliae* propagadas por los métodos más utilizados de propagación de plantas de olivo en España y en Italia, el enraizamiento de estaquillas semileñosas bajo nebulización y la germinación de semillas.

Las variedades utilizadas como patrón fueron Empeltre, Frantoio y Lechín, sobre las cuales, a los siete meses y medio se injertaron las púas de Cornicabra. Las plantas obtenidas fueron artificialmente inoculadas por inmersión de sus raíces heridas en una suspensión de  $10^6$  conidias/ml de *V. dahliae* patotipo defoliante. A los seis meses de la inoculación se cuantificaron las plantas que mostraban síntomas de Verticilosis.

Los resultados han demostrado que cuando el cv. Cornicabra se injerta sobre las tres variedades tolerantes a *V. dahliae* seleccionadas, previamente enraizadas, tanto por germinación de semillas, como a partir de estaquillas semileñosas propagadas bajo nebulización, las plantas obtenidas presentan un notable incremento de su tolerancia a *V. dahliae*, con respecto a las plantas del cv. Cornicabra propagadas a pie franco, siendo las obtenidas del injerto de las púas de cv. Cornicabra sobre patrones de cv. Frantoio, las que ofrecen mayor tolerancia a *V. dahliae*.

**H-2****EFICACIA DE LA DESINFECCIÓN DEL SUELO DE INVERNADEROS DE PIMIENTO MEDIANTE BIOSOLARIZACIÓN**

**GUERRERO, M.M.<sup>1</sup>, MARTÍNEZ, M.A.<sup>1</sup>, ROS, C.<sup>1</sup>, FERNÁNDEZ, P.<sup>2</sup>, MARTÍNEZ, M.C.<sup>1</sup>, BELLO, A.<sup>3</sup>, LACASA, A.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Biotechnología y Protección de Cultivos, IMIDA, c/ Mayor s/n, 30150 La Alberca (Murcia).

<sup>2</sup>CIFEA, Consejería de Agricultura y Agua, Avda. Gutiérrez Mellado, 17, 30500 Molina de Segura (Murcia).

<sup>3</sup>Agroecología, Centro de Ciencias Medioambientales, CSIC, c/Serrano 115 dpdo, 20006 Madrid.

La biofumigación con solarización (biosolarización) se considera un método de desinfección de suelos y una alternativa al bromuro de metilo para algunos cultivos y países. La eficacia en el control de los patógenos presenta variaciones con la enmienda utilizada, con el patógeno, con la fecha de aplicación y con las características del suelo. Con el fin de conocer la estabilidad de la eficacia en los invernaderos de pimiento de la Región de Murcia, donde los patógenos (*Phytophthora* y *Meloidogyne*) y la fatiga del suelo son el motivo de la desinfección anual, se planteó un ensayo de bloques al azar con tres repeticiones y 7 años de duración en un invernadero experimental contaminado de *Meloidogyne incognita*. En las parcelas elementales se reiteró la biosolarización hasta 7 años consecutivos, evaluando la eficacia en relación a suelo desinfectado con bromuro de metilo o a un testigo no desinfectado, midiendo para ello: la incidencia del nematodo, la altura de las plantas y las producciones comercial y total. En el tercer año de reiteración el control del nematodo fue (73,3% de plantas infestadas y 2,3 de índice de nodulación) inferior al del bromuro de metilo (6,6% y 2,2), siendo este último similar al obtenido cuando se reiteró 5 años (13,3% y 0,7), 6 años (20,0% y 0,7) y 7 años (6,7% y 0,1). En el bromuro de metilo las plantas fueron más bajas que en los tratamientos de biosolarización, y todas más altas que las del testigo. No se encontraron diferencias entre años de reiteración de la biosolarización en la producción comercial (8,7 kg/m<sup>2</sup> en el 3<sup>er</sup> año; 9,2 kg/m<sup>2</sup> en el 5º año; 8,4 kg/m<sup>2</sup> en el 6º año y 8,4 kg/m<sup>2</sup> en el 7º año) que resultó más elevada que la del bromuro (5,9 kg/m<sup>2</sup>) y del testigo (6,3 kg/m<sup>2</sup>). En definitiva la reiteración de la biosolarización muestra estabilidad en la eficacia desinfectante cuando se reitera su aplicación.

**H-3****CARACTERIZACIÓN DE LA MICROBIOTA PRESENTE EN SUELOS MODIFICADOS POR ENMIENDAS ORGÁNICAS EN EL CULTIVO DEL AGUACATE****BONILLA, N.<sup>1</sup>, CAZORLA, F.M.<sup>1</sup>, PÉREZ-GARCÍA, A.<sup>1</sup>, TORÉS, J.A.<sup>2</sup>, DE VICENTE, A.<sup>1</sup>**<sup>1</sup>*Departamento de Microbiología, Facultad de Ciencias, Campus de Teatinos s/n, 29071 Málaga.*<sup>2</sup>*Estación Experimental "La Mayora", CSIC, Algarrobo-Costa, 29750 Málaga. E-mail: fitomicro@uma.es*

Las podredumbres radicales causadas por hongos de suelo constituyen uno de los mayores problemas fitosanitarios del cultivo del aguacate a nivel mundial. En Andalucía están causadas principalmente por el hongo *Rosellinia necatrix* y por el oomicete *Phytophthora cinnamomi*. El control de estas podredumbres es complejo y se están ensayando diferentes estrategias de control físico, químico y biológico. Una de las estrategias cuyo interés se ha planteado recientemente es la supresión de estos patógenos mediante la aplicación de enmiendas orgánicas, que han sido aplicadas previamente en otros cultivos para el control de hongos fitopatógenos. Estas enmiendas parecen prevenir la enfermedad mediante su influencia en el equilibrio entre las poblaciones microbianas del suelo y mediante la estimulación de distintas actividades con efecto antifúngico. En este sentido, se está desarrollando un estudio sobre la aplicación de distintos tipos de enmiendas orgánicas en suelos de cultivo de aguacate y de cómo éstas afectan a la composición y actividad de la microbiota bacteriana y fúngica del suelo, con el objetivo de conocer los posibles modos de acción de su potencial capacidad supresora. Se llevarán a cabo distintos abordajes experimentales que incluyen el estudio de la diversidad de microorganismos cultivables mediante técnicas de aislamiento en placa, usando distintos tipos de medios selectivos. También se emplearán técnicas independientes de cultivo basadas en la extracción de ADN del suelo y su análisis por PCR-DGGE, con la que se separarán los amplicones de ADNr correspondientes a los microorganismos presentes en cada tipo de suelo y que permiten conocer la complejidad microbiana de cada uno de los sustratos estudiados.

**H-4** **AISLAMIENTO Y SELECCIÓN DE RIZOBACTERIAS PROMOTORAS DE CRECIMIENTO E INDUCTORAS DE RESISTENCIA SISTÉMICA EN MELÓN****GARCÍA-GUTIÉRREZ, L., ROMERO, D., CODINA, J.C., DE VICENTE, A., PÉREZ-GARCÍA, A.***Grupo de Microbiología y Patología Vegetal, Departamento de Microbiología, Universidad de Málaga, 29071 Málaga. E-mail: aperez@uma.es*

Las cucurbitáceas son cultivos de gran importancia en toda España, siendo el más extendido el de melón, con una producción anual de más de un millón de toneladas. El oídio de las cucurbitáceas (*Podosphaera fusca*) es uno de los principales factores limitantes de estos cultivos, no sólo en España sino también en el resto del mundo. Las dos principales estrategias de control de la enfermedad, el empleo de cultivares resistentes y el uso intensivo de fungicidas, presentan limitaciones. En este escenario, el control biológico ha surgido como una estrategia interesante que puede paliar alguna de estas deficiencias y contribuir a mejorar el control que actualmente se realiza de la enfermedad. Las rizobacterias promotoras del crecimiento (PGPR) son aquellas que inducen el crecimiento de las plantas mejorando su nutrición y su balance hormonal, pero que también pueden prevenir el efecto de microorganismos patógenos, bien inhibiendo su crecimiento mediante la producción de antibióticos, o induciendo resistencia sistémica en la planta (ISR). El objetivo de este estudio es el aislamiento y selección de rizobacterias promotoras de crecimiento e inductoras de resistencia sistémica en melón para su empleo como agentes de control biológico contra el oídio, principalmente en cultivos a campo abierto. Actualmente estamos analizando una colección de cepas de *Pseudomonas* spp. y *Bacillus* spp. de diferentes orígenes por ser los principales grupos taxonómicos donde las actividades PGPR e ISR está bien caracterizada. La actividad PGPR se está analizando mediante ensayos sobre semillas y plántulas. Además, estamos analizando su capacidad de colonización y supervivencia en raíces mediante ensayos de formación de biopelículas y el empleo de mutantes espontáneos resistentes a rifampicina, respectivamente. A partir de la colección inicial de cepas, se han seleccionado cuatro, dos *Pseudomonas* spp. y dos *Bacillus* spp., que presentan una marcada actividad PGPR y una gran capacidad para formar biopelículas, que están siendo actualmente evaluadas por su actividad ISR mediante ensayos de inducción de resistencia sistémica en melón.

**H-5****IDENTIFICACIÓN DE GENES IMPLICADOS EN LA PRODUCCIÓN DE 2-HEXYL 5-PROPYL RESORCINOL EN *Pseudomonas fluorescens* PCL 1606 Y SU RELACIÓN CON LA ACTIVIDAD DE BIOCONTROL****MARTÍN-PÉREZ, R., PÉREZ-GARCÍA, A., DE VICENTE, A., CAZORLA, F.M.**<sup>1</sup>*Departamento de Microbiología, Facultad de Ciencias, Campus de Teatinos s/n, 29071 Málaga. E-mail: fitomicro@uma.es*

La rizobacteria *Pseudomonas fluorescens* PCL 1606 ha sido aislada en estudios previos por su elevada actividad de biocontrol frente a distintos hongos patógenos de suelo, especialmente frente a *Rosellinia necatrix* en aguacate. La actividad protectora de esta cepa parece estar directamente relacionada con la producción del antibiótico 2-Hexyl,5-Propyl resorcinol (HPR). En este trabajo se avanzará en el estudio de los genes implicados en la producción del HPR y su regulación. Para ello, se ha llevado a cabo la construcción de mutantes defectivos en la actividad antagonista mediante dos estrategias simultáneas: i) Mutagénesis al azar sobre el genoma de *P.fluorescens* PCL 1606 empleando el plásmido pRL1063a que contiene un transposón Tn5; ii) Mutagénesis dirigida sobre genes en el operon *dar*, previamente descrito como uno de los responsables en la producción de HPR, y presente en *P.fluorescens* PCL 1606. Los resultados de la mutagénesis al azar indican la implicación de genes que codifican para putativas metil-transferasas, aril sulfatasas, o genes reguladores con alta identidad con GacA y GacS. Por otro lado, la mutagénesis dirigida sobre genes del operon *dar*, han puesto de manifiesto el papel de algunos genes del mismo en la biosíntesis del HPR y su regulación en *P.fluorescens* PCL 1606. Además se va a estudiar la organización de dichos genes, mediante el rastreo de una genoteca de ADN genómico de *P. fluorescens* PCL 1606 en fagos, para posteriormente llevar a cabo experimentos de complementación de la actividad antagonista y de evaluación de la capacidad de biocontrol. Para ello, a todos estos mutantes, así como a los complementantes que se obtengan, se les evaluará la actividad de biocontrol empleando los sistemas experimentales aguacate/*Rosellinia* y tomate/*Fusarium*.

## H-6

**CONTROL BIOLÓGICO DE OÍDIO DE CUCURBITÁCEAS MEDIANTE EL USO DE CEPAS DE *Bacillus subtilis***

**ROMERO, D., ZERIOUH, H., CAZORLA, F.M., TORÉS, J.A., DE VICENTE, A., PÉREZ-GARCÍA, A.**

*Grupo de Microbiología y Patología Vegetal-Unidad Asociada a CSIC, Departamento de Microbiología, Universidad de Málaga, 29071 Málaga. E-mail: diego.romero@uma.es*

El oídio es la enfermedad de origen fúngico más común en cultivos de cucurbitáceas al aire libre e invernadero en todo el mundo. En el sur de España, *Podosphaera fusca* ha sido descrito como el único agente causal de la enfermedad. El desarrollo de resistencias por parte del oídio a muchos de los fungicidas comerciales y la creciente demanda de estrategias de control menos agresivas con el medio ambiente han situado al control biológico como una atractiva estrategia alternativa o complementaria al control químico. Considerando la naturaleza ectoparasítica del oídio, nos planteamos como objetivo aislar cepas bacterianas con capacidad de producir sustancias antifúngicas para ser usadas como agentes de biocontrol frente al oídio de las cucurbitáceas. De entre una amplia colección de bacterias, cuatro cepas, identificadas como *Bacillus subtilis*, fueron seleccionadas por su fuerte acción antifúngica y amplio espectro de acción frente a diferentes hongos fitopatógenos. Ensayos de biocontrol frente a *P. fusca* sobre hojas cortadas de melón mantenidas *in vitro*, así como sobre plántulas mantenidas en cámaras de cultivo, demostraron que estas cepas eran capaces de reducir la enfermedad hasta en un 80%, además de mostrar una buena capacidad de colonización y persistencia. Esta capacidad antagonista fue posteriormente contrastada en ensayos de invernadero, donde los síntomas de la enfermedad fueron reducidos en torno al 70-80%, así como la capacidad de dispersión del oídio, indicada por la fuerte inhibición de los niveles de esporulación. Paralelamente se determinó que la capacidad inhibitoria de estas cepas estaba presente en los filtrados libres de células, los cuales causaban serios daños ultraestructurales a las conidias de *P. fusca*, conduciendo a una notable pérdida de la viabilidad. El empleo de diferentes técnicas analíticas mostraron que las cuatro cepas producían los lipopéptidos surfactina, fengicina e iturina/bacilomicina, siendo fengicina y bacilomicina los que mostraron una mayor capacidad inhibitoria de *P. fusca*. Mutantes deficientes en la producción de cada lipopéptido corroboraron la mayor implicación de bacilomicina y fengicina en esta actividad antagonista. Nuestros resultados sostienen que *P. fusca* puede ser eficazmente controlado por estas cepas de *Bacillus* y abre la posibilidad de incluirlas en estrategias de control integrado de la enfermedad, y confirman la hipótesis de la antibiosis como principal mecanismo de acción implicado en la capacidad antagonista de estas cepas frente a *P. fusca*.

**H-7****ENSAYO *IN VITRO* DE FUNGICIDAS FRENTE A *Exserohilum turcicum* EN ASTURIAS****GONZÁLEZ, A.J., GONZÁLEZ-VARELA, G.**

Laboratorio de Fitopatología, Servicio Regional de Investigación y Desarrollo Agroalimentario (SERIDA), Carretera de Oviedo s/n, 33300 Villaviciosa (Asturias). E-mail: [anagf@serida.org](mailto:anagf@serida.org)

En los últimos años se ha venido observando un aumento en la incidencia de la enfermedad conocida como niebla del maíz producida por el hongo *Exserohilum turcicum* en los cultivos de maíz de Asturias.

Para conocer la sensibilidad a fungicidas y así poder evaluar la utilidad de la terapia química para el control de esta enfermedad se realizó un ensayo *in vitro* con siete productos fitosanitarios para lo cual se seleccionaron tres aislamientos del hongo cedidos por el Laboratorio de Sanidad Vegetal del Principado de Asturias. Los productos ensayados fueron: clortalonil 75%, azoxystrobin 25%, carbendazima 50%, epoxiconazol 12,5% y la mezclas de flusilazol 0,5% y carbendazima 1%, flutriafol 9,4% y carbendazima 20% y ciproconazol 16% y carbendazima 30%.

El medio de cultivo empleado fue el agar de patata glucosado al que se añadieron los productos en las cantidades adecuadas. Las dosis ensayadas siguieron una progresión geométrica de 1 a 1.024 µg/ml referidas, en el caso de las mezclas, siempre a la materia activa de referencia, es decir, ciproconazol, fluxilazol y flutriafol. Se incluyó en el ensayo un testigo sin producto y los ensayos se realizaron, al menos, por duplicado.

Como inóculo se utilizaron trozos de medio de igual tamaño conteniendo el hongo en estudio. Las placas se incubaron 10 días a temperatura ambiente, en bancada de laboratorio y el crecimiento se estimó por la media de dos diámetros perpendiculares de la colonia medidos con un pie de rey. Se evaluó únicamente el efecto de los productos respecto al desarrollo del micelio. La disminución del diámetro de la colonia respecto al testigo se utilizó como indicador de inhibición total o parcial del crecimiento.

A la vista de los resultados, podemos destacar que no se encontraron variaciones importantes de sensibilidad en las tres cepas ensayadas.

El producto fitosanitario que mostró mayor eficacia en el control del crecimiento del hongo *in vitro* fue la mezcla de fluxilazol y carbendazima, seguido del epoxiconazol y de las mezclas de flutriafol y ciproconazol ambos con carbendazima. Como podemos ver tres de los cuatro productos que se han mostrado eficaces son mezclas de diferentes materias activas con carbendazima, sin embargo, este fungicida por sí solo no fue capaz de inhibir el crecimiento del hongo ni siquiera a la concentración más alta ensayada (1.024 µg/ml). Estos resultados han permitido seleccionar los tratamientos más eficaces *in vitro* para realizar posteriormente ensayos de campo.



## H-8

**EVALUACIÓN DE LA SOLARIZACIÓN, AGENTES DE BIOCONTROL Y BIOFUMIGACIÓN CON BRASICAS PARA EL CONTROL DE *Pyrenochaeta lycopersici* EN TOMATE****DÍAZ-HERNÁNDEZ, S.<sup>1</sup>, GALLO-LLOBET, L.<sup>1</sup>, RODRÍGUEZ-PÉREZ, A.<sup>1,2</sup>**<sup>1</sup>Dpto. Protección Vegetal, Instituto Canario de Investigaciones Agrarias (I.C.I.A.), Apdo. 60, 38200 La Laguna (Tenerife).<sup>2</sup>Dpto. Microbiología y Biología Celular, Facultad de Farmacia, Universidad de La Laguna, 38207 La Laguna (Tenerife).

En anteriores ensayos se comprobó la efectividad de la solarización y de la solarización+biofumigación con estiércol para controlar el síndrome de las raíces corchosas (*Pyrenochaeta lycopersici*) del tomate. En el presente ensayo se evaluaron los siguientes tratamientos: 1) control biológico con *Trichoderma harzianum* T-22; 2) solarización combinada con la aplicación posterior de *T. harzianum*; 3) solarización combinada con biofumigación utilizando restos de coles; y 4) control sin tratar. Los ensayos fueron realizados siguiendo un diseño experimental de cuadrado latino, en un invernadero de malla dedicado al cultivo del tomate afectado por *Pyrenochaeta lycopersici*. Al final del cultivo se comprobó la capacidad de *T. harzianum* para colonizar raíces del tomate. En los tratamientos en los que se aplicó el agente de biocontrol las poblaciones de *Trichoderma* fueron del orden de  $10^4$  ufc/g de suelo rizosférico, frente a menos de  $10^2$  ufc/g en las subparcelas correspondientes a los tratamientos sin *T. harzianum*. Al final de la cosecha se evaluó la incidencia de la enfermedad (IIE) utilizando una escala visual de 0 a 4, donde 0 corresponde a plantas sanas y 4 a plantas con más del 75% de las raíces afectadas. Los tratamientos solarización+biofumigación y solarización+*T. harzianum* redujeron significativamente la incidencia de la enfermedad respecto al control y al tratamiento de *T. harzianum* (IIE=0,9; 1,1; 2,9 y 3,1, respectivamente). La producción más alta fue obtenida en el tratamiento solarización+biofumigación (3,1 Kg/planta), seguido de solarización+*T. harzianum*, control y *T. harzianum*. El análisis de los datos de producción e incidencia de enfermedad dio como resultado una correlación negativa entre ellos, estadísticamente significativa. Estos resultados indican que el síndrome de las raíces corchosas afecta a la producción y que su control mediante solarización y biofumigación con brásicas incrementa el rendimiento del cultivo.

## H-9

**CONTROL BIOLÓGICO E INTEGRADO DE LA MARCHITEZ VASCULAR DE LA SANDÍA Y EL MELÓN****DE CAL, A., SZTEJNBERG, A., SABUQUILLO, P., MELGAREJO, P.**

*Dpto. Protección Vegetal, Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria, SGIT-INIA, Ctra. de La Coruña, Km 7,5, 28040 Madrid. E-mail: cal@inia.es*

*Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum* (FON) y *F. oxysporum* f. sp. *melonis* (FOM) causan la marchitez vascular de la sandía y el melón respectivamente. Su control está restringido al uso de cultivares resistentes o parcelas libres del patógeno. *Penicillium oxalicum* es un agente de biocontrol que induce resistencia en plantas de tomate frente a *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*.

Se ha comprobado la efectividad de distintos formulados de *P. oxalicum* frente a la marchitez vascular del melón (cv. Amarillo Canario) y la sandía (cv. Sugar Baby), en ensayos llevados a cabo en cámaras de cultivo e invernadero. Los ensayos de cámara se realizaron con plantas de melón y sandía de dos hojas verdaderas en cultivo hidropónico líquido (Hoagland nº2) infectado con  $10^3$  conidias/ml de FOM ó  $10^5$  conidias/ml de FON respectivamente. Las plantas habían sido tratadas en el semillero 7 días antes del trasplante con una suspensión de conidias de *P. oxalicum* ( $10^7$  conidias/ml). Los controles constaban de plantas sin tratar. Se ensayaron 5 plantas por tratamiento, huésped e inóculo. Las plantas se mantuvieron durante 3 semanas a 22°C, 80% humedad y 16 horas de fotoperiodo. El ensayo se repitió dos veces. Los ensayos de invernadero se realizaron sobre turba estéril inoculada artificialmente con  $10^3$  conidias/g de FOM ó  $10^5$  conidias/ml de FON respectivamente. Se aplicó Basamid granulado (98% dazomet) a 100%, 70% y 50% de la dosis recomendada, a la turba 7 días después de la inoculación con el patógeno y 21 días antes del trasplante. Las plantas habían sido tratadas en el semillero 7 días antes del trasplante con una suspensión de conidias de *P. oxalicum* ( $10^7$  conidias/ml) y cada 15 días hasta el final del ensayo. Los tratamientos químico, biológico e integrado se aplicaron en bloques al azar, con 3 bloques por ensayo y 10 plantas por tratamiento y bloque. La incidencia de la enfermedad fue evaluada cada 15 días hasta 100 días después del trasplante. Los tratamientos de *P. oxalicum* controlan la marchitez vascular de la sandía en los ensayos de cámara e invernadero, mientras que la marchitez vascular del melón sólo se reducía con los tratamientos integrados de *P. oxalicum* + Basamid al 100% ó 70% de la dosis recomendada.

**H-10****CONTROL BIOLÓGICO DEL OÍDIO EN PLANTAS DE FRESA****DE CAL, A., SZTEJNBERG, A., SABUQUILLO, P., REDONDO, C., MELGAREJO, P.**

*Dpto. Protección Vegetal, Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria, SGIT-INIA, Ctra. de La Coruña, Km 7,5, 28040 Madrid. E-mail: cal@inia.es*

*Sphaeroteca macularis* f. sp. *fragariae* es el hongo causante del oídio en plantas de fresa. La enfermedad se manifiesta sobre hojas, peciolo, flores y frutos. En el control del oídio de la fresa se utilizan variedades resistentes o tolerantes, y se aplican fungicidas de contacto y sistémicos. El carácter policíclico de la enfermedad obliga al uso de múltiples tratamientos químicos con el consiguiente riesgo de aparición de cepas del patógeno resistentes a los productos aplicados. Se han de buscar alternativas, como el control biológico, que reduzcan o eliminen los tratamientos químicos frente al oídio de la fresa.

*Penicillium oxalicum* es un agente de biocontrol que induce resistencia frente a la marchitez vascular del tomate. Para comprobar el efecto de *P. oxalicum* en el control del oídio de la fresa se utilizaron diferentes formulados biológicos de alta viabilidad, gran estabilidad y solubilidad en agua. Se realizan dos ensayos en cámara de cultivo y dos en parcelas comerciales de viveros de fresa, con plantas naturalmente infectadas con oídio. Las variedades utilizadas fueron Camarosa, Elsanta, Aguedilla, y Ventana. Los ensayos en cámara de cultivo se llevaron a cabo con diez plantas de cada variedad, plantadas en macetas individuales que contenían turba estéril tratada con 100ml de una suspensión de conidias de *P. oxalicum* ( $10^7$  conidias/ml). Estas plantas se pulverizaban hasta goteo cada 7 días con una suspensión de conidias de *P. oxalicum* ( $10^7$  conidias/ml), durante los 90 días que permanecían en la cámara de cultivo (22°C, 80% humedad, 16 horas fotoperiodo). Los testigos constaban del mismo nº de plantas de cada variedad a los que se les aplicaba agua estéril. Se evaluó el desarrollo de la enfermedad cada 7 días. Los ensayos en parcelas comerciales se realizaron con un diseño de bloques al azar, con 4 bloques y 20 plantas de cada variedad por bloque, que se pulverizaban con una suspensión de conidias de *P. oxalicum* ( $10^7$  conidias/ml) cada 15 días hasta el final del cultivo, una vez aparecían los primeros síntomas de la enfermedad. La variedad más susceptible a oídio es Ventana (100% incidencia a los 20 días en los ensayos de cámara), seguida de Elsanta (60% incidencia a los 20 días) y por último Camarosa y Aguedilla (20-40% incidencia a los 20 días). Los tratamientos de *P. oxalicum* reducían el desarrollo de la enfermedad en las variedades Camarosa (30-60% control), Elsanta (30-20% control), y Aguedilla (40-74% control) en condiciones de campo y cámara, respectivamente.

## H-11

**MEJORA DE LA EFICACIA DEL AGENTE DE BIOCONTROL *Penicillium frequentans* SOBRE LA PODREDUMBRE PARDA FAVORECIENDO SU PERSISTENCIA EN FRUTO****GUIJARRO, B., MELGAREJO, P., DE CAL, A.**

Dpto. Protección Vegetal, Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria, SGIT-INIA, Crta. de La Coruña, Km 7,5, 28040 Madrid. E-mail: bguijarr@inia.es

*Penicillium frequentans* (Pf) es un hongo componente de la microflora residente de flores y brotes de melocotonero en España, cuyas conidias reducen el marchitamiento de los brotes y la podredumbre parda los melocotones causada por *Monilinia laxa*. La lluvia, el viento, el riego, son factores que contribuyen a eliminar el producto, reduciendo la eficacia y el desarrollo del agente de biocontrol. Para ampliar la eficacia de *Penicillium frequentans* frente a la podredumbre de frutos causada por el patógeno en los frutales de hueso, es necesario mejorar su adherencia y persistencia en el microambiente en el que actúa, aplicando la concentración óptima de conidias e incorporando aquellos aditivos que favorezcan la adhesión del microorganismo al fruto.

Se ha puesto a punto en nuestro laboratorio un método para estimar la cantidad de conidias que permanecen en la superficie de los melocotones tras realizar los tratamientos biológicos ( $n^{\circ}$  conidia/cm<sup>2</sup>) y la viabilidad de las mismas (unidades formadoras de colonias (cfu)/cm<sup>2</sup>). Esto nos ha permitido comprobar el efecto que sobre la adherencia de las conidias tiene: 1) la concentración de las suspensiones de *Penicillium frequentans* aplicadas, 2) la edad y viabilidad de las conidias, y 3) aditivos añadidos en distintos momentos del proceso de producción y dosis de los mismos. Se estimó la adherencia de 6 concentraciones de *Penicillium frequentans* ( $10^4$ ,  $10^5$ ,  $10^6$ ,  $10^7$ ,  $10^8$ , y  $10^9$  conidia/ml); y se utilizaron conidias almacenadas a T<sup>a</sup> ambiente durante 0, 90, 180, y 365 días con diferente grado de viabilidad. Se añadieron a las conidias de *Penicillium frequentans* compuestos adherentes como sacarosa, d-sorbitol, glicerol, alginato sódico, carboximetil celulosa, gel de sílice, gelatina, leche desnatada o un adherente comercial (96% di-menteno, NU-FILM-17), bien antes o después del secado de las mismas. La concentración de las suspensiones de *Penicillium frequentans* y los aditivos aplicados a las mismas tienen un efecto significativo sobre la adherencia de las conidias, no así su edad o viabilidad. La máxima adhesión se observa con suspensiones de  $10^7$  conidia de *Penicillium frequentans*/ml que han sido formuladas con 1.5% alginato sódico, 1.5% carboximetil celulosa, 1.5% gelatina antes o después del secado. Estos formulados redujeron la incidencia y el diámetro de lesión causado por *M. laxa* sobre melocotones en ensayos de postcosecha. Se observó un aumento significativo de la eficacia de *Penicillium frequentans* frente a la podredumbre parda en aquellos formulados cuyas conidias se adhieren significativamente mejor a la superficie de los melocotones.

**H-12****RESISTENCIA SISTÉMICA ADQUIRIDA EN OLIVO AL REPILO CAUSADO POR *Spilocaea oleagina*****ROCA, L.F., ZAMRI, A., ALSALIMIYA, M., TRAPERO, A.**

*Dpto. de Agronomía, ETSIAM, Universidad de Córdoba, Campus de Rabanales, Edif. Celestino Mutis, 14071 Córdoba. E-mail: trapero@uco.es*

El repilo del olivo causado por *Spilocaea oleagina*, es una de las principales enfermedades que afectan a dicho cultivo en todas las zonas olivareras del mundo. La defoliación que origina conduce al debilitamiento general del árbol, con la consecuente reducción de cosecha. El control se lleva a cabo principalmente mediante la aplicación de fungicidas cúpricos de efecto protector. Determinadas sustancias químicas, tanto orgánicas como inorgánicas, poseen la capacidad de activar mecanismos de defensa de las plantas, algunas de las cuales se comercializan para su utilización en diversos cultivos frente a una amplia gama de patógenos. En olivo se han identificado genes implicados en la resistencia al repilo y que responden diferencialmente a moléculas inductoras de diferentes vías de defensa. En el presente trabajo diversos productos, incluyendo activadores vegetales comerciales, productos cúpricos y productos químicos de laboratorio, se aplicaron en plantones de olivo del cv. Picual, en los que se cubrieron las hojas apicales de las ramas. Se ensayaron tratamientos antes y después de la inoculación artificial con una suspensión conidial preparada mediante inmersión de hojas con lesiones esporuladas en agua destilada, ajustándose la concentración a  $1-1,5 \times 10^5$  conidias/ml. La evaluación de la enfermedad se realizó en las hojas apicales que no habían recibido tratamiento; la incidencia de la enfermedad se calculó como el número de hojas con síntomas de la enfermedad y la severidad según el porcentaje de superficie foliar afectada. Todos los activadores vegetales redujeron la incidencia y la severidad de la enfermedad, observándose diferencias significativas entre productos y respecto al testigo. Los productos cúpricos comerciales mostraron una amplia variabilidad en su efecto sobre la enfermedad, desde productos que no mostraron actividad alguna hasta otros que inhibieron el 100% de la enfermedad respecto al testigo. La baja incidencia y severidad de la enfermedad observadas aconsejan continuar esta línea de investigación antes de su posible aplicación como medida de control integrado de la enfermedad en campo.

**H-13****EVALUACIÓN *IN VITRO* DE PRODUCTOS QUÍMICOS Y BIOLÓGICOS PARA EL CONTROL DE CHANCROS CAUSADOS POR *Botryosphaeria* spp. EN TRONCOS DE ALCORNOQUES****ROMERO, M.A., JIMÉNEZ, J.J., SÁNCHEZ, M.E., TRAPERO, A.**

*Dpto. Agronomía, Universidad de Córdoba, Campus Rabanales, Edif. Celestino Mutis, 14071 Córdoba. E-mail: ma2romam@uco.es*

Desde la supresión del benomilo del registro de productos fitosanitarios en Andalucía no se realiza ningún tipo de tratamiento después del descorche, por lo que se hace necesario buscar nuevos productos que protejan al alcornoque frente al ataque de *Botryosphaeria corticola*. Se han llevado a cabo ensayos *in vitro* de productos fitosanitarios para comprobar la inhibición del crecimiento micelial del hongo en medios de cultivo. Los productos a ensayar fueron protectores, sistémicos y biológicos, ensayando un total de 12 productos, cada uno con cuatro dosis. Se utilizaron dos aislados monoascospóricos de *B. corticola*: DOA-28M y DOA-32M. El medio de crecimiento base que se empleó para los productos químicos fue PDA Difco, al que una vez esterilizado, se le añadió la concentración correspondiente de fungicida, mientras que para los productos biológicos estos se aplicaron sobre el medio de crecimiento. En cuanto a los productos biológicos, ninguno de ellos inhibió el crecimiento micelial de los dos aislados. Todos los productos químicos a la concentración de 1000 ppm, inhibieron casi completamente el crecimiento micelial del patógeno. El metil tiofanato y la carbendazima, sola o mezclada con flusilazol, inhibieron el crecimiento micelial en todas las concentraciones de producto. Las materias activas metil tiofanato mezclado con sulfato cuprocálcico y epoxiconazol dieron lugar a un crecimiento micelial mínimo, incluso a la concentración más baja de 1 ppm. El Difenconazol apenas inhibe el crecimiento micelial a la concentración más baja, pero conforme aumenta la dosis de producto va impidiendo el crecimiento de los dos aislados de *B. corticola*. En la mezcla folpet y sulfato cuprocálcico, la inhibición total del crecimiento del micelio sólo se produjo a la concentración más alta de 1000 ppm. De este trabajo se puede deducir que los benzimidazoles siguen siendo los productos más recomendables para el tratamiento de los alcornoques, con un alto potencial para evitar la formación de chancros causados por *B. corticola* en el tronco de los árboles.

## H-14

**TÉCNICAS PREDICTIVAS DE LA SUPRESIVIDAD A LA FUSARIOSIS VASCULAR DEL CLAVEL DE LOS SUSTRATOS**

**BORRERO, C.<sup>1,2</sup>, ARESTOY, F.<sup>2</sup>, FERNÁNDEZ-CABANÁS, V.M.<sup>2</sup>, CASTILLO, S.<sup>2</sup>, TRILLAS, M.I.<sup>3</sup>, AVILÉS, M.<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Biocontrol Technologies S. L. C/ Baldiri Reixac, nº 4 i 6, 08028 Barcelona. E-mail: cborrero@us.es

<sup>2</sup>Dpto. Ciencias Agroforestales, Escuela de Ingeniería Técnica Agrícola, Universidad de Sevilla, Ctra Utrera Km 1, 41013 Sevilla. E-mail: aviles@us.es

<sup>3</sup>Dpto. Biología Vegetal, Universidad de Barcelona, Avda Diagonal 645, 08028 Barcelona. E-mail: mtrillas@ub.edu

La fusariosis vascular del clavel es la enfermedad más importante en este cultivo en prácticamente todo el mundo. Con el fin de evitar el uso del bromuro de metilo para su control, el uso de sustratos supresivos puede ser una alternativa viable para este cultivo. Con el fin de identificar las propiedades asociadas al comportamiento supresivo a la fusariosis vascular del clavel de los sustratos se han realizado ensayos en cámara de cultivo con claveles crecidos en sustratos inoculados con *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi*. Los sustratos utilizados fueron: compost de orujo de uva, corcho compostado, alperujo con residuo de desmotadora compostado y mezclado con cascarilla de arroz, compost de sustrato de champiñón mezclado con turba, fibra de coco, turba y vermiculita. Los parámetros que se midieron en los sustratos fueron pH, actividad  $\beta$ -glucosidasa y espectros NIR (infrarrojo cercano).

Todos los sustratos formulados con compost mostraron distintos niveles de supresividad a la fusariosis mientras que la fibra de coco, la turba y la vermiculita fueron conductivos a la enfermedad. La actividad  $\beta$ -glucosidasa y el pH de los sustratos presentaron una correlación múltiple con la severidad registrada, con una  $R^2 = 67,78\%$ . Estas variables ya se habían mostrado como predictivas para la supresividad de sustratos frente a la fusariosis vascular del tomate. Por otro lado, se ha conseguido una buena predicción de la severidad registrada a partir de los espectros NIR de los sustratos orgánicos, a su vez esta técnica también es capaz de predecir el pH y la actividad microbiana de los sustratos.

**H-15****INFLUENCIA DEL TIEMPO DE MADURACIÓN DEL COMPOST Y DE LA REUTILIZACIÓN DE LOS SUSTRATOS FORMULADOS CON COMPOST SOBRE SU SUPRESIVIDAD NATURAL A LA FUSARIOSIS VASCULAR DEL TOMATE****CASTILLO, S.<sup>1</sup>, BORRERO, C.<sup>1,2</sup>, LÓPEZ, C.<sup>1</sup>, PÉREZ, S.<sup>1</sup>, AVILÉS, M.<sup>1</sup>**<sup>1</sup>Dpto. de Ciencias Agroforestales, EUITA Ctra. de Utrera Km 1, s/n, 41013 Sevilla. E-mail: aviles@us.es<sup>2</sup>Biocontrol Technologies S. L. C/ Baldiri Reixac, nº 4 i 6, 08028 Barcelona. E-mail: cborrero@us.es

Las fusariosis vasculares provocan numerosas pérdidas en distintos cultivos. La supresividad a esta enfermedad que presentan ciertos sustratos formulados con composts es una posible solución al problema. La supresividad en estos sustratos supresivos formulados con compost de distintos tiempos de maduración y después de una campaña de cultivo se evaluó en un ensayo en condiciones semi-comerciales en invernadero. El diseño experimental fue de bloques al azar con tres repeticiones. Cada repetición consistió en 5 macetas. Se sembró una planta de tomate (cv. Roma) por maceta de 2 L. Los sustratos evaluados fueron: alperujo más residuo de desmotadora compostado mezclado con cascarilla de arroz (1:1, v/v) compostado en 2003 y 2004 y cultivado previamente; corcho compostado en 2003 y 2004, corcho compostado cultivado previamente; compost de residuo agotado del cultivo del champiñón mezclado con turba (1:1, v/v) y el mismo cultivado previamente; compost de orujo de vid compostado en 2003 y 2004 y compost de orujo de vid cultivado previamente, y, como sustratos de referencia: fibra de coco y turba. El patógeno utilizado en este ensayo fue *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*, raza 2, a una concentración de  $4 \cdot 10^4$  conidias por ml de sustrato, estableciéndose también controles sin inocular. Durante el ensayo se recogieron las producciones de tomates. La severidad se midió tomando una escala de 0 a 4 según el porcentaje de hojas afectadas, se calculó el área bajo la curva de progreso de enfermedad relativa. Los datos mostraron que aquellos sustratos que fueron cultivados previamente mejoraron o igualaron la supresividad y la producción de sus respectivos composts con distinto tiempo de maduración. El tiempo de maduración afecta a la supresividad de manera distinta según el material. Así en el compost de orujo de vid afecta negativamente, en el compost de corcho afecta positivamente y en el alperujo compostado no se aprecia efecto.



**H-16****EVALUACIÓN DE LA SUPRESIVIDAD NATURAL DE SUSTRATOS FORMULADOS CON COMPOSTS FRENTE A LA FUSARIOSIS VASCULAR DEL CLAVEL BAJO CONDICIONES COMERCIALES DE CULTIVO****GARCÍA-RUIZ, A.<sup>1</sup>, ORDOVÁS, J.<sup>2</sup>, TELLO, J.C.<sup>1</sup>, AVILÉS, M.<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Dpto. Producción Vegetal, Universidad de Almería, Ctra. Sacramento s/n, 04120 Almería.  
E-mail: [aurora.garcia.ruiz.ext@juntadeandalucia.es](mailto:aurora.garcia.ruiz.ext@juntadeandalucia.es)

<sup>2</sup>Dpto. Ciencias Agroforestales, Universidad de Sevilla, Ctra. Utrera Km 1, 41013 Sevilla. E-mail: [aviles@us.es](mailto:aviles@us.es)

De entre todas las enfermedades que afectan al cultivo del clavel, la marchitez vascular inducida por *Fusarium oxysporum* f.sp. *dianthi* está considerada como una enfermedad que amenaza al cultivo en todo el mundo. Son muchas las fuentes de inóculo primario: suelos contaminados, estiércoles infectados, transporte de masas de polvo y esquejes de plantación infectados. Entre las posibles medidas de control de este patógeno se consideran los cultivos sin suelo. Si además, el sustrato empleado presenta supresividad natural a la fusariosis se verá reducida la vulnerabilidad del sistema. El objetivo de este ensayo es evaluar el carácter supresor de varios sustratos formulados con compost frente a la fusariosis vascular del clavel respecto a la fibra de coco, en condiciones comerciales de cultivo. El experimento se ha realizado en contenedores de 72 litros con los siguientes sustratos: fibra de coco (FC), compost de orujo de vid (CV), compost de corcho (CC) y compost del residuo agotado del cultivo del champiñón mezclado con cascarilla de arroz (1:1, v/v) (CCH+CAS). Se emplearon dos dosis de inóculo del fitopatógeno  $1 \cdot 10^4$  y  $8 \cdot 10^4$  conidias/ml de sustrato. Además, se dispusieron testigos sin inocular de los mismos. El experimento se estableció en un invernadero tipo parral, la duración del ensayo fue de 12 meses. Se realizaron las prácticas y manejo del cultivo habituales de la zona (Chipiona). El diseño experimental fue de bloques al azar con 6 repeticiones. La severidad de la enfermedad se cuantificó semanalmente. El cultivar susceptible empleado fue Medea. El comportamiento supresivo/conductivo de los sustratos se expresó a ambas dosis de inóculo. Los sustratos CV, CCH+CAS y CC mostraron menores severidades que la FC. No obstante, el CC registró mayor severidad que los otros dos compost. Además, el CV presentó las menores poblaciones del fitopatógeno al final del ensayo. Como conclusión podemos establecer que los sustratos CV y CCH+CAS presentan una elevada supresividad a la fusariosis vascular del clavel.

## H-17

**UTILIZACIÓN DE *Saccharomyces cerevisiae* EN EL ESTUDIO DEL MODO DE ACCIÓN DEL PÉPTIDO ANTIMICROBIANO PAF26****LÓPEZ-GARCÍA, B., MARCOS, J.F.**

*Laboratorio de Fisiología y Biotecnología Postcosecha, Instituto de Agroquímica y Tecnología de los Alimentos (IATA)-CSIC, Apartado de Correos 73, 46100 Burjassot (Valencia). E-mail: lopezb@iata.csic.es*

El hexapéptido antimicrobiano PAF26 fue identificado previamente por nuestro grupo mediante la utilización de estrategias combinatoriales y de diseño racional. PAF26 tiene propiedades antimicrobianas diferenciadas y específicas de hongos fitopatógenos, entre ellos *Penicillium digitatum* (el principal patógeno postcosecha de frutos cítricos) (López-García *et al.*, 2002). Como objetivo general de este trabajo proponemos la utilización de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* como modelo unicelular para el estudio del modo de acción de pequeños péptidos antifúngicos, y en particular de PAF26.

Desde una perspectiva de genómica funcional, se han analizado los cambios en el transcriptoma de *S. cerevisiae* por la exposición a concentraciones subinhibitorias de PAF26 y del péptido hemolítico melitina. La hibridación de macromatrices y el análisis de sus resultados muestran cambios de expresión por la acción de PAF26 en el 7% de 5.477 genes analizados. El análisis de anotación funcional por ontología génica revela entre los genes inducidos una representación significativa de genes implicados en respuesta a estrés o a estímulos (algunos de ellos reguladores), componentes estructurales de pared celular, y transportadores de carbohidratos. En este trabajo describimos la inducción por tratamiento con PAF26, pero no con melitina, de la expresión de determinados genes que codifican para glicoproteínas de pared celular. Mediante la técnica de PCR en tiempo real se ha comprobado los cambios de expresión de los genes seleccionados. Estos resultados indican que la levadura responde de forma activa a la acción del péptido PAF26 con alteraciones específicas de la estructura y/o composición de su pared celular. El uso de la levadura como modelo es de interés en el estudio de los posibles determinantes de la actividad y/o especificidad en distintos péptidos antimicrobianos, y esperamos que conduzca a la identificación de posibles genes candidatos en hongos filamentosos.

**H-18****NUEVOS FUNGICIDAS A PARTIR DE MALAS HIERBAS****BOTÍA, J.M., ANADÓN, A., ASENCIO, A.D., TORRES, M.P., DÍAZ, G.**

*División Botánica, Dpto Biología Aplicada, Facultad de Ciencias Experimentales, Universidad Miguel Hernández de Elche, Campus de Elche, Avda de la Universidad s/n, 03202 Elche (Alicante). E-mail: jmbotia@umh.es*

Con este trabajo se ha intentado establecer una línea de investigación sobre los plaguicidas biorracionales y su posible elaboración a partir de extractos de especies vegetales de malas hierbas. En el marco científico y medioambiental adquiere importancia el estudio de los bioplaguicidas, como nuevas posibilidades para la obtención de compuestos biodegradables para la lucha contra los patógenos. Para comprobar si esta hipótesis planteada podría ser viable, seleccionamos dos géneros de malas hierbas: *Erodium cicutarium* y *Senecio vulgaris*, así como dos hongos fitopatógenos: *Phytophthora citrophthora* y *Rhizoctonia solani*, causantes de enfermedades de una gran transcendencia económica en nuestra sociedad. En la realización de ensayos de crecimiento *in vitro* se empleó el material vegetal secado y triturado. En primer lugar se ensayó el extracto de planta completa con distintos extractantes: agua, metanol y dimetilsulfóxido; y dos concentraciones (Concentración I, 10 g/L y Concentración II, 20 g/L). Posteriormente se inocularon los hongos en medios de dichos extractos y se procedió a cuantificar la inhibición del crecimiento, para comprobar cual de los distintos extractantes y de las distintas concentraciones era más eficiente en la inhibición de los hongos. En líneas generales, el agua no es un buen extractante en ninguno de los casos, por lo que fue descartado. Sin embargo, se seleccionaron el extractante DMSO para *P. citrophthora* y el extractante metanol para *R. solani*. Con respecto a las concentraciones, fue más efectiva la II (20 g/L). En segundo lugar, se trabajó con extractos de distintos órganos de las especies estudiadas: tallo, raíz, hoja y flores. La inhibición sobre *P. citrophthora* fue mayor cuando se inoculó sobre medio con extracto de raíz de *E. cicutarium* (45%). Sin embargo, la máxima inhibición alcanzada fue con *R. solani* sobre medio con extracto de tallo de *S. vulgaris* (65%). Podemos concluir, que el tallo de *Senecio vulgaris* representa una posible fuente de compuestos secundarios con acción inhibidora frente al hongo *Rhizoctonia solani*, al ser el extracto más eficaz de los estudiados.

**H-19****RESPUESTA A LA MICORRIZACIÓN ARTIFICIAL DEL PORTAINJERTO DE VID 161-49 EN SITUACIONES DE REPLANTE****CALVET, C., NOGALES, A., ESTAÚN, V., LUQUE, J., CAMPRUBÍ, A.**

*Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentàries (IRTA), Departament de Protecció Vegetal, Ctra. de Cabrils s/n, 08348 Cabrils (Barcelona). E-mail: cinta.calvet@irta.es*

La inoculación en campo con el hongo formador de micorrizas arbusculares *Glomus intraradices* Schenk & Smith, aislado BEG 72, se está evaluando en dos viñedos de características distintas ubicados en Gandesa (Tarragona). Previamente se hizo una estimación del potencial micorrícico natural de ambas parcelas. La primera, en reposo durante diez años, tenía 1,14 propágulos micorrícicos infectivos por cada 100 ml de suelo, mientras que la segunda, en cultivo hasta el año anterior a la replantación, no tenía propágulos micorrícicos y estaba infestada de *Armillaria mellea* (Vahl:Fr.) P. Kumm.

La inoculación con *G. intraradices* se realizó en el momento de plantar, en mayo de 2004, situando el inóculo bajo los plantones de 161-49 (*Vitis riparia* Michx x *Vitis berlandieri* Planch) injertados con la variedad vinífera Cabernet Sauvignon. Al finalizar la primera temporada de crecimiento, el tratamiento de micorrización había favorecido el desarrollo de las plantas en la primera parcela, mientras que en la segunda parcela el mayor desarrollo vegetativo correspondió a las plantas no micorrizadas. Sin embargo, en la temporada de crecimiento 2005-2006, la longitud de brotes y la producción de biomasa no difirieron entre los dos tratamientos de la primera parcela. En la segunda, afectada por el patógeno, la micorrización favoreció significativamente ambos parámetros.

**H-20****UTILIZACIÓN COMBINADA DEL HONGO MICORRÍCICO *Glomus intraradices* Y DE *Trichoderma* spp. PARA EL CONTROL DE *Armillaria mellea* EN EL PORTAINJERTO DE VID RICHTER 110****NOGALES, A.<sup>1</sup>, GARCÍA-FIGUERES, F.<sup>2</sup>, CAMPRUBÍ, A.<sup>1</sup>, ESTAÚN, V.<sup>1</sup>, CALVET, C.<sup>1</sup>**<sup>1</sup>*Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentàries (IRTA), Departament de Protecció Vegetal, Ctra de Cabrils s/n, 08348 Cabrils (Barcelona). E-mail: cinta.calvet@irta.es*<sup>2</sup>*Departament d' Agricultura, Ramaderia i Pesca, Laboratori de Sanitat Vegetal, Generalitat de Catalunya, Via Circulació Nord, Tram 6, 08040 Barcelona.*

La utilización de microbiota beneficiosa para el control de la podredumbre blanca de raíz causada por *Armillaria mellea* (Vahl:Fr.) P. Kumm, se contempla como una alternativa al tratamiento químico en suelos de replante de vid.

El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de dos cepas de *Trichoderma*: *Trichoderma* spp. cepa T-3, CECT:20528, y *Trichoderma harzianum* cepa T-22, en su formulación comercial Trianum-P (Koppert) y del hongo formador de micorrizas arbusculares *Glomus intraradices* Schenk & Smith BEG 72, en el control de la podredumbre blanca de raíz producida por *A. mellea*. El estudio fue llevado a cabo en el portainjerto de vid Richter 110 (*Vitis berlandieri* Planch x *Vitis rupestris* Scheele) en condiciones de microparcels. Se consideraron 12 tratamientos con todas las combinaciones posibles de tres hongos: simbionte micorrícico, antagonista y patógeno. Se evaluaron parámetros de crecimiento (longitud de brotes, número de hojas, peso fresco y peso seco), la colonización micorrícica y la infección patogénica a lo largo del experimento.

En el primer año se observaron efectos significativos de la micorriza y de los tratamientos con *Trichoderma* en todos los parámetros de crecimiento, mientras que en la parte aérea no se detectó un efecto de *A. mellea*. No obstante, se observaron síntomas incipientes de necrosis en el cuello de las plantas inoculadas con el patógeno. Al final de la temporada de crecimiento se observaron interacciones significativas entre los factores micorriza, patógeno y antagonista en peso fresco y entre micorriza y patógeno en peso seco.

**H-21****INCOMPATIBILIDAD *IN VITRO* DE AISLADOS DE *Trichoderma* spp. POTENCIALES AGENTES DE BIOCONTROL DE *Rosellinia necatrix* EN PLANTAS DE AGUACATE****RUANO-ROSA, D., LÓPEZ-HERRERA, C.J.***Instituto de Agricultura Sostenible, C.S.I.C, Apdo. 4084, Córdoba.*

Dentro de los métodos propuestos para el control de la podredumbre blanca (PB) radical, causada por *Rosellinia necatrix* Prill., se encuentra el uso de agentes de control biológico (ACB), siendo el género *Trichoderma* el que ha recibido mayor atención. Con el fin de reducir la variabilidad que habitualmente se encuentra en los estudios de biocontrol y favorecer el sinergismo entre los organismos implicados en dicho control, se ha propuesto en numerosos trabajos llevar a cabo combinación entre diferentes aislados del hongo.

Utilizamos cinco aislados monoconídicos de *Trichoderma* spp (CH 101, CH 273, CH 303, CH 304.1 y CH 314), procedentes de la rizosfera de árboles de aguacate. Estos se seleccionaron por sus características de inhibición y por sus características culturales, *in vitro*; así como por su efectividad en el biocontrol de la PB, en inoculaciones artificiales individualizadas de cada uno de los aislados sobre plantas de aguacate. Antes de la realización de posteriores inoculaciones artificiales *in vivo* con combinaciones de dichos aislados, se efectuaron cultivos en placa de Petri con celofán, sembrando consecutivamente ambos aislados antes y después de retirar el celofán, con el fin de descartar posibles situaciones de incompatibilidad entre ellos. Se llevaron a cabo tres repeticiones por aislado. Se calculó el área bajo la curva del crecimiento acumulado a los 5 días (final del experimento). El aislado CH 303 mostró una significativa alta inhibición sobre el resto de los aislados, con un efecto fungicida frente al aislado CH 101 y fungistático frente al resto. Los aislados CH 101, CH 273, CH 304.1 y CH 314 disminuyeron el crecimiento de CH 303, siendo CH 273 el que mayor inhibición produjo. En cambio, los aislados CH 101, CH 304.1 y CH 314, produjeron una significativa promoción del crecimiento sobre los demás aislados, mientras que el aislado CH 273 no dio lugar a diferencias significativas en el crecimiento de estos.

Estos resultados obtenidos, sugieren el estudio previo de compatibilidad *in vitro* entre aislados *Trichoderma*, antes de obtener formulaciones comerciales con combinaciones de los mismos para el control biológico de la PB del aguacate, ya que existen aislados de *Trichoderma* como el CH 303, incompatibles con el resto de los estudiados y que pueden disminuir la acción de biocontrol de éstos.

**H-22****ESTUDIO DE CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS, DE COMPATIBILIDAD SOMÁTICA Y BIOMOLECULARES DE AISLADOS DE *Rosellinia necatrix*****RUANO-ROSA, D.<sup>1</sup>, SCHENA, L.<sup>2</sup>, IPPOLITO, A.<sup>2</sup>, LÓPEZ-HERRERA, C.J.<sup>1</sup>**<sup>1</sup>*Instituto de Agricultura Sostenible, C.S.I.C, Apdo 4084, 14080 Córdoba.*<sup>2</sup>*Dipartimento di Protezione delle Piante e Microbiologia Applicata, Università degli Studi, Bari, Italia*

La detección de polimorfismo intra e interespecífico, mediante el uso de técnicas moleculares como RAPD (random amplification of polymorphic DNA), ha sido utilizada anteriormente con éxito en patógenos de plantas o en identificación de aislados de *Trichoderma*. En el presente trabajo 57 aislados de *R. necatrix*, se caracterizaron fenotípica y genotípicamente, con el fin de estudiar la diversidad dentro de la población.

Para el estudio de las características fenotípicas se evaluó la morfología de las colonias en PDA (anverso y reverso) así como la incompatibilidad somática, mediante cultivos duales en MA2%, entre los 57 aislados de *R. necatrix*. Las características morfológicas observadas en el anverso de las placas a los 10 días fueron: abundante micelio aéreo compacto o esponjoso, y escaso micelio aéreo; y según los bordes de las colonias: circulares, poco lobulados o muy lobulados. Las características observadas en el reverso de la colonia fueron: colonias sin melanizar blancas o miel, o colonias mecanizadas de color oscura-negra. El estudio de incompatibilidad somática reveló la existencia de cuatro aislados (Rn 3, Rn 10, Rn 16 y Rn 33) con una baja incompatibilidad somática (5%, 46%, 21% y 9% respectivamente), inferior a la esperada por proceder de diferentes fincas.

Para la caracterización molecular se utilizó la metodología RAPD. El número de marcadores RAPD seleccionados por cebador osciló entre 1 y 7. El análisis de los 30 marcadores seleccionados se efectuó realizando una matriz binaria, en función de la presencia o ausencia de banda. Como resultado se obtuvo un dendrograma con escasa agrupación entre aislados, en el que solo se diferenció de forma significativa el aislado Rn 21 del resto. No obstante este aislado presentó gran diversidad morfológica cuando creció en PDA, manifestando todas las características morfológicas que se observaron para el resto de los grupos establecidos. Quizás esta circunstancia sea debida a lo que se describe en la bibliografía como aislados mutantes de *R. necatrix*. No se obtuvo ninguna correlación entre la incompatibilidad somática de los aislados y las características morfológicas o moleculares

**H-23****EFFECTO BIOFUMIGANTE DE ESPECIES DE *Brassica* EN EL CRECIMIENTO DE *Phytophthora* spp. *IN VITRO*. AVANCE DE RESULTADOS****ROMERO, E., ZURERA, C., BARRAU, C., ROMERO, F.***IFAPA-CECI, CIFA "Las Torres-Tomejil", IFAPA, Apdo. Oficial, 41200 Alcalá del Río (Sevilla).*

La biofumigación se basa en el control de los patógenos de suelo por la acción de compuestos volátiles producidos en la biodescomposición de materia orgánica. Estos compuestos, isotiocianatos (ITCs), se originan en la hidrólisis de los glucosinolatos. Distintas especies de crucíferas son utilizadas como biofumigante, presentando diferentes concentraciones y tipos de ITCs durante su descomposición, que varían significativamente en su toxicidad frente a los hongos patógenos.

El objetivo de este trabajo es seleccionar *in vitro* el biofumigante más eficaz en el control de *Phytophthora* spp. Para ello se han testado *Brassica juncea*, *B. nigra*, *B. carinata*, *B. napus*, *B. oleracea* y *Raphanus sativus*. Se ha determinado el efecto biofumigante de las especies en diferentes estadios fenológicos del cultivo y fechas de siembra, seleccionándose: crecimiento vegetativo, prefloración y producción de semillas. Las siembras se llevaron a cabo en los meses de octubre, diciembre, abril y mayo. Sobre vasos de precipitado, conteniendo cuatro concentraciones de material vegetal (5g, 10g, 20g y 30g.) se sellaron placas de PDA en las que se sembraron discos de 5 mm de diámetro de los aislados del hongo. Diariamente se midió el crecimiento radial de la colonia para determinar la dosis mínima efectiva de biofumigante en la supresión del crecimiento del hongo. Con *B. napus* en el estadio de producción de semillas, el crecimiento del hongo fue menor del 5%, a partir de 20g de biofumigante. *B. juncea*, *B. nigra* y *B. carinata* en el estadio de fructificación se mostraron como las más eficaces en el control con un 0% de crecimiento del hongo respecto al control para una dosis de 5g de biofumigante. Siendo *B. juncea*, la especie con mayor potencial biofumigante en todos los estadios fenológicos.



**H-24****ESTUDIO DE LA INFLUENCIA DE TRATAMIENTOS DE DESINFESTACIÓN DE SUELOS EN LA POBLACIÓN NATIVA DE *Trichoderma* EN CAMPOS DE PRODUCCIÓN DE FRUTOS DE FRESA EN HUELVA (S.O. DE ANDALUCÍA)**

**DE LOS SANTOS, B.<sup>1</sup>, MEDINA, J.J.<sup>1</sup>, MIRANDA, L.<sup>1</sup>, BLANCO, C.<sup>1</sup>, LÓPEZ-ARANDA, J.M.<sup>2</sup>, ROMERO, F.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Centro de Investigación y Formación Agraria "Las Torres - Tomejil", IFAPA-CICE, Junta de Andalucía, Apdo. de Correos Oficial, 41200 Alcalá del Río (Sevilla).

<sup>2</sup>Centro de Investigación y Formación Agraria "Churriana", IFAPA-CICE, Junta de Andalucía, 29140 Churriana (Málaga). E-mail: bertas.garcia.ext@juntadeandalucia.es

El 90% de la superficie destinada al cultivo de la fresa (*Fragaria x Ananassa* Duch.) se sitúa en la provincia de Huelva. Debido al uso continuado de bromuro de metilo, los suelos dedicados a este cultivo presentan bajos niveles de patógenos, a pesar de lo cual, las producciones son más altas en los desinfestados, en los que se observa un incremento de las poblaciones nativas de *Trichoderma*, las cuales se caracterizan por su capacidad en el control de enfermedades de plantas, pero además afectan de forma positiva al crecimiento de las mismas. Durante dos años, se han testado varios tratamientos de desinfestación de suelo en dos fincas productoras de fruto de fresa. El objetivo de este trabajo es el estudio de los cambios en la población nativa de *Trichoderma* después de diferentes tratamientos de fumigación. Su influencia en la población de suelo fue determinada mediante aislamientos en medios de cultivo selectivos. En las muestras analizadas no se detectaron hongos patógenos de fresa, pero la población de *Trichoderma* se incrementó después de los tratamientos. Hubo diferencias significativas entre los tratamientos y también al compararlos con el control. Las mayores poblaciones de *Trichoderma* se encontraron en suelos tratados con bromuro de metilo y cloropicrina. Existen, por tanto, tratamientos a suelo, capaces de incrementar, como el bromuro de metilo, las poblaciones de hongos beneficiosos para este cultivo.

## H-25

**OCUPACIÓN DIFERENCIAL DE LA RIZOSFERA DE AGUACATE POR CEPAS DE *Pseudomonas* spp. ANTAGONISTAS FRENTE A *Rosellinia necatrix***

**PLIEGO, C.<sup>2</sup>, DE WEERT, S.<sup>3</sup>, LAMERS, G.E.M.<sup>3</sup>, BLOEMBERG, G.<sup>3</sup>, CAZORLA, F.M.<sup>4</sup>, RAMOS, C.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Área de Genética, Universidad de Málaga, 29071 Málaga. E-mail: crr@uma.es

<sup>2</sup>IFAPA, CIFA de Churriana, Cortijo de la Cruz s/n, 29140 Churriana (Málaga).

<sup>3</sup>Institute of Molecular Plant Sciences, University of Leiden, Leiden 2333 AL, The Netherlands.

<sup>4</sup>Departamento de Microbiología, Universidad de Málaga, 29071 Málaga.

Ciertos aislados de *Pseudomonas* spp. controlan enfermedades vegetales causadas por hongos fitopatógenos. Independiente del mecanismo de acción ejercido, el control de la enfermedad requiere que el agente de biocontrol colonice eficiente y competitivamente la raíz de la planta que se desea proteger. Aislados bacterianos diferentes pueden colonizar la rizosfera de plantas o el micelio de cierto hongos de forma variable, sin embargo, hasta la fecha no se han relacionado patrones específicos de colonización con la capacidad de biocontrol de los aislados. En una fase anterior de este proyecto, y utilizando un método de selección que permite el aislamiento de cepas que colonizan eficientemente la rizosfera de plantas, se aislaron 10 cepas bacterianas antagonistas *in vitro* frente a *R. necatrix*. Ensayos de biocontrol frente a este patógeno en plantas de aguacate revelaron que únicamente algunas de estas cepas reducían los síntomas de la enfermedad. De entre estas cepas, se seleccionaron dos de ellas, *Pseudomonas* spp. Avo73 y Avo110, no productoras de antibióticos y capaces de persistir en la rizosfera de aguacate a una densidad celular de  $10^5$ - $10^6$  ufc/g de raíz durante al menos 50 días. Aunque ambos aislados muestran movilidad tipo *swimming* y *twitching*, siendo esta última más acusada en Avo73, y producen sideróforos,  $\beta$ -glucanasas y celulasas, únicamente Avo73 sintetiza lipasas y proteasas a niveles detectables. A pesar del mayor número de propiedades antagonistas mostradas por Avo73, esta cepa no es capaz de inhibir el crecimiento del hongo *in vivo*; por el contrario, Avo110 reduce el desarrollo de la enfermedad en un 20%. El patrón de colonización de la rizosfera de aguacate y de las hifas de *R. necatrix* se analizó para ambos aislados mediante microscopía láser confocal utilizando derivados marcados con la proteína verde fluorescente (Gfp) o con una versión derivada de esta que emite fluorescencia azul (Bfp). Avo110 coloniza eficientemente las uniones entre células epidérmicas de la raíz y las hifas del patógeno, sin embargo, Avo73 se encontró fundamentalmente asociada a pelos radiculares y en unión débil con el hongo. El patrón diferencial de colonización mostrado por estos aislados podría estar relacionado con su capacidad de biocontrol de *R. necatrix* en raíces de aguacate.

## H-26

 **AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE UNA BACTERIA PROMOTORA DEL CRECIMIENTO VEGETAL COMO AGENTE DE CONTROL BIOLÓGICO****SACRISTÁN, G.<sup>1</sup>, REGUERA, J.I.<sup>1</sup>, LÓPEZ, D.J.<sup>2</sup>, OLALLA, C.<sup>2</sup>**<sup>1</sup>Área de Microbiología. E-mail: gsacristan@ubu.es<sup>2</sup>Área de Edafología y Química Agrícola, Facultad de Ciencias, Universidad de Burgos, Plaza de Misael Bañuelos s/n, 09001 Burgos. E-mail: djlopez@ubu.es

Los microorganismos antagonistas se usan en cultivos vegetales, tanto para proteger las plantas de enfermedades y plagas, como para proporcionarles sustancias nutritivas. Las bacterias promotoras del crecimiento vegetal (Plant Growth Promoting Rhizobacteria, PGPR) pueden presentar antagonismo frente a patógenos y/o producir metabolitos, reguladores del crecimiento o precursores de éstos. En este trabajo se aísla y caracteriza una cepa PGPR mediante pruebas bioquímicas y PCR (Polimerase Chain Reaction). Igualmente, se evalúa la capacidad de esta cepa PGPR y su efecto antifúngico sobre *Rhizoctonia solani* AG-4 en remolacha azucarera. Se aislaron y seleccionaron colonias microbianas procedentes de muestras de suelo agrícola que mostraban el mayor efecto inhibitor. Se inocularon semillas de remolacha azucarera con un cultivo PGPR ( $3 \times 10^8$  ufc/ml) durante 5 h, sembrándose a continuación en macetas individuales con vermiculita previamente autoclavada (ensayo Ps). Asimismo se sembraron otras semillas inoculadas sólo con caldo BHI (ensayo T). En todos los casos se mantuvieron en cámara de climatización (fotoperíodo de 14/10 h, temperatura de 30/20 °C y luminosidad del 75%). Al cabo de 30 d se trasplantaron a parcelas experimentales en campo, en suelos naturalmente infectados con *R. solani*. La cepa PGPR que mostraba mayor inhibición sobre *R. solani* se identificó como *Pseudomonas fluorescens*. La concentración media de sacarosa de las remolachas inoculadas con esta PGPR fue del 21,95%, un 7,33% mayor respecto a las del ensayo T. No se apreció incidencia alguna de *R. solani* en campo en todos los ensayos. Estos resultados se obtuvieron al final del ciclo productivo. Así, se puede considerar *P. fluorescens* como una PGPR en el cultivo de remolacha azucarera, tanto para el control del *damping off* causado por *R. solani*, como en el aumento de rendimientos productivos en remolacha azucarera. Estos hechos ponen de manifiesto la utilidad de las PGPR como alternativa complementaria en la producción de alimentos en el sector primario, de manera compatible con el desarrollo sostenible, sin perjuicio del medio ambiente ni de la salud de los consumidores.

**H-27****CONTROL BIOLÓGICO DEL AHOGAMIENTO DE PLÁNTULAS DE PEPINO (*Pythium aphanidermatum*) MEDIANTE EL USO DEL HONGO ANTAGONISTA *Penicillium citrinum*****SÁNCHEZ, J., GALLEGU, E.**

Área de Botánica, Departamento de Biología Vegetal y Ecología, Universidad de Almería, Ctra. Sacramento, s/n, 04120 La Cañada (Almería). E-mail: josanche@ual.es

Resulta de interés la búsqueda de alternativas al control químico de las enfermedades de los semilleros que surten de plántulas a las más de 30.000 ha de invernaderos hortícolas de Almería. Con este objetivo, se realizaron diversas pruebas de control biológico del ahogamiento de plántulas de pepino causado por el hongo cromista fitopatógeno *Pythium aphanidermatum* (1,07 ufc/ml de sustrato) mediante tres diferentes concentraciones del hongo hifomiceto antagonista *Penicillium citrinum* (5,06; 0,51 y 0,05 ufc/ml de sustrato). El hongo antagonista *P. citrinum* no provocó fitotoxicidad en las plántulas de pepino. La supervivencia de las plántulas de pepino inoculadas con el hongo fitopatógeno *P. aphanidermatum* mejoró considerablemente con el tratamiento del hongo antagonista *P. citrinum*. Las tres concentraciones del antagonista *P. citrinum* usadas en este ensayo ofrecieron resultados similares en la mejora de la supervivencia de las plántulas de pepino inoculadas con el agente fitopatógeno *P. aphanidermatum* (1,07 ufc/ml de sustrato). La supervivencia de las plántulas de pepino inoculadas en siembra con *P. aphanidermatum* mejoró notablemente con el tratamiento de *P. citrinum* en las aplicaciones en presiembra y siembra. Sin embargo, el tratamiento en postsiembra no ofreció ningún resultado positivo. La mayor concentración de *P. citrinum* mejoró, en mayor medida que las otras, los siguientes parámetros fisiológicos: diámetro del tallo, longitud de la hoja, anchura de la hoja, número de hojas, peso húmedo aéreo, peso húmedo radicular y peso seco aéreo.

**H-28****EFFECTO DE LOS TRATAMIENTOS FUNGICIDAS: SUSTANCIAS QUÍMICAS, ACEITES ESENCIALES, ANTAGONISTAS Y TERMOTERAPIA EN EL DESARROLLO DE *Sphaeropsis sapinea* Y *Fusarium circinatum*. APLICACIÓN DE LOS TRATAMIENTOS EN LA DESINFECCIÓN DE SEMILLAS**

ITURRITXA, E.<sup>1</sup>, MARTINEZ, I.<sup>2</sup>, HEPPE, E.<sup>1</sup>, AITKIEN, J.<sup>3</sup>

<sup>1</sup>NEIKER, Granja Modelo-Arkaute, Apdo. 46, 01080 Vitoria-Gasteiz.

<sup>2</sup>C/ Doctor Ferrán, 16 - 5°C; 48980 Santurtzi (Bizkaia)

<sup>3</sup>The Tree Lab Ltd. Managing Director. Level 5, 1135 Arawa Street. PO Box 293. Rotorua. New Zealand.

Los hongos de chancro *Sphaeropsis sapinea* y *Fusarium circinatum* son los principales agentes causantes de daños forestales en las semillas, viveros y plantaciones de pino insignis.

Entre las principales vías de dispersión de la enfermedad se consideran la transmisión a través de la semilla y planta de vivero. En este estudio se llevan a cabo varios experimentos para determinar el efecto inhibitor del crecimiento y fungicida de: sustancias químicas (20 sustancias y 4 dosis: 1 µg/l, 10 µg/l, 100 µg/l y 1.000 µg/l), aceites esenciales (las sustancias sometidas a estudio proceden de diferentes partes de la planta (hojas, flores, ramas) de ocho especies vegetales, que se corresponden respectivamente con los siguientes compuestos bioquímicos: 1 pineno, cimol borneol, 4 terpineol, geraniol, 1,8 cineol, citrales, acetato de linalino y timol. Estas sustancias se analizan en 5 diluciones: 10, 25, 50, 75 y 100%), antagonistas (2 *Trichoderma*, uno de origen comercial y el otro procedente de plantaciones de *Pinus radiata* en el País Vasco) y tratamientos de termoterapia (4 Tratamientos térmicos, Temperatura 55 grados centígrados, Tiempo de exposición a dicha temperatura: 8, 9, 10, 11 horas).

Los tratamientos se testan para ambos hongos patógenos de chancro *Sphaeropsis sapinea* y *Fusarium circinatum*. Los aislados utilizados en este ensayo fueron obtenidos de plantas infectadas de *Pinus radiata*, con síntomas visibles de la enfermedad. Se utiliza una cepa de *Sphaeropsis sapinea* procedente de una plantación infectada de *Pinus radiata*, morfotipo A, (D01-75) y una cepa de *Fusarium circinatum*, grupo de compatibilidad A, Mat-2 aislada a partir de rama de *Pinus radiata* (F37-02).

Se evalúa su incidencia diferencial en la inhibición del crecimiento de estas dos especies y se ha comprobado, posteriormente, la actividad fungicida o fungiestática de los tratamientos ensayados.

Una vez obtenidos los resultados preliminares de eficacia de los tratamientos, en condiciones de *in vitro*, se selecciona una representación de los mejores tratamientos químicos biológicos y térmicos, para su aplicación sobre semilla. Se estima la eficacia en la desinfección, efecto fungicida y su fitotoxicidad.

Se observan diferencias significativas en la variable analizada: porcentaje de inhibición del área de crecimiento del hongo, con respecto al control sin tratamiento, debidas a la materia activa aplicada, a la dosis y a la especie de hongo inoculada.

## H-29

**RESISTENCIA A FUNGICIDAS INHIBIDORES DE LA BIOSÍNTESIS DEL ERGOSTEROL EN *Podosphaera fusca*****LÓPEZ-RUIZ, F.<sup>1</sup>, PÉREZ-GARCÍA, A.<sup>2</sup>, DE VICENTE, A.<sup>2</sup>, TORÉS, J.A.<sup>1</sup>**<sup>1</sup>Estación Experimental "La Mayora" (CSIC), 29750 Algarrobo-Costa (Málaga). E-mail: tores@eelm.csic.es<sup>2</sup>Grupo de Microbiología y Patología Vegetal-Unidad Asociada a CSIC, Departamento de Microbiología, Universidad de Málaga, 29071 Málaga. E-mail: aperez@uma.es

Los inhibidores de la enzima estero C14 $\alpha$ -demetilasa (DMI) constituyen el grupo más importante dentro de los inhibidores de la biosíntesis del ergosterol (IBE). Estos compuestos representan más del 45% de los productos utilizados en el control del oídio de las cucurbitáceas causado por *P. fusca*. Debido a que la aplicación repetida de fungicidas es el principal método de control de la enfermedad, la exposición continuada a estos compuestos constituye una presión de selección que elimina a los individuos de la población que carecen de resistencia frente a dicho agente selectivo. En consecuencia, el uso prolongado de un fungicida en particular provoca el desarrollo de resistencia en las poblaciones del patógeno y la pérdida de efectividad del compuesto. Con objeto de desarrollar nuevas estrategias que permitan un mejor manejo de la enfermedad y eviten este tipo de situaciones, se evaluaron los niveles de sensibilidad de 50 aislados de *P. fusca* escogidos al azar a tres fungicidas DMI ampliamente utilizados en el control del oídio de las cucurbitáceas, miclobutanil, triadimenol y fenarimol, empleando para ello un método *in vitro* de discos de hoja. A continuación, se establecieron una serie de concentraciones críticas de ensayo con objeto de diferenciar fácilmente entre aislados sensibles y resistentes. Posteriormente, estas concentraciones fueron aplicadas en un ensayo a mayor escala en el que se evaluó la sensibilidad a estos mismos antifúngicos de 250 aislados de *P. fusca* procedentes de las principales áreas productoras de cucurbitáceas de España (Almería, Murcia, Badajoz, Ciudad Real, Córdoba y Valencia). Los datos obtenidos sirvieron para elaborar un mapa de distribución espacio temporal de la resistencia que puede ser empleado en el diseño de campañas de control del hongo. Por otra parte, se está estudiando la relación existente entre los aislados que mostraron los niveles de resistencia más elevados frente a triadimenol y fenarimol, y otros DMI para determinar la existencia de resistencia cruzada. Finalmente, se está llevando a cabo el aislamiento del gen que codifica la enzima estero C14 $\alpha$ -demetilasa, debido a que cambios en la secuencia del mismo han sido asociados a incrementos en los niveles de resistencia de otros hongos a fungicidas DMI.

**H-30****CONTROL DEL DAMPING-OFF DE *Fusarium* EN *Pinus pinea* MEDIANTE EL EMPLEO DEL HONGO ECTOMICORRÍFICO COMESTIBLE *Laccaria laccata*****MACHÓN, P., DíEZ, J.J., ALVES-SANTOS, F.M.**

Dpto. Producción Vegetal y Recursos Forestales, ETSIIAA de Palencia, Campus "La Yutera", Avda. Madrid 57, 34071 Palencia. E-mail: fmalvess@pvs.uva.es

*Fusarium oxysporum* y *Fusarium moniliforme* son dos de las principales especies causantes del *damping-off*, enfermedad que origina importantes pérdidas en los viveros forestales de todo el mundo. Debido a los inconvenientes que presenta su manejo mediante métodos químicos, cada vez cobra mayor importancia el control biológico, sobre todo mediante el empleo de hongos ectomicorrícicos comestibles ya que además pueden suponer un importante valor añadido a la planta producida en vivero.

En este estudio se pretendió evaluar el efecto protector del hongo ectomicorrícico comestible *Laccaria laccata* frente al *damping-off* de pre-emergencia, post-emergencia y tardío en plántulas de *Pinus pinea* así como determinar su capacidad de colonización micorrícica y su influencia en el crecimiento de las plantas. Para ello, se analizó la germinación y supervivencia de plantas recién emergidas y de plantas de 2 meses de *P. pinea* sobre sustrato colonizado por *L. laccata* e inoculado con las dos especies de patógenos. También se estimó el porcentaje de micorrización y se evaluó su influencia en distintos parámetros de las plantas.

En los ensayos de *damping-off* de preemergencia no se apreciaron diferencias significativas con los controles. Los resultados de las inoculaciones con *F. moniliforme* no permitieron calificar a este aislado como patógeno (aunque si resultó patógeno en estudios previos frente a otros hospedadores). *Fusarium oxysporum* produjo daños estadísticamente significativos tanto en los ensayos de *damping-off* de post emergencia como *damping-off* tardío.

Hay que destacar que en los ensayos con *F. oxysporum* los niveles de micorrización fueron muy bajos. En el caso del *damping-off* tardío, estos niveles (2%) no fueron estadísticamente distintos de los controles no micorrizados y no hubo reducción de las lesiones producidas por *F. oxysporum*. Sin embargo, en el caso del *damping-off* de post emergencia un 2,6% de porcentaje de micorrización fue suficiente para reducir de forma significativa los daños producidos por el patógeno aunque no hasta los niveles de los controles sin *Fusarium*. Estos resultados hacen pensar que niveles mínimos de micorrización podrían ser suficientes para una protección efectiva, y que la protección en este caso puede deberse a una respuesta inducida en la planta y no a una competencia ni un efecto de barrera.

**H-31****ESTRATEGIAS PARA MEJORAR EL CONTROL DEL MOTEADO DEL MANZANO**

**BATLLORI, J.LL.<sup>1</sup>, LLORENTE, I.<sup>2</sup>, VILARDELL, P.<sup>3</sup>, VILARDELL, A.<sup>2</sup>, VILAJELIU, M.<sup>3</sup>, MONTESINOS, E.<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Servei Sanitat Vegetal DARP, Aiguamolls Empordà, 17486 Castelló Empúries (Girona).

<sup>2</sup>Institut de Tecnologia Agroalimentària-CeRTA-CIDSAV, Universitat de Girona, Avda Lluís Santaló s/n, 17071 Girona.

<sup>3</sup>IRTA-Mas Badia, Mas Badia, 17134 La Tallada d'Empordà (Girona)

El moteado del manzano está causado por el hongo ascomiceto *Venturia inaequalis* (anamorfo *Spilocea pomi*) y es una de las enfermedades de mayor importancia económica del cultivo en numerosas zonas frutícolas europeas. El modelo de Mills ha sido el más usado en las zonas endémicas para guiar los tratamientos fungicidas. Actualmente, se utilizan otros modelos predictivos que incorporan además la fenología del hongo y la del cultivo logrando aumentar la eficacia de control de la enfermedad con menor número de aplicaciones fungicidas. El estudio consistió en determinar durante tres años consecutivos la curva de emisión de ascosporas mediante capturador Burkard, comparar el número de riesgos de infección y evaluar la efectividad en el control de la enfermedad al realizar los tratamientos según los modelos de Mills, RIMpro y A-Scab, los dos últimos basados en estimar el riesgo de enfermedad a partir de las emisiones de ascosporas. Paralelamente se evaluaron métodos para reducir el inóculo primario mediante procedimientos mecánicos consistentes en retirar los restos de hojas y frutos presentes en la plantación durante el invierno y métodos biológicos con aplicaciones de *Trichoderma* spp. Los resultados obtenidos mostraron coincidencia en los momentos de liberación de ascosporas entre las curvas observadas y las predichas por los modelos RIMpro y A-Scab. Los métodos utilizados para reducir el inóculo primario mostraron buena eficacia evaluados sobre microparcelas pero no se obtuvieron resultados significativos a nivel de campo en la reducción de la incidencia de la enfermedad.

Financiado por el proyecto INIA RTA03-56.



**H-32****EVALUACIÓN DE NUEVAS ESTRATEGIAS PARA MEJORAR LA EFICACIA EN EL CONTROL DE *Stemphylium vesicarium* EN PERAL****LLORENTE, I.<sup>1</sup>, VILARDELL, A.<sup>1</sup>, VILARDELL, P.<sup>2</sup>, MONTESINOS, E.<sup>1</sup>**<sup>1</sup>*Institut de Tecnologia Agroalimentària-CeRTA-CIDSAV, Universitat de Girona, Avda Lluís Santaló s/n, 17071 Girona. E-mail: Isidre.llorente@udg.es*<sup>2</sup>*IRTA-Mas Badia, Mas Badia, 17134 La Tallada d'Empordà (Girona).*

La estemfiliosis causada por el hongo deuteromiceto *Stemphylium vesicarium* es una de las enfermedades de mayor importancia económica en el cultivo del peral en determinadas zonas frutícolas europeas. La utilización del modelo BSPcast para guiar los tratamientos fungicidas permite un ahorro entre el 20 y el 70% de aplicaciones en comparación con la estrategia estándar basada en una cadencia fija. La eficacia de control, en ambos casos, puede oscilar entre el 45% y el 95% de reducción de la enfermedad en función de su presión. Con el objetivo de incrementar la eficacia de control utilizando el modelo BSPcast se ensayaron diferentes estrategias. En el modelo BSPcast fueron incorporados nuevos conocimientos sobre el efecto de la humedad relativa y la duración de las interrupciones de la humectación. Así mismo se utilizó como umbral de acción un índice diario (R) en vez del acumulado durante tres días (CR). Se comparó la eficacia de control de la enfermedad utilizando el modelo BSPcast respecto al mismo modelo modificado. Se concluye que la utilización de un índice de riesgo diario no mejora la eficacia de control. Por otra parte se evaluaron métodos biológicos y mecánicos de reducción del inóculo primario con el objetivo de reducir la presión de enfermedad y mejorar así el control de la misma con las aplicaciones de fungicidas guiadas con el modelo BSPcast. Los métodos mecánicos consistieron en retirar los restos de hojas y frutos presentes en la plantación durante el invierno y el método biológico en aplicaciones de *Trichoderma* spp. Los resultados obtenidos muestran una eficacia parcial de estos dos métodos en la reducción de la enfermedad.

Financiado por el proyecto INIA RTA03-56.

**H-33****CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DEL GENERO *Penicillium*.  
MONITORIZACIÓN DEL AGENTE DE CONTROL BIOLÓGICO *Penicillium  
frequentans*****REDONDO, C., CUBERO, J., MELGAREJO, P.**

*Dpto. Protección Vegetal, Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria, SGIT-INIA, Crta. de la Coruña, Km 7,5, 28040 Madrid. E-mail: rcasero@inia.es*

*Penicillium frequentans* (ATCC nº 66108) es un hongo filamentoso que se utiliza como agente de control biológico (ACB) contra la podredumbre parda de los frutales de hueso causada por *Monilinia* spp. El registro de un producto basado en un agente de control biológico requiere que su identidad y su estabilidad sean determinadas con precisión

En este trabajo nos planteamos en primer lugar, lograr un método de caracterización molecular del género *Penicillium*, que aparece frecuentemente como saprofito en nuestro patosistema, que nos permitiese identificar de forma inequívoca a la especie *P. frequentans*. Posteriormente, nos propusimos obtener marcadores específicos para la cepa de este hongo utilizada en el biocontrol de la podredumbre parda de los frutales de hueso.

*Penicillium* es uno de los géneros fúngicos que presenta mayor número de especies. Conseguir un método preciso y fiable de identificación y de caracterización taxonómica es por tanto especialmente interesante para las especies y aislados del género. Con este fin, una colección de 33 cepas correspondientes a distintas especies del género *Penicillium* fue caracterizada por diferentes técnicas moleculares. La clasificación obtenida mediante el análisis de las secuencias nucleotídicas correspondientes a los espacios intergénicos entre las subunidades ribosomales de estas cepas no difirió de la obtenidas tras el análisis de los perfiles de bandas obtenidos después de la amplificación de secuencias repetidas.

Utilizando las técnicas desarrolladas fue posible diferenciar la especie *P. frequentans* del resto de especies del género *Penicillium*, pudiendo distinguirse incluso de aquellas que están muy próximas filogenéticamente como *P. thomii* o *P. adametzoides* y que por sus características macro y microscópicas son difícilmente identificables.

Los marcadores específicos diseñados para identificar la cepa de biocontrol (ATCC nº 66108), han permitido la monitorización el agente de biocontrol dos años después de su aplicación en huertos experimentales.

**H-34****CONTROL MEDIANTE TEBUCONAZOL DE LA PODREDUMBRE BLANCA (*Sclerotium cepivorum*) EN DOS CULTIVARES DE AJO Y DOS FECHAS DE SIEMBRA****CABRERA, J., LÓPEZ-BELLIDO, F.J., RECIO, D.**

*E.U.I.T.A. Universidad de Castilla-La Mancha, Ronda de Calatrava, 7, 13071 Ciudad Real.  
Email: Javier.Cabrera@uclm.es*

La podredumbre blanca, causada por *Sclerotium cepivorum* Berk., es una de las enfermedades más importantes del cultivo del ajo, que concentra aproximadamente el 51% de la producción nacional en Castilla-La Mancha. Para su control, se han obtenido excelentes resultados mediante la inmersión de dientes de siembra en una disolución de tebuconazol, reduciéndose drásticamente la incidencia de la enfermedad y aumentando la rentabilidad neta del cultivo en un 116% respecto de las parcelas testigo. Para la integración de otras medidas de control, se ha planteado el estudio de la influencia en la incidencia de la enfermedad de la modificación de la fecha de siembra y evolución del estado fenológico del cultivo, así como del uso de dos cultivares distintos de ajo, y la confirmación de la eficacia del uso de tebuconazol en el control de la enfermedad.

El diseño experimental de campo fue triple factorial con cuatro repeticiones combinando los siguientes tratamientos: dos fechas de siembra (diciembre y enero), dos cultivares de ajo (Blanco y Morado de Las Pedroñeras) y dos tratamientos (testigo y tebuconazol). Previamente a la siembra se determinó la densidad de inóculo en la parcela experimental, y durante el cultivo se evaluó periódicamente parámetros fisiológicos y de incidencia de la enfermedad, así como la producción y calidad de la misma para cada tratamiento.

Los resultados obtenidos indican un nivel de infestación de la parcela experimental de 16,8 esclerocios viables/kg de suelo; no hubo diferencias significativas en el progreso epidémico entre las dos fechas de siembra, ni entre los dos cultivares, aunque sí las hubo en la producción de ambas variables; el uso de tebuconazol redujo significativamente el porcentaje de plantas muertas (3,2%) respecto a las parcelas testigos (11,6%), lo que significó una mayor rentabilidad de las parcelas tratadas con tebuconazol, debido a una producción significativamente mayor. Se comprobó un alto índice de correlación entre la bulbificación y el progreso epidémico.

## H-35

**AGRESIVIDAD DEL PATOGENO Y EFICACIA DEL BIOCONTROL DE PODREDUMBRES FÚNGICAS EN POSTCOSECHA MEDIANTE *Pantoea agglomerans***

**FRANCÉS, J., BONATERRA, A., MORENO, M.C., CABREFIGA, J., BADOSA, E., MONTESINOS, E.**

*Instituto de Tecnología Agroalimentaria-CeRTA-CIDSAV, Universidad de Girona, Campus Montilivi, 17071 Girona. E-mail: emilio.montesinos@udg.es*

En podredumbres de postcosecha, la eficacia del agente de biocontrol (BCA) depende de factores como el mecanismo de actuación y la eficiencia de la cepa utilizada, la agresividad del patógeno, la susceptibilidad del huésped y las condiciones de conservación.

En este trabajo se estudió la eficacia de cepas de *Pantoea agglomerans* con el mismo mecanismo de acción, frente a distintos patosistemas en postcosecha. También se estudió la relación dosis-efecto entre cinco patógenos (*Rhizopus stolonifer*, *Botrytis cinerea*, *Penicillium expansum*, *Monilinia laxa* y *Colletotrichum acutatum*) y dos cepas de *P. agglomerans*, en los niveles de enfermedad obtenidos en seis tipos de frutas diferentes (manzana, pera, nectarina, melocotón, fresa y aceituna). Además de los resultados propios con la cepa EPS125, se utilizaron datos publicados por otros investigadores, con la cepa CPA-2 de *P. agglomerans*.

Los resultados obtenidos se ajustaron a un modelo matemático de saturación hiperbólica, descrito por Montesinos y Bonaterra (1996) que proporcionó información sobre la dosis efectiva mediana ( $DE_{50}$ ) de cada BCA ( $K_z$ ) y patógeno ( $K_x$ ). También se determinó la relación entre ( $K_z$ ) y ( $K_x$ ), que proporciona información sobre el número de células de BCA necesarias para inactivar una espora de hongo. Los valores de  $DE_{50}$  de los patógenos se situaron entre 1 y 475 esporas por punto de inoculación (PI) y los de  $DE_{50}$  de las cepas de BCAs entre 205 y 30.000 ufc/PI. La eficiencia de las cepas de *P. agglomerans* se estimó mediante el cociente entre ( $K_z$ ) y ( $K_x$ ). Los valores observados se situaron entre 7 y 25.000 ufc/espora, indicando valores bajos altas eficiencias. Se observó una correlación inversa significativa entre la eficiencia de biocontrol del BCA y la  $DE_{50}$  de los patógenos en los diferentes huéspedes, indicando que cuanto mayor es la agresividad del patógeno más baja es la eficiencia del BCA.

## H-36

**FITOANTICIPINAS DE *Citrus* sp. IMPLICADAS EN LOS MECANISMOS DE DEFENSA FRENTE A *Penicillium digitatum* Y *Alternaria alternata* pv. *citri***

**ORTUÑO, A.<sup>1</sup>, GÓMEZ, P.<sup>1</sup>, GONZÁLEZ, A.<sup>1</sup>, MARTÍNEZ, D.<sup>1</sup>, PORRAS, I.<sup>2</sup>, GARCÍA-LIDÓN, A.<sup>2</sup>, DEL RÍO, J.A.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Dpto. Biología Vegetal, Facultad de Biología, Universidad de Murcia, Campus de Espinardo, 30100 Murcia. E-mail: aortuno@um.es

<sup>2</sup>Departamento de Citricultura, Instituto Murciano de Investigación y Desarrollo Agrario y Alimentario (IMIDA), 30150 La Alberca (Murcia). E-mail: ignacio.porras@carm.es

Los hongos de los géneros *Penicillium* y *Alternaria* son responsables de importantes pérdidas en los cítricos tanto en post como pre-cosecha. Para prevenir el desarrollo de estos patógenos y reducir las pérdidas comerciales que se producen durante el almacenamiento y transporte de los frutos, se utilizan tratamientos con fungicidas químicos. Sin embargo, tales tratamientos pueden producir serios problemas con los residuos en el fruto, así como favorecer la aparición de cepas resistentes al fungicida. Una estrategia alternativa en la lucha frente a estos patógenos sería la alteración de los mecanismos de defensa natural de la planta. En este sentido, aunque escasas, existen algunas aportaciones acerca del posible papel que los compuestos fenólicos puedan desempeñar como posibles fitoanticipinas. El género *Citrus* contiene una serie de flavanonas y flavonas hidroxiladas y polimetoxiladas, las cuales son características de cada especie, y se localizan principalmente en la piel de los cítricos. Entre dichos compuestos cabe mencionar, hesperidina, naringina, sinensetina, tangeretina, quercetogetina, nobiletina, heptametoxiflavona, y hexametoxiflavona. En esta comunicación mostramos los resultados obtenidos sobre la capacidad antifúngica de los diferentes flavonoides presentes en *Citrus* sobre *Penicillium digitatum* y *Alternaria alternata* pv. *citri*. Los estudios realizados *in vivo* e *in vitro* revelan que tanto las flavanonas como las flavonas polimetoxiladas presentes en los frutos de diferentes especies cítricas reducen el crecimiento micelial de *Penicillium digitatum* y *Alternaria alternata* pv. *citri*. Mediante microscopia electrónica de barrido y de transmisión se observan cambios ultraestructurales en las hifas de los hongos, como son paredes celulares más engrosadas, menor densidad citoplasmática, grandes vacuolas con un contenido opaco, pequeñas vesículas secretoras bordeando la membrana plasmática, así como una inhibición en la esporulación. Estos resultados revelan que determinados flavonoides cítricos están implicados en los mecanismos de defensa contra hongos patógenos, pudiendo ser considerados como fitoanticipinas.

Agradecimientos: Proyecto AGR/8030/05 Consejería de Agricultura, Agua y Medio Ambiente de la Región de Murcia.

## H-37

**ANÁLISIS DE INCIDENCIA DE HONGOS DURANTE LA CONSERVACIÓN EN VARIEDADES DE MANZANA DE LA COMARCA DEL BIERZO (LEÓN)**

**GUERRA, M.<sup>1</sup>, VALENCIANO, J.B.<sup>1</sup>, CASQUERO, P.A.<sup>1</sup>, LORENZANA, A.<sup>1,2</sup>, CAMPELO, M.P.<sup>2</sup>, MARCOS, M.F.<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>*Departamento de Ingeniería Agraria, Universidad de León, Avda. de Portugal, 41, 24071 León.*

<sup>2</sup>*Laboratorio de Diagnóstico, Fundación Chicarro-Canseco-Banciella, E.S.T.I.A. Universidad de León, Avda. de Portugal, 41, 24071 León.*

El manzano es un cultivo importante en la comarca de El Bierzo (León) y fue reconocido en el año 1999 por la Junta de Castilla y León mediante la Denominación de Origen (D.O.) "Manzana Reineta del Bierzo", figura de calidad que protege a las variedades Reineta Blanca y Reineta Gris, tradicionales en esta zona y con unas cualidades físicas y organolépticas especiales. El almacenamiento de los frutos durante varios meses los expone al ataque de numerosos hongos causantes de pudriciones que los deprecia comercialmente. En este trabajo se presentan los resultados obtenidos en la evaluación de la incidencia de patógenos de postcosecha en las dos variedades acogidas a la mencionada D.O. y también en la Golden Delicious. Se analizaron un total de 200 frutos por variedad y tratamiento. La mitad de las manzanas Reineta de cada tipo fueron duchadas después de la recolección con una mezcla de  $\text{CaCl}_2$  (2%), imazalil 7,5% + iprodiona 10% (0,5%) y difenilamina 31% (0,3%), y el resto no recibió ningún tratamiento. En la caso de la variedad Golden todos los frutos fueron tratados con la mezcla de  $\text{CaCl}_2$  (2%), imazalil 7,5% + iprodiona 10% (0,5%) y etoxiquina 72% (0,15%). El ensayo se realizó en cámara manteniendo los frutos nueve meses a una temperatura de 1 °C y humedad relativa del 95% ("frío normal"). Estos se inspeccionaron mensualmente, retirándose aquellos que presentaban pudriciones e identificándose en laboratorio los hongos implicados. Los primeros frutos afectados en todas las variedades fueron observados a partir del tercer mes de almacenamiento. El porcentaje acumulado de podredumbres por variedades (sin tratar/tratada) fue: Reineta Blanca (16,14%/0,36%), Reineta Gris (7,68%/2,68%) y Golden (-/2,46%). Los géneros identificados y el porcentaje sobre el total de muestras analizadas fueron en Reineta Blanca *Cladosporium* (77%), *Alternaria* (35%), *Penicillium* (23%), *Stemphylium* (19%) y *Acremonium* (4%), y en Reineta Gris *Cladosporium* (42%), *Alternaria* (33%), *Penicillium* (25%), *Botrytis* (8%), *Monilia* (8%) y *Trichoderma* (8%). En dos frutos de la variedad Golden se detectó la presencia de *Cladosporium* y en uno *Trichoseptoria*. Es importante destacar que el aumento de podredumbre en Reineta Blanca no tratada se dispara a partir del quinto mes, observándose igualmente un incremento, aunque no tan acusado, a partir del cuarto mes en Reineta Gris.

Este trabajo ha sido financiado por la Universidad de León (ULE 2004-08)

## H-38

**DESARROLLO DE UN TRATAMIENTO POR TERMOTERAPIA CON AGUA CALIENTE PARA EL CONTROL DE *Phaeomoniella chlamydospora* Y *Phaeoacremonium aleophilum* EN MATERIAL DE PROPAGACIÓN DE VID**

**ARMENGOL, J.<sup>1</sup>, GRAMAJE, D.<sup>1</sup>, SALAZAR, D.M.<sup>2</sup>, LÓPEZ-CORTÉS, I.<sup>2</sup>, GIMÉNEZ-JAIME, A.<sup>1</sup>, CRESPO, A.<sup>1</sup>, ALBARÁÑEZ, E.H.<sup>1</sup>, GARCÍA-JIMÉNEZ, J.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Instituto Agroforestal Mediterráneo, Universidad Politécnica de Valencia, Camino de Vera s/n, 46022 Valencia. Email:jarmengo@eaf.upv.es

<sup>2</sup>Departamento de Producción Vegetal, Universidad Politécnica de Valencia, Camino de Vera s/n, 46022 Valencia.

Los tratamientos por termoterapia con agua caliente han sido citados como un método prometedor para el control de *Phaeomoniella chlamydospora* y *Phaeoacremonium aleophilum* en material de propagación de vid. Hasta la fecha, la mayoría de protocolos descritos consisten en baños a 50 °C durante 30 minutos. En este trabajo se evaluaron las condiciones adecuadas para la aplicación de termoterapia en patrones y plantas injertadas, utilizando un amplio rango de temperaturas. Los patrones (41-B, 161-49C, 110-R, 140-Ru y 1103-P) y plantas injertadas (Tempranillo/110-R, Merlot/110-R, Bobal/1103-P y Tempranillo/161-49C) se sumergieron en un baño de agua a temperatura controlada a 50 °C, 51 °C, 52 °C, 53 °C ó 54 °C durante tres intervalos de tiempo: 30, 45 ó 60 minutos. Cuatro grupos de 10 plantas con sus respectivos controles se trataron para cada temperatura y tiempo, y fueron plantados en un campo donde nunca se había cultivado vid mediante un diseño en bloques al azar. Las prácticas culturales se realizaron de acuerdo a las pautas habituales seguidas en vivero. Al final del periodo de crecimiento, se evaluaron la brotación, y la longitud y peso de los sarmientos. En un segundo experimento, se estudió el efecto de la temperatura en el control de *P. chlamydospora* y *P. aleophilum*. Para ello, se inocularon plantas sanas del patrón 110-R con suspensiones de conidios (10<sup>6</sup> conidios/ml) de un aislado de cada patógeno. Estas plantas se sometieron a los tratamientos indicados anteriormente. Cuatro grupos de 10 plantas con sus respectivos controles se trataron para cada temperatura, tiempo y patógeno. Se realizaron aislamientos inmediatamente después de los tratamientos cortando secciones (10cm longitud) de la zona basal de las plantas. Éstas se plantaron y evaluaron tal como se indicó anteriormente. Los resultados demostraron que los patrones y plantas injertadas pueden tolerar temperaturas de hasta 53°C sin una reducción significativa en la brotación y crecimiento. *P. chlamydospora* se mostró más sensible que *P. aleophilum* a las temperaturas ensayadas para todos los periodos de tiempo. Se obtuvieron altos porcentajes de control para ambos patógenos a temperaturas por encima de 51 °C. Estos resultados suponen un avance en el objetivo de desarrollar un tratamiento efectivo de termoterapia con agua caliente para controlar la enfermedad de Petri en material de propagación en viveros de vid.

## H-39

**ESTUDIO PRELIMINAR DEL EFECTO DE LA GALLINAZA SOBRE LA VIABILIDAD DE LOS PROPÁGULOS DE *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi*****VILLAMAR-FERNÁNDEZ, L.<sup>1</sup>, MELERO-VARA, J.M.<sup>2</sup>, PRADOS-LIGERO, A.M.<sup>1</sup>**<sup>1</sup>CIFA "Alameda del Obispo", IFAPA, Apdo 3092, 14080 Córdoba. E-mail: [anam.prados.ext@juntadeandalucia.es](mailto:anam.prados.ext@juntadeandalucia.es).<sup>2</sup>IAS-CSIC, Apdo 4084, 14080 Córdoba. E-mail: [cs9mevaj@uco.es](mailto:cs9mevaj@uco.es).

Varios los autores propugnan el uso de enmiendas orgánicas en el control de agentes fitopatógenos del suelo. Se propuso el aporte de gallinaza seguido de la solarización del suelo realizada en invernadero cerrado, como método de control integrado de la FV del clavel. En un invernadero de plástico situado en el CIFA de Chipiona (Cádiz) se enterraron, a 15, 30 y 45 cm, bolsas de nylon conteniendo 20g de suelo infestado, independientemente, con los aislados monoconídicos de *Fod* A7 y G1. Se compararon los tratamientos: 1: aporte de gallinaza fresca (menos de tres meses de madurez) seguida de solarización o no, 2: aporte de gallinaza madura (más de tres meses de madurez) seguida de solarización o no, y 3: testigo sin aporte de enmienda orgánica seguida de solarización o no. Para la solarización se consideraron dos tipos de polietileno transparente: plástico térmico antigoteo, y plástico barrera (VIF). El diseño estadístico fue en parcelas sub-divididas con tres bloques, donde el factor principal fue el aporte de enmienda orgánica, el secundario el tipo de plástico y el terciario el aislado. A partir de los 15 días desde el establecimiento del experimento se extrajeron muestras secuenciales (1, 5, 9, 12, 16, 20, 24, 29 y 36 días). Las muestras fueron desecadas a temperatura ambiente en el laboratorio. Posteriormente, se tomó 1 g/muestra que se aportó a erlenmeyer conteniendo 150 ml de AA (0,1%). De cada solución se aportó 1 ml/ placas Petri conteniendo Agar-V8. Se consideraron la solución madre y la dilución 10<sup>-1</sup>. Las placas se incubaron a 24±1 °C, 2 días en oscuridad y 3 días más bajo luz, con ciclos de 12 horas. Posteriormente, se realizó el conteo de ufc de *Fod*. Se consideró como inóculo inicial el número de propágulos de *Fod* al inicio de los experimentos. El número de propágulos de *Fod*, para cada una de las muestras extraídas se expresó en porcentaje respecto del inóculo inicial del aislado correspondiente. Se realizaron ANOVAs para cada una de las extracciones según profundidades. Al final del experimento, a cualquiera de las profundidades consideradas, el aislado A7 fue menos sensible que G1 a cualquiera de los tratamientos ensayados. A 15 y 30 cm, los tratamientos con cualquiera de los plásticos empleados fueron mejores que los controles sin cubierta. A dichas profundidades no hubo diferencias entre las enmiendas empleadas, mientras que a 45 cm fue el aporte de gallinaza fresca el que redujo más la densidad de propágulos de *Fod* en el suelo.



## H-40

**MUPLICACIÓN DE *Fusarium oxysporum* f.sp. *dianthi* EN DISTINTOS SUSTRATOS Y EFECTO DE LA TEMPERATURA EN LA VIABILIDAD DEL PATÓGENO****VILLAMAR-FERNÁNDEZ, L.<sup>1</sup>, PRADOS-LIGERO, A.M.<sup>1</sup>, MELERO-VARA, J.M.<sup>2</sup>**<sup>1</sup>CIFA "Alameda del Obispo", IFAPA, Apdo 3092, 14080 Córdoba. E-mail: [anam.prados.ext@juntadeandalucia.es](mailto:anam.prados.ext@juntadeandalucia.es).<sup>2</sup>IAS-CSIC, Apdo 4084, 14080 Córdoba. E-mail: [cs9mevaj@uco.es](mailto:cs9mevaj@uco.es).

Entre los hongos que afectan al cultivo del clavel, *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* (*Fod*) es el que mayores pérdidas de cosecha ocasiona. Se han descrito muchos métodos de incremento de *Fusarium oxysporum* en sustratos artificiales. Con objeto de determinar el más adecuado para el incremento de *Fod*, se han ensayado 6 tipos de sustrato: 1) limo, 2) arena:limo (2:1, v), 3) arena:limo (9:1, v), 4) arena:limo:turba (2:1:2, v), 5) talco, 6) arena:harina de avena:limo (2:1:1), que se infestaron por separado con tres aislados monoconídicos de *Fod* (A4, A7 y G1). Se incubaron a 24 °C en oscuridad durante 28 días, y se tomaron muestras semanales para determinar el número de ufc/g de sustrato. De cada uno de los sustratos se suspendió 1 g en 150 ml de agar-agua y se vertieron alícuotas en placas con medio semiselectivo, que se incubaron a 24 °C, 2 días en oscuridad y 3 días con fotoperiodo de 12 h. Mediante observación al microscopio se determinó, para cada una de las muestras, la proporción de conidias o de clamidosporas formadas en cada uno de los sustratos. Al cabo de cuatro semanas sólo se detectaron clamidosporas. Con el sustrato arena:limo:turba se obtuvo la mayor densidad de inóculo, pero el número de propágulos aumentó durante el proceso de desecación de las muestras. En las combinaciones de arena:limo se produjo más inóculo que con el limo sólo. La harina de avena estimuló el crecimiento de bacterias que impidieron el desarrollo de *Fod*. Se estudió el efecto de la temperatura en la viabilidad de los propágulos de *Fod* utilizando sustrato arena:limo (2:1,v) inoculado independientemente con dos aislados monoconídicos de *Fod*: A4 y A7. A los 28 días se tomaron alícuotas de 150 g y se establecieron los siguientes tratamientos: 1) cubierto con plástico térmico antigoteo (CP-129, Repsol) y 2) control no cubierto. Ambos se sometieron a 39 °C, 41 °C y 43 °C durante 3 semanas y se muestrearon semanalmente para determinar el número de ufc/g de sustrato. El diseño fue totalmente al azar con cuatro repeticiones. A los 7 días del inicio del experimento, se anularon (A4) o se redujeron a niveles del 0,02% (A7) los propágulos de *Fod* en el tratamiento cubierto con plástico, erradicándose este aislado a los 14 días de tratamiento, a cualquiera de las temperaturas ensayadas. A la finalización del experimento, el tratamiento sin plástico no erradicó al patógeno a ninguna de las temperaturas ensayadas.

**H-41****SUSTRATOS ORGÁNICOS ALTERNATIVOS A LAS TURBAS PARA EL CONTROL DE LA FUSARIOSIS DE MELÓN A NIVEL DE SEMILLERO****BERNAL, A., NAVARRO, N., LÓPEZ-MONDÉJAR, R., MARTÍNEZ-MEDINA, A., PASCUAL, J.A.***Departamento de Conservación de Suelo, Agua y Manejo de Residuos Orgánicos (CEBAS-CSIC) Aptdo 164, 30100 Espinardo (Murcia).*

La fusariosis de melón es un problema ampliamente distribuido en el sector agrícola español, en especial en semillero, donde las condiciones propias necesarias para la germinación y desarrollo de plántula (temperatura, humedad, proximidad de planta, uso de turba, sustratos orgánicos no supresivos, etc) provocan un aumento en la severidad de esta enfermedad.

El abordaje a este grave problema, a nivel de semillero, pasa por la búsqueda de sustratos orgánicos con capacidad supresiva frente *Fusarium oxysporum*, agente causante de esta enfermedad. En bibliografía, existen numerosas citas referentes al efecto supresivo de composts; sin embargo, la peculiaridad de semillero dificulta la utilización generalizada de estos.

Por ello, el objetivo de este estudio fue el realizar un estudio de potenciales materiales orgánicos que por sus características puedan cumplir con los mínimos de calidad exigidos en semillero, y que además tuviesen el valor añadido de ser supresivos. De este estudio, se seleccionó, el residuo de la industria de manipulación de cítricos, los cuales se sometieron a un proceso de bioestabilización mediante compostaje por si solos y en combinación con lodo de depuradora.

Una vez bioestabilizados mediante compostaje se realizó un estudio exhaustivo tanto a nivel *in vivo* como *in vitro* para determinar su potencial utilización como sustratos orgánicos con capacidad de controlar la fusariosis de melón en semilleros.

En los experimentos realizados *in vitro*, se demostró que estos eran candidatos a ser utilizados como sustratos orgánicos supresores y que el componente principal de control de los mismos radicaba en la fracción biológica, si bien el compost sin adición de yodo presentaba una mayor acción biopesticida frente a *Fusarium oxysporum*. Los dos composts analizados mostraban diferencias tanto en el número de microorganismos presentes en ellos, como en su diversidad. Así, el compost sin adición de lodo presentaba un menor número de microorganismos (hongos y bacterias, ufc), pero una mayor diversidad (medida por PCR-DGGE).

En los experimentos *in vivo*, se demostró la reducción de la incidencia del patógeno, respecto a las turbas tradicionales, demostrándose que la causa principal se debe de atribuir a la microbiota del compost, posiblemente por interacciones de micoparasitismo y/o antibiosis, y a una resistencia sistémica inducida.

## H-42

**CONTROL DE *Olpidium bornovanus* MEDIANTE EL MOJANTE AGRAL EN CULTIVO SIN SUELO**

**GUIRADO, M<sup>a</sup>.L., RODRÍGUEZ, J.M., SERRANO, Y., SÁEZ, E., GÓMEZ, J.**

*Centro de Investigación y Formación Agraria "La Mojonera-La Cañada", I.F.A.P.A., Autovía del Mediterráneo, Sal. 420, Paraje San Nicolás, 04745 La Mojonera (Almería). E-mail: micocifa@arrakis.es*

El Chytridiomiceto *Olpidium bornovanus* (= *O. radiale*) además de ser vector del virus de las manchas necróticas del melón (MNSV), es patógeno sobre melón y sandía, causándoles necrosis del sistema radicular y, en ocasiones, mermas de cosecha. El virus persiste en los esporangios de resistencia o quistes del hongo, que se conservan en el suelo durante varios años. Para el control de ambos patógenos sería necesaria la eliminación de los quistes del hongo de un suelo o sustrato contaminado o evitar la infección de las plantas por las zoosporas liberadas de los quistes.

Los objetivos pretendidos con el experimento realizado fueron: evaluar la eficacia del tratamiento de la solución nutritiva empleada para el riego con 90 ppm de Agral en el control de *O. bornovanus* y de MNSV en melón y evaluar una posible fitotoxicidad en nuestras particulares condiciones de cultivo.

El experimento se realizó en un invernadero multitúnel de 500 m<sup>2</sup> con cubierta de policarbonato, dotado de ventilación cenital y lateral automáticas. La siembra directa de las semillas de melón cv. Regal se realizó sobre sacos de perlita "B12" el 18 de marzo de 2003. Con un diseño experimental en bloques al azar con cuatro repeticiones, nueve sacos de cultivo por parcela elemental y utilizando seis plantas por saco. Se ensayaron cuatro tratamientos consistentes en los cambios de la solución nutritiva siguientes: solución nutritiva (SN), solución nutritiva tratada con Agral (SNT), solución nutritiva contaminada con *O. bornovanus* (SNC) y solución nutritiva contaminada con *O. bornovanus* y tratada con Agral (SNCT). Para ello se utilizaron cuatro depósitos de 3 m<sup>3</sup> de capacidad donde se preparó la solución final de riego para cada uno de los tratamientos. La adición de Agral, en los tratamientos SNT y SNCT, se realizó cada vez que se preparó la solución nutritiva. La contaminación de las soluciones nutritivas con *O. bornovanus*, en los tratamientos SNC y SNCT, se realizó incorporando semanalmente a cada depósito, una concentración de 10<sup>8</sup> zoosporas y, de forma continuada, el agua de drenaje procedente de dos sacos, ajenos al ensayo, que contenían plantas contaminadas con el hongo. Durante el experimento se anotaron los síntomas y a su fin, se determinó la producción, el número de frutos recolectados, se observaron las raíces para la detección de *O. bornovanus* y se analizaron los hipocotilos de las plantas para la detección de MNSV.

*O. bornovanus* se observó en las raíces de las plantas del 88,9% de los sacos de sustrato y MNSV se detectó en el 4,6% de las plantas del tratamiento SNC. Ni el hongo ni el virus se detectaron en los restantes tratamientos. Aunque la producción de las plantas estuvo interferida por la presencia de colapso, ésta fue significativamente menor en las parcelas regadas con SNT con respecto a la regada con SN. Los resultados obtenidos indican el control del mojante Agral sobre *O. bornovanus* y MNSV y su efecto fitotóxico sobre el cultivo.

**H-43****EFICACIA DE LA DESINFECCIÓN DEL SUSTRATO CONTRA *Olpidium bornovanus* Y MNSV**

**GUIRADO, M<sup>a</sup>.L., RODRÍGUEZ, J.M., SERRANO, Y., SÁEZ, E., GÓMEZ, J.**

*Centro de Investigación y Formación Agraria "La Mojonera-La Cañada", I.F.A.P.A., Autovía del Mediterráneo, Sal. 420, Paraje San Nicolás, 04745 La Mojonera (Almería). E-mail: micocifa@arrakis.es*

El virus de las manchas necróticas del melón (MNSV), también conocido como "virus del cribado del melón", causa una grave enfermedad en este cultivo en invernadero. El virus es transmitido de forma natural por el hongo *Olpidium bornovanus* (= *O. radicale*) y se conserva en el suelo durante años en los esporangios de resistencia de éste. Por este motivo será necesario erradicar de un suelo o sustrato contaminado este tipo de estructuras de conservación para prevenir la virosis en años posteriores.

El objetivo de los experimentos realizados fue estudiar el efecto de diferentes métodos de desinfección del sustrato frente a *O. bornovanus*. Los experimentos se realizaron en el C.I.F.A. de Almería, durante los veranos de 2001 y 2002, en invernaderos tipo túnel y multitúnel, respectivamente, utilizando como sustrato sacos de perlita contaminados por el hongo y por MNSV.

En el año 2001 se ensayaron los siguientes tratamientos: S-30: solarización durante 30 días; S-60: solarización durante 60 días; SS: sin solarizar y DH: desinfección con hipoclorito sódico (3.000 ppm). Una vez acabado el periodo de solarización se sembraron semillas de melón cv. Gallicum en los sacos de cultivo. El experimento se completó con dos tratamientos más, utilizando sacos nuevos; uno de ellos, se inoculó con un aislado del hongo portador del virus MNSV (testigo inoculado), y el otro tratamiento no se inoculó (testigo no inoculado). Durante el cultivo, se realizaron semanalmente observaciones de las plantas para detectar la posible aparición de síntomas. En el año 2002 se ensayaron tres tratamientos: S-30: solarización durante 30 días; S-60: solarización durante 60 días y SS: sin solarizar. Al término del periodo de 60 días de solarización se tomaron muestras de sustrato que se utilizaron para realizar un bioensayo. Éste se llevó a cabo en contenedores de 300 ml que contenían una mezcla de vermiculita y del sustrato muestreado, y en los que se sembraron semillas de sandía cv. Sugar Baby. En ambos experimentos se utilizó un diseño de cuatro bloques al azar. Durante los cultivos, se registraron las temperaturas de los sacos solarizados y no solarizados, así como la temperatura y humedad ambiental del interior de los invernaderos. Cuando finalizaron los experimentos, se analizaron las plantas por serología para detectar MNSV y se observaron sus raíces mediante microscopio óptico para detectar *O. bornovanus*.

Los resultados obtenidos durante el ensayo de 2001 indican la conservación de *O. bornovanus* y MNSV en los sacos de cultivo durante el verano y la falta de eficacia de los métodos de desinfección empleados para el control de *O. bornovanus* (solarización, tratamiento con hipoclorito sódico), mientras que los obtenidos en el ensayo de 2002, indican la eficacia de la solarización durante 60 días en el control de *O. bornovanus*. Las diferencias observadas entre ambos experimentos, pudieron ser debidas a las diferencias existentes en las temperaturas del sustrato acumuladas (°C día) durante el proceso de solarización en ambos años.

**H-44****SENSIBILIDAD DE *Thielaviopsis paradoxa* (*Ceratocystis paradoxa*) AGENTE DE LA PODREDUMBRE NEGRA DEL PLÁTANO A DIFERENTES FUNGICIDAS****PERERA, S.<sup>1</sup>, HERNÁNDEZ, J.M.<sup>2</sup>**<sup>1</sup>*Cabildo Insular de Tenerife, Plaza de España, 1, 38003 Santa Cruz de Tenerife.*<sup>2</sup>*ICIA, Dpto. de Protección Vegetal, Apdo. 60, 38080 (La Laguna) Tenerife.*

*T. paradoxa* (*C. paradoxa*) es un patógeno polífago, que ataca entre otras, a la piña tropical y a la palmera canaria. En plátano produce la podredumbre negra, que afecta a corona, pedicelo y dedos. Es una enfermedad post-cosecha común aunque en Canarias sólo se ha detectado en pocas ocasiones. En la pasada campaña se presentaron daños en varios lugares de destino de la península, de los que se aisló consistentemente *T. paradoxa*.

Como se estaba tratando con extracto de tomillo rojo, que no había sido probado en Canarias frente a *T. paradoxa*, se pensó que no era activo o que habían aparecido aislados tolerantes. Para comprobar esta hipótesis, se realizó una experiencia *in vitro* utilizando como medio de cultivo patata dextrosa agar (PDA). Se probaron cinco productos y dos concentraciones: imazalil 7,5% SL (2,5 y 5 ml/L); tiabendazol 60% SC (0,5 y 0,75 ml/L); extracto de tomillo rojo (2 y 3 ml/L), extracto de ajo (10 y 15 ml/L); control sin producto. Por cada fungicida y dosis se incluyeron 10 repeticiones. Las siembras se mantuvieron en incubador a 25 °C y en oscuridad midiéndose el diámetro de la colonia a las 24, 48, 96, 120, 144, 168, 192 y 264 horas. La actividad se expresó como reducción porcentual del crecimiento lineal frente al control.

Imazalil y tiabendazol presentaron reducciones del 100% frente al control. El extracto de tomillo rojo, reducciones del 100% hasta el séptimo día. El extracto de ajo, reducciones del 58,6% (10 ml/L) y 74,1% (15ml/L) que fueron disminuyendo hasta el 27,5% y el 53% a las 168 horas (siete días). Estos resultados indican que *T. paradoxa* es una especie sensible a las dosis empleadas de extractos de tomillo rojo, por lo que los daños observados en los envíos a la península no pueden atribuirse, en principio, a resistencia o baja eficacia del producto. No obstante, estos resultados tendrán que ser confirmados en ensayos *in vivo*.

**H-45****CONTROL BIOLÓGICO DE *Fusarium circinatum* MEDIANTE EL HONGO ANTAGONISTA *Trichoderma viride***

**CABEZA, A., SANTAMARÍA, O., ALVES-SANTOS, F.M., PAJARES, J.A., DíEZ, J.J.**

*Universidad de Valladolid, Laboratorio de Entomología y Patología Forestal, Dpto. Producción Vegetal y Recursos Forestales, E.T.S. Ingenierías Agrarias, Avda. Madrid 44, 34004 Palencia. E-mail: jdcasero@pvs.uva.es*

*Fusarium circinatum* es un hongo patógeno con una extremada virulencia sobre las especies del género *Pinus*. Este hongo fue detectado hace una década en California en plantaciones de *P. radiata*, y desde aquí se ha distribuido a otras áreas del planeta a través del transporte de semilla, llegando a países tan lejanos como Nueva Zelanda, Sudáfrica, Chile o México. En España se detectó por primera vez en 1995 causando daños en diversos viveros del País Vasco, y desde aquí se ha ido dispersando por toda la costa cantábrica hasta Galicia, y más al interior hasta la comunidad de Navarra.

El control de una enfermedad en el monte presenta ciertas complicaciones. Por una parte, la aplicación indiscriminada de formulaciones fitosanitarias no es posible en muchas ocasiones debido a los daños colaterales producidos sobre las comunidades bióticas que en él conviven. Además, la eficacia de estas formulaciones se muestra muchas veces ineficaz por la imposibilidad de llegar a su objetivo, protegidos en el interior de los tejidos de los árboles. El control biológico con organismos antagonistas es una alternativa que ha resultado muy eficaz en muchas plagas y enfermedades forestales. Las especies del género *Trichoderma* poseen un elevado potencial antagonista frente a otros hongos causantes de diversas patologías de cultivos, por lo que son excelentes candidatos a ser utilizados como herramienta eficaz en muchas patologías forestales.

Con la intención de conocer el antagonismo ejercido por *Trichoderma viride* sobre *F. circinatum* se confrontaron en el laboratorio distintos aislamientos de ambos hongos, en medio de cultivo MEA+acículas en el interior de una placa de Petri de 9 cm. Los controles del experimento fueron establecidos enfrentando a cada uno de los aislados de *F. circinatum* frente a sí mismo. De cada tratamiento se hicieron cinco repeticiones.

El antagonismo producido por el patógeno se evaluó midiendo los tres radios de la colonia de *Fusarium* semanalmente hasta completar un total de 6 semanas. La inhibición producida por *Trichoderma* sobre los aislamientos de *Fusarium* fue visible a partir de las primeras semanas del co-cultivo.

**H-46****ANTAGONISMO *IN VITRO* DE HONGOS ECTOMICORRÍDICOS COMESTIBLES FRENTE A *Fusarium moniliforme* Y *F. oxysporum*****OLAIZOLA, J., ORIA DE RUEDA, J.A., DÍEZ, J.J.**

Universidad de Valladolid, Laboratorio de Entomología y Patología Forestal, Dpto. Producción Vegetal y Recursos Forestales, E.T.S. Ingenierías Agrarias, Avda. Madrid 44, 34004 Palencia. E-mail: jdcasero@pvs.uva.es

Algunos hongos ectomicorrícicos son capaces de controlar importantes enfermedades forestales como el *damping-off*, jugando un interesante papel como agentes de control biológico. En este trabajo se ha evaluado *in vitro* el efecto de 21 aislamientos de hongos ectomicorrícicos comestibles (HEC), correspondientes a 15 especies, sobre el crecimiento y la germinación esporal de dos aislados patógenos de *F. moniliforme* y dos de *F. oxysporum*. En el crecimiento de todas los aislados de *Fusarium* spp. fue reducido significativamente en los co-cultivos con *Rhizopogon roseolus* (Rr-1), *Suillus luteus* (Sl-1, Sl-2), *Tricholoma portentosum* (Tp-1), *Amanita rubescens* (Ar-1), *Amanita ovoidea* (Ao-1), *Boletus fragrans* (Bf-1) y *Laccaria laccata* (Li-1). La germinación esporal de todos los aislados de *Fusarium* fue reducida por los filtrados de cultivo de *Rhizopogon roseolus* (Rr-1) y *Suillus luteus* (Sl-1, Sl-2). Se observaron diferencias inter e intraespecíficas tanto entre aislados de HEC como entre aislados de *Fusarium* spp.

La inhibición ocasionada por los HEC frente a *Fusarium* demuestra que varios aislados de HEC pueden tener un elevado potencial como control biológico. Por otra parte, la metodología utilizada se muestra como una útil herramienta para la selección *in vitro* de HEC, para su posterior utilización en ensayos *in vivo*.

## H-47

**VALORACIÓN DE LA EFICACIA *IN VITRO* DE DIFERENTES FUNGICIDAS FRENTE A *Fusarium circinatum*****LANDERAS, E.<sup>1</sup>, GARCÍA, P.<sup>1</sup>, GONZÁLEZ, A.J.<sup>2</sup>, BRAÑA, M.<sup>1</sup>**<sup>1</sup>Laboratorio de Sanidad Vegetal, Consejería de Medio Rural y Pesca del Principado de Asturias, c/ Lucas Rodríguez, 4 bajo, 33011 Oviedo. E-mail: labsave@princast.es<sup>2</sup>SERIDA, Carretera de Oviedo, s/n, 33300 Villaviciosa (Asturias). E-mail: anagf@serida.org

Desde la detección en 2004 del patógeno de cuarentena *F. circinatum* en un vivero de Asturias, se han llevado a cabo inspecciones en los viveros productores de *Pinus* spp. y *Pseudotsuga menziessi* de diferentes comunidades autónomas, encontrándose infestados muchos de ellos. Los tratamientos antifúngicos utilizados habitualmente contra *Fusarium* spp. no parecen eficaces en el control de esta enfermedad. Con el fin de seleccionar algún producto alternativo se realizó un ensayo de eficacia *in vitro* a ocho productos fitosanitarios con las siguientes materias activas: tiram (80%), tebuconazol (2,5%), procloraz (39,8%), procloraz cloruro de cobre (5,5%) + triticonazol (1,8%), quinosol (50%), iprodiona (50%), flutriafol (12,5%) y flutriafol (9,4%) + carbendazima (20%).

Las dosis ensayadas siguieron una progresión geométrica de 1 a 1.024 ppm referidas siempre a la materia activa de referencia, es decir, tiram, tebuconazol, procloraz, quinosol, iprodiona y flutriafol. Los ensayos se realizaron por triplicado y en todos los casos se incluyó un testigo sin producto. Como inóculo se utilizaron discos de agar, todos del mismo tamaño, del cultivo de una semana en agar de patata y dextrosa (PDA) de dos cepas de *F. circinatum* de dos *mating types* diferentes (Mat1 y Mat2). Las placas se incubaron una semana a 25 °C y en oscuridad y sólo se valoró el efecto del fungicida sobre el crecimiento micelial del hongo, anotando el valor medio de dos diámetros perpendiculares de la colonia. La reducción de crecimiento de las colonias con respecto al testigo se utilizó para calcular el crecimiento relativo de cada cepa a diferentes concentraciones del fungicida y establecer la concentración inhibitoria mínima (CIM). Para determinar el efecto fungicida o fungistático se resembró el inóculo del que se inhibió el crecimiento, en PDA sin producto para comprobar su viabilidad.

La materia activa más eficaz fue el procloraz, sólo o en mezcla con el triticonazol, con CIMs que oscilan entre 2 y 8 ppm y un efecto fungicida por encima de 16 ppm. Después, la mezcla flutriafol + carbendazima con poder inhibitorio con tan sólo 1 ppm y el tebuconazol con 16-32 ppm, según la cepa, ambos de tipo fungistático. El quinosol y el flutriafol también inhiben pero a concentraciones superiores a 64 y 128 ppm, respectivamente. Y por último, el tiram y la iprodiona que no consiguen bloquear totalmente el crecimiento del hongo ni a las concentraciones más altas.



## H-48

**CONTROL BIOLÓGICO DE *Phytophthora cactorum* EN FRESÓN (*Fragaria X Ananassa*) MEDIANTE CEPAS DE *Pseudomonas fluorescens* Y *Pantoea agglomerans*, Y DETERMINACIÓN DE POSIBLES MECANISMOS DE ACCIÓN****AGUSTÍ, L., BONATERRA, A., MORAGREGA, C., MONTESINOS, E.***Instituto de Tecnología Agroalimentaria-CeRTA-CIDSAV, Universidad de Girona, Campus Montilivi, 17071 Girona. E-mail: lagusti@intea.udg.es*

El Oomicete *Phytophthora cactorum* se distribuye comúnmente en zonas templadas e infecta más de 200 especies de plantas, entre ellas muchas plantas leñosas (*Prunus* sp., *Pyrus* sp., y *Malus* sp.), ornamentales y otras plantas de interés comercial como el fresón (*Fragaria x ananassa*). En este último *P. cactorum* es el agente causal de la podredumbre de cuello y raíz. En condiciones favorables para la infección los esporangios de *P. cactorum* formados en los tejidos de la planta huésped producen zoosporas que se propagan por el agua de riego y suelos encharcados, infectando otras plantas susceptibles. Las oosporas permanecen en el suelo y en los tejidos de plantas infectadas, siendo muy difíciles de eliminar. El control de *P. cactorum* se realiza de forma preventiva mediante métodos culturales y químicos. Sin embargo, la prohibición de la utilización del bromuro de metilo y la regulación de la aplicación de los productos químicos alternativos hace necesario identificar agentes de biocontrol que se puedan utilizar en combinación con otros métodos de control tradicionales.

En este estudio, se realizó una selección de cepas de *Pseudomonas fluorescens* y *Pantoea agglomerans* con capacidad de inhibir *P. cactorum* *in vitro*, *ex vivo* y en plantas de fresón de la variedad Diamante en invernadero. Se caracterizaron 58 cepas mediante la producción de metabolitos secundarios y enzimas, así como la capacidad antagonista *in vitro* contra *P. cactorum*. También se determinó la actividad de biocontrol del patógeno en ensayos *ex vivo* sobre hojas de fresón. Las cepas que redujeron significativamente la infección sobre hoja se evaluaron mediante tratamiento por riego en plantas de fresón inoculadas con *P. cactorum*. Cuatro cepas de *P. fluorescens* mostraron eficacia contra la podredumbre de cuello y raíz de fresón y fueron seleccionadas para estudios posteriores de determinación de los mecanismos de acción. La cepa *P. fluorescens* EPS894, productora del compuesto antifúngico ácido fenazin-1-carboxílico (PCA), mostró una actividad muy significativa contra *P. cactorum*. Plantas de fresón tratadas con la cepa EPS894 y posteriormente inoculadas con *P. cactorum* mostraban una severidad de la enfermedad hasta un 40% significativamente inferior a la de plantas testigo no tratadas.

## H-49

**LA FUSARIOSIS VASCULAR DEL TABACO ASOCIADA A *Globodera tabacum*: EFECTO DE LA VARIEDAD Y DE LA FUMIGACIÓN DEL SUELO**

**RODRÍGUEZ-MOLINA, M.C.<sup>1</sup>, ESPÁRAGO, G.<sup>2</sup>, VERDEJO-ALONSO, E.<sup>2</sup>, GARCÍA-BARRADO, J.A.<sup>3</sup>, PALO-NÚÑEZ, E.J.<sup>1</sup>, PALO-OSORIO, C.<sup>1</sup>, BLANCO-MARTÍN, I.<sup>3</sup>**

<sup>1</sup>Centro de Investigación de la Finca “La Orden” y “Valdesequera”, Consejería de Infraestructuras y Desarrollo Tecnológico, 06187 Guadajira (Badajoz). E-mail: carmen.rodriguez@juntaextremadura.net

<sup>2</sup>Servicio de Sanidad Vegetal, Consejería de Agricultura y Medio Ambiente, Avda. de Portugal s/n, 06800 Mérida (Badajoz). E-mail: guadalupe.esparrago@aym.juntaex.es

<sup>3</sup>Centro Tecnológico Agroalimentario de Extremadura (CTAEX). 06195 Villafranco del Gadiana (Badajoz). E-mail: jgarcia@ctaex.com

La fusariosis vascular del tabaco, asociada a la presencia de nematodos del complejo *Globodera tabacum* en el suelo, se ha convertido en una enfermedad grave del cultivo en el Valle del Tiétar (Cáceres). Con el objetivo de determinar el efecto de la fumigación del suelo y de la variedad de tabaco en el control de la enfermedad se establecieron una serie de ensayos en el Valle del Tiétar en las campañas de 2004 y 2005. Se estudiaron tres factores: 1) fumigación (fumigación con dicloropropeno en pretransplante o sin fumigación); 2) variedad de tabaco (tres variedades en 2004 (C-26, NC-72, C4-M) y cuatro en 2005 (C-26, NC-72, C4-M, AG-41)); y 3) fecha de muestreo. Se determinó el efecto de los factores estudiados en el desarrollo de la enfermedad y en las poblaciones de *Fusarium oxysporum* y de *Globodera tabacum* en el suelo.

Los resultados obtenidos indican que en ambas campañas la gravedad de la enfermedad dependía de la interacción de los factores fumigación y variedad: la fumigación disminuía la gravedad de la enfermedad en todas las variedades, pero las diferencias entre variedades eran más acusadas en las parcelas sin fumigar. La variedad menos afectada por la enfermedad fue la AG-41, seguida por la C4-M y por la NC-72, siendo la C-26 la más afectada. Respecto a las poblaciones de *Fusarium oxysporum* en el suelo, en ambas campañas el número de unidades formadoras de colonias (ufc)/g de suelo fue menor en las parcelas fumigadas, pero en la del 2005 se detectó interacción entre los factores fumigación y fecha de muestreo. La variedad no tuvo efecto en las poblaciones de *F. oxysporum* en el año 2004, pero sí en el 2005, en el que el número de ufc/g de suelo en las parcelas de la variedad C-26 fue mayor que en las de las otras variedades. Ni la fumigación ni la variedad tuvieron efecto en las poblaciones de *G. tabacum* (número de huevos y juveniles/100 cm<sup>3</sup> de suelo) en ninguna de las dos campañas, pero sí se observaron diferencias entre las poblaciones según la fecha de muestreo.

Se discuten las posibilidades de control de la enfermedad mediante la elección de variedad y la fumigación del suelo en pretransplante.

**H-50****SOBRE EL CONTROL DE OIDIO EN CULTIVOS PROTEGIDOS EN EL SUR Y SUDESTE ESPAÑOL**

**GALEANO, M., LEÓN, P., MEDINA, C., GARCÍA, G., BELDA, J.E.**

*Dpto. I+D Koppert Biological Systems, S.L., Apdo. Correos 38, 04738 Vícar (Almería). E-mail: mgaleano@koppert.es*

Se incluyen en este trabajo los ensayos realizados en cultivos de pimiento y rosa sitios en la Región de Murcia, y los realizados en cultivos de bayas como fresa y frambuesa de la provincia de Huelva, que forman parte de un proyecto sobre el desarrollo del nuevo antioídio natural producido por Koppert para el control de hongos patógenos en plantas cultivadas, basado en la actividad de la lactoperoxidasa (LP).

Se ha evaluado el fungicida natural (Sistema LP) contra oídio en sus diferentes manifestaciones según cultivo (*Leveillula taurica*, *Sphaerotheca panosa* var. *rosae* y *Sphaerotheca* sp).

Por una parte se seleccionaron dos invernaderos comerciales de pimiento y uno de mini-rosa en el Campo de Cartagena, y otro de rosa cortada en Totana (Murcia). Por otra parte, se analizó el efecto sobre cultivo de fresa y frambuesa en macrotúneles de Huelva.

En cada ensayo se comparó la eficacia del tratamiento con el fungicida natural frente al químico. Se llevaron a cabo de dos a tres aplicaciones con intervalos de una semana entre las mismas. Semanalmente se llevaba a cabo el monitoreo de acuerdo a las directrices de la EPPO, evaluando la superficie de hoja afectada por oídio.

Tanto en pimiento como en rosa, el producto ofreció un buen nivel de control en ambos cultivos (del orden del 60% de reducción de la superficie foliar afectada por el hongo). El control llevado a cabo por el antioídio no era significativo estadísticamente cuando se comparaba con el tratamiento químico en todos los ensayos. Sin embargo, en mini-rosa si controló mejor el antioídio natural que el fungicida químico.

En los ensayos llevados a cabo en fresa y frambuesa de Huelva, los resultados mostraron que el producto en frambuesa controló satisfactoriamente en comparación con el fungicida usado para dicho cultivo y con las plantas no tratadas (diferencias significativas; ANOVA  $P=0,05$ ). En el cultivo de fresa este antioídio natural fue igual de efectivo que el fungicida químico.

El producto no mostró actividad residual contra oídio en ninguno de los ensayos realizados.

**H-51****EFFECTO DE LA CEPA T-22 DE *Trichoderma harzianum* (TRIANUM) SOBRE CULTIVO DE TOMATE BAJO INVERNADERO****GALEANO, M., FERNÁNDEZ, P., CREVILLÉN, M., BELDA, J.E.**

<sup>1</sup>Dpto. I+D Koppert Biological Systems, S.L., Apdo. Correos 38, 04738 Vícar (Almería). E-mail: mgaleano@koppert.es

La cepa T-22 del hongo *Trichoderma harzianum* actúa como promotor de crecimiento y aumenta la resistencia a hongos patógenos del suelo. Este hongo se viene usando en los últimos años como una herramienta más en los programas de agricultura tanto ecológica, integrada como convencional, por su versatilidad y compatibilidad con la mayoría de tratamientos químicos.

Se ha evaluado en este trabajo el efecto de la cepa T-22 de *Trichoderma harzianum* sobre un cultivo hidropónico de tomate en un invernadero comercial de Almería en dos campañas consecutivas (tomate de verano y de invierno).

El tomate de verano se trató a la dosis estándar, primero en el semillero y posteriormente dos aplicaciones más, a mitad dosis, por el sistema de fertirrigación del invernadero.

En el tomate de invierno se aplicó a las plantas a la dosis estándar, primero sobre las bandejas en el momento del trasplante y posteriormente una aplicación vía riego justo antes de comenzar el periodo de cosecha.

Se analizaron los parámetros vegetativos al trasplante y la cosecha durante todo el periodo de recolección.

Las plantas tratadas presentaron un sistema radicular y una porción foliar mayores que las no tratadas en el momento del trasplante. Las plantas tratadas mostraron también una cosecha mayor que las no tratadas (ANOVA,  $P=0,05$ ), obteniendo más frutos por planta en las plantas a las que se aplicó la T-22. El incremento de cosecha fue para el cultivo de verano del 19,59% y para el de invierno del 11,58%.

## H-52

**ESPECIES DE *Pseudomonas* Y *Bacillus* AISLADAS DE SUELOS Y RAÍCES DE AGUACATE PARA SU APLICACIÓN EN EL BIOCONTROL DE *Rosellinia necatrix***

**GONZÁLEZ-SÁNCHEZ, M.A.<sup>1</sup>, CAZORLA, F.M.<sup>2</sup>, RAMOS, C.<sup>3</sup>, DE VICENTE, A.<sup>2</sup>, PÉREZ-JIMÉNEZ, R.M.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>CIFA de Churriana (IFAPA-CICE), Cortijo de la Cruz s/n, 29140 (Churriana) Málaga.

<sup>2</sup>Dept. Microbiología, Facultad de Ciencias, Universidad de Málaga, 29071 Málaga.

<sup>3</sup>Área de Genética, Facultad de Ciencias, Universidad de Málaga, 29071 Málaga.

*Rosellinia necatrix* Prill. es un hongo ascomiceto de suelo que causa la podredumbre blanca radicular en numerosas plantas, es un patógeno muy agresivo de tal forma que, en Andalucía, su presencia es un factor limitante del cultivo de aguacate. El control biológico de esta enfermedad puede ser un método efectivo y ambientalmente aceptable realizando prácticas culturales apropiadas junto con la aplicación de microorganismos nativos.

Así, para disponer de bacterias nativas que puedan aplicarse como agentes de biocontrol frente a *R. necatrix*, en el CIFA de Churriana se ha generado una colección de 332 aislados bacterianos procedentes de muestras de suelo y raíz tomadas de 20 árboles de aguacate localizados en 12 plantaciones andaluzas representativas de esta zona. El potencial biocontrolador de las bacterias conservadas se ha determinado *in planta* realizando bioensayos con plántulas de aguacate obtenidas mediante germinación de embriones *in vitro*. En total se han estudiado 146 aislados bacterianos: 26 aislados que habían manifestado antagonismo *in vitro* frente al patógeno en un estudio previo de toda la colección, más 120 aislados que no mostraron actividad antifúngica *in vitro*.

Estos experimentos han permitido distinguir 24 aislados bacterianos con potencial en el biocontrol ya que las plantas tratadas mostraron reducción de la enfermedad con respecto al control. De éstos, sólo 8 de ellos habían sido seleccionados por su antagonismo *in vitro*. Todos los aislados seleccionados se están evaluando de nuevo en ensayos con mayor número de réplicas utilizando plántulas clonales micropropagadas, para eliminar las variaciones de respuesta debido al genotipo del huésped. Los aislados seleccionados (13 Gram negativos y 11 Gram positivos) se están identificando mediante secuenciación del ADNr 16s y test API 20. Hasta la fecha, los resultados obtenidos muestran que los aislados Gram negativos son especies de *Pseudomonas fluorescentes* (*P. chlororaphis*, *P. putida*, *P. fluorescens*). Por otro lado, se han identificado 4 aislados Gram positivos como *Bacillus* spp. (*B. cereus* y *B. subtilis*). Adicionalmente, se están caracterizando distintos mecanismos de acción que puedan estar implicados en la actividad biocontrol: producción de sustancias antifúngicas (antibióticos, ácido cianhídrico y enzimas hidrolíticas), capacidad de colonización de raíces de aguacate, y promoción del crecimiento de la planta (PGPR).

## H-53

**BIOCONTROL DE LA “TRISTEZA” DEL PIMIENTO CAUSADO POR *Phytophthora capsici* MEDIANTE UNA COMBINACIÓN DE MICROORGANISMOS ANTAGONISTAS****EZZIYANI, M.<sup>1</sup>, REQUENA, M.E.<sup>1</sup>, EGEA-GILABERT, C.<sup>2</sup>, CANDELA, M.E.<sup>1</sup>**<sup>1</sup>Dept. de Biología Vegetal, Facultad de Biología, Universidad de Murcia, Campus de Espinardo, 30100 Espinardo (Murcia). E-mail: mcandela@um.es.<sup>2</sup>Dept. de Ciencia y Tecnología Agraria, E.T.S. Ingeniería Agronómica, Universidad Politécnica de Cartagena, Paseo Alfonso XIII, 52, 30203 Cartagena (Murcia).

Hasta hoy la “tristeza” causada por *P. capsici* en pimiento, que produce la pudrición de la raíz y un marchitamiento generalizado de la planta, no tenía tratamiento ya que, cuando se observan los primeros síntomas, la planta está invadida e irremediamente muere. Los ensayos realizados por nuestro grupo, utilizando una combinación de tres microorganismos, han conseguido inhibir totalmente el crecimiento del patógeno y posibilitan el cultivo de pimiento en suelos contaminados. Los tres microorganismos utilizados son: el hongo *Trichoderma harzianum* y las bacterias *Burkholderia cepacia* y *Streptomyces rochei* “Ziyani”. Los mecanismos de acción analizados comprenden: 1.- Micoparasitismo mediante un enrollamiento masivo de las hifas de *P. capsici* por las de *T. harzianum* y *St. rochei* “Ziyani”, así como adhesión y proliferación de las colonias de *B. cepacia* sobre las hifas del patógeno. 2.- Antibiosis, con producción de los antibióticos: 1-propanona,1-(4-clorofenilo) por *St. rochei* “Ziyani” y pirrol-nitrina por *B. cepacia*, tóxicos para *P. capsici*. 3.-Producción de enzimas extracelulares, por los tres antagonistas, con lisis enzimática de las hifas del patógeno y 4.- Incremento de la resistencia de la planta mediante la producción de proteínas-PR con actividades peroxidasa y glucanasa. Se ha optimizado la producción de la biomasa de los antagonistas, que mantienen su capacidad inhibitoria del patógeno hasta dos años, en condiciones de laboratorio, sin tener que someter las cepas a ningún tratamiento. El uso de los tres antagonistas, adicionados en conjunto a un formulado de vermiculita, más tierra de plantación y medio de cultivo, tiene un rango eficaz de pH entre 3,5 y 5,6 y un rango de temperaturas entre 23 y 30°C. Las dosis mínimas de los antagonistas en el formulado final son para *T. harzianum*:  $4,2 \times 10^8$  esporas/ml, para *B. cepacia*:  $1,2 \times 10^{10}$  ufc/ml y para *St. rochei* “Ziyani”  $2,5 \times 10^9$  ufc/ml. Una de las razones del éxito de este trabajo es la elección de los tres antagonistas que aunque pertenecen a géneros distintos, hay una compatibilidad total entre ellos y en contra del patógeno. Es la primera vez que se presenta una formulación de biocontrol en que se usan estos antagonistas donde la suma de sus mecanismos de acción, al adicionarlos conjuntamente a la rizosfera de la planta de pimiento, logra una reducción efectiva de la enfermedad de la “tristeza” del 100%.

## H-54

**EFFECTO DEL SUSTRATO Y LA TEMPERATURA EN EL CONTROL BIOLÓGICO DE LA “TRISTEZA” DEL PIMIENTO (*Capsicum annuum*) POR MICROORGANISMOS ANTAGONISTAS DE *Phytophthora capsici*****EZZIYANI, M.<sup>1</sup>, REQUENA, M.E.<sup>1</sup>, EGEA-GILABERT, C.<sup>2</sup>, REQUENA, A.<sup>2</sup>, CANDELA, M.E.<sup>1</sup>**<sup>1</sup>*Departamento de Biología Vegetal, Facultad de Biología, Universidad de Murcia, Campus de Espinardo, 30100 Espinardo (Murcia). E-mail: mcandela@um.es.*<sup>2</sup>*Departamento de Ciencia y Tecnología Agraria, E.T.S. Ingeniería Agronómica, Universidad Politécnica de Cartagena, Paseo Alfonso XIII, 52, 30203 Cartagena (Murcia).*

El objetivo de este trabajo fue comparar el efecto de la temperatura y el pH sobre la capacidad antagónica *in vitro* e *in vivo* del hongo *Trichoderma harzianum* y las bacterias *Burkholderia cepacia* y *Streptomyces rochei* “Ziyani”, sobre la “tristeza” causada por el patógeno *Phytophthora capsici* en plantas de pimiento, crecidas a partir de semillas tratadas con cada antagonista. En los ensayos *in vitro* se realizaron confrontaciones duales de cada antagonista con el patógeno *P. capsici*, analizando las interacciones macroscópicas y las capacidades antagónicas a temperaturas entre 23 y 30 °C y distintos pH. Utilizando una escala de 0 grado (ninguna invasión de la superficie de la colonia de *P. capsici*) a 4 grados (invasión total y esporulación sobre la misma) la capacidad antagónica de los tres antagonistas fue 4. La temperatura óptima fue 30 °C para las bacterias, *St. rochei* “Ziyani” y *B. cepacia* pero en cambio *T. harzianum* tuvo un crecimiento óptimo a 25 °C. El pH 4,5 no afecta la acción inhibidora de las bacterias, incluso la favorece y aunque la colonia del hongo *T. harzianum* reduce su densidad y su color, mantiene su capacidad antagónica frente al patógeno.

Las experiencias *in vivo* se realizaron en macetas en cámara de cultivo y los resultados indican que la agresividad del patógeno, medido como longitud de la necrosis en tallos infectados, es mayor a 30 °C, y que la respuesta defensiva de la planta esta favorecida a 23°C. El efecto del pH en el crecimiento de las plántulas se realizó en el suelo, en invernaderos de cubierta de plástico consiguiendo sustratos de pH 5,61, 5,44, 4,95, 4,58, 4,20 y 3,48, mediante mezclas de turba, arena y disolución de KCl 1M en diferentes proporciones. La mayor reducción de la enfermedad se llevó a cabo utilizando una mezcla de turba en una disolución de KCl 1M, que proporcionó un pH= 4,58 y a 25 °C. En esas condiciones, la reducción efectiva de la enfermedad fue de un 3,25 (con el hongo *T. harzianum*), un 2,10 (con la bacteria *B. cepacia*) y un 1,85 (con la bacteria *St. rochei* “Ziyani”) frente a 5 lo cual equivale a una reducción porcentual del 35%, 58% y 63% respectivamente. Las distintas concentraciones de las bacterias usadas no alteran significativamente la reducción de la “tristeza”.

## H-55

**INFLUENCIA DE LA ANTIBIOSIS DE *Streptomyces rochei* “ZIYANI”, EN EL CONTROL BIOLÓGICO DE LA ENFERMEDAD CAUSADA POR *Phytophthora capsici* EN PIMIENTO (*Capsicum annuum*)****EZZIYYANI, M.<sup>1</sup>, REQUENA, M.E.<sup>1</sup>, EGEA-GILABERT, C.<sup>2</sup>, REQUENA, A.<sup>2</sup>, CANDELA, M.E.<sup>1</sup>**<sup>1</sup>*Departamento de Biología Vegetal, Facultad de Biología, Universidad de Murcia, Campus de Espinardo, 30100 Espinardo (Murcia). E-mail: mcandela@um.es.*<sup>2</sup>*Departamento de Ciencia y Tecnología Agraria, E.T.S. Ingeniería Agronómica, Universidad Politécnica de Cartagena, Paseo Alfonso XIII, 52, 30203 Cartagena (Murcia).*

El objetivo de este trabajo fue analizar la influencia de la antibiosis, como uno de los mecanismos de acción ejercidos por el aislado bacteriano *Streptomyces rochei* “Ziyani”, en la reducción de la “tristeza” causada por el patógeno *Phytophthora capsici* en plantas de pimiento. La bacteria nos había demostrado una elevada capacidad antagónica contra el patógeno, desarrollando una zona de inhibición de su crecimiento en confrontaciones duales *in vitro* con lisis y destrucción de sus hifas. En los ensayos *in vivo* su adición a semillas de pimiento crecidas en suelos contaminados con el patógeno redujo la “tristeza” en un 55,6%. Para la obtención del posible “antibiótico”, el aislado bacteriano se cultivó mediante fermentación sólida en vermiculita y caldo nutritivo y al cabo de un mes se extrajeron los posibles metabolitos antifúngicos con n-butanol (2:1, v/v). Los compuestos se purificaron inicialmente en cromatografía en capa fina (TLC) de silicagel con cloroformo:metanol (7:3, v/v). Sobre la cromatoplaqueta desarrollada se realizó un bioensayo para delimitar el componente antifúngico mediante tapizado con agar y crecimiento de esporas de *P. capsici*. Los resultados mostraron inhibición de la colonia del patógeno en una banda de Rf 0,8 de 12 mm de anchura. Esta zona solo fue visible bajo luz ultravioleta a 360 nm y así delimitada se recogió de la placa y se purificó mediante HPLC. Con las condiciones cromatográficas de columna de Sephadex C-18 y gradiente de elución acetonitrilo: agua se obtuvieron dos picos mayoritarios, que se testaron para comprobar su capacidad anti-oomiceto. De ellos el que se eluyó a 2,795 minutos mostró inhibición del crecimiento de *P. capsici* en un ensayo de antifungicidad en placa en el que se utilizaron 20 µl del extracto eluído directamente del cromatógrafo HPLC a pie del detector.

El compuesto anti-oomiceto se identificó por resonancia magnética nuclear como 1-propanona, 1-(4-clorofenilo) y debido a su capacidad de inhibición del crecimiento del patógeno, se considera uno de los responsables de la capacidad antagonista que muestra el aislado bacteriano *Streptomyces rochei* “Ziyani”, frente a *P. capsici*.



## H-56

**ACTIVIDAD PEROXIDASA Y  $\beta$ -1,3-GLUCANASA EN PLANTAS DE PIMIENTO INFECTADAS CON *Phytophthora capsici* Y TRATADAS CON *Streptomyces rochei* “ZIYANI”****EZZIYANI, M.<sup>1</sup>, REQUENA, M.E.<sup>1</sup>, PEREZ, C.<sup>1</sup>, EGEA-GILABERT, C.<sup>2</sup>, CANDELA, M.E.<sup>1</sup>**<sup>1</sup>*Departamento de Biología Vegetal, Facultad de Biología, Universidad de Murcia, Campus de Espinardo, 30100 Espinardo (Murcia). E-mail: mcandela@um.es.*<sup>2</sup>*Departamento de Ciencia y Tecnología Agraria, E.T.S. Ingeniería Agronómica, Universidad Politécnica de Cartagena, Paseo Alfonso XIII, 52, 30200 Cartagena (Murcia).*

El aislado bacteriano *Streptomyces rochei* “Ziyani” obtenido por nuestro grupo en la rizosfera de plantas de pimiento, ha demostrado poseer cualidades para el biocontrol del crecimiento del patógeno *P. capsici*. En este trabajo se analiza uno de los posibles mecanismos de acción integrantes del biocontrol como es la inducción de resistencia sistémica en la planta con producción de proteínas-PR. El oomiceto patógeno fue inoculado a las plantas de pimiento por decapitación de los tallos de modo que no interfería directamente con la bacteria, pero si podríamos evaluar la inducción de resistencia sistémica de la planta, midiendo la longitud de la reacción necrótica que se produce en los tallos inoculados con *P. capsici* y las proteínas-PR producidas a los 3 y 9 días de la inoculación. En esos tiempos se analizó también la distribución de la bacteria antagonista a lo largo de la raíz del pimiento. Los resultados muestran una disminución de la longitud de la necrosis del tallo debida a la resistencia sistémica inducida en la raíz por la bacteria antagonista con producción de proteínas-PR con actividad glucanasa y peroxidasa en todos los tiempos de tratamiento analizados. Las proteínas se extrajeron de las zonas intermedias del tallo (inmediatamente debajo de la necrosis) y se separaron mediante electroforesis (PAGE-nativa) e isoelectroenfoque (IEF). El revelado se realizó con laminarina para actividad glucanasa y con 4-metoxi naftol para actividad peroxidasa directamente en los geles. Los resultados muestran la inducción de nuevas isoenzimas ácidas y básicas con actividad glucanasa y peroxidasa, como expresión diferencial del tratamiento con la bacteria antagonista y con la inoculación con el patógeno. Las fotografías de secciones de las raíces colonizadas con la bacteria, realizadas por microscopía electrónica de barrido, nos muestran un crecimiento miceliar con un establecimiento intra y extracelular de la colonia bacteriana, en todas las secciones analizadas, desde la punta de la raíz hasta la coronilla del tallo de la planta de pimiento.

## H-57

**LUCHA CONTRA LA MANCHA NEGRA (ANTRACNOSIS) DE LA FRUTA DE FRESA CULTIVADA (*Fragaria X Ananassa*)****AGOUIZ, O.<sup>1</sup>, EZZIYYANI, M.<sup>1</sup>, LAMARTI, A.<sup>2</sup>, EL MODAFAR C.**

<sup>1</sup>Departamento de Biología, Laboratorio de Biotecnología y Mejora de las Plantas, Facultad de las Ciencias M'hannech II, BP 212, 93002 Tetuán, Marruecos. E-mail: lamarti.ahmed@menara.ma

<sup>2</sup>Laboratorio Biotecnología y Fitopatología Molecular, Departamento de Biología, Facultad de las Ciencias de Guéliz, B.P. 549, 40000 Marrakech, Marruecos.

*Colletotrichum* es un hongo que en su fase imperfecta puede atacar a las fresas produciendo la enfermedad conocida como antracnosis que causa la putrefacción del rizoma, estolones y pecíolos y manchas necróticas que ennegrecen las hojas y frutos de la fresa.

En este trabajo evaluamos el efecto de diferentes fungicidas sobre el crecimiento del micelio fúngico para lo cual se añadieron, a diferentes concentraciones, cada producto, individualmente, al PDA de cultivo del hongo. El crecimiento se calcula midiendo el diámetro de las colonias después de 12 días de incubación y a los 15 días se estudia la esporulación del aislado. La evaluación de la germinación de las esporas se efectúa por la enumeración de los conidios germinados entre 100 conidios, después de las 24 de la incubación a 25°C en la oscuridad. De los resultados obtenidos se observa que el azoxystrobine, el clorotalonil y la carbendazina son bastante eficaces en la inhibición del crecimiento del hongo ( $CI_{50} < DH$  y  $CI_{90} > 2 DH$ ). Los ensayos con fenarimol nos muestran que su utilización a dosis bajas da un nivel significativo en la reducción de la colonia fúngica, y en cambio, el hongo muestra resistencia al fungicida cuando se utilizan elevadas dosis elevadas ( $CI_{50} > 2 DH$  y  $CI_{90} < DH$ ). Los resultados de la adición de los fungicidas sobre la germinación de las esporas del hongo muestra que el azoxystrobine y el fenarimol son ineficaces ( $CI_{50}$  y  $CI_{90} > DH$ ), mientras que frente al clorotalonil y la carbendazina, el hongo muestra sensibilidad ( $CI_{50}$  y  $CI_{90} < 1/2 DH$ ). Los ensayos sobre la esporulación mostraron que el fenarimol es eficaz a dosis bajas y que esta eficacia disminuye con el aumento de la concentración ( $CI_{50} > 2 DH$  y  $CI_{90} < DH$ ). El clorotalonil y la carbendazina son muy activos sobre la esporulación ( $CI_{50}$  et  $CI_{90} < DH$ ), mientras que el azoxystrobine, es sólo medianamente eficaz.

Debido a los problemas de residuos de fungicidas sobre la frutas, realizamos ensayos para comprobar la eficacia de algunas hongos y bacterias telúricas y endófitas que pudieran ser usados como antagonistas del *Colletotrichum*. Los resultados iniciales obtenidos nos mostraron su utilidad contra la antracnosis ya que varios antagonistas aislados generan una zona de inhibición muy interesante y podrían usarse en tratamientos de biocontrol contra este hongo patógeno de la fresa.

**H-58****INFLUENCIA *IN VITRO* DE COMPUESTOS FENÓLICOS Y DE REGULADORES DE CRECIMIENTO SOBRE LA EXPANSIÓN MICELIAR Y LA ESPORULACIÓN DE *Botrytis cinerea*****AITOUNA, H., LAMARTI, A., EZZIYANI, M., HAMDACHE, A., AGOUIZ, O.**

*Departamento de Biología, Laboratorio de Biotecnología y Mejora de las Plantas, Facultad de Ciencias M'hannech II, BP 2121, 93002 Tetuán, Marruecos. E-mail: lamarti.ahmed@menara.ma*

El género *Botrytis* pertenece a la clase Hifomicetos, al orden Moniliales y a la familia Moniliaceae. Se caracteriza por grandes conidióforos, elaborados y muy ramificados. Los conidios solitarios, secos, unicelulares son de color hialino a marrón pálido y nacen sobre cortos denticulos. En las infecciones envejecidas se pueden encontrar esclerocios con facilidad. *Botrytis cinerea* es un patógeno necrotrófico muy ubicuo y que tiene una amplia gama de plantas hospedadoras. Es el agente causal de la podredumbre gris que causa pérdidas severas en las cosechas de plantas cultivadas en particular la fresa. El control de la enfermedad es difícil ya que el patógeno afecta a los distintos órganos de la planta y a las distintas fases de su desarrollo.

En este trabajo se ha estudiado el efecto de los compuestos fenólicos y de algunas fitohormonas sobre el crecimiento y la esporulación del hongo patógeno *Botrytis cinerea*. Los fenoles utilizados han mostrado producir una ligera inhibición frente al crecimiento micelial de *B. cinerea*. Así el ácido para-benzoico y el ácido para-hydroxybenzoico produjeron la mayor inhibición con un porcentaje del 31,11 y del 16,02 respectivamente. Por el contrario, el ácido caféico tiene poco efecto sobre el crecimiento de *B. cinerea*.

Los resultados obtenidos con los reguladores de crecimiento probados a dosis fisiológicas mostraron que ejercían efectos antifúngicos muy variables sobre *B. cinerea*. La auxina (AIA), cuando se adicionó a los cultivos durante 4, 8 y 12 días no dio resultados significativos de inhibición micelial con relación al testigo. Por el contrario, el 2,4 D debilitó el crecimiento micelial sobre todo en los tiempos de aplicación de 4 y 8 días de incubación. El hongo patógeno parece ser más sensible al ácido salicílico el cual causa una fuerte inhibición de su crecimiento del cuarto al octavo día. Sin embargo, el patógeno recupera más tarde su crecimiento normal. El ácido abscísico (ABA), la poliamina (putrescina) y las citoquininas utilizadas, no producen resultados significativos en la inhibición del crecimiento del patógeno. Finalmente se ha constatado que la adición del ácido giberélico al medio de cultivo disminuyó momentáneamente el crecimiento de las colonias miceliares, pero el hongo es capaz de revertir la inhibición pues su crecimiento se reanudó al cabo de 12 días.

**H-59****CONTROL QUÍMICO Y BIOLÓGICO, *IN VITRO*, DE LA PODREDUMBRE GRIS CAUSADA POR *Botrytis cinerea* EN LA FRESA (*Fragaria X Ananassa*)****HAMDACHE, A., LAMARTI, A., EZZIYANI, M.**

*Departamento de Biología, Laboratorio de Biotecnología y Mejora de las Plantas, Facultad de Ciencias M'hannech II, BP 212, 93002 Tetuán, Marruecos. E-mail: lamarti.ahmed@menara.ma*

El cultivo de fresa es muy sensible y frágil y requiere un seguimiento muy cercano ya que sufre fácilmente ataques de hongos como *Botrytis* sp. que causa pérdidas importantes en los cultivos, antes y después de cosecha produciendo la podredumbre gris, que se favorece en clima húmedo.

En este trabajo se han utilizado cepas de *Botrytis cinerea* aisladas a partir de fresas descompuestas. El hongo se purificó en medio PDA manteniéndose en crecimiento en medios nutritivos como medio Fresa y MEA donde se evaluó la acción sobre su crecimiento, germinación y esporulación de tres tipos de fungicidas, frecuentemente utilizados en los campos de fresas al norte de Marruecos. Los ensayos *in vitro* han mostrado que *Botrytis cinerea* tiene una considerable resistencia al fenarimol durante su germinación ya que dio una disminución de casi el 50%, siendo también sensible al fungicida durante su crecimiento y esporulación con una inhibición superior al 50%. La clorotalonil-carbendazina mostró una gran eficacia para controlar las tres fases del desarrollo del *B. cinerea*, inhibiendo la germinación en un 99,93%, la esporulación en un 97,80% y el crecimiento en un 72,46%. El azoxystrobin fue el menos eficaz pues produjo una inhibición del crecimiento de un 51,79% y una reducción de la germinación y de la esporulación de un 20,25% y un 24,43% respectivamente.

Actualmente, puesto que ha surgido una resistencia múltiple a los fungicidas usuales, el control químico de la podredumbre gris se limita a los bencimidazoles y a las dicarboximidas y en alternancia. Al problema de resistencia, se añade el problema de residuos de fungicida sobre fruta, ya que se sabe que un gran número de los fungicidas comúnmente utilizados como el benomilo, presentan un riesgo para la salud. Debido a estos inconvenientes, hemos iniciado unos ensayos sobre el control biológico basado en la utilización de microorganismos antagónicos del patógeno como alternativa al uso de pesticidas. Para nuestro trabajo se realizó una selección de bacterias antagónicas a partir de 50 cepas bacterianas aisladas a partir del rizosfera y las raíces de seis plantas de fresa. De las interacciones bacteria-*B. cinerea* se han seleccionado cuatro cepas bacterianas del suelo y dos procedentes de la raíz. Los mecanismos de inhibición del crecimiento del patógeno analizados incluyen el micoparasitismo por contacto directo y la antibiosis, con el desarrollo de una zona de inhibición en las confrontaciones.

**H-60****INCIDENCIA SOBRE *Alternaria alternata* Y *Penicillium expansum* PATÓGENOS PRINCIPALES DE LAS PERAS RECOLECTADAS, AL SER TRATADAS CON FUNGICIDAS Y CALCIO****MAOUNI, A., LAMARTI, A., EZZIYYANI, M.**

*Departamento de Biología, Laboratorio de Biotecnología y Mejora de las Plantas, Facultad de Ciencias M'hannech II, BP 2121, 93002 Tetuán, Marruecos. E-mail: lamarti.ahmed@menara.ma*

Durante la conservación de peras en post-cosecha, la aparición de enfermedades fúngicas como las ocasionadas por *Penicillium expansum* llamada podredumbre azul y por *Alternaria alternata* llamada la mancha negra, ocasionan pérdidas económicas serias.

Los tratamientos químicos con fungicidas redujeron considerablemente la aparición de enfermedades pos-cosecha causadas por estos hongos y durante muchos años, la adición de estos compuestos fue eficaz para reducir las pérdidas. Sin embargo, últimamente han empezado a aparecer partidas de peras con síntomas de estas enfermedades, incluso después de una protección química intensa con los fungicidas habituales. Este hecho se debe a la aparición de cepas de hongos resistentes a los fungicidas utilizados, que han revertido la resistencia. Solucionar este problema de la resistencia a fungicidas tradicionales y luchar contra ciertos desórdenes fisiológicos de peras (como la deficiencia del calcio que produce la pudrición del extremo del brote de los frutos) es el objetivo de esta investigación. Así pues, en este trabajo se ha utilizado la adición de cloruro de calcio asociado con fungicidas para evaluar la incidencia de estos compuestos en la disminución de los desórdenes mencionados. La asociación de estos compuestos se ha probado *in vitro* sobre el crecimiento de los hongos en cultivo e *in vivo* después de adicionar calcio y fungicidas a peras en el campo, antes de la cosecha. Los fungicidas analizados se han probado en distintas dosis y adicionados solos y en conjunto con distintas dosis de cloruro de calcio. Los hongos utilizados fueron aislados de peras enfermas después de varios meses almacenadas.

Los resultados de eficacia de los fungicidas *in vitro* e *in vivo* contra las dos especies de hongos utilizados, han demostrado que su uso no disminuye eficazmente el crecimiento de estas cepas resistentes y por lo tanto no tiene ningún interés práctico. La adición de cloruro de calcio a cultivos *in vitro*, de los microorganismos patógenos nos ha demostrado que el calcio fue tolerado por ambas especies hasta el de 4%. La adición de cloruro de calcio a los perales *in vivo* y a una baja temperatura, proporcionó buenos resultados cuando se utilizó al 4 y al 6%. La asociación fungicidas- $\text{CaCl}_2$  al 4% permitió un control significativo del hongo *Alternaria alternata*.

**H-61****LUCHA CONTRA EL OIDIO PRODUCIDO POR *Sphaerotheca macularis* sp. *fragariae* EN LA FRESA CULTIVADA (*Fragaria* X *Ananassa*)**

**NASSEUR, F., EZZIYANI, M., HAMDACHE, A., AGOUIZ, O., LAMARTI, A.**

*Departamento de Biología, Laboratorio de Biotecnología y Mejora de las Plantas, Facultad de Ciencias M'hannech II, BP 2121, 93002 Tetuán, Marruecos. E-mail: lamarti.ahmed@menara.ma*

El oidio de la fresa causada por el hongo *Sphaerotheca macularis*. (Wallr. ex Fr.) sp. *fragariae* parásito obligatorio que causa una enfermedad policíclica en las fresas, produce un síntoma característico de esta enfermedad que consiste en un enrollamiento de los folíolos hacia la cara superior. Desde hace unos años, el oidio afecta aún más a la fresa y los síntomas distan mucho de limitarse al enrollamiento foliar. La variabilidad de los síntomas hace mucho más difícil el diagnóstico visual en el campo.

El presente trabajo consiste en aislar, identificar y purificar el hongo (*Sphaerotheca macularis*) estudiando los efectos de algunos medios nutritivos sobre el crecimiento, la germinación y la esporulación del patógeno. Así mismo se han evaluado *in vitro* la eficacia de algunos fungicidas utilizados en Marruecos, sobre el desarrollo del hongo patógeno. Finalmente, se ha iniciado el estudio de una posible lucha biológica, iniciándose confrontaciones *in vitro* entre aislados de *Sphaerotheca macularis*, y rizobacterias y bacterias endófitas aisladas de las raíces de la fresa cultivada en el campo.

Comprobamos que los medios "Fresa" y PDA permiten un buen desarrollo de *S. macularis*. Los resultados obtenidos *in vitro* sobre el aislado "S m7" ponen de manifiesto que este último presenta efectivamente una resistencia frente a los fungicidas de la familia estrobilurines (marca comercial Ortiva). Las pirimidinas, representados por Rubigán 12EC y los complejos de los cloronitrilos y bencimidazoles dieron resultados muy satisfactorios inhibiendo significativamente la germinación y la esporulación *in vitro* del patógeno.

Una vez realizado el control biológico, en el que se han probando 80 cepas bacterianas se han obtenido algunas interacciones patógeno-antagónista que dieron *in vitro* resultados satisfactorios. Entre ellos se han identificado ciertos aislados idóneos para usarse como microorganismos antagonistas de *Sphaerotheca macularis* sp. *fragariae* en el control biológico del oidio de las fresas cultivadas.

## H-62

**EFFECTO DE ACEITES ESENCIALES EN LA PRODUCCIÓN DE TOXINAS POR *Penicillium aurantiogriseum* Y *Penicillium viridicatum* Y EN LA INHIBICIÓN DEL CRECIMIENTO DE *Bacillus subtilis***

**SAIDI, R., ABDALI, A., AIDOUN, A., KHADDOR, M., EZZIYANI, M., SERRAR, D., HAMDACHE, A., AGOUIZ, O., LAMARTI, A.**

*Departamento de Biología, Laboratorio de Biotecnología y Mejora de las Plantas, Facultad de Ciencias M'hannech II, BP 2121, 93002 Tetuán, Marruecos. E-mail: lamarti.ahmed@menara.ma*

Los aceites esenciales usados en este estudio fueron obtenidos mediante hidrodestilación de eucalipto, romero y artemisa. Las plantas se cosecharon en Marruecos y se usaron 250g de plantas frescas por cada litro de agua, después de dos horas de destilación. Los aceites esenciales se analizaron en un cromatógrafo de gases GLC/MS. Los componentes mas importantes de la esencia de eucalipto identificados fueron: 1.8-cineole (29,5%), p-cymene (11,5%) y  $\alpha$ -terpineol (5,2%). Los del romero fueron 1,8-cineole (40,7%) y alcanfor (10,8%), mientras que los de artemisa fueron  $\beta$ -thujone (35,9%),  $\alpha$ -thujone (22,4%) y alcanfor (13,9%).

Un análisis micológico sobre 410 muestras de aceitunas en salmuera de Marruecos demostró la presencia de *Penicillium crustosum*, *Penicillium viridicatum* y *Penicillium aurantiogriseum* con una abundancia del 46%, 11,3% y 7,9% respectivamente. Estos *Penicillium* toxicogénicos también se han encontrado en los cereales demostrando más resistencia a los agentes antihongos (ácidos sórbicos y benzoicos, propionato cálcico o extracto del cinamomo) que otros hongos. El actual estudio fue diseñado para evaluar el efecto de los aceites esenciales de las tres plantas aromáticas - eucalipto, romero y artemisa- en el crecimiento de *P. viridicatum* (aislado del trigo) y *P. aurantiogriseum* (aislado de aceitunas negras) cultivados en caldo sacarosa-extracto de levadura (SÍ) así como sobre el crecimiento de *Bacillus subtilis*. Se evaluó la producción de compuestos tóxicos por los *Penicillium* cuando crecen en diferentes medios de cultivo como agar del extracto de malta (MEA), de la levadura de Czapeck (CYA) y del SÍ (caldo y agar), al que se adicionan aceites esenciales en diferente concentración. Los resultados obtenidos muestran que *P. aurantiogriseum* produce: ácido penicílico, ácido terrestre y aurantiamina mientras que *P. viridicatum* produce ácido penicílico, ácido terrestre, brevianamida A y xanthomegnin en distintas proporciones según el medio de cultivo utilizado. Hay una disminución significativa del peso seco de ambos hongos al adicionar los aceites esenciales desde 0,055 al 2,5%, siendo el más eficaz el de artemisa seguido por el de eucalipto. El efecto sobre *B. subtilis* fue muy significativo pero varió con la cantidad de líquido filtrado usada, con la temperatura y con la naturaleza de los medios usados en el crecimiento del hongo.

**H-63****EFFECTO DE BIOFUMIGACIÓN, SOLARIZACIÓN Y BIOFUNGICIDAS SOBRE *Phytophthora infestans* EN CULTIVO DE TOMATE****BARRAU, C.<sup>1</sup>, PORRAS, M.<sup>1</sup>, SALAS, D.<sup>1</sup>, RAMOS, N.<sup>2</sup>, SOARES, C.<sup>2</sup>, ROMERO, F.<sup>1</sup>**<sup>1</sup>IFAPA, Centro de Investigación y Formación Agraria (CIFA) Las Torres, Apdo. Correos Oficial, 41200 Alcalá del Río (Sevilla). E-mail: carmen.barrau.ext@juntadeandalucia.es.<sup>2</sup>DRAALG, Aptdo. 282, Patacao 8001-904, Faro, Portugal.

La biofumigación+solarización, la solarización, y tres biofungicidas comerciales: Aen (A), Brotomax (B) y Puxa (P), fueron testadas para el control de *Phytophthora infestans* en cultivo de tomate.

Los ensayos se realizaron en la finca experimental de la DRAALG de Patacao (Portugal) durante dos campañas consecutivas, 2004-05 y 2005-06, en el marco del Proyecto INTERREG III A-ANDALGHORT II. El diseño fue un factorial 2 x 4 en bloques completos al azar, con cuatro repeticiones.

En suelo, naturalmente infestado, se realizó biofumigación utilizando *Brassica carinata*. La solarización se efectuó con plástico de polietileno transparente de 50 µm de grosor, colocando cinta de riego bajo éste para mantener el suelo a capacidad de campo, según lecturas de la sonda de humedad a 20 cm de profundidad.

En semillero, quince días antes de la plantación, se trataron las plántulas con los biofungicidas P y B. El formulado biológico A se aplicó después de la plantación. Se repitió el tratamiento con los tres productos a los 20 días post-plantación, en prefloración y tras la recolección.

La biofumigación+solarización favoreció el desarrollo de la planta e incrementó la producción con respecto a la solarización. Cuando las condiciones ambientales permitieron mantener el invernadero a baja humedad relativa, se observaron brotes sobre los tejidos enfermos, con nueva producción de flores y frutos. El número de plantas con brotes de tejido sano fue mayor en las parcelas tratadas con biofungicidas que en las testigos, en los dos años de estudio.



**H-64****APLICACION DE FUNGICIDAS DE ORIGEN BIOLOGICO EN LA PROTECCION DE MADERAS**

**TROYA, M.T.<sup>1,3</sup>, PRIETO, M.J.<sup>1,2</sup>, RUBIO, F.<sup>3</sup>, MARTÍNEZ, M.P.<sup>3</sup>, LORENZO, M.P.<sup>3</sup>, LORENZO, D.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> Centro de Investigación Forestal, I.N.I.A., Ctra. Coruña Km 7,5, 28040 Madrid.

<sup>2</sup> FKR QUIMICA S.L., Ctra. Morella Km 0,7, Nave 2, 12500 Vinaroz (Castellón).

<sup>3</sup> Fac. de Farmacia, Universidad San Pablo, Urb. Montepríncipe (Boadilla del Monte-Madrid).

La comercialización de los productos utilizados hasta la fecha para el tratamiento de la madera contra hongos, debido a sus características de toxicidad y persistencia en el medio, está siendo prohibida como consecuencia de las exigencias de la Directiva 98/8/CE (Directiva Biocidas), transpuesta a la legislación española en octubre de 2002. Actualmente, entre otras investigaciones, los autores están siguiendo una línea que estudie la eficacia de sustancias biocidas naturales utilizadas en el campo agrícola y de nuevas moléculas aisladas de hongos y bacterias que puedan tener propiedades antifúngicas, para su aplicación en el campo de la protección de maderas.

El objetivo de este trabajo ha sido el estudio de este tipo de productos contra hongos cromógenos y xilófagos, y de nuevos metabolitos con efecto inhibidor del crecimiento de estos hongos, de cara a aislarlos e identificarlos, de forma que se pueda probar su eficacia como protectores de madera, abriendo nuevas posibilidades en este campo como sustancias poco contaminantes.

La evaluación, a nivel de laboratorio, de cara a comprobar la producción de metabolitos, se ha hecho en función de los tamaños de los halos de inhibición generados en los enfrentamientos en placas de agar-malta, de los hongos xilófagos y cromógenos frente a distintas especies del género *Mycena*. Como control de producción de estrobilurinas se ha utilizado la especie *Strobilurus tenacellus*. Tras un periodo de incubación se ha comprobado la existencia de halos de inhibición, y se han seleccionado las especies más productoras procediéndose a seleccionar el medio más adecuado para la producción de antibiótico. Para ello, se han preparado distintos medios de uso frecuente en la producción de metabolitos secundarios, y se han vuelto a realizar los enfrentamientos, frente al hongo xilófago *Postia placenta*.

Los resultados obtenidos han mostrado que muchas especies de *Mycena* pueden producir metabolitos inhibidores contra este tipo de hongos. El estudio de sus extractos, debido a su naturaleza compleja, ha requerido poner a punto un procedimiento de limpieza y concentración de los mismos, en fase sólida (SPE), así como el desarrollo de un método analítico HPLC/MS, tomando como patrones diferentes estrobilurinas comerciales.

En conclusión, se abre un esperanzador camino para el desarrollo de este tipo de productos, que deberían ser modificados para garantizar tiempos mayores de permanencia en la madera, y así poder ser aplicados en las clases de riesgo correspondientes, cubriendo el vacío existente en el mercado, puesto que al ser de baja toxicidad para el hombre y el medio ambiente, cumplirían con las exigencias de la Directiva de Biocidas.

**H-65****EFFECTO COMBINADO DE HONGOS MICORRÍMICOS Y BACTERIAS RIZOSFÉRICAS SOBRE LA VID EN PRESENCIA DEL HONGO PATÓGENO *Armillaria mellea***

**ARMAS-PÉREZ, I.E.<sup>1</sup>, RODRÍGUEZ-ROMERO, A.S.<sup>1</sup>, GARCÍA-FIGUERES, F.<sup>2</sup>, GONZÁLEZ-DÍAZ, E.<sup>1</sup>, JAIZME-VEGA, M.C.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> Dpto. de Protección Vegetal, Instituto Canario de Investigaciones Agrarias (ICIA), Apdo. 60, 38200 La Laguna (Tenerife).

<sup>2</sup> Laboratori de Sanitat Vegetal, D.A.R.P., Vía Circulació Nord, Tram 6, 08040 Barcelona.

El patógeno de origen fúngico *Armillaria mellea* Vahl., agente causal de la podredumbre blanca de la raíz, es uno de los principales problemas fitopatológicos de la vid en Canarias. El uso de microorganismos rizosféricos puede ser una alternativa a considerar entre los métodos de control. Cada vez son más conocidos los beneficios de los hongos formadores de micorrizas arbusculares (MA) sobre la vid y su efecto protector frente a estreses de tipo biótico y abiótico. Asimismo el uso de inoculantes biológicos, como es el caso de las bacterias rizosféricas promotoras del crecimiento vegetal (PGPRs), tiene un potencial considerable como agente de biocontrol y un papel protector al incrementar el desarrollo de las plantas. Con el fin de estudiar la interacción del efecto combinado hongos MA y bacterias PGPRs y el patógeno *A. mellea* hemos diseñado el presente experimento. Para ello, se micorrizaron varetas de vid del cv. Negra Molle con el aislado local *Glomus mosseae*. Después de un mes en condiciones de vivero, se añadió un cóctel de bacterias rizosféricas (*Bacillus* sp. y *Pseudomonas* spp.). Tras 13 meses en estas condiciones, las plantas se inocularon con el patógeno *A. mellea*, previamente multiplicado sobre bellotas, a razón de 2 unidades/planta. El ensayo se prolongó durante 3 años, tras los cuales se procedió al levante de las vides. Los resultados confirman un interesante efecto positivo de los hongos micorrícicos frente a *A. mellea*, aunque nuestros datos no nos permiten corroborar el correspondiente beneficio de las bacterias rizosféricas, ni de la interacción de ambos microorganismos benéficos sobre el patógeno.

## H-66

**CONTROL DE LA RAZA 1.2 DE *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* MEDIANTE PROTECCIÓN CRUZADA****CHIKH-ROUHO, H.<sup>1,2</sup>, ÁLVAREZ, J.M.<sup>1</sup>, GONZÁLEZ-TORRES, R.<sup>2</sup>***Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria de Aragón.*<sup>1</sup>*Unidad de Tecnología en Producción Vegetal.*<sup>2</sup>*Unidad de Sanidad Vegetal.**Apartado 727, 50080 Zaragoza. E-mail: hchikhrouhou@aragon.es; jalvarez@aragon.es; rgonzalez@aragon.es*

Cuatro razas patogénicas de *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* (*Fom*) se han descrito infectando melón (*Cucumis melo* L.) en España: 0, 1, 2 y 1.2. Ésta última se divide en los patotipos 'Yellow' (Y), que causa síntomas de amarilleamiento y 'Wilt' (W) que se exterioriza por una marchitez en verde. Hasta la actualidad se han detectado diversas fuentes de resistencia monogénica dominante a las razas 0, 1 y 2; pero no sucede lo mismo con la raza 1.2, para la que tan solo se ha detectado una resistencia parcial en algunas entradas procedentes del Lejano Oriente. Este tipo de resistencia tiene un control poligénico recesivo difícil de introducir en cultivares comerciales. Por ello, en este trabajo se presenta una vía alternativa de control basada en la protección cruzada. Plantas del cultivar de melón Charentais T, susceptibles a todas las razas de *Fom*, fueron preinoculadas a distintas concentraciones ( $3 \times 10^7$ ,  $3 \times 10^6$  y  $3 \times 10^5$  conidias/ml) con un aislado no patogénico de *Fom* raza 1.2 W, a las 0, 4, 24 y 48 h antes de la inoculación con aislados patogénicos de los patotipos 1.2 Y y 1.2 W, por separado, (concentración:  $3 \times 10^6$  conidias/ml). Las preinoculaciones e inoculaciones se realizaron mediante la inmersión de las raíces de las plántulas en vasos de plástico conteniendo 200 ml de suspensión de conidias y mantenidos en agitación continua a 120 rpm en una cámara climatizada a 28/20 °C (día/noche) y 1.300  $\mu\text{einstein/m}^2$  durante 14 h/día. El 100% de las plantas de melón inoculadas con el agente de biocontrol resultaron asintomáticas durante el transcurso de los experimentos. El 100% de las plantas de melón inoculadas con los patotipos 1.2 Y y 1.2 W de *Fom* murieron entre los 15 y 20 días después de la inoculación. La preinoculación de plantas de melón con el aislado de biocontrol a distintas concentraciones indujo un retraso en la aparición de los síntomas de fusariosis vascular en las plantas inoculadas con el patotipo 1.2 Y y en mayor grado en las inoculadas con el patotipo 1.2 W de *Fom*. Un biocontrol efectivo de la raza 1.2 W de *Fom* se produjo cuando la concentración del agente no patógeno fue de  $3 \times 10^7$  conidias/ml y la preinoculación se realizó 4, 24 y 48 h antes de la inoculación con el patógeno.

**H-67****CONTROL DE LA PODREDUMBRE RADICULAR Y DEL TALLO DE PEPINO (*Cucumis sativus*) MEDIANTE PATRONES DE INJERTO EN CULTIVOS BAJO PLÁSTICO****AÑAÑOS, M.A., BLANCO, R., TELLO, J.C.**

*Departamento de Producción Vegetal, Universidad de Almería, Cañada de San Urbano s/n, 04120 Almería. E-mail: ananos67@yahoo.es*

Una nueva enfermedad viene afectando áreas cultivadas de pepino (*Cucumis sativus* L.), especialmente en invernaderos comerciales hidropónicos del maravilloso poniente almeriense. El patógeno causante de la enfermedad es *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-cucumerinum*, descubierta en la isla de Creta, Grecia durante la campaña 1989-1990, y en otros países posteriormente. En España, el año 2000, se hace el estudio de la especificidad patogénica del hongo, obteniendo resultados que son coincidentes con los descritos en Grecia y permiten hacer una primera aproximación de la enfermedad, asignando como agente incitante observado en pepino *F. oxysporum* f.sp. *radicis-cucumerinum*. El año 2001 se confirman definitivamente estos resultados. No han sido identificadas hasta ahora razas o patotipos de esta forma especializada.

Ante este problema, se planteó como un posible método de control a esta nueva enfermedad, el empleo del injerto. Se usaron siete patrones portainjertos de calabaza (*Cucurbita maxima* x *Cucurbita moschata*), utilizados en el injerto de la sandía, patrones que son resistentes a la fusariosis de esta especie vegetal. Las variedades utilizadas fueron: RS-841, TZ-148, Titán, Hércules, C-16, PS-110, PS-190, y el cv. Borja como testigo sin injertar.

Como resultado de la experiencia, se tiene que ninguno de los siete portainjertos, muestran podredumbre radicular y del tallo, síntomas típicos de la enfermedad incitada por *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-cucumerinum*. La producción obtenida al final de campaña fué: C-16: 11,80 kg/m<sup>2</sup>, Hercules: 11,89 kg/m<sup>2</sup>, Titán: 12,11 kg/m<sup>2</sup>, Tz-148: 12,20 kg/m<sup>2</sup>, RS-841: 13,16 kg/m<sup>2</sup>, PS-190: 13,73 kg/m<sup>2</sup>, PS-110: 15,96 kg m<sup>2</sup> y el testigo cv. Borja sin injertar: 10,60 kg/m<sup>2</sup>, el cual se encuentra en el promedio de rendimiento de pepino en la provincia. La conclusión más inmediata de este trabajo es que los injertos controlan la enfermedad de manera completa e incrementan la producción considerablemente, hasta el 30% en algunos casos.

## H-68

**EFFECTO DEL PACLOBUTRAZOL Y ÁCIDO GIBERÉLICO EN EL DESARROLLO DE *Botrytis cinerea* IN VITRO****MARTÍNEZ, J.A.<sup>1</sup>, NAVARRO, A.<sup>2</sup>, FERNÁNDEZ, J.A.<sup>1,2</sup>, BAÑÓN, S.<sup>1,2</sup>**<sup>1</sup>Departamento de Producción Vegetal, Universidad Politécnica de Cartagena, 30203 Cartagena (Murcia). E-mail: [juanantonio.martinez@upct.es](mailto:juanantonio.martinez@upct.es)<sup>2</sup>Horticultura Sostenible en Zonas Áridas, Unidad Asociada al CSIC-CEBAS, 30100 Espinardo (Murcia). E-mail: [sebastian.arias@upct.es](mailto:sebastian.arias@upct.es)

El paclobutrazol es un triazol utilizado comúnmente como retardante del crecimiento en cultivos ornamentales. Inhibe la síntesis de ácido giberélico en los meristemos subapicales, provocando plantas más compactas, con follaje muy brillante y más resistente a los estreses en general. No obstante, algunos triazoles son utilizados como fungicidas porque interfieren en la síntesis de los esteroides de las membranas fúngicas. El ácido giberélico, una hormona típica vegetal, se encuentra también presente en diversos hongos, pero aún no se ha confirmado inequívocamente su síntesis en *Botrytis cinerea*. La condición fisiológica provocada por el balance hormonal en un momento dado, incluido el ácido giberélico, determina la susceptibilidad de una planta a un patógeno y, por tanto, el establecimiento de la infección y colonización de un microorganismo patógeno. El objetivo del trabajo, ha sido valorar la eficacia del paclobutrazol en el control in vitro de una cepa de *Botrytis cinerea* aislada de la planta *Chamelaucium uncinatum* afectada de la micosis denominada *Botrytis Blight* (Gray Mold). Asimismo, se ha valorado el efecto de la aplicación de ácido giberélico al hongo, tanto en el crecimiento del micelio como en la conidiogénesis y formación de esclerocios. El fin último de la investigación residiría en determinar la eficacia fungicida de una aplicación de paclobutrazol destinada fundamentalmente a provocar plantas más compactas para su cultivo en maceta, por tanto, aprovechar los efectos fungicidas simultáneamente en una aplicación destinada a regular el crecimiento vegetal. Los resultados reflejaron que el paclobutrazol controló el crecimiento de *Botrytis cinerea* a dosis muy bajas (0,05 - 6,25 mg/placa Petri, Ø 90 mm, con aproximadamente 20 ml medio cultivo). También provocó daños irreparables en el micelio, con formación de hifas pardas irregulares. A 6,25 mg, se inhibió casi totalmente la conidiogénesis pero esta dosis no afectó al tamaño de los pocos conidios formados, impidiendo la formación de esclerocios. Dosis iguales o inferiores a 1,25 mg redujo el tamaño de los esclerocios. Por otra parte, el ácido giberélico (1 mM) aplicado por pulverización sobre el micelio de 6 días no afectó al crecimiento de las colonias ni al tamaño de los conidios formados. Tampoco modificó la conidiogénesis, pero sí estimuló el número de esclerocios por placa sin interferir en su tamaño.

**H-69****IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE HONGOS ASOCIADOS A LOS DECAIMIENTOS DE LA VID****COBOS, R., DE LA IGLESIA, E., RODRÍGUEZ, L., MARTÍN, M.T.**

Dpt. Viticultura, ITACYL, Ctra. de Burgos, Km 119, 47071 Valladolid. E-mail: [marvilte@itacyl.es](mailto:marvilte@itacyl.es)

Algunas de las especies de hongos fitopatogenos asociados a los decaimientos de la vid se pueden identificar molecularmente utilizando cabadores específicos. Este es el caso de *Phaeomoniella chlamydospora*, *Phaeoacremonium aleophilum* y *Cylindrocarpon destructans*. Para los otros hongos se recurre a la secuenciación de amplimeros como los que se obtienen con los "Internal Transcribed Spacer" (ITS4-ITS5). Con unas y/o con otras técnicas se han identificado los hongos aislados de 105 muestras de distintas procedencias. Para ello se realizan extracciones de ADN por distintos métodos, utilizando también "Kit" comerciales, dependiendo del tipo de hongo. Los hongos aislados con mayor frecuencia pertenecen a *Botryosphaeria* spp. 30%, *P. chlamydospora* 20%, *P. aleophilum* 16% y *C. destructans* 14%. *Phomopsis viticola*, *Fomitiporia mediterranea*, *Eutypa lata* y *Stereum hirsutum* suman entre los cuatro un 20%. El análisis de las secuencias ITS4-ITS5 de los 71 aislados de *P. chlamydospora* indica una homología de secuencia media de 95%, formando un grupo muy conservado. El árbol filogenético de las secuencias ITS4-ITS5 de los hongos asociados a los decaimientos de la vid muestra también una buena agrupación dentro de cada especie, en este árbol también se observan las distancias entre los distintos hongos asociados a los decaimientos de la vid.

## H-70

**BIOCONTROL DE PATÓGENOS FÚNGICOS CON AISLADOS PROTECTORES DEL GÉNERO *Ceratobasidium* (*Rhizoctonia* BINUCLEADA)****GONZÁLEZ, V.<sup>1</sup>, PORTAL, M.A.<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Departamento de Protección Vegetal y Biotecnología, Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA), Ctra. Moncada-Náquera, Km 4,5, 46113 Moncada (Valencia). E-mail: [vgonzale@ivia.es](mailto:vgonzale@ivia.es)

<sup>2</sup>Museo Nacional de Ciencias Naturales (CSIC), José Gutiérrez Abascal, 3, 28006 Madrid.

Las enfermedades atribuidas a hongos del complejo *Rhizoctonia* causan habitualmente grandes pérdidas económicas en la agricultura. Ciertos aislados de dicho complejo, pertenecientes al denominado grupo de especies de *Rhizoctonia* binucleada (género *Ceratobasidium* Rogers) han sido reportadas como efectivos agentes de biocontrol, frente a cepas patógenas de *R. solani* Kühn. y otros patógenos fúngicos. De este modo, se han descrito fenómenos de protección biológica por parte de aislados hipovirulentos del género *Ceratobasidium* en un amplio rango de especies vegetales de interés agronómico (melón, tomate, lechuga, colza, rábano, patata, guisante, etc.) o forestal (pino). Además de los fenómenos de biocontrol indicados, se ha descrito la capacidad de algunos de estos aislados no patógenos de *Rhizoctonia* binucleada para promover (e incrementar) el crecimiento en ciertos cultivos vegetales, lo que conlleva por parte de dichos aislados la posesión de un alto potencial para su uso como fertilizantes biológicos. La presente comunicación explora el comportamiento como agentes de biocontrol de una serie de cepas pertenecientes a una nueva especie del complejo de hongos de *Rhizoctonia*; *Ceratobasidium albasitensis* V. Gonzalez & V. Rubio, descrita recientemente en España. El potencial de dicho táxon como herramienta de biocontrol fué analizado frente a varios hongos fitopatógenos y sobre diversas especies vegetales, a distintas escalas de experimentación. En lo referente al rango de especies fúngicas sobre las que los aislados de *C. albasitensis* fueron capaces de actuar, es destacable el hecho de que las diferentes cepas mostraron capacidades de protección frente a una serie de géneros fúngicos inéditos hasta la fecha en los diferentes trabajos existentes sobre protección biológica con *Rhizoctonia* binucleada. Así, los aislados de *C. albasitensis* fueron capaces de proteger plántulas de ciertas especies vegetales frente a cepas virulentas de los géneros *Fusarium*, *Alternaria* o *Penicillium*. Además de éstos géneros, las cepas de *C. albasitensis* protegieron efectivamente del ataque de diversos aislados virulentos de *R. solani*, en concordancia con lo observado por numerosos estudios precedentes. Finalmente, algunas de las cepas protectoras ensayadas incrementaron el crecimiento vegetativo de ciertas plantas, incluso en ausencia de patógeno fúngico alguno.

## H-71

**BIOLOGÍA Y DAÑOS DEL ESCUDETE DE LA ACEITUNA CAUSADO POR *Botryosphaeria dothidea*****GONZÁLEZ, N.<sup>1</sup>, VARGAS-OSUNA, E.<sup>2</sup>, TRAPERO, A.<sup>1</sup>**<sup>1</sup>Dpto. Agronomía, ETSIAM, Universidad de Córdoba, Campus Rabanales, Edif. Celestino Mutis, 14071 Córdoba. E-mail: trapero@uco.es<sup>2</sup>Dpto. Ciencias y Recursos Agrícolas y Forestales, ETSIAM, Campus Rabanales, Edif. Celestino Mutis, 14071 Córdoba. E-mail: cr1vaose@uco.es

El escudete de la aceituna es una enfermedad ampliamente distribuida en la cuenca mediterránea que afecta gravemente sobre todo a la aceituna de verdeo. Aunque es una enfermedad poco estudiada, se acepta que están implicados tres agentes bióticos: el hongo *Botryosphaeria dothidea* (anamorfo: *Fusicoccum aesculi*; sinónimos *Macrophoma dalmatica*, *Sphaeropsis dalmatica* o *Camarosporium dalmaticum*) como agente patógeno, el cecidómido *Prolasioptera berlesiana* como posible agente vector y la mosca del olivo (*Bactrocera oleae*) como nexo de unión entre los dos anteriores.

Los estudios se han realizado en dos campos de la provincia de Sevilla, con el cultivar Manzanilla de Sevilla como dominante, que presentaron graves ataques de escudete en años previos. Semanalmente desde el comienzo del verano hasta el final del otoño de 2005 se tomaron muestras de aceitunas afectadas de escudete y de aceitunas sanas. Las observaciones de campo y los análisis de laboratorio realizados permiten concluir que no se observaron síntomas de Escudete ni el cecidómido *P. berlesiana* en las aceitunas sin presencia de mosca. Los datos obtenidos de incidencia de Escudete y del cecidómido no permiten confirmar ni rechazar la hipótesis de que *P. berlesiana* sea vector de *B. dothidea*, ya que en un porcentaje elevado (77,5%) de aceitunas con Escudete no se encontró *P. berlesiana* y en el escaso número de larvas de cecidómido analizadas no se detectó *B. dothidea*. La mayor incidencia de *P. berlesiana* en picada de mosca no viva frente a picada viva, así como en lesiones de escudete, podría sugerir un papel del mosquito como depredador de huevos de mosca y micófago, pero habría que confirmar dicha hipótesis con trabajos en condiciones controladas.

En las muestras analizadas sólo se observó el estado asexual del hongo *F. aesculi*. El estado sexual *B. dothidea*, desconocido para esta enfermedad del olivo, no se ha podido obtener tampoco en condiciones controladas, aunque en ramas de olivo separadas e inoculadas con varios aislados del patógeno se produjeron cuerpos inmaduros que podrían corresponderse con ascomas de dicho estado.

Las aceitunas afectadas de escudete produjeron un aceite que se pudo clasificar en la máxima categoría Virgen Extra, aunque con mayor acidez e índice de peróxidos y menor estabilidad que el obtenido de aceitunas sanas.



## H-72

**SUSCEPTIBILIDAD DE LAS INFLORESCENCIAS Y FRUTOS JÓVENES DEL OLIVO A LA INFECCIÓN POR *Colletotrichum* spp.****MORAL, J.<sup>1</sup>, OLIVEIRA, R.<sup>2</sup>, TELLO, J.C.<sup>3</sup>, TRAPERO, A.<sup>1</sup>**<sup>1</sup>Dpto. Agronomía, ETSIAM, Universidad de Córdoba, Campus Rabanales, Edif. Celestino Mutis, 14071 Córdoba. E-mail: trapero@uco.es<sup>2</sup>Facultad de Ciencias Agrarias de Huambo, Universidade Agostinho Neto, Angola.<sup>3</sup>Dpto. Producción Vegetal, EPS, Universidad de Almería.

El ciclo de patogénesis de *Colletotrichum* spp. (*C. acutatum* y *C. gloeosporioides*) en olivo no es bien conocido. En España, se ha sugerido que el hongo puede sobrevivir desde el invierno hasta el otoño en las aceitunas momificadas que quedan en el árbol. Otros estudios indican que además pueden existir infecciones latentes en los frutos jóvenes. Para aclarar esta situación se han realizado inoculaciones en plantones de olivo con inflorescencias formadas y con frutos jóvenes.

La capacidad infecciosa y patogénica de *Colletotrichum* spp. en inflorescencias de olivo se ha estudiado inoculando plantones al inicio y en plena floración durante las primaveras de 2004 y 2005. Se han utilizado tres variedades: Picual (resistente), Arberquina (moderadamente susceptible) y Hojiblanca (susceptible). La evaluación se ha realizado calculando el número de inflorescencias con fruto. Para estudiar la susceptibilidad de los frutos en desarrollo, se realizaron inoculaciones mensuales de plantones de Hojiblanca con frutos, desde junio (crecimiento del fruto) hasta diciembre (madurez). En todos los ensayos se utilizaron testigos a los que se aplicó agua.

Los aislados de *Colletotrichum* spp. se han comportado como altamente patogénicos sobre las inflorescencias del olivo, independientemente del momento de la inoculación y de la variedad. Las escasas aceitunas que permanecieron en los plantones estaban infectadas y mostraron lesiones de antracnosis durante la maduración. La inoculación de frutos jóvenes ha mostrado que éstos son susceptibles a la infección en cualquier momento, incrementándose la susceptibilidad con el desarrollo del fruto. Nuevamente, las infecciones se mantuvieron quiescentes hasta la maduración, como se ha observado en condiciones de campo.

Estos resultados modifican el ciclo tradicional de la antracnosis del olivo en España, en el cual se consideraba la infección de los frutos durante el otoño como la infección primaria. Ahora se hace necesario considerar las infecciones en inflorescencia y frutos jóvenes en primavera. Esta fase podría ser especialmente importante en algunas regiones o años con primaveras húmedas.

**H-73****INFLUENCIA DE LAS CONDICIONES AMBIENTALES EN LA DISPERSIÓN DE CONIDIOS DEL PATÓGENO *Sphaerotheca macularis* EN CULTIVOS DE FRESA EN LA PROVINCIA DE HUELVA****BLANCO, C.<sup>1</sup>, DE LOS SANTOS, B.<sup>1</sup>, ROMERO, F.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Centro de Investigación y Formación Agraria "Las Torres-Tomejil", IFAPA-CICE, Junta de Andalucía, Apdo. de Correos Oficial, 41200 Alcalá del Río (Sevilla). E-mail: cesar.blanco.ext@juntadeandalucia.es

Una de las enfermedades fúngicas de dispersión aérea más importantes que afecta al cultivo de la fresa es el oidio, ocasionada por *Sphaerotheca macularis*. El patógeno infecta los órganos aéreos de las plantas: hojas, flores, frutos, peciolo y pedúnculo, reduciendo los rendimientos de cosecha y haciendo que el fruto afectado sea inviable para la comercialización.

El objetivo de este trabajo fue determinar la influencia de las condiciones medioambientales en la concentración de inóculo del patógeno. Para ello se utilizó, durante tres campañas consecutivas, un capturador de esporas modelo Burkard, con el que se registró la concentración de conidios del patógeno. Los valores ambientales diarios de temperatura, humedad relativa y precipitación se obtuvieron a partir de los datos registrados en la estación meteorológica de Moguer perteneciente a la Red de Estaciones Meteorológicas de la Junta de Andalucía.

Se determinó el ciclo de dispersión diaria de conidios del patógeno a lo largo de las campañas, encontrando un mayor liberación de los mismos entre las 13 y las 15 horas. La concentración de conidios, a lo largo de los tres años de ensayo, aumentó a medida que el cultivo maduraba, alcanzándose la máxima presencia de conidios en el aire en el mes de mayo. Se observó una correlación significativa y positiva entre la temperatura y la concentración de conidios de *S. macularis*. Las correlaciones entre precipitaciones y concentración de conidios fueron significativas y negativas. Así mismo, se observó una correlación negativa entre humedad relativa y concentración de conidios en el aire.

**H-74****INFLUENCIA DE LAS CONDICIONES AMBIENTALES EN LA DISPERSIÓN DE CONIDIOS DEL PATÓGENO *Botrytis cinerea* EN CULTIVOS DE FRESA EN LA PROVINCIA DE HUELVA****BLANCO, C.<sup>1</sup>, DE LOS SANTOS, B.<sup>1</sup>, ROMERO, F.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Centro de investigación y Formación Agraria "Las Torres-Tomejil", IFAPA-CICE, Junta de Andalucía, Apdo. de Correos Oficial, 41200 Alcalá del Río (Sevilla). E-mail: cesar.blanco.ext@juntadeandalucia.es

Una de las enfermedades fúngicas de dispersión aérea más importantes que afecta al cultivo de la fresa es el moho o podredumbre gris, ocasionada por *Botrytis cinerea*. Esta enfermedad afecta de manera importante a la fresa en todos aquellos países donde se cultiva. Los síntomas aparecen principalmente en las partes más sensibles de la planta, como la flor, el fruto y los pedúnculos florales.

El objetivo de este trabajo fue determinar la influencia de las condiciones medioambientales en la concentración de inóculo del patógeno. Para ello se utilizó, durante tres campañas consecutivas, un capturador de esporas modelo Burkard, con el que se registró la concentración de conidios del patógeno. Los valores ambientales diarios de temperatura, humedad relativa y precipitación se obtuvieron a partir de los datos registrados en la estación meteorológica de Moguer perteneciente a la Red de Estaciones Meteorológicas de la Junta de Andalucía.

Se determinó el ciclo de dispersión diaria de conidios del patógeno a la largo de las campañas, encontrando una mayor liberación de los mismos entre las 6:00 y las 17:00 horas. La concentración de conidios, a lo largo de los tres años de ensayo, aumentó a medida que el cultivo maduraba, alcanzándose la máxima presencia de conidios en el aire en los meses de abril y mayo. Se observó una correlación significativa y positiva entre la concentración de conidios de *B. cinerea* capturados y la temperatura media; mientras que las correlaciones entre concentración de conidios y humedad relativa o precipitación fueron significativas pero negativas.

**H-75****DISPERSIÓN DE *Verticillium dahliae* EN EL AGUA UTILIZADA PARA EL RIEGO DE OLIVARES EN ANDALUCÍA****RODRÍGUEZ-JURADO, D., BEJARANO-ALCÁZAR, J.**

CIFA "Alameda del Obispo", IFAPA, Apdo. 3092, 14080 Córdoba.

El riego puede influir en el desarrollo de las verticilosis por diferentes mecanismos entre los que destaca su papel como vehículo de dispersión del inóculo de *Verticillium dahliae*. La dispersión de este patógeno en el agua de riego de olivares, podría explicar la súbita aparición de árboles enfermos que se observa tras la implantación de regadío en olivares tradicionales sin antecedentes de verticilosis, y la rápida extensión de la enfermedad en plantaciones de olivar intensivo en regadío. Por ello, nos planteamos determinar y cuantificar el tipo de propágulos de *V. dahliae* presentes en el agua utilizada para el riego de olivares en Andalucía, y estudiar la evolución temporal de los niveles de dichos propágulos en el agua. Se realizaron prospecciones de un total de 33 campos de olivo afectados por la verticilosis en las provincias de Jaén y Sevilla en los años 2004 (5 y 18, respectivamente) y 2005 (7 y 14, respectivamente), siendo 11 de los campos comunes en ambos años de muestreo. En cada campo, se analizaron 2-8 muestras de 0,5 L de agua obtenidas desde marzo hasta julio del año 2004, y 3-4 muestras de 1000 L de agua recolectadas desde febrero hasta abril de 2005. *V. dahliae* fue aislado sólo de las muestras de agua analizadas en el año 2005. El patógeno infestó el agua de riego del 85,7% de los campos prospectados en cada provincia, que se abastecieron con agua embalsada de origen en el río Guadalquivir o de pozo en Jaén, y con agua de pozo en Sevilla. El tipo de propágulo del hongo presente en el agua varió principalmente con el periodo de prospección, y la cantidad de conidias lo hizo con aquél y con el campo, en tanto que la cantidad de esclerocios sólo varió con el campo. En el agua de riego infestada de los campos en Jaén, los esclerocios se detectaron en todos los periodos de muestreo considerados, excepto en la 2ª quincena de marzo (2º muestreo), en un porcentaje variable (17-33%) de diferentes campos, y en cantidades estimadas de 1-7/1.000 l de agua según el campo; mientras que las conidias se aislaron en la 2ª quincena de marzo (2º muestreo) y 1ª de abril (3º muestreo), en un porcentaje de campos mayor (33%) y en número más elevado, 1.000-4.000/1.000 L según el campo, en el primer periodo indicado. En el agua de riego infestada de los campos en Sevilla, los esclerocios se identificaron desde la 2ª quincena de febrero (1º muestreo) hasta la 1ª quincena de abril (3º muestreo), pero en diferentes campos (8-17%), y en cantidades de 1-25/1000 L según el campo; de otra parte, las conidias se aislaron en todos los periodos de muestreo, con una incidencia de campos variable (8-75%), que fue mucho mayor en la 1ª quincena de marzo (2º muestreo) coincidiendo con los valores estimados más elevados de conidias, 2.000-108.000/1.000 L según el campo.

## H-76

**CORRELACIÓN DE LA VIRULENCIA CON LOS GRUPOS AFLP Y EL HUÉSPED DE ORIGEN EN POBLACIONES DE *Verticillium dahliae***

RODRÍGUEZ-JURADO, D.<sup>1</sup>, JIMÉNEZ-DÍAZ, R.M.<sup>2,3</sup>, VALVERDE-CORREDOR, A.<sup>3</sup>, MERCADO-BLANCO, J.<sup>3</sup>

<sup>1</sup> CIFA "Alameda del Obispo", IFAPA, Apdo. 3092, 14080 Córdoba.

<sup>2</sup> ETSIAM, Universidad de Córdoba, Apdo. 3048, 14071 Córdoba.

<sup>3</sup> Instituto de Agricultura Sostenible, CSIC, Apdo. 4084, 14080 Córdoba.

En estudios anteriores, los VCGs de aislados de *Verticillium dahliae* correlacionaron con su agrupación mediante análisis de AFLPs y se diferenciaron subgrupos moleculares dentro de determinados VCGs. La utilidad de los marcadores AFLP específicos de (sub)grupos moleculares para el diagnóstico y control de las verticilosis, dependerá de la relación entre ellos y el fenotipo de virulencia de los aislados pertenecientes a cada grupo. Además, la correspondencia que pueda existir entre el huésped de origen de los aislados y la virulencia de los mismos es información de interés para el manejo de las verticilosis. En este trabajo se ha investigado si la asignación de aislados de *V. dahliae* a un grupo AFLP está correlacionada con su virulencia en algodónero y sandía, y si ésta presenta relación con el huésped de origen de los aislados. La virulencia de 29 aislados de *V. dahliae* originarios de alcachofa (9), algodónero (10), melón (1), olivo (5), ornamentales leñosas (3) y sandía (1), procedentes en su mayoría de la cuenca mediterránea, y representativos de los grupos AFLP principales 1 $\alpha$  (4), 1 $\beta$  (3), 2 $\alpha$  (8), 2 $\beta^{334}$  (6), 2 $\beta^{824}$  (4), 4 $\beta$ I (1) y 4 $\beta$ II (3), y de los subgrupos 2 $\alpha$ I (1), 2 $\alpha$ II (3), 2 $\alpha$ III (4), 2 $\beta^{824}$ I (2) y 2 $\beta^{824}$ II (2), se determinó mediante inoculaciones artificiales de sandía Dulce Maravilla y algodónero Coker 310 y Conchita en condiciones controladas. Los resultados indicaron que las relaciones entre la virulencia de los aislados y su asignación a (sub)grupos AFLP o huésped de origen variaron en mayor extensión entre algodónero y sandía que entre los dos genotipos de algodónero utilizados. La virulencia sobre el cv. Coker 310 susceptible correlacionó con la mayoría de los (sub)grupos AFLP, pero dicha relación fue escasa sobre el cv Conchita tolerante y no hubo correlación en sandía. Los aislados más virulentos sobre los cultivares de algodónero fueron los del grupo 1 $\alpha$ , mientras que los más virulentos sobre sandía pertenecieron a los grupos AFLP 1 $\beta$ , 2 $\beta^{824}$  y 4 $\beta$ I, que conformaron un sólo grupo de virulencia. La reacción de enfermedad sobre los cultivares de algodónero causada por los aislados originarios de algodónero, olivo y leñosas ornamentales resultó en promedio significativamente más severa que la inducida por los aislados de huéspedes hortícolas. Por el contrario, los aislados de huéspedes leñosos ornamentales fueron los más virulentos en sandía, y el resto de aislados no causaron reacciones significativamente diferentes en este huésped.

Subvencionado por el proyecto CICYT AGL2003-00503.

**H-77****EFFECTO DE LOS FACTORES DE PREDISPOSICIÓN A LA ENFERMEDAD: ESTRÉS HÍDRICO Y DEFICIENCIAS NUTRICIONALES, ASOCIADOS A LA INFECCIÓN POR *Sphaeropsis sapinea* Y *Fusarium circinatum* EN PLÁNTULA DE *Pinus radiata*****ITURRITXA, E.<sup>1</sup>, HEPPE, E.<sup>1</sup>, SÁNCHEZ-ZABALA, J., DUNABEITIA, M.<sup>2</sup>**<sup>1</sup>NEIKER, Dpto Producción y Protección Vegetal, Granja Modelo-Arkaute, Apdo. 46, 01080 Vitoria-Gasteiz<sup>2</sup>Universidad del País Vasco, Dpto de Biología Vegetal y Ecología, Apdo. 644 P.K. 48080 Bilbao.

Se estudia el efecto en la infección por parte de SS y F sobre planta de vivero de *Pinus radiata*, sometida a situaciones de predisposición a la enfermedad, heridas, deficiencias de abonado y estrés hídrico.

Se analiza el efecto de los tratamientos en el crecimiento y desarrollo de la planta de vivero, mediante parámetros dasométricos (alturas y diámetros) y fisiológicos (intercambio gaseoso y actividad fotosintética)

Se estiman los daños ocasionados, por la inoculación de los hongos *Sphaeropsis sapinea* y *Fusarium circinatum*, en la plantas tratadas frente al control sin tratamiento y en el control como indicador de la agresividad de las especies. Se contrastan los resultados obtenidos en condiciones de laboratorio con los observados en vivero.

Se han detectado diferencias entre tratamientos y respuestas diferenciales de la planta con respecto a la especie de hongo inoculada. Independientemente de los factores de predisposición a la enfermedad, en igualdad de condiciones de estudio, la especie *Fusarium circinatum* muestra una mayor agresividad con respecto a *Sphaeropsis sapinea* en planta de *Pinus radiata*.

## H-78

**EFFECTO DE DIFERENTES SISTEMAS DE CULTIVO SIN SUELO SOBRE LA DISPERSIÓN Y SEVERIDAD DE *Verticillium dahliae* EN FRESÓN****MARTÍNEZ, F.<sup>1</sup>, CASTILLO, S.<sup>1</sup>, TELLO, J.C.<sup>2</sup>, AVILÉS, M.<sup>1</sup>**<sup>1</sup>Dpto. Ciencias Agroforestales, Universidad de Sevilla, Carretera Utrera, Km 1, 41013 Sevilla. E-mail: aviles@us.es<sup>2</sup>Dpto. Producción Vegetal, Universidad de Almería, Carretera Sacramento s/n, 04120 La Cañada de San Urbano (Almería).

En los sistemas de cultivo sin suelo (CSS), la microflora presente en la solución nutritiva recirculante (SNR) juega un papel importante en la incidencia de enfermedades. Por ello, es importante adoptar métodos de desinfección biológicos, como la filtración lenta en lecho de arena (FLA), donde no se esteriliza la SNR y permite el desarrollo de dicha microflora. En este trabajo se estudió el efecto de tres sistemas de CSS: abierto (A), cerrado (C) y cerrado con FLA (CFLA) sobre la dispersión y la severidad de la afección producida por *Verticillium dahliae*. El diseño fue completamente al azar con 3 repeticiones. Cada repetición consistió en una línea de cultivo colgante de 6 metros de longitud con 65 plantas de fresas (*Fragaria x ananassa* Duch.) de la variedad Camarosa, de las cuales se inocularon con *V. dahliae* las 12 últimas plantas de la línea de cultivo. El ensayo se prolongó durante dos campañas (2002/03 y 2003/04) sustituyendo las plantas para la segunda campaña. La inoculación de *V. dahliae* se realizó al inicio del primer año del ensayo. El sustrato utilizado fue fibra de coco. La dispersión de la enfermedad en los sistemas de CSS se estudió mediante la detección de los propágulos en la SNR y en el sustrato y mediante la evaluación de la intensidad de enfermedad en la zona no inoculada de la línea. Se ha constatado que la FLA no elimina los propágulos de *V. dahliae* y que no se observan diferencias en la concentración de propágulos del mismo en las distintas soluciones drenadas (antes del filtro) de los tres sistemas. En la zona inoculada, el número de microesclerocios recuperados fue significativamente mayor que en la zona no inoculada. Observándose una dispersión de *V. dahliae* desde la zona de inoculación. En la segunda campaña la concentración de microesclerocios en el sistema C se redujo significativamente respecto a los otros sistemas. En la primera campaña en el sistema CFLA se apreció un incremento de la severidad al final respecto al resto de sistemas. Una reducción de la biomasa microbiana en la SN después del filtro en el sistema CFLA podría mejorar la viabilidad de las conidias dispersadas de *V. dahliae*. Esto junto a la no reducción de los propágulos de *V. dahliae* por la FLA podría justificar el incremento de la severidad registrada.

**H-79****INCIDENCIA DE ELEMENTOS DE dsRNA EN HONGOS ENDOFITICOS DE GRAMÍNEAS****HERRERO, N., GARCÍA, B., ZABALGOGEAZCOA, I.***Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología de Salamanca, CSIC, Cordel de Merinas 40-52, 37008 Salamanca.*

Es común en la mayoría de las plantas la presencia de hongos que viven en su interior de forma asintomática. Son los llamados hongos endofíticos. En gramíneas son frecuentes, y así, se han aislado un gran número de géneros de endofitos en especies como *Dactylis glomerata* y *Holcus lanatus*. De manera similar, la infección de hongos por virus es frecuentemente un proceso en el cual no hay aparición de síntomas. El dsRNA asociado a hongos suele representar genomas de virus. El objetivo de este trabajo es conocer cual es la incidencia de moléculas de dsRNA en una colección de hongos endofíticos aislados de gramíneas. De este modo, se realizó un análisis sistemático de un total de 32 especies de endofitos, pertenecientes a 13 géneros diferentes: *Acremonium*, *Chaetomium*, *Colletotrichum*, *Coniothyrium*, *Cordyceps*, *Drechslera*, *Fusarium*, *Helgardia*, *Leptodontidium*, *Penicillium*, *Phaeosphaeria*, *Stemphyllium* y *Valsa*. De las 32 especies 6 portaban en su interior elementos de dsRNA de tamaños comprendidos entre 0,5 y 3 Kb. La frecuencia obtenida ha sido pues, de casi un 19%, demostrándose que la presencia de estos elementos de dsRNA, indicativos de infección vírica, es común en endofitos de gramíneas.



## H-80

**SUPERVIVENCIA Y POTENCIAL DE INÓCULO DE *Verticillium dahliae* EN RESTOS DE PODA DE OLIVOS INFECTADOS****CABEZA-FERNÁNDEZ, E., BEJARANO-ALCÁZAR, J.**

CIFA Alameda del Obispo, IFAPA, Apdo. 3092, 14080 Córdoba. E-mail: [elvira.cabeza.ext@juntadeandalucia.es](mailto:elvira.cabeza.ext@juntadeandalucia.es)

El establecimiento de cubiertas inertes basadas en material de poda troceado constituye uno de los sistemas de manejo del suelo utilizados habitualmente en el olivar. En este sentido, se ha indicado que las hojas caídas de olivos infectados por *Verticillium dahliae* pueden actuar como fuente de inóculo potencial del patógeno. Sin embargo, aunque se ha sugerido que las ramas de olivos infectados podrían contribuir también al mantenimiento y dispersión del hongo, su papel en la epidemiología de la verticilosis del olivo no ha sido suficientemente investigado. En este trabajo se ha estudiado la supervivencia y potencial de inóculo de *V. dahliae* en ramas de olivos enfermos utilizadas como cubierta inerte. Se han realizado experimentos en dos campos de olivar cv. Picual situados en Marchena y Morón de la Frontera (Sevilla), en los años 2003 y 2004, respectivamente. Restos de poda de olivos infectados por los patotipos defoliante (D) o no defoliante (ND) de *V. dahliae* en el año 2003, y de olivos infectados por el patotipo D en el año 2004, fueron troceados y mantenidos sobre el suelo al pie de cada árbol durante 150 (febrero a julio de 2003) o 210 (febrero a septiembre de 2004) días. Periódicamente, se realizaron aislamientos de 30 trozos de ramas de cada olivo. Asimismo, el potencial infectivo de los restos de poda troceados de olivos infectados por el patotipo D mantenidos durante 0, 30, 60, 90 o 120 días bajo los árboles cada año, se evaluó mediante bioensayos en condiciones controladas en los que plantas del algodón Acala cv. SJ-2, susceptible a la verticilosis, crecieron en suelo estéril mezclado con los restos finamente molidos. La frecuencia de aislamiento de *V. dahliae* a partir de las ramas troceadas de olivos infectados por el patotipo D, disminuyó progresivamente desde valores iniciales de 35 y 47% hasta alcanzar valores prácticamente nulos o nulos a los 150 y 210 días después de la poda, en los años 2003 y 2004, respectivamente. Comparativamente, la frecuencia de recuperación inicial del hongo a partir de las ramas picadas de olivos infectados por el patotipo ND fue mucho menor (7%), y se anuló a los 60 días de la poda. Las plantas de algodón mostraron síntomas de verticilosis en todos los bioensayos realizados, siendo la incidencia media de plantas enfermas de 13 y 25% en los años 2003 y 2004, respectivamente. Los resultados obtenidos indican que *V. dahliae* puede sobrevivir y mantener su potencial infectivo prolongadamente en los restos de poda de olivos infectados que son utilizados como cubierta inerte. Consecuentemente, dichos restos pueden representar un medio eficiente de dispersión del inóculo del patógeno en campos de olivar.

## H-81

**EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD PREDICTIVA DE UN MODELO EPIDEMIOLÓGICO (ALTERIAM 1.0) PARA EL CONTROL DE *Alternaria alternata* pv. *citri***

**BADAL, J.<sup>1</sup>, ZORNOZA, C.<sup>1</sup>, ARMENGOL, J.<sup>1</sup>, CUENCA, F.<sup>2</sup>, ALFARO-LASSALA, F.<sup>2</sup>, GARCÍA-JIMÉNEZ, J.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>*Instituto Agroforestal Mediterráneo, Universidad Politécnica de Valencia, Camino de Vera s/n, 46022 Valencia. E-mail: joabate@etsia.upv.es.*

<sup>2</sup>*Área de Protección de los Cultivos, Generalitat Valenciana, Silla (Valencia).*

La mancha marrón de los cítricos causada por *Alternaria alternata* pv. *citri* es un grave problema en la producción de las variedades híbridas Fortune y Nova en las zonas citrícolas españolas. Con el objeto de conocer en qué momento se deben realizar los tratamientos fungicidas para el control de la enfermedad se ha desarrollado un modelo predictivo (Alteriam 1.0). Este modelo se basa en unos valores acumulados diariamente que son asignados a partir de valores de temperatura, humedad relativa y humectación.

Desde marzo de 2003 a marzo de 2005 se realizó una evaluación de la capacidad predictiva del modelo y del nivel de control de la enfermedad. Para ello se hicieron aplicaciones fungicidas en los momentos en que según el modelo había riesgo de infección. El estudio se desarrolló en dos fincas de cítricos de la variedad Fortune, una situada en Ribarroja y otra en Monserrat (Valencia).

El modelo predijo todas las infecciones observadas en campo en ambas parcelas y se consiguió en el momento de la cosecha un nivel de control de la enfermedad muy elevado. Los resultados confirman que el modelo Alteriam 1.0 es una herramienta útil, para saber en qué momento hay que realizar los tratamientos fungicidas y para mejorar el control de la enfermedad reduciendo los tratamientos a los estrictamente necesarios.

En el presente año se están llevando a cabo estudios de validación definitiva del modelo en ocho fincas de distintas zonas citrícolas de la provincia de Valencia.

El presente trabajo ha sido financiado parcialmente por la Consellería de Agricultura, Pesca y Alimentación de la Generalitat Valenciana (Proyecto de Investigación GV-CAPA00-12).

## H-82

**CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE *Alternaria alternata* pv. *citri*, AGENTE CAUSAL DE LA MANCHA MARRÓN DE LOS CÍTRICOS****ABAD-CAMPOS, P., LEÓN, M., NOGUERA, B., BADAL, J., VICENT, A., GARCÍA-JIMÉNEZ, J.***Instituto Agroforestal Mediterráneo, Universidad Politécnica de Valencia, Camino de Vera s/n, 46022 Valencia.*

Desde 1998, año de su detección en España, la mancha marrón de los cítricos ha ampliado su área de distribución a la Comunidad Valenciana, Murcia, Andalucía y Cataluña, causando graves daños sobre frutos y hojas de variedades susceptibles, principalmente Fortune y Nova. La posición taxonómica del agente causal ha sido confusa, siendo descritas 8 morfoespecies de *Alternaria* asociadas a esta enfermedad. Por el contrario, los análisis filogenéticos indican que todos los aislados de *Alternaria* que forman esporas pequeñas y son originales de cítricos pertenecen a la especie *Alternaria alternata*. De los diversos marcadores habitualmente empleados en la sistemática molecular de hongos, varios no han sido resolutivos en el estudio de este patógeno, mientras que las filogenias estimadas a partir de secuencias del gen de la endopoligalacturonasa (endoPG) y dos regiones anónimas, OPA1 y OPA2, han sido congruentes. Por ello, a partir de una colección de aislados de *A. alternata* pv. *citri*, se realizó una selección basada en el origen geográfico y de hospedante, con el fin de valorar el grado de variabilidad genética en la población española de este patógeno así como su grado de relación con aislados procedentes de otras áreas citrícolas. Se amplificó 464 pb del gen endoPG, ~900 pb de la región genómica OPA1 y ~600 pb de la región genómica OPA2, usando parejas de cebadores específicos. La filogenia inferida se ha basado en el alineamiento y análisis de las secuencias generadas y de diversas accesiones homólogas de aislados de *Alternaria* (asociados a las enfermedades que causan en hospedantes cítricos y no cítricos, y aislados de *A. alternata* no patógenos) de orígenes geográficos no españoles. Los resultados revelan variación genética intrapoblacional de *A. alternata* pv. *citri* asociada a la mancha marrón presente en las áreas citrícolas de nuestro país. La mayoría de los aislados se distribuyen en dos grupos, que poseen diversidad de origen tanto geográfico como de hospedante. Estos dos grupos son representativos de dos de los tres linajes que *A. alternata* pv. *citri* muestra a nivel mundial. La distribución geográfica conocida de uno de ellos incluye áreas citrícolas de Turquía, Israel, Sudáfrica y Australia, mientras que el segundo linaje contiene aislados originales de Israel, Sudáfrica, Australia y Florida.

## H-83

**BIOLOGÍA DE LA INFECCIÓN Y NATURALEZA DEL INÓCULO QUE DETERMINA LOS ATAQUES DE MILDIU EN ADORMIDERA****MONTES, M.<sup>1</sup>, LANDA, B.B.<sup>1,2</sup>, MUÑOZ-LEDESMA, F.J.<sup>3</sup>, JIMÉNEZ-DÍAZ, R.M.<sup>1,2</sup>**<sup>1</sup>Instituto de Agricultura Sostenible, CSIC, Apdo. 4084, 14080 Córdoba.<sup>2</sup>Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos y Montes, Universidad de Córdoba, Edificio C4-Celestino Mutis, Ctra. de Madrid, Km 396, Campus de Rabanales, 14071 Córdoba.<sup>3</sup>Alcaliber, S.A. Ctra. Carmona-El Viso del Alcor, Km 1,8, Carmona (Sevilla).

El mildiu de la adormidera (*Peronospora arborescens*) causa importantes pérdidas en cultivos de adormidera (*Papaver somniferum*) en España. El ciclo de patogénesis de la enfermedad es escasamente conocido, y en la mayoría de los casos su interpretación se basa en las infecciones foliares y en la información existente sobre patosistemas similares. Este conocimiento insuficiente de aspectos claves del patosistema dificulta el desarrollo de estrategias para el control eficiente de la enfermedad. En este trabajo hemos abordado el estudio de la biología de la interacción *P. somniferum*/*P. arborescens* con el objetivo principal de determinar la fuente de inóculo primario y el/los tipo(s) de infección más determinantes para el desarrollo del mildiu. Para ello, durante las campañas 2004/05 y 2005/06 se realizaron siembras en microparcelas sin historia de cultivo adormidera utilizando lotes de semilla de adormidera libres de *P. arborescens* o contaminadas por dicho agente (en ambos casos determinadas mediante análisis de ADN total de las semillas en ensayos PCR-específica de *P. arborescens*). Además, en un grupo de microparcelas se incorporó suelo procedente de parcelas comerciales con historia de adormidera y alta incidencia de mildiu, o restos de adormideras infectadas conteniendo numerosas oosporas del patógeno. Dicho desarrollo experimental se reprodujo en experimentos en condiciones controladas. Además, se realizaron inoculaciones artificiales depositando sobre las hojas gotas de una suspensión de 10<sup>6</sup> esporangios/ml. Las observaciones del desarrollo de los síntomas en un curso temporal en condiciones de campo y condiciones controladas confirmaron que tiene lugar la infección sistémica de la planta por el patógeno, y demostraron que las oosporas formadas en los tejidos foliares infectados son inóculo efectivo para dichas infecciones sistémicas; así como que los esporangios formados en hojas cloróticas son efectivos como inóculo para originar infecciones secundarias de tejidos foliares. Asimismo, se ha demostrado que las semillas de adormidera infestadas/infectadas también son efectivas como fuente de inóculo primario del mildiu de la adormidera. Estos resultados indican que para el control eficiente de la enfermedad deben ser consideradas estrategias que aseguren la sanidad de la semilla y eviten el uso de suelos con historia de mildiu o del cultivo huésped.

## H-84

**DIVERSIDAD GENÉTICA DEL AGENTE CAUSAL DEL MILDIU DE LA ADORMIDERA EN ESPAÑA****LANDA, B.B.<sup>1,2</sup>, MONTES, M.<sup>1</sup>, MUÑOZ-LEDESMA, F.J.<sup>3</sup>, JIMÉNEZ-DÍAZ, R.M.<sup>1,2</sup>**<sup>1</sup>*Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos y Montes, Universidad de Córdoba, Edificio C4-Celestino Mutis, Ctra. Madrid, Km 396, Campus de Rabanales, 14071 Córdoba.*<sup>2</sup>*Instituto de Agricultura Sostenible, CSIC, Apdo. 4084, 14080 Córdoba.*<sup>3</sup>*Alcaliber, S.A. Ctra. Carmona-El Viso del Alcor, Km 1,8, Carmona (Sevilla).*

En el curso de los últimos años, la incidencia y severidad de los ataques de mildiu de la adormidera en España se han incrementado a medida que el cultivo se ha extendido a nuevas zonas frescas y húmedas o se ha incorporado al regadío. En el año 2003 identificamos como *P. arborescens* (*Pa*) al agente causal de dicha enfermedad en España, mediante caracteres morfológicos y análisis y secuenciación de la región ITS1-5,8S-ITS2 del ADNr extraído de micelio del patógeno. *P. arborescens* fue descrito como agente causal de mildiu de *Papaver* spp. en Europa en 1929; pero recientes estudios de diagnóstico molecular en Australia identificaron a *P. cristata* (*Pc*) como agente causal de la enfermedad en Tasmania. El objetivo de este trabajo ha sido confirmar la composición y diversidad de las poblaciones de *Peronospora* spp. en cultivos comerciales de adormidera afectados por mildiu así como en *Papaver* spp. silvestres en las diferentes zonas de España, en relación con poblaciones de *Pa* y *Pc* de otras partes del mundo, y determinar la diversidad genética que pueda existir en ellas. Para ello, durante 2003-2006 hemos muestreado tejidos afectados de adormidera y de *Papaver* spp. arvenses sintomáticas y asintomáticas en las principales áreas de cultivo, incluyendo las provincias de Albacete, Córdoba, Málaga, Sevilla y Toledo, de los que se extrajo el ADN genómico micelial (mediante FastPrep® y el kit FastDNA-Qbiogene) y se amplificó la región ITS1-5,8S-ITS2 con cebadores universales y cebadores específicos de Pythiales y Peronosporales. En estos análisis se incluyeron muestras de ADN de *Pc* de Australia y Reino Unido. Los amplicones se secuenciaron y con las secuencias se realizó un análisis filogenético con los métodos Neighbour Joining y Maximun Parsimony y el programa Bionumerics 4.5. Los resultados demuestran que *Pa* es el único agente causal del mildiu de la adormidera en España, y que las secuencias ITS obtenidas presentan homología de 99,3 a 99,6% con las de *Pa* de la base de datos del GenBank, y de 81,5 y 94,0% con las de *Pc* de Australia y Europa, respectivamente. Entre las secuencias ITS obtenidas se diferencian cuatro grupos principales que varían en un total de ocho nucleótidos en las regiones 5,8S e ITS2. Los dos análisis indican que *Pc* se encuentra más alejada filogenéticamente de *Pa* que de otras *Peronospora* spp. (p.ej, *P. destructor*, *P. farinosa* y *P. tabacina*) cuyos huéspedes se encuentran en familias distintas a *Papaveraceae*.

**H-85****FALSO MAL DE PANAMÁ DE LA PLATANERA (*Musa acuminata*): RESULTADOS DE UN ENSAYO DE COMPACTACIÓN DEL SUELO Y DIFERENTES DOSIS DE RIEGO EN EL SEGUNDO CICLO DE PRODUCCIÓN****SABADELL, S., ALCOVERRO, T., HERNÁNDEZ, J.M.***ICIA, Dpto. de Protección Vegetal, Apdo. 60, 38088 La Laguna (Tenerife).*

El falso mal de Panamá de la platanera, con síntomas similares a los del mal de Panamá, producido por *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*, es una enfermedad cuya etiología sigue siendo incierta. Las pruebas de patogenicidad con las especies fúngicas (*Fusarium* spp.) y bacterianas asociadas, han sido siempre negativas. Evidencias de campo y de ensayos de invernadero sugieren que ciertos factores abióticos deben jugar un papel en su desarrollo.

Para estudiar la influencia de la compactación del suelo y de la dosis de riego se diseñó un ensayo de campo con tres dosis de riego, compactación del suelo y prácticas agronómicas pre-plantación (lavado de sales; enmiendas minerales y orgánicas), que se dispuso según un diseño de bloques al azar, con tres repeticiones y tres dosis de riego. Las prácticas agronómicas fueron las habituales de la zona. En este segundo ciclo de producción se estudiaron las variables físico-químicas del suelo, el peso del racimo y la aparición de síntomas.

Se obtuvieron síntomas internos en dieciséis plantas, frente a cinco en el primer ciclo. Para necrosis del rizoma se observaron diferencias significativas entre bloques y dosis de riego. Entre plantas sanas y enfermas hubo diferencias significativas para pasta saturada (PS), conductividad eléctrica (CE) y capacidad de intercambio catiónico (CIC). Algunas variables físico-químicas del suelo, como la suma de cationes cambiabiles, el Ca cambiabie, el Fe, el Zn y la materia orgánica presentaron diferencias para los factores bloque, riego o para ambos. No hubo diferencias significativas para peso del racimo entre plantas sanas y enfermas. Tampoco hubo para el factor bloque, pero sí para el factor riego. Estos resultados, junto con los del primer ciclo, muestran que se ha conseguido reproducir los síntomas, pero no aclaran la etiología de la enfermedad, por lo que los estudios deben continuarse con diseños más refinados que incluyan las variables estudiadas y otras variables.

**H-86****DISPERSIÓN Y DISTRIBUCIÓN DE *Cryphonectria parasitica* EN CASTILLA Y LEÓN****ZAMORA, P.<sup>1</sup>, SIERRA, J.M.<sup>1</sup>, DíEZ, J.J.<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>*Centro de Sanidad Forestal de Calabazanos, Consejería de Medio Ambiente, Junta de Castilla y León, Polígono de Villamuriel, 34190 Villamuriel de Cerrato (Palencia). E-mail: zambrapa@jcyl.es*

<sup>2</sup>*Departamento de Producción Vegetal y Recursos Forestales, ETSIIAA Palencia, Universidad de Valladolid, Avda. Madrid, 57, 34004 Palencia. E-mail: jdcasero@pvs.uva.es*

El hongo *Cryphonectria parasitica* causante del chancro de castaño ha diezariado las masas de castaño europeas desde su introducción en 1938. Actualmente, esta enfermedad se encuentra en expansión en las distintas provincias de Castilla y León, provocando la muerte de numerosos castaños. Con el fin de determinar la posible influencia de factores edáficos, climáticos, ambientales y de situación en la diseminación y distribución del chancro, se llevó a cabo un muestreo en el que se recogieron datos sobre edad de los castaños, orientación de las parcelas, orografía, suelo, labores selvícolas, regeneración, restos de madera y localización respecto a caminos o carreteras en las provincias de León, Zamora, Salamanca y Ávila.

Mediante muestreo sistemático se replantearon un total de 252 parcelas. En cada parcela fueron analizados un total de 16 árboles para determinar la presencia de chancro. En caso de existencia de chancro, también se recogieron datos de las características de los mismos como dimensiones, aspecto, presencia/ausencia de cuerpos de fructificación, etc., útiles a la hora de determinar el estado de avance del patógeno o presencia de posibles cepas hipovirulentas.

Debido a la reciente expansión del chancro en las provincias de Salamanca y Zamora, el muestreo sistemático fue complementado mediante un muestreo dirigido, para poder caracterizar todas las masas afectadas por esta enfermedad. En este segundo muestreo fueron analizadas un total de 33 parcelas.

Los datos obtenidos han permitido determinar el estado real de las masas de castaño con respecto al chancro en relación con su distribución y dispersión.

## H-87

**DIVERSIDAD GENÉTICA EN LAS POBLACIONES DE *Fusarium oxysporum* DE TABACO EN EL VALLE DEL TIÉTAR: GRUPOS DE COMPATIBILIDAD VEGETATIVA (VCGS)**

RODRÍGUEZ-MOLINA, M.C.<sup>1</sup>, GARCÍA-BARRADO, J.A.<sup>2</sup>, PALO-OSORIO, C.<sup>1</sup>, PALO-NÚÑEZ, E.J.<sup>1</sup>, ALVES-SANTOS, F.M.<sup>3</sup>, VERDEJO-ALONSO, E.<sup>4</sup>, ESPÁRRAGO, G.<sup>4</sup>, TORRES-VILA, L.M.<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Centro de Investigación de la Finca “La Orden” y “Valdesequera”, Consejería de Infraestructuras y Desarrollo Tecnológico, 06187 Guadajira (Badajoz). E-mail: carmen.rodriguez@juntaextremadura.net

<sup>2</sup>Centro Tecnológico Agroalimentario de Extremadura (CTAEX), 06195 Villafranco del Gadiana (Badajoz). E-mail: jgarcia@ctaex.com

<sup>3</sup>Dpto. Producción Vegetal y Recursos Forestales, ETSIIAA de Palencia, Campus “La Yutera”, Avda. Madrid 57, 34071 Palencia.

<sup>4</sup>Servicio de Sanidad Vegetal, Consejería de Agricultura y Medio Ambiente, Avda. de Portugal s/n, 06800 Mérida (Badajoz).

Para caracterizar la diversidad genética de las poblaciones de *F. oxysporum* de tabaco en el Valle del Tiétar (Cáceres) se empleó la técnica de los Grupos de Compatibilidad Vegetativa (VCGs), basada en que los aislados que pueden fusionar sus hifas y formar un heterocarionte pertenecen al mismo VCG, asumiéndose que son idénticos en todos los loci *vic*. Durante las campañas 2004 y 2005 se realizaron prospecciones en parcelas de tabaco afectadas de fusariosis vascular y se estableció una colección de 38 aislados de *F. oxysporum*, 29 de ellos de plantas enfermas y los otros 9 de suelo de cultivo. Para la determinación de los VCGs de los aislados se obtuvieron mutantes incapaces de utilizar nitrato como fuente de nitrógeno (mutantes *nit*), que posteriormente se identificaron fenotípicamente (*nit1*, *nit3*, NitM) y se emplearon en las pruebas de complementación en medio mínimo (MM).

Los resultados obtenidos permiten diferenciar tres VCGs entre los aislados de plantas enfermas. El primero de ellos (VCG1) agrupa a 17 aislados de tabaco tipo Virginia procedentes de tres parcelas diferentes. El segundo, (VCG2) agrupa a cinco aislados de tabaco Virginia procedentes de una sola parcela y cuatro aislados de tabaco Burley de parcelas distintas. El tercero (VCG3) agrupa a dos aislados de tabaco Virginia de una misma parcela. Los nueve aislados de suelos de cultivo se distribuyen en los siguientes VCGs: cuatro de ellos en el VCG1; otros dos, procedentes de la misma parcela, en un nuevo grupo (VCG4); y los tres restantes son autocompatibles, pero no complementan con ningún otro aislado, constituyendo 3 nuevos grupos: VCG5, VCG6 y VCG7.

Actualmente se está realizando la caracterización patogénica y molecular mediante RAPDs de los 38 aislados. Los resultados se discuten desde el punto de vista de la diversidad de VCGs según la parcela de procedencia, el tipo de tabaco (Virginia o Burley) y el origen (planta enferma o suelo) de los aislados.



## H-88

**INTEGRACIÓN SEMÁNTICA DE FUENTES DE DATOS VÍA AXmed PARA EL ESTUDIO DE MECANISMOS FITOPATOLÓGICOS. EJEMPLO DE LA ANTRACNOSIS CAUSADO POR *Colletotrichum* spp.**

**EZZIYANI, M.<sup>1</sup>, SEBIHI, W.<sup>3</sup>, BENNOUNA, M.<sup>2</sup>, ESSAAIDI, M.<sup>3</sup>, EZZIYANI, M.<sup>4</sup>, REQUENA, A.<sup>4</sup>, CANDELA, M.E.<sup>4</sup>**

<sup>1</sup>Universidad Abdelmalek Essaâdi, F.S.T.T, Departamento de Informática, Km 10, Ziaten, Tánger, Marruecos. E-mail: ezziyyani@ieee.org

<sup>2</sup>Universidad Abdelmalek Essaâdi, El rectorado, c/Moulay El Hassan, BP: 211, Martil-Tétouan, Marruecos

<sup>3</sup>Université Abdelmalek Essaâdi, Facultad de Ciencias de Tétouan, B.P. 2121 Mhannech II, 93002 Tétouan, Marruecos.

<sup>4</sup>Universidad de Murcia, Facultad de Biología, Departamento de Biología Vegetal, Campus de Espinardo, 30100 Murcia.

El objetivo de este trabajo es la realización de un sistema bioinformático, que integre las bases de datos de intereses en fitopatología permitiendo convertir Inter-operables fuentes distintas de datos, mediante la liberación de los problemas de heterogeneidad y distribución. El sistema mediador establecido llamado AXmed (Advance XML Mediator), propone un acceso transparente a las fuentes de datos agrupando su contenido bajo un esquema global. La función principal elegida por el usuario se divide en sub-funciones y luego, mediante los adaptadores, se asigna cada una de ellas a la fuente conveniente. En consecuencia, el mediador fusiona las distintas respuestas de las sub-funciones, para proporcionar una respuesta global al usuario. Un ejemplo de la aplicación se ha realizado en la integración de datos relativa a la antracnosis causada por *Colletotrichum* spp., enfermedad de postcosecha de varias plantas, que viene determinado por caracteres morfológicos y moleculares heterogéneos. Para poder valorar los mecanismos de lucha biológica y/o química contra tal enfermedad necesitamos no sólo una comprensión genética de la enfermedad sino que debemos integrar los datos relativos a la taxonomía microbiana y vegetal y a la sintomatología fitopatológica. Estos datos se deben integrar con las pruebas experimentales tanto *in vitro* como *in vivo* y en función de factores abióticos. En nuestro ejemplo, toda la información necesaria para el estudio de la antracnosis causada por *Colletotrichum* spp, se introduce en una base de datos y se construye el esquema global del sistema, basada en la extracción del conjunto de las entidades biológicas y abióticas que intervienen en el estudio de dicha enfermedad. Estas entidades no son independientes unas de las otras sino que forman un gráfico semántico cuyos nudos son las entidades biológicas y los bordes las relaciones entre estas entidades. La puesta en práctica del núcleo se basa en la tecnología de gestión de los objetos distribuidos en torno a los dos modelos de datos: el modelo objeto/relacional y el modelo XML. Por lo que se refiere al enfoque adoptado es un enfoque mixto entre GAV (Global-As-View) y LAV (Local-As-View). Esta última elección se justifica, al buscar la simplicidad en la redacción de las peticiones utilizando el enfoque GAV y así poder garantizar el carácter evolutivo y la flexibilidad de los sistemas con la introducción del enfoque LAV. El punto crucial de este método es la especificación de las correspondencias entre el esquema global y los esquemas locales para que las funciones se transcriban correctamente a las fuentes.

## H-89

**APROXIMACIÓN A LA BIOGEOGRAFÍA DEL GÉNERO *Phytophthora* EN EL RÍO ANDARAX (ALMERÍA)**

**RUÍZ, F.J., DE CARA, M., LÓPEZ, V., CARRETERO, F., SEGURA, J.M., DIÁNEZ, F., SANTOS, M., TELLO, J.C.**

*Departamento de Producción Vegetal, Universidad de Almería, La Cañada de San Urbano s/n, 04120 Almería. E-mail: jtello@ual.es*

La biogeografía se define como el estudio del modelo de distribución de organismos o de sus asociaciones. Es un registro empírico de la distribución de los mismos. Para el caso de *Phytophthora*, los estudios de biogeografía permiten plantearse cuestiones sobre las cuales, y a pesar de la abundantísima biografía generada para el género, poca información existe.

El Valle del Andarax se encuentra localizado en la provincia de Almería, estando limitado en sus márgenes por la sierra de Gádor y el sistema de Sierra Nevada. Debido al carácter de los diferentes pueblos localizados en el valle, las explotaciones agrarias son de pequeño tamaño y destinadas a la economía familiar, por lo que es común encontrar huertos frutales y hortícolas muy diversificados. Estos huertos están representados mayoritariamente por los cítricos en la vega baja, olivos y parrales en la vega media y viñedos en la vega alta del río Andarax, siendo estas últimas explotaciones de reciente implantación.

Puesto que el río Andarax contiene agua de forma estacional en función de las lluvias torrenciales de la zona, las explotaciones se encuentran adaptadas para el rápido aprovechamiento de las aguas turbias. Si bien este arrastre de aguas se puede prolongar durante la época lluviosa.

La toma de muestras estuvo comprendida entre el período de mayo del 2004 y mayo del 2006. Para realizar el muestreo de agua procedente del río se fijaron 12 puntos de recogida de agua, estando comprendidos desde el nacimiento del río hasta su desembocadura. El agua fue recogida directamente del lecho del río después de una lluvia torrencial o bien en períodos de aguas claras posteriores a los arrastres principales. El análisis de las muestras se realizó mediante la técnica de trampa vegetal con pétalos de clavel. Durante el período de muestreo se recogieron 56 muestras de agua, resultando positivas un 35,7% para *Phytophthora*. Se identificaron un total de 23 aislados, los cuales 21 correspondieron a *Phytophthora citrophthora*, 1 aislado a *Phytophthora nicotianae* var. *parasítica* y 1 aislado a *Phytophthora cryptogea*, siendo esta comunicación la primera cita bibliográfica al respecto en los naranjales de Almería. Se encontraron muestras con el fomiceto en el nacimiento del río, a lo largo de su recorrido y en su desembocadura, así como en aguas turbias y claras.

Puesto que es reconocido el que estos organismos son acuáticos, cabría esperar el que estuvieran en el río durante las avenidas torrenciales aunque podría estar presente después de estas avenidas, como demostró Larregla del Palacio en cauces de ríos de Vizcaya en el País Vasco, de igual manera que Gómez encuentra en el río Guadalfeo a su paso por Motril (Granada) especies de *Phytophthora*. Este hecho explicaría la abundante presencia de *Phytophthora citrophthora* en suelos cultivados con naranjos en el río Andarax.

**H-90*****Phytophthora ramorum* Y LOS ECOSISTEMAS FORESTALES IBÉRICOS: FACTORES DE RIESGO****MORALEJO, E., GARCÍA, J.A., DESCALS, E.**

*Institut Mediterrani d'Estudis Avançats, IMEDEA (CSIC-UIB), c/ Miquel Marqués 21, 07190 Esporles (Majorca). E-mail: viaemr@uib.es; Telefono: (+34) 971 611828; Fax: (+34) 971 611761*

El oomiceto *Phytophthora ramorum* Werres, de Cock & Man in't Veld (2001) es conocido como el agente causal de la muerte repentina de encinas "sudden oak death" en California, desde 1995. El patógeno incide a nivel de comunidades vegetales, provocando distintos tipos de sintomatología, desde lesiones foliares y muerte de ramillos en especies leñosas del sotobosque, hasta chancros letales en troncos de algunas especies nativas de fagáceas. En Europa afecta principalmente a plantas ornamentales en viveros y centros de jardinería, aunque ya se han registrado algunos casos de infecciones en la vegetación natural en el Reino Unido. Desde 2002, *P. ramorum* ha sido detectado en viveros y centros de jardinería españoles. En el marco del proyecto europeo RAPRA para la evaluación de riesgo de establecimiento del hongo de cuarentena *P. ramorum* en Europa, se están realizando diversos ensayos de inoculaciones *in vitro* sobre las principales especies forestales. En nuestro laboratorio se llevaron a cabo ensayos para determinar la susceptibilidad de los troncos, ramillos, hojas y frutos de las especies forestales más comunes en España. A su vez se obtuvieron datos sobre la capacidad de esporulación de *P. ramorum* sobre lesiones foliares y frutos. Los troncos de *Quercus pyrenaica*, *Q. humilis*, *Q. canariensis* y *Q. ilex* mostraron lesiones de tamaño considerable. Por otro lado, las hojas de varias especies (*Q. ilex*, *Viburnum tinus*, *Arbutus unedo*, etc.) que forman parte del encinar mediterráneo y sus ecotonos fueron altamente susceptibles y capaces de sostener un importante número de esporangios. Se presentan algunos ejemplos de integración de los distintos resultados de inoculaciones de hospedadores particulares a nivel de comunidades vegetales. La distribución de estos últimos se compara con los primeros mapas de riesgo, basados en la comparación de parámetros climáticos de zonas afectadas en California con los de Europa. Diversas áreas de la península ibérica muestran un solapamiento inquietante entre ambos factores, lo que indica que el clima y la vegetación podrían contribuir al establecimiento del patógeno. Por ejemplo, asociaciones vegetales de gran valor ecológico del tipo *Rhododendron ponticum*/*Q. canariensis*, emplazadas en el sur de España (Parque de los Alcornocales), corren un serio riesgo si *P. ramorum* es introducido.

**H-91****PROSPECCIÓN DE CHANCRO DEL CASTAÑO EN EL PRINCIPADO DE ASTURIAS****GONZÁLEZ-VARELA, G., GONZÁLEZ, A.J.**

*Laboratorio de Fitopatología, Servicio Regional de Investigación y Desarrollo Agroalimentario (SERIDA), Carretera de Oviedo s/n, 33300 Villaviciosa (Asturias). E-mail: ggonzalez@serida.org*

La superficie de castaño en Asturias se estima en unas 60.000 has que se encuentran, en general, en estado de abandono. Una de las enfermedades con mayor presencia en los castañares asturianos es el chancro, cuyo agente causal es el hongo *Cryphonectria parasitica*. Los síntomas más característicos de esta enfermedad son: presencia de coloraciones rojizas y grietas longitudinales en la corteza, pústulas de color naranja-amarillento, producción de un chancro, proliferación de brotes epicórmicos y el marchitamiento y secado de las hojas. En la literatura se recogen ya desde el año 1982 datos de la presencia de chancro en Asturias y a partir de los años 1999/2000 del gran avance que la enfermedad había experimentado en la región. De esta última prospección hemos recibido 22 cepas correspondientes a 9 concejos que nos han sido cedidas por el Laboratorio de Sanidad Vegetal del Principado de Asturias. También disponemos de 115 aislamientos procedentes de un trabajo realizado en el concejo de Aller cedidos por el programa forestal del SERIDA.

Sin embargo, para estudiar las características de *C. parasitica* en la región era necesario ampliar el número de concejos muestreados y actualizar además los datos referentes a la situación de la enfermedad. Así, en 2005 se comenzó una nueva prospección en la que, hasta el momento, se han muestreado 35 concejos, que representan el 59,58% de la superficie de la provincia y engloban el 71,45% de la superficie de castaño. Se ha conseguido aislar el hongo en 33 de los 35 concejos y se han obtenido 274 aislamientos. En total se dispone de una colección de 411 aislamientos monospóricos del hongo.

La morfología de estos aislamientos es muy variable en color, textura y velocidad de crecimiento. Algunos de ellos responden a las características descritas para las cepas hipovirulentas del hongo, es decir, baja conidiación, coloración blanquecina y crecimiento lento. En este sentido, se ha realizado un ensayo previo de virulencia sobre madera y corteza con 146 aislamientos, y la presencia del hipovirus se confirmará posteriormente mediante la extracción del ARN. Además, antes de iniciar un plan de lucha biológica, es fundamental conocer los grupos de compatibilidad vegetativa (GCV) existentes, para ello se están realizando los enfrentamientos entre los aislamientos de la serie en estudio. Hasta el momento, se ha encontrado variabilidad en los aislamientos de cuatro concejos, mientras que en los 29 restantes, los aislamientos de cada uno de ellos han resultado pertenecer al mismo GCV.

**H-92****UTILIDAD DE LA TÉCNICA RAPD EN EL ESTUDIO DE AISLAMIENTOS DE *Cryphonectria parasitica* DEL PRINCIPADO DE ASTURIAS****GONZÁLEZ-VARELA, G., GONZÁLEZ, A.J.**

Laboratorio de Fitopatología, Servicio Regional de Investigación y Desarrollo Agroalimentario (SERIDA), Carretera de Oviedo s/n, 33300 Villaviciosa (Asturias). E-mail: ggonzalez@serida.org

El chancro del castaño, enfermedad producida por el hongo *Cryphonectria parasitica*, presenta una alta incidencia en los castaños del Principado de Asturias.

En 2005 se estableció en el SERIDA una colección de este hongo con 411 aislamientos que se irán incrementando con nuevas entradas, y sirve de base a los estudios que sobre este patógeno se están llevando a cabo.

Para conocer la utilidad de la técnica RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) como marcador genético de *C. parasitica* se seleccionaron 24 cepas diferentes agrupadas por concejo de procedencia. Se eligieron dos concejos situados en la zona oriental de Asturias (Ribadesella y Cabrales), dos en la zona central (San Martín del Rey Aurelio y Quiros) y otros dos en la zona occidental (Tineo y Cangas del Narcea). Como cepa fuera de grupo se utilizó un aislamiento de *Exserohilum turcicum*.

Para cada una de las cepas en estudio se realizaron tres extracciones de ADN. Los iniciadores utilizados fueron diez y las amplificaciones se realizaron, al menos, en dos ensayos distintos con el mismo ADN.

El resultado fue que con nueve de los iniciadores ensayados todos los aislamientos de la serie en estudio mostraron idéntico perfil que, a su vez, resultó ser diferente al de la cepa fuera de grupo, lo que se podría explicar o bien por una alta homogeneidad de las cepas en estudio o bien porque los iniciadores o la técnica no fueran los más adecuados para conocer la variabilidad intraespecie. Sin embargo, con uno de los iniciadores se pudieron diferenciar tres RAPD-tipos. Los aislamientos correspondientes al concejo de Ribadesella mostraron todos el RAPD-tipo 1, aunque pertenecían a dos grupos de compatibilidad vegetativa distintos. En San Martín del Rey Aurelio los aislamientos mostraron dos RAPD-tipos distintos (2 y 3) que se corresponden con los dos grupos de compatibilidad vegetativa presentes en el concejo. El resto de las cepas en estudio fueron del RAPD-tipo 3.

La técnica RAPD, con determinados iniciadores, podría ser útil como marcador genético intraespecie en *C. parasitica* y se estudiará en un futuro su posible utilidad como marcador interespecie dada la homogeneidad de los resultados obtenidos.

## H-93

**CARACTERIZACIÓN MORFOFISIOLÓGICA Y PATOGENICA DE *Botryosphaeria dothidea*, AGENTE DEL ESCUDETE DE LA ACEITUNA****GONZÁLEZ, N., TRAPERO, A.**

Dpto. Agronomía, ETSIAM, Universidad de Córdoba, Campus Rabanales, Edif. Celestino Mutis, 14071 Córdoba. E-mail: [trapero@uco.es](mailto:trapero@uco.es)

El escudete de la aceituna es una enfermedad ampliamente distribuida en la cuenca mediterránea y conocida desde antiguo, pero escasamente estudiada. El agente causal es un hongo mitospórico que ha sido identificado como *Macrophoma dalmatica*, *Sphaeropsis dalmatica* o *Camarosporium dalmaticum*, aunque análisis filogenéticos recientes utilizando técnicas moleculares lo identifican con el loculoascomiceto *Botryosphaeria dothidea*. Nuestras observaciones sobre las características morfológicas del hongo en aceitunas y en medios de cultivo confirman su identificación como *Fusicoccum aesculi*, el anamorfo de *B. dothidea*, de acuerdo con la nueva definición del género *Fusicoccum* que incluye especies con conidios hialinos y aseptados, pero que también producen conidios oscuros y con 1-2 septas en los cultivos más viejos.

El crecimiento de varios aislados del hongo en medios de cultivo y la germinación de conidios a diferentes temperaturas han determinado que se trata de un hongo con un amplio rango de temperaturas de crecimiento y germinación de conidios, con una temperatura óptima elevada (26 °C para el crecimiento en medio de cultivo y 30 °C para la germinación de conidios). Ello indica una buena adaptación del hongo para su desarrollo en la aceituna durante el verano y el principio del otoño. El crecimiento del hongo en medios de cultivo con diferentes potenciales hídricos ha demostrado que los requerimientos de humedad son similares a los de la mayoría de los hongos, lo que indica que este patógeno no está adaptado a condiciones excepcionales de baja humedad, sino que la infección en tiempo seco está asociada con los daños de la mosca de la aceituna (*Bactrocera oleae*) y obtiene los requerimientos de agua de la propia aceituna en la que se desarrolla.

Las inoculaciones artificiales realizadas en aceitunas separadas del árbol e incubadas en cámaras húmedas confirmaron la patogenicidad de *F. aesculi*, obteniéndose resultados positivos incluso sin practicar herida en los frutos; si bien las aceitunas que fueron heridas antes de la inoculación presentaron síntomas más graves. Las aceitunas afectadas mostraron una podredumbre general del fruto en lugar del típico escudete observado en campo. La variedad Manzanilla de Sevilla resultó más susceptible que Hojiblanca en las inoculaciones artificiales.

**H-94****LA PODREDUMBRE DE FRUTOS DE MEMBRILLERO CAUSADA POR *Botryosphaeria obtusa*****MORAL, J.<sup>1</sup>, LOVERA, M.<sup>2</sup>, BENÍTEZ, M. J.<sup>3</sup>, ARQUERO, O.<sup>2</sup>, TRAPERO, A.<sup>1</sup>**<sup>1</sup>Dpto. Agronomía, ETSIAM, Universidad de Córdoba, Campus Rabanales, Edif. Celestino Mutis, 14071 Córdoba. E-mail: trapero@uco.es<sup>2</sup>Dpto. Fruticultura, IFAPA "Alameda del Obispo". Apdo. 3290, 14080 Córdoba.<sup>3</sup>Coop. Agrícola y Ganadera Virgen del Castillo, Crta. Estepa-Guadix, 14810 Carcabuey (Córdoba).

El membrillero (*Cydonia oblonga*) se ha convertido en un cultivo complementario al olivar en pueblos situados en la Sierra Subbética de la provincia de Córdoba. En prospecciones realizada para caracterizar su estado fitosanitario se ha observado que algunos frutos muestran una podredumbre seca de coloración rojiza quedando, en su mayoría, en el árbol. El síndrome más avanzado lo constituyen frutos momificados con un estroma oscuro y poco definido en el que no se observan con claridad cuerpos fructíferos. El hongo consistentemente aislado de los membrillos afectados se identificó según sus características morfológicas como *Sphaeropsis malorum* o *Diplodia* sp., anamorfo de *Botryosphaeria obtusa*.

Para confirmar los postulados de Koch se inocularon frutos sanos que previamente se habían limpiado y desinfestado. La inoculación se realizó situando una gota (10 µl) de una suspensión de  $2,8 \times 10^5$  conidias/ml<sup>1</sup> en la zona próxima al pedúnculo. Todos los frutos, incluido los testigos, se incubaron en una cámara de cultivo durante 14 días a 23-24°C y 100% humedad relativa. A los 20 días de la inoculación se disminuyó la humedad relativa (40-50%) para inducir su momificado.

A los 5 días de incubación se inició una podredumbre firme en la zona peduncular que terminó por cubrir todo el fruto. Los primeros picnidios se formaron a los 7 días de incubación. Los frutos inoculados terminaron por momificarse. Los síntomas fueron similares a los observados en condiciones de campo. El anamorfo de *B. obtusa* fue reaislado de todos los frutos inoculados, pero no de los testigos.

El hongo *B. obtusa* muestra una amplia distribución afectando a numerosas especies de plantas. En árboles, causa podredumbre de frutos, manchas foliares y chancros, aunque en nuestro trabajo sólo hemos observado el primero de ellos. Este patógeno ha sido descrito afectando a membrillero en Australia, Canadá, EE. UU., Francia, Grecia, Nueva Zelanda y Sudáfrica. Este trabajo constituye la primera descripción de *B. obtusa* causando podredumbre de frutos en España.

**H-95****BIOENSAYO PARA LA DETECCIÓN DE INFECCIONES LATENTES DE *Colletotrichum* spp. EN ACEITUNAS****MORAL, J.<sup>1</sup>, CHERIFI, F.<sup>1</sup>, OLIVEIRA, R.<sup>2</sup>, TRAPERO, A.<sup>1</sup>**<sup>1</sup>Dpto. Agronomía, ETSIAM, Universidad de Córdoba, Campus de Rabanales, Edif. Celestino Mutis, 14071 Córdoba. E-mail: trapero@uco.es<sup>2</sup>Facultad de Ciencias Agrarias de Huambo, Universidade Agostinho Neto, Angola.

Entre las micosis que afectan a las aceitunas destaca la antracnosis causada por *Colletotrichum* spp. (*C. acutatum* y *C. gloeosporioides*). Un aspecto de gran importancia de la patogénesis de *Colletotrichum* spp. es la existencia de infecciones quiescentes o latentes en los tejidos del huésped, especialmente en los frutos. Este hecho ha sido escasamente estudiado en la antracnosis del olivo. Para poder cuantificar su importancia se han realizado distintos ensayos buscando un método de evaluación rápido y consistente. Este método constituiría herramienta fundamental para los estudios epidemiológicos.

Las variables estudiadas han sido: material vegetal asintomático (hojas, ramitas y aceitunas), época del año, tiempo de incubación y tratamiento de las muestras. De los distintos tratamientos a los que han sido sometidas las muestras han destacado por su utilidad: (1) incubación en cámara húmeda (22 °C y 100% HR); (2) lavado bajo corriente de agua 45 min, desinfestación con lejía (20%) 1 min e incubación; (3) lavado, desinfestación con alcohol (70%) 2 min y lejía (10%) 7 min, inmersión en paraquat (2,9 g/l) 1 min e incubación.

De los tejidos asintomáticos estudiados, *Colletotrichum* spp. fue detectado consistentemente sólo en las aceitunas. El uso del herbicida paraquat (tratamiento 3) resultó el más eficiente para la detección de infecciones latentes en los frutos permitiendo acortar sustancialmente el tiempo de incubación. Se ha observado que el porcentaje de aceitunas infestadas (portadoras de inóculo pero sin que exista infección establecida) puede ser elevado y depende del momento de recolección del material vegetal. Por ello, en la cuantificación global del patógeno es necesario contemplar tanto las aceitunas infestadas (inóculo superficial) como las infectadas (infección quiescente o latente). Las aceitunas infestadas se pueden determinar como la diferencia de frutos afectados tras los tratamientos 1 y 2. Mientras que las aceitunas infectadas serían las obtenidas tras el tratamiento 3. Estos tratamientos han puesto de manifiesto la elevada variabilidad del periodo de latencia de las infecciones que oscila entre 10 días y más de 6 meses.



**H-96*****Erysiphe flexuosa* (*Uncinula flexuosa*) Y *Erysiphe elevata* (*Microsphaera elevata*): DOS OÍDIOS DE RECIENTE INTRODUCCIÓN EN EUROPA PRESENTES EN LUGO****VILAS, M., CABAILEIRO, C.**

*Departamento de Producción Vexetal, Escola Politécnica Superior, Universidade de Santiago de Compostela, Campus Universitario s/n, 27002 Lugo. E-mail: pvcabsob@lugo.usc.es*

A lo largo de 2004 se realizó un inventario de agentes fitopatógenos y alteraciones fisiológicas en el Parque de Rosalía de Castro en Lugo y en los campos de prácticas de la EPS. El muestreo se llevó a cabo para elaborar una herramienta de apoyo a las clases de Patología Vegetal (Paseo Virtual). El grupo de hongos fitopatógenos con mayor presencia y mayor valor didáctico por la diversidad de huéspedes y claridad de síntomas y por la posibilidad de estudiar diversas formas de desarrollo, resistencia y reproducción de un hongo, fue el de los oídios.

Se localizaron varios géneros y especies comunes de oídios en plantas ornamentales: *Phyllactinia guttata* en *Corylus*, *Betula*, *Fraxinus* y *Crataegus*; *Erysiphe* (*Uncinula*) *necator* en *Vitis vinifera*; *Erysiphe* (*Uncinula*) *bicornis* en *Acer*; *Blumeria* (*Erysiphe*) *graminis* en diversas gramíneas; *Sphaerotheca pannosa* en *Rosa* y *Prunus armeniaca*; *Sphaerotheca mors-uvae* en *Ribes*; *Microsphaera euonymi-japonici* en *Euonymus*; *Microsphaera polonica* en *Hydrangea macrophylla*; *Microsphaera viburni* en *Viburnum tinus*.

Además, se identificaron dos oídios de origen Norteamericano y de reciente introducción en Europa que no han sido citados en España: *Erysiphe* (*Uncinula*) *flexuosa* y *Erysiphe* (*Microsphaera*) *elevata*.

*Erysiphe* (*Uncinula*) *flexuosa* se encontró en ejemplares adultos de *Aesculus hippocastanum* y *Aesculus x carnea* tanto en el parque como en el campus. Las cleistotecas son abundantes en el envés de las hojas, adheridas al micelio; tienen varias ascas con 6-8 ascosporas unicelulares. Presentan dos clases de fulcros: unos largos y curvados en el extremo, con una ondulación típica en zig-zag, característica de la especie *flexuosa*, y otros fulcros, cortos y rectos. La primera cita en Europa fue en Alemania (Ale-Agha *et al.*, 2000) y posteriormente se ha detectado en Suiza, Hungría, Eslovenia y Gran Bretaña.

*Erysiphe* (*Microsphaera*) *elevata* se encontró en varios ejemplares jóvenes de *Catalpa bignonioides* en el campus. El oídio común en Europa es *Erysiphe catalpae* pero las cleistotecas en este caso son las características del género *Microsphaera*, con fulcros largos, ramificados dicotómicamente y con los extremos ligeramente curvados. En Europa se ha citado en Hungría (Vajna *et al.* 2004), y posteriormente en Alemania, Eslovaquia, Eslovenia, República Checa y Suiza.

**H-97****AISLADOS DE *Pythium ultimum* PATÓGENOS DE JUDÍA (*Phaseolus vulgaris*) EN EXPLOTACIONES GALLEGAS****POMAR, F.<sup>1</sup>, RIVERA, A.<sup>1</sup>, ASCASIBAR, J.<sup>2</sup>, COLLAR<sup>2</sup>, J., MARTÍNEZ DE ILÁRDUYA, O.<sup>1</sup>**<sup>1</sup>*Centro de Investigaciones Agrarias de Mabegondo, Xunta de Galicia, 15318 A Coruña.*<sup>2</sup>*Laboratorio Agrario y Fitopatológico de Galicia.**(Fax: + 34 981 673656; E-mail: federico.pomar.barbeito@xunta.es).*

Desde la década de los 90, han ido apareciendo en las explotaciones gallegas de judía problemas con el conocido como “mal de pie”. Esta enfermedad está causada por un verdadero complejo parasitario, en el que se incluyen hongos como: *Fusarium solani*, *Rhizoctonia solani*, *Thielaviopsis basicola* y *Pythium* spp. En el caso de *Pythium* el ataque a las plantas se suele producir en estadios muy tempranos, incluso en las semillas, provocando problemas de germinación conocidos como *damping off*.

Durante los años 2004 y 2005 se realizaron prospecciones en explotaciones gallegas de judía verde y grano, en busca de plantas afectadas por “mal de pie” y *damping off*. De los resultados de estas prospecciones se obtuvieron un total de 19 aislados del género *Pythium* de los cuales 9 fueron determinados taxonómicamente como pertenecientes a la especie *Pythium ultimum* Trow.

La pertenencia de estos aislados a esta especie fué confirmada con el uso de primers específicos para regiones ITS del DNA ribosomal. Asimismo se obtuvieron los patrones RFLPs para las enzimas de restricción TaqI, HaeIII y Msp I, siendo estos coincidentes con los mostrados por aislados tipo de *P. ultimum* suministrados por el Centraalbureau voor Schimmelcultures (Holanda). El uso de los primers específicos complementados con el análisis por RFLPs se mostró muy útil en la determinación de aislados que no generaban estructuras reproductoras.

Paralelamente se ha caracterizado el poder patógeno de los aislados frente a la variedad de judía Música, presentando todos ellos un alto poder patógeno y un comportamiento muy homogéneo entre ellos.

Por último se ha estudiado el efecto *in vitro* de dos de los fungicidas más usados, en la comunidad gallega, para la lucha contra este patógeno, el propamocarb (en forma comercial Precur), y el himexazol (en forma comercial Tachigaren), mostrando ambos unos valores de EC<sub>50</sub> muy similares próximos a 50 µg/ml.

**H-98****DETECCIÓN ESPECÍFICA Y SENSIBLE DE *Phaeomoniella chlamydospora* MEDIANTE PCR COOPERATIVA**

**TORRES, E.<sup>1</sup>, EL BAKALI, M.A.<sup>1</sup>, LUQUE, J.<sup>2</sup>, MARTOS, S.<sup>2</sup>, RAPOSO, R.<sup>3</sup>, AROCA, A.<sup>3</sup>, GARCÍA, F.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Laboratori de Sanitat Vegetal, DARP, Generalitat de Catalunya, Via Circulació Nord, Tram 6, 08040 Barcelona. E-mail: ester.torres@gencat.net

<sup>2</sup>IRTA, Centre de Cabrils, Dep. Protecció Vegetal, Ctra. Cabrils s/n, 08348 Cabrils. E-mail: jordi.luque@irta.es

<sup>3</sup>CIFOR-INIA, Ctra. Coruña, Km 7,5, 28040 Madrid.

*Phaeomoniella chlamydospora* se considera el principal responsable de la enfermedad de Petri en vides jóvenes y uno de los agentes primarios de la yesca en vides adultas. La distribución vascular del patógeno y la facilidad de sus conidios por desplazarse a través del xilema permite una amplia colonización potencial del material vegetal. Sin embargo el diagnóstico se complica porque estos hongos son de crecimiento muy lento y frecuentemente quedan enmascarados por otros saprofitos.

El método de PCR cooperativa (Co-PCR) se ha descrito y aplicado con éxito para la detección de diferentes virus y bacterias. Esta técnica se lleva a cabo en una única reacción y puede acoplarse a hibridación dot-blot, minimizando así los riesgos de contaminación.

En este trabajo se ha validado el método de co-PCR acoplado a la hibridación dot-blot para la detección y la caracterización de *P. chlamydospora*. El ADN de distintos aislados de *P. chlamydospora* se extrajo con ayuda del kit EZNA Plant MiniPrep Kit (Omega Bio-tek). Como controles negativos se emplearon el ADN extraído de plantas sanas de *Vitis vinifera*, así como de aislados de otros patógenos de la vid, entre ellos *Fomitiporia mediterranea*, *Botryosphaeria obtusa*, *Eutypa lata*, *Cryptovalsa ampelina* y *Phaeoacremonium aleophilum*. La reacción de co-PCR se realizó con Ready-to-Go PCR Beads (Amersham Biosciences) y los siguientes iniciadores generales para hongos: NSA3, NLC2, NSI1 y NLB4. Para la hibridación molecular se diseñó una sonda marcada en el extremo 3' con digoxigenina a partir de la secuencia del iniciador Pch2 específico para *P. chlamydospora*.

Este método permite detectar específicamente *P. chlamydospora* evitando el riesgo de contaminación que puede producirse al utilizar nested-PCR y con una sensibilidad superior a PCR directa. En el futuro se pretende diseñar sondas específicas para los distintos hongos implicados en las enfermedades de madera de la vid, que se aplicarían a partir de una única reacción de co-PCR.

## H-99

**CONTROVERSIAS TAXONÓMICAS DEL HONGO CAUSAL DE LA ANTRACNOSIS DEL AVELLANO “BORRÓ SEC”****GARCÍA, F.<sup>1</sup>, REIGADA, S.<sup>1</sup>, TORRES, E.<sup>1</sup>, ESCOFET, M.<sup>2</sup>, SÁNCHEZ A.<sup>3</sup>, MONTÓN, C.<sup>1</sup>**<sup>1</sup>Laboratori de Sanitat Vegetal, DARP, Generalitat de Catalunya, Via Circulació Nord, Tram 6, 08040 Barcelona. E-mail: fgarciafigueres@gencat.es<sup>2</sup>Servei de Sanitat Vegetal, Av. Catalunya, 50, 43071 Tarragona.<sup>3</sup>Dep. Genética, Universitat de Barcelona, Avda. Diagonal, 645, 08071 Barcelona.

La enfermedad conocida como antracnosis o “borró sec” del avellano ha sido durante años la principal causa de pérdida de cosecha en la zona mediterránea y en especial del campo de Tarragona. Afecta principalmente las yemas florales y vegetativas aunque también puede atacar ramillas y hojas, produciendo la muerte de las yemas ubicadas en dichas ramillas. Durante años se consideró a *Gloeosporium coryli* como causante de la patología, aunque con diversas controversias taxonómicas dependiendo de los criterios de los diferentes investigadores. En 1982 se decidió, basándose en aspectos morfológicos, que el patógeno asociado al “borró sec” era *Cryptosporiopsis coryli*. Más tarde (1985) se determinó una nueva especie llamada *Cryptosporiopsis tarraconensis*, que fue aceptada internacionalmente como causante de esta patología en España y Francia. A consecuencia de recientes estudios relacionados con esta enfermedad en los avellanos de Tarragona y aplicando técnicas moleculares, se ha puesto de manifiesto que los aislados obtenidos no tienen ninguna relación genética con el género *Cryptosporiopsis*. Comparando muestras de Tarragona, Francia y el cultivo tipo de *Cryptosporiopsis tarraconensis*, se deduce que se trata del mismo patógeno y en cualquier caso distinto del género *Cryptosporiopsis*. El estudio filogenético demuestra que la lejanía con éste género es considerable, en cambio presenta una notable similitud con la familia Gnomoniaceae.

Estos datos abren una nueva perspectiva en el estudio del patógeno causante del “borró sec” del avellano y en consecuencia permitir replantear aspectos epidemiológicos que puedan mejorar las estrategias de control de la enfermedad

**H-100****DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN SOBRE MATERIAL VEGETAL DE LAS TRES ESPECIES DE *Monilinia* spp. CAUSANTES DE LA PODREDUMBRE PARDA EN FRUTALES DE HUESO****GELL, I., CUBERO, J., DE CAL, A., MELGAREJO, P.**

*Dpto. Protección Vegetal, Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria, SGIT-INIA, Ctra. de La Coruña, Km 7,5. 28040 Madrid. E-mail: gell@inia.es.*

La podredumbre parda es una de las enfermedades fúngicas más importante que afectan a los frutales de hueso. Existen tres especies del género *Monilinia* que pueden causar esta enfermedad: *M. laxa*, *M. fructigena* y *M. fructicola*. La identificación de estas especies se ha basado tradicionalmente en características culturales y morfológicas que requieren el aislamiento del hongo del material vegetal e implican la incubación del mismo durante al menos siete o diez días. Se han desarrollado métodos moleculares basados en pequeñas diferencias nucleotídicas en regiones del genoma del hongo que reducen el tiempo de identificación pero que no son efectivas cuando se aplican directamente sobre el material vegetal infectado. Además algunos grupos de investigación actualmente realizan ensayos de detección partiendo de frutos maduros o infectados artificialmente, desde trampas de esporas, o directamente desde micelio. Existe, sin embargo, poca información referente a la detección de infecciones latentes en frutos inmaduros, a pesar de constituir una importante fuente de inóculo.

En nuestro laboratorio se ha desarrollado un método de diagnóstico rápido de la podredumbre parda desde material vegetal mediante PCR. Para ello, en primer lugar se seleccionaron aislados de *Monilinia* spp. obtenidos a partir de frutos de albaricoque, melocotón y nectarino. El ADN correspondiente a las regiones ribosomales de estos aislados fue secuenciado después de ser amplificado por PCR usando los cebadores ITS-5 e ITS-4. Las secuencias obtenidas, se compararon con las disponibles en las bases de datos correspondientes a otros géneros fúngicos que comúnmente se encuentran sobre los frutos (*Botrytis* spp., *Sclerotinia* spp., *Myriosclerotinia* spp., *Epicoccum* spp., *Penicillium* spp., *Alternaria* spp y *Aspergillus* spp.). La comparación permitió el diseño de una pareja de cebadores: MON3.1 y MON3.2, que amplifica un fragmento de 250 pb que incluye la subunidad 5.8 del ADNr, parte del ITS1 y la casi totalidad del ITS2 y que permite identificar simultáneamente las tres especies de *Monilinia* diferenciándolas de otros géneros presentes en el fruto. Paralelamente se analizaron los patrones de bandas obtenidos a partir de reacciones RAPDs utilizando ADN procedente de cultivos puros de *Monilinia* spp. Usando el cebador OPR-09, se obtuvo un fragmento polimórfico de 400 pb para *M. laxa*; con el OPN-16, un fragmento de 300 pb para *M. fructicola*, y con OPB-06 un fragmento de 700 pb para *M. fructigena*. Los fragmentos polimórficos purificados fueron insertados en un vector de clonación, introducidos en *Escherichia coli* y secuenciados. Las secuencias obtenidas nos han permitido diseñar parejas de cebadores específicas para cada especie que han sido evaluadas empleando una colección de cien aislados de *Monilinia* spp. Estos cebadores se han utilizado también sobre material vegetal en los distintos estados fenológicos del melocotón. Para la realización de estos últimos ensayos se han diseñado controles internos que permiten eliminar los falsos negativos debidos a la presencia de inhibidores de la reacción de PCR en las extracciones de ADN de las muestras analizadas.

**H-101****DIAGNÓSTICO DEL HONGO DEL CRIBADO *Wilsonomyces carpophylus* COMO CAUSANTE DEL MARCHITAMIENTO DE YEMAS Y BROTES EN ALMENDRO****MUÑOZ, R.M.<sup>1</sup>, LERMA, M.L.<sup>1</sup>, MARÍN-GONZÁLEZ, J.C.<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Servicio de Diagnóstico y Asistencia Fitosanitaria (SEDAF) del Instituto Técnico Agronómico Provincial de Albacete (ITAP), Apdo. Correos 451, 02080 Albacete. E-mail: [rmg.itap@dipualba.es](mailto:rmg.itap@dipualba.es); [mll.itap@dipualba.es](mailto:mll.itap@dipualba.es)

<sup>2</sup>S.C.L. Almendra Sierra del Segura, Polígono Agropecuario nº 15, 02430 Elche de la Sierra (Albacete). E-mail: [carlos@almendroliva.com](mailto:carlos@almendroliva.com)

Yemas y brotes de las partes más bajas de almendros de la provincia de Albacete sufrieron marchitamientos durante la primavera del año 2004. Además de estos síntomas, se observaron en ramillas y en hojas manchas redondeadas de color oscuro. Los daños fueron generalizados en las parcelas afectadas.

Los diagnósticos se efectuaron mediante observación directa, cámara húmeda y aislamiento de hongos fitopatógenos.

En la observación directa inicial mediante métodos microscópicos se detectaron esporas de *Wilsonomyces carpophylus* en las manchas de las hojas y de las ramillas, así como en yemas y brotes afectados.

Las cámaras húmedas realizadas fueron examinadas diariamente con el microscopio estereoscópico, realizando preparaciones microscópicas a fin de identificar el agente causal. Aparte de *Wilsonomyces carpophylus*, no se observó presencia significativa de otras enfermedades; al cabo de ocho días de incubación se observó un gran número de esporas de este hongo.

Los aislamientos se llevaron a cabo en PDAS tras desinfección inicial de los explantos en lejía comercial (40% de cloro activo) diluida al 20%. El tamaño de las conidias, observados en los aislamientos del hongo, oscila entre 25 y 52 micras de largo y entre 10 y 15 micras de anchura; el número de tabiques varía entre dos y cuatro. Las dimensiones más frecuentes de esporas son 30 - 40 micras de espesor y 11 - 12 micras de anchura, con tres tabiques.

En una de las parcelas afectadas se llevó a cabo seguimiento de la enfermedad. Al cabo de algo más de un mes del inicio de los primeros síntomas, se observó como las partes bajas de los árboles quedaron totalmente defoliadas y en las partes aéreas se observaba de forma masiva la presencia de cribado, el síntoma típico del ataque de *Wilsonomyces carpophylus*.

**H-102****HONGOS PATÓGENOS DE LA MADERA DE LA VID EN MUESTRAS PROCEDENTES DE PLANTACIONES Y DE VIVERO****MUÑOZ, R.M.<sup>1</sup>, LERMA, M.L.<sup>1</sup>, SALVADOR, D.<sup>2</sup>, MUÑOZ, M.I.<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Servicio de Diagnóstico y Asistencia Fitosanitaria (SEDAF) del Instituto Técnico Agronómico Provincial de Albacete (ITAP), Apdo. Correos 451, 02080 Albacete. E-mail: rmg.itap@dipualba.es; mll.itap@dipualba.es

<sup>2</sup>Dpto. Producción Vegetal y Tecnología Agroforestal, Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos de Albacete, Campus Universitario s/n, 02071 Albacete. E-mail: Dolores.Salvador@uclm.es

Los recientes planes de reestructuración del viñedo han permitido la sustitución de plantaciones con el objeto de incorporar una mejora varietal o del sistema de cultivo. En algunas de estas nuevas plantaciones se están detectando problemas de crecimiento y desarrollo en los que pueden estar implicados hongos patógenos de la madera de la vid.

En este trabajo se presentan los resultados anuales de los diagnósticos de hongos patógenos de la madera de la vid, efectuados en el Servicio de Diagnóstico y Asistencia Fitosanitaria (SEDAF) del ITAP durante los años 2002 a 2005. El total de muestras analizadas es de 602; en 585 muestras se conoce su procedencia: 295 provienen de vivero y 290 son de plantaciones establecidas, en su mayoría jóvenes y sintomáticas. Los hongos patógenos detectados son *Phaeomoniella chlamydospora*, *Cylindrocarpon* spp., *Phaeoacremonium aleophilum*, *Botryosphaeria obtusa* y *Phomopsis viticola*.

En las muestras procedentes de vivero el porcentaje anual de muestras donde se ha detectado algún hongo patógeno varía entre el 20 y el 27%. En muestras de plantaciones ya establecidas, este porcentaje oscila entre el 52 y el 66%.

*Phaeomoniella chlamydospora* es el hongo más frecuentemente aislado en los resultados anuales, tanto en muestras de campo como de vivero, seguido de *Cylindrocarpon* spp. A mayor distancia se sitúan *Phaeoacremonium aleophilum*, *Botryosphaeria obtusa* y *Phomopsis viticola*.

Según estos resultados, la presencia de hongos patógenos de la madera de la vid en material procedente de vivero puede ser una fuente de diseminación de los mismos. Los resultados de plantaciones ya establecidas deben analizarse más profundamente, teniendo en cuenta en cada caso los hongos detectados y la presencia de síntomas.

**H-103****APLICACIÓN DE NESTED-PCR PARA LA DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN DE ESPECIES DEL GÉNERO *Armillaria* A PARTIR DE MUESTRAS DE SUELO****ESCOFET, P.<sup>1</sup>, AGUÍN, O.<sup>1</sup>, MONTENEGRO, D.<sup>1</sup>, PINTOS, C.<sup>1</sup>, MANSILLA, J.P.<sup>1,2</sup>**<sup>1</sup>*Estación Fitopatológica do Areeiro, Excm. Diputación Provincial de Pontevedra, Subida a la Robleda s/n, 36153 Pontevedra. E-mail: efa@efa-dip.org*<sup>2</sup>*Departamento de Producción Vegetal, Universidad de Santiago de Compostela, Campus Universitario, 27002 Lugo.*

El procedimiento para el diagnóstico de especies del género *Armillaria* consiste en la utilización de material fúngico (micelio, rizomorfos y/o setas) recogido sobre material vegetal para su aislamiento en medios de cultivo y para la aplicación de técnicas moleculares. Sin embargo cuando se produce la detección en campo en ese momento el hongo puede estar ya muy extendido en el suelo, creando múltiples focos de infección. La prevención y control de la podredumbre causada por *Armillaria* podrían verse facilitados si el hongo pudiese ser detectado en suelo antes de la aparición de plantas sintomáticas o antes de establecer cualquier cultivo susceptible. Por eso el objetivo de este trabajo fue optimizar la técnica de *nested*-PCR propuesta por Lochman *et al.* (2004) para la detección e identificación de especies del género *Armillaria* a partir de suelo. Se han analizado 180 muestras de suelo procedentes en su mayoría de parcelas cultivadas situadas en diferentes localizaciones de Galicia. La extracción del ADN se ha efectuado con diferentes kits comerciales que permiten la obtención de un ADN óptimo a partir de 0,5 mg, 1 mg y 10 g de suelo. Tras la extracción se amplificó la región ITS del hongo por *nested*-PCR con los cebadores externos ITS1 e ITS4 y los internos AR1 y AR2. Los productos resultantes de la doble amplificación se analizaron por RFLP utilizando para la digestión las enzimas de restricción *Hinf*I y *Mbo*I. En el 42% de las muestras analizadas se identificó *A. mellea*, en el 6% *A. gallica* y en el 2% *A. ostoyae*. En el resto de las muestras no se detectó presencia de *Armillaria*. Estos resultados, contrastados mediante secuenciación y análisis de los fragmentos de ADN fúngicos amplificados, indican que el protocolo utilizado puede ser empleado como método eficaz de diagnóstico rutinario de las especies de *Armillaria* a partir de muestras de suelo.



**H-104****DETERMINACIÓN DE LOS IDIOMORFOS *MAT-1* Y *MAT-2* EN POBLACIONES DE *Cryphonectria parasitica* DEL NOROESTE DE ESPAÑA****MONTENEGRO, D.<sup>1</sup>, AGUÍN, O.<sup>1</sup>, PINTOS, C.<sup>1</sup>, MANSILLA, J.P.<sup>1,2</sup>**<sup>1</sup>Estación Fitopatológica de Areeiro, Excm. Diputación Provincial de Pontevedra, Subida a la Robleda s/n, 36153 Pontevedra. E-mail:efa@efa-dip.org<sup>2</sup>Departamento de Producción Vegetal, Universidad de Santiago de Compostela, Campus Universitario, 27002 Lugo.

*Cryphonectria parasitica* es el ascomiceto responsable del cancro del castaño, una de las enfermedades más graves que afectan a los castaños del Noroeste peninsular. No hay ningún método químico que permita controlar o minimizar el daño causado por esta enfermedad. En los últimos años la investigación se ha dirigido a encontrar un sistema de control biológico que sea eficaz. Los resultados indican que el éxito de un posible método de biocontrol para *Cryphonectria parasitica* dependerá en gran medida de la diversidad de las poblaciones del hongo en la zona donde se pretende aplicar este sistema de control. Esta diversidad está relacionada con la incompatibilidad vegetativa y con la probabilidad de recombinación sexual entre cepas. Mientras que la incompatibilidad vegetativa en *C. parasitica* depende de varios loci, la compatibilidad sexual está controlada por un solo locus (*MAT*) que comprende dos idiomorfos (*MAT-1* y *MAT-2*). En este trabajo se ha estudiado la incidencia y distribución de los dos idiomorfos *MAT* en aislados de *C. parasitica* procedentes del Noroeste de España (Castilla y León y Galicia). Se hizo una extracción del ADN fúngico a partir de micelio en cultivo utilizando un kit comercial. Con el ADN extraído de cada aislado, se hizo una *nested*-PCR para la detección del idiomorfo *MAT-1*, y otra para *MAT-2*. En el caso de *MAT-1*, la primera PCR se efectuó con los primers M1-GS1 y M1-GS2rev, y la segunda con M1-GS1n y M1-GS3rev, obteniéndose un producto final de 1,6 kb. Para *MAT-2*, la primera ronda de PCR se llevó a cabo con los primers Inv-A5n y M2-GS2, y la segunda con gs1-d-1 y M2-GS3, resultando un producto final de 0,6 kb. Los resultados indicaron que el idiomorfo *MAT-1* es el más abundante entre las poblaciones de *C. parasitica* del Noroeste de España. Estudios realizados en Grecia e Italia coinciden en señalar a este idiomorfo como predominante frente a *MAT-2*. El desequilibrio entre los tipos *MAT-1* y *MAT-2* es sintomático de una población clonal, donde la reproducción sexual habría tenido poco efecto en su estructura genética, lo cual incrementa las expectativas de éxito de programas de control biológico.

## H-105

**IDENTIFICACIÓN DE ESPECIES DE *Mycosphaerella* EN *Eucalyptus globulus* Y *Eucalyptus nitens* EN GALICIA****OTERO, L., AGUÍN, O., MANSILLA, J.P., MONTENEGRO, D., PINTOS, C.***Estación Fitopatológica do Areeiro, Excma. Diputación Provincial de Pontevedra, Subida a la Robleda s/n, 36153 Pontevedra. E-mail: efa@efa-dip.org*

El género *Mycosphaerella* incluye más de 30 especies que causan enfermedad en especies de eucalipto en todo el mundo. El principal síntoma de la infección por *Mycosphaerella* consiste en la aparición de manchas necróticas de diferente coloración en hojas jóvenes y adultas, que ven reducida su capacidad fotosintética, con la consiguiente disminución de crecimiento y de la producción de madera. El diagnóstico de especies de *Mycosphaerella* mediante técnicas clásicas es complicado. El aislamiento y cultivo *in vitro* de estos hongos es difícil debido a que su micelio crece muy lentamente. Además las características morfológicas de las colonias son muchas veces inespecíficas y no permiten una identificación fiable. Muy recientemente se han desarrollado técnicas moleculares basadas en el estudio de las regiones ITS del ADN ribosomal que han facilitado enormemente el diagnóstico. El objetivo de este trabajo fue estudiar la diversidad del género *Mycosphaerella* en las dos especies de eucalipto más utilizadas habitualmente en las plantaciones de Galicia, *Eucalyptus globulus* y *E. nitens*. Se llevó a cabo una extracción de ADN fúngico a partir de material recogido sobre lesiones necróticas observadas en muestras de hojas, mayoritariamente pertenecientes a *E. globulus*. Se amplificaron las regiones ITS1 e ITS2 del ADNr usando los primers ITS1F e ITS4. En todas las muestras, el fragmento de ADN amplificado tenía aproximadamente 550 pares de bases. Estos fragmentos se secuenciaron y compararon con las secuencias disponibles en el GenBank para *Mycosphaerella*. Se han identificado once especies de *Mycosphaerella* en la comunidad gallega: *M. nubilosa*, *M. vespa*, *Pseudocercospora pseudoeucaiptorum* (anamorfo), *M. marksii*, *M. parva*, *M. madeirae*, *M. readeriellophora*, *M. molleriana*, *M. aurantia*, *M. lateralis* y *M. communis*. La mayor parte de las muestras estaban infectadas por *M. nubilosa*, que puede considerarse la principal responsable de la enfermedad en *E. globulus* en Galicia. Las hojas de *E. nitens*, sin embargo, estaban infectadas por *Pseudocercospora pseudoeucaiptorum* y *M. parva*. En esta especie de eucalipto no se detectó *M. nubilosa*.

Este trabajo ha sido financiado por la Xunta de Galicia (PGIDITO5RFO60301PR)

**H-106****CARACTERIZACIÓN DE LA POBLACIÓN ACTUAL DE *Fusarium circinatum* SOBRE MASAS DE *Pinus* spp EN LA PROVINCIA DE PONTEVEDRA**

**PINTOS, C.<sup>1</sup>, AGUIN, O.<sup>1</sup>, PÉREZ, R.<sup>1</sup>, MANSILLA, J.P.<sup>1,2</sup>, GONZALEZ, B.<sup>1</sup>, MONTENEGRO, D.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Estación Fitopatológica do Areeiro, Excma. Diputación Provincial de Pontevedra, Subida a la Roblada s/n, 36153 Pontevedra. E- mail: efa@efa-dip.org

<sup>2</sup>Departamento de Producción Vegetal, Universidad de Santiago de Compostela, Campus Universitario, 27002 Lugo.

*Gibberella circinata* Nirenberg & O'Donnell (anamorfo *Fusarium circinatum*) es un importante patógeno, incluido en la lista A2 de acción de la EPPO, que causa daños graves a numerosas especies de pinos, afectando tanto a semillas como a material de reproducción de vivero, así como a árboles adultos. Es un hongo heterotálico, donde las cepas de los opuestos *mating types* MAT-1 y MAT-2 dan lugar a cruzamientos fértiles formando estructuras sexuales, denominadas peritecas. La posibilidad del hongo de reproducirse asexual o sexualmente y la frecuencia de ambos tipos de reproducción afectaran a la estructura de la población y a la patogenicidad del mismo.

Desde que en el año 2005 identificamos, en el laboratorio de la Estación, por primera vez el hongo sobre plantas de pino, primeramente en viveros y con posterioridad en plantas adultas, hemos tratado de conocer la distribución y comportamiento del mismo en la comunidad autónoma gallega. Como consecuencia de esto presentamos, en este estudio, los resultados del exhaustivo muestreo realizado en cuadrículas de 5 x 5 kilómetros sobre masas de *Pinus* spp, fundamentalmente, *P. pinaster* y *P. radiata*, en la provincia de Pontevedra determinándose la presencia del patógeno sobre las mismas y la distribución de los *mating types*, deduciéndose de estos resultados una amplia presencia del patógeno en un importante número de masas, detentándose incluso en algunas masas asintomáticas; determinándose, así mismo, la presencia de ambos *mating types*, MAT-1 y MAT-2, aunque con una prevalencia bastante mayor de MAT-1. La presencia de ambos *mating types* abre camino a procesos de recombinación que podrían incrementar el poder patógeno del mismo.

La identificación del patógeno se ha realizado tanto morfológicamente como por técnicas moleculares utilizando primers específicos (CIRC1A y CIRC4A). La determinación de los *mating types* se realizó por técnicas moleculares utilizando primers específicos para cada uno de los MAT.

## H-107

***Santolina chamaecyparissus*, UN NUEVO HOSPEDANTE DE *Phytophthora tentaculata*****ÁLVAREZ, L. A., PÉREZ-SIERRA, A., LEÓN, M., ARMENGOL, J., GARCÍA-JIMÉNEZ, J.***Instituto Agroforestal Mediterráneo, Universidad Politécnica de Valencia, Camino de Vera s/n, 46022 Valencia. E-mail: luialber@eaf.upv.es*

La santolina es un arbusto perenne de origen mediterráneo cultivado principalmente por su follaje ornamental y aromático. Durante 2004, en diversos viveros comerciales de la provincia de Valencia se presentó una alta mortandad de plantas de esta especie. Las plantas enfermas presentaron marchitez de follaje tornándose posteriormente de color marrón, produciéndose finalmente la muerte de la planta. Una especie de *Phytophthora* se aisló consistentemente a partir de las raíces afectadas utilizando el medio selectivo PARBH. Los aislados presentaban un patrón de crecimiento estolonífero en medio PDA a 24 °C, con una tasa de crecimiento de 2,2 mm diarios. Los esporangios eran papilados, ocasionalmente caducos, con un pedicelo corto (<5 µm), ovoides a obpiriformes, de 27,5 – 64,8 (48,3) x 25 – 52,5 (37,5) µm, presentando una relación L/A media de 1,3:1. Los aislados eran homotáticos, con oogonios terminales de 27,5 - 40 (36,2) µm de diámetro, anteridios predominantemente paraginos presentando también algunos anfíginos. Las oosporas eran apleróticas, de 25 - 35 (32,3) µm de diámetro. Esta descripción reúne las características descritas para *P. tentaculata* Kröber et Marwitz. La secuenciación de la región ITS del ADNr de los aislados y la comparación de estas secuencias con otras disponibles en el Genbank confirmaron la caracterización de esta especie. Las pruebas de patogenicidad se realizaron mediante dos metodologías utilizando 10 plantas de 5 meses de edad en maceta por cada método. En el primer ensayo se inoculó cada planta alrededor de las raíces enterrando un contenido de 3% p/v de un sustrato infestado con el patógeno compuesto por 200g de avena y 120 ml de jugo V8 llevado a 1 litro de agua destilada estéril. El segundo método consistió en la aplicación de una suspensión de 30 ml con una concentración de 10<sup>4</sup> zoosporas/ml en el sustrato alrededor de cada planta. Las plantas control se inocularon con medio estéril y agua destilada estéril respectivamente, repitiéndose dos veces este ensayo. Todas las plantas inoculadas con el primer método mostraron los síntomas de la enfermedad y murieron dentro de los 2 meses después de la inoculación, mientras que las plantas inoculadas con zoosporas murieron después de 3 meses. *P. tentaculata* se reaisló de cada ensayo. Las plantas control no mostraron ningún síntoma de la enfermedad. Esta es la primera cita de *P. tentaculata* causando pudrición radicular en santolina.

**H-108****IDENTIFICACIÓN DE ESPECIES DE *Phytophthora* ASOCIADAS A CHANCROS EN TRONCO Y RAMAS DE CÍTRICOS. FRECUENCIA DE AISLAMIENTO Y DISTRIBUCIÓN**

**ALVAREZ, L.A.<sup>1</sup>, VICENT, A.<sup>1</sup>, DE LA ROCA, E.<sup>2</sup>, BASCÓN, J.<sup>2</sup>, ABAD-CAMPOS, P.<sup>1</sup>, ARMENGOL, J.<sup>1</sup>, GARCÍA-JIMÉNEZ, J.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Instituto Agroforestal Mediterráneo, Universidad Politécnica de Valencia, Camino de Vera s/n, 46022 Valencia. E-mail: luialber@eaf.upv.es.

<sup>2</sup>Laboratorio de Sanidad Vegetal de Huelva, Ctra. El Portil-Rompido s/n, 21459 Cartaya (Huelva).

Desde 2003, una alta mortandad de árboles cítricos asociada a chancros en ramas y tronco ha sido observada en las principales zonas productoras españolas. La principal característica de esta enfermedad es que las lesiones no están conectadas con infecciones en el cuello del árbol y, en todos los casos, los patrones se mantienen sanos. Se muestreó un total de 122 campos con este síndrome, y de cada campo se tomó tejido afectado de los puntos de infección en ramas y tronco. Los resultados obtenidos indicaron que el punto de infección más frecuente fueron las ramas en el 63,9% de los campos muestreados. A partir de este punto de infección, las lesiones se expandieron hacia otras ramas del árbol y hacia el tronco. El 31,9% de los campos presentaban lesiones originadas en troncos y en el 4,2% de los campos no se podía determinar el punto de infección debido al avanzado estado de infección. Dos especies de *Phytophthora*, *P. citrophthora* y *P. parasitica* se identificaron en este muestreo. *P. citrophthora* fue la única especie asociada a lesiones en ramas en un total de 78 de los campos muestreados (63,9%), encontrándose también en lesiones en tronco en 26 campos (21,3%), y en puntos de infección no determinados en 5 campos (4,2%). *P. parasitica* se encontró ligado solamente a lesiones en tronco en 7 campos representando el 5,7% de las infecciones. Se realizaron ensayos de patogenicidad con 4 aislados de *P. citrophthora* en planta joven en invernadero y con 2 aislados en campo sobre ramas de árboles cítricos adultos. En el ensayo de invernadero, los cultivares Hernandina y Lane Late fueron más susceptibles a *P. citrophthora* que los patrones naranjo amargo y citrange Carrizo. El cultivar Hernandina resultó ser también altamente susceptible en inoculaciones de ramas de plantas adultas, lo que coincide con situación observada en infecciones naturales en campo.

La re-emergencia de *P. citrophthora* ocasionando este nuevo síndrome en la citricultura nacional cambia el escenario de enfermedades de *Phytophthora* en cítricos en España y, consecuentemente, el conocimiento actual sobre su epidemiología y estrategias de control deben ser re-examinadas.

**H-109****LA “NECROSIS FOLIAR”, UNA NUEVA ENFERMEDAD DE LA CHUFA (*Cyperus esculentus*) EN LA COMUNIDAD VALENCIANA**

**MONTAÑO-MATA, N., PÉREZ-SIERRA, A., LEÓN, M., VICENT, A., ARMENGOL, J., GARCÍA-JIMÉNEZ, J.**

*Instituto Agroforestal Mediterráneo, Universidad Politécnica de Valencia, Camino de Vera s/n, 46022-Valencia. E-mail: nelmon@cantv.net*

La chufa (*Cyperus esculentus* L.) es un cultivo de gran importancia en la comarca de L' Horta Nord de Valencia, con la cual se elabora la “horchata”, muy apreciada como refresco. En los últimos años se viene observando, con intensidad creciente, una nueva enfermedad en este cultivo que en la actualidad afecta a la práctica totalidad de las parcelas cultivadas. Esta afección se manifiesta a los 15-20 días de la emergencia de las plantas en un secado de la mitad superior de las hojas, que 7-10 días más tarde empiezan a mostrar la presencia de puntitos negros. Paralelamente se aprecia una coloración rojizo-anaranjada en el interior de los tubérculos que suele evolucionar a podredumbre.

Preparaciones microscópicas de los puntos negros demuestran que se trata de cuerpos fructíferos (peritecios o pseudotecios) en cuyo interior se encuentran ascas con ascosporas hialinas, de forma elipsoidal, que en su madurez presentan 1-3 tabiques y de tamaño 8-10 x 1,8-2,3 µm. Aislamientos de estos cuerpos fructíferos, de los tubérculos afectados y de zonas vasculares producen el mismo hongo, de crecimiento muy lento, que en los medios de cultivo tradicionales no llega a esporular, aunque sí sobre trozos de hojas de chufa esterilizadas al autoclave, reproduciendo los cuerpos fructíferos encontrados en el campo.

Estudios moleculares llevados a cabo analizando la región ITS y el gen de la  $\beta$ -tubulina no han mostrado ninguna semejanza con las especies registradas en la base de datos GenBank. Las características morfológicas del hongo no coinciden tampoco con ninguna de las especies descritas por lo que posiblemente se trate de una nueva especie fúngica. .

**H-110****NECROSIS FOLIAR DE ROMERO CAUSADA POR *Rhizoctonia solani***

**PÉREZ-SIERRA, A., ÁLVAREZ, L.A., LEÓN, M., BERBEGAL M., ARMENGOL, J., GARCÍA-JIMÉNEZ, J.**

*Instituto Agroforestal Mediterráneo, Universidad Politécnica de Valencia, Camino de Vera s/n, 46022 Valencia. E-mail: aperesi@eaf.upv.es*

Desde el año 2003 se viene observando una nueva enfermedad en diversos viveros de romero (*Rosmarinus officinalis*) de la Comunidad Valenciana. Inicialmente, las plantas presentaban epinastia de hojas, con coloraciones amarillas o rojizas, desprendiéndose fácilmente la epidermis. Posteriormente, las hojas tomaban un aspecto plateado y, finalmente, se producía una necrosis foliar severa, no observándose daños en cuello y raíces. *Rhizoctonia* sp. se aisló consistentemente a partir de las hojas y tallos de las plantas afectadas.

Se amplificó y se secuenció la región ITS de los aislados, resultando idéntica a *Rhizoctonia solani* AG-1 IB (*Thanatephorus cucumeris* AB122138). Adicionalmente se realizó la observación de núcleos del micelio de los aislados mediante la técnica de tinción de Giemsa, confirmándose que las células hifales eran multinucleadas.

Para las pruebas de patogenicidad se utilizaron plantas de 5 meses de edad. Se pulverizó la parte aérea de las plantas con una suspensión de fragmentos hifales obtenido de un triturado de las colonias en PDA de 6 a 7 días de edad. Los controles fueron pulverizados con agua estéril. Se utilizaron 10 plantas por aislado y 10 plantas como control. Las plantas inoculadas mostraron los síntomas de la enfermedad 2 meses después de la inoculación. El hongo se reaisló de las plantas afectadas, confirmándose así los postulados de Koch.

Se trata de la primera cita de *R. solani* AG-1 IB como agente causal de necrosis foliar de romero en España. Esta enfermedad ha sido previamente descrita en Estados Unidos (1992), en India (1993) y en Brasil (2005).

## H-111

**PODREDUMBRE RADICULAR Y DE CUELLO DE *Polygala myrtifolia* CAUSADA POR *Cylindrocladium pauciramosum***

**PÉREZ-SIERRA, A.<sup>1</sup>, ÁLVAREZ, L.A.<sup>1</sup>, HENRICOT, B.<sup>2</sup>, GARCÍA-JIMÉNEZ, J.<sup>1</sup>, ARMENGOL, J.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Instituto Agroforestal Mediterráneo, Universidad Politécnica de Valencia, Camino de Vera s/n, 46022-Valencia. Email:aperesi@eaf.upv.es

<sup>2</sup>Royal Horticultural Society, Wisley, Woking, Surrey GU23 6QB, United Kingdom.

*Polygala myrtifolia* es un arbusto perenne, de hojas verde grisáceas y flores color púrpura intenso, utilizado comúnmente en jardinería. En noviembre de 2004, se detectó en diversos viveros de la Comunidad Valenciana el marchitamiento y muerte de plantas de esta especie. Las plantas afectadas mostraban clorosis, marchitez de brotes, y podredumbre de raíces y cuello. La zona del cuello aparecía hinchada, agrietada y en algunos casos, se observaba la esporulación de un hongo blanco en la superficie. *Cylindrocladium* sp. se aisló consistentemente de las zonas afectadas.

Se obtuvieron cultivos monospóricos y se realizó el estudio morfológico de los aislados en medio agar con hojas de clavel, ajustándose sus características a las descritas para la especie *C. pauciramosum*.

Para confirmar la identidad de los aislados se realizaron estudios moleculares mediante la ampliación del gen de la  $\beta$ -tubulina con los cebadores T1 y Bt2b. Se secuenció el producto amplificado y se comparó con otras secuencias depositadas en GenBank confirmando que eran idénticas a *C. pauciramosum* (DISTEF-G 192).

Se utilizaron plantas de un año de edad para las pruebas de patogenicidad. Se realizaron pequeñas heridas en la base de los tallos, que fueron inoculados con una suspensión de  $2 \times 10^5$  conidias/ml. Los controles fueron inoculados con agua destilada estéril. Las plantas inoculadas mostraron los síntomas de la enfermedad y el hongo *C. pauciramosum* fue reaislado de las plantas afectadas confirmando así los postulados de Koch.

Este patógeno afectando a *P. myrtifolia* fue citado por primera vez Europa en 1999 y, aunque *C. pauciramosum* puede afectar a una amplia gama de hospedantes ornamentales, ésta es su primera cita en España.



## H-112

***Mycosphaerella* sp. ASOCIADA A MANCHAS FOLIARES DE CÍTRICOS EN ESPAÑA****VICENT, A., ÁLVAREZ, L.A., LEÓN, M., GARCÍA-JIMÉNEZ, J.***Instituto Agroforestal Mediterráneo, Universidad Politécnica de Valencia, Camino de Vera s/n, 46022 Valencia. E-mail: anvici@eaf.upv.es*

Desde hace más de dos décadas, en la Comunidad Valenciana se viene detectando la presencia de pustulaciones necróticas en las hojas de diferentes variedades de cítricos. Esta sintomatología es muy similar a la mancha grasienta o "greasy spot" de los cítricos causada por *Mycosphaerella citri* en áreas citrícolas del Caribe. En España, estos síntomas no parecen afectar a la productividad de los árboles y tradicionalmente se han atribuido a diversas causas, tanto fisiológicas como climatológicas. Con el objetivo de determinar la posible etiología fúngica de esta afección, en verano de 2002 se realizó una prospección en diversas parcelas de la provincia de Valencia. Se recolectaron tanto hojas sintomáticas en el árbol como hojas secas caídas al suelo. Se realizaron observaciones microscópicas y aislamientos en PDAS de ambos materiales. En las hojas secas caídas al suelo se identificó la presencia de pseudotecios. La observación de ascas bitunicadas y de ascosporas hialinas con un único septo central permitió identificarlos como pertenecientes al género *Mycosphaerella*. En los aislamientos se obtuvo un micelio oscuro de color marrón-verdoso, de crecimiento lento y que hasta la fecha se ha mostrado estéril. El análisis mediante secuenciación de la región ITS del ADN ribosomal de varios de estos aislados los situó claramente dentro del género *Mycosphaerella*. En junio de 2003 se realizó una prueba de patogenicidad en invernadero con dos de estos aislados sobre plantones de clementina cv. Clemenules, híbrido cv. Nova y pomelo cv. Star Ruby. Se pulverizó una suspensión de micelio y sacarosa sobre el envés de las brotaciones, que se recubrieron inmediatamente con una bolsa plástica para mantener las condiciones de humedad. Las plantas testigo se pulverizaron únicamente con la solución de sacarosa. A los cuatro meses se evaluó la severidad de los síntomas y se realizaron aislamientos de las zonas afectadas. Ambos aislados desarrollaron sobre las tres variedades ensayadas los mismos síntomas observados en campo, sin embargo, no fue posible reaislar el hongo en ningún caso. No se detectó ningún tipo de síntoma en las plantas testigo. Como conclusión, se ha identificado por primera vez en España una especie de *Mycosphaerella* asociada a una sintomatología muy similar a la descrita para la mancha grasienta de los cítricos. Hasta la fecha no ha sido posible identificar los aislados a nivel de especie, pero resultados preliminares apuntan a que no pertenecen a *M. citri*. Se han realizado nuevas pruebas de patogenicidad con el fin de poder reaislar el patógeno y completar los postulados de Koch-Pasteur.

**H-113****FUSARIOSIS (GOMOSIS) DE LA PIÑA TROPICAL (*Ananas comosus*) EN LA ISLA DE EL HIERRO, CANARIAS****MOLINA, M. J.<sup>1</sup>, HERNÁNDEZ, J.M.<sup>2</sup>**<sup>1</sup>Técnico del Servicio de Agricultura, Cabildo de El Hierro, c/ El Matorral s/n, 38911 Frontera (El Hierro).<sup>2</sup>ICIA, Dpto. de Protección Vegetal, Apdo. 60, 38080 La Laguna (Tenerife).

*Fusarium subglutinans* es un patógeno muy polífago que ataca, entre otros, al arroz, a la caña de azúcar, al mango (malformación) y a la piña tropical (gomosis). Esta enfermedad ha sido citada para Argentina, Bolivia, Brasil, Chile, Hawai y Sudáfrica. Los síntomas característicos consisten en el oscurecimiento de algunos frutillos individuales, acompañados de reabsorción y de producción de goma. En el resto de la planta también pueden presentarse diversos síntomas acompañados de gomosis.

En Canarias, la piña tropical se cultiva principalmente en el municipio de Frontera, en la isla de El Hierro. La variedad cultivada es Roja Española. En el Dpto. de Protección Vegetal del ICIA se han recibido muestras a lo largo de los últimos años, de las que en algunas ocasiones se aisló *F. subglutinans* pero en las que no siempre se presentaban los síntomas de gomosis. En esta campaña, ha habido una alta incidencia de síntomas característicos, probablemente debido a condiciones climáticas muy favorables y el Dpto. de Protección Vegetal ha aislado consistentemente *F. subglutinans* de frutos que presentaban síntomas típicos de gomosis.

En este trabajo se presentan los resultados de un estudio preliminar en el que se aportan datos de incidencia en plantaciones antiguas y recientes, características culturales y determinaciones de VCGs realizadas en un número limitado de aislados.

## H-114

**EVALUACIÓN DE LA DEFOLIACIÓN Y DECOLORACIÓN EN PLANTACIONES DE CHOPO MEDIANTE TÉCNICAS DE ANALISIS DIGITAL****MARTÍN-GARCÍA, J.<sup>1</sup>, JACTEL, H.<sup>2</sup>, Díez, J.J.<sup>1</sup>**<sup>1</sup>*Universidad de Valladolid, Laboratorio de Entomología y Patología Forestal, E.T.S. Ingenierías Agrarias, Avda. Madrid 44, 34004 Palencia. E-mail: jdcasero@pvs.uva.es*<sup>2</sup>*Biodiversité Gènes et Ecosystèmes, Equipe Entomologie Forestière, INRA, 69 route d'Arcachon, 33612 CESTAS Cedex, Francia.*

En la actualidad, la sociedad exige a los gestores información sobre el estado del medio ambiente en general y de las masas forestales en particular. Así, en el año 1987 se desarrolló en el ámbito europeo una metodología de muestreo de las masas forestales, denominada Red Europea de los Daños a los Bosques (ICP Forest, nivel I). La metodología se fundamenta principalmente en la estimación de la defoliación y decoloración de 24 árboles de cada parcela, la elección de dichas parcelas se realizó mediante un muestreo sistemático utilizando una malla de 16 kilómetros de lado. Sin embargo, la metodología utilizada para evaluar los parámetros defoliación y decoloración ha sido ampliamente criticada, ya que dichas variables son estimadas visualmente por observadores, con la consiguiente subjetividad. Las fuentes de error son variadas; cada país utiliza distintos métodos de evaluación, experiencia y estilo de cada observador, condiciones climáticas, visibilidad de las copas, especie, edad y clase social, etc. Numerosas investigaciones han sido destinadas a eliminar dichos problemas, siendo una línea muy importante de trabajo el análisis digital de imágenes. A este respecto Mizoue desarrollo un sistema semiautomático de análisis de imágenes digitales denominado CROCO, para evaluar la transparencia de copa a partir de fotografía. CROCO obtiene un valor de un índice denominado DSO, el cual es definido como la diferencia de la dimensión fractal de la silueta de la copa ( $D_s$ ) y la dimensión fractal de su contorno ( $D_o$ ). No obstante, es necesario realizar un ajuste entre el valor DSO obtenido desde CROCO y valores reales de transparencia de copa. Este ajuste puede ser llevado a cabo a partir de las fotografías de referencia o partir de fotografías realizadas sobre árboles previamente evaluados. En este estudio se optó por estas últimas al no existir fotografías de referencia para el chopo. De este modo, se seleccionaron 7 árboles con distintos porcentajes de defoliación, se fotografiaron y fueron estimados sus índice DSO, a su vez un experto observador de la red de daños estimó la defoliación de estos árboles. Con este par de valores, DSO y defoliación estimada por el observador fue llevado a cabo el ajuste, obteniéndose la ecuación exponencial simple  $\text{Defoliación} = 62,055 e^{-27,933 \text{DSO}}$  con  $R^2_{\text{adj}}$  (ajustado por grados de libertad) = 96,18%. Así, a partir del valor DSO de cada árbol podremos obtener una estimación objetiva de la defoliación, asumiendo que existirá un pequeño error (ya sea por exceso o por defecto) pero que siempre mantendrá una misma tendencia, lo cual facilitará la comparación de los datos entre años, observadores, etc. Por otro lado, también se ha desarrollado una metodología para estimar objetivamente la decoloración de los árboles, utilizando la paleta de colores RGB (rojo, verde y azul) del analizador de imágenes WinDias. A partir de tres hojas terminales del tercio superior de la copa de cada árbol, se estimó un índice de decoloración como la RGB media, en función del área de los diferentes RGB de cada hoja. Así, el índice de decoloración para cada árbol fue calculado como la suma de los valores numéricos de rojo, verde y azul, y la media de las tres hojas.

**H-115****INTERACCIÓN EXISTENTE ENTRE LOS HONGOS *Sclerophoma pythiophila* Y *Cenangium ferruginosum* Y EL PATÓGENO *Gremmeniella abietina*****SANTAMARÍA, O.<sup>1</sup>, TEJERINA, L.<sup>2</sup>, Díez, J.J.<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Departamento de Biología y Producción de los Vegetales, Escuela de Ingenierías Agrarias, Ctra. De Cáceres s/n, 06071 Badajoz. E-mail: osantama@unex.es

<sup>2</sup>Universidad de Valladolid, Laboratorio de Entomología y Patología Forestal, E.T.S. Ingenierías Agrarias, Avda. Madrid 44, 34004 Palencia. E-mail: jdcasero@pvs.uva.es

Los hongos *Sclerophoma pythiophila* y *Cenangium ferruginosum* son aislados frecuentemente de ramillos en los que aparece también *Gremmeniella abietina*, hongo patógeno que causa una de las enfermedades más importantes sobre coníferas en el hemisferio norte. Por tanto, el principal objetivo del trabajo consistió en evaluar la interacción existente entre ellos y el grado de implicación de cada uno en los daños observados sobre *Pinus halepensis*. Para ello se realizaron dos tipos de experimentos: unos *in vitro*, sobre placas Petri que contenían extracto de malta agar con extracto de acículas en las que se realizaron co-cultivos de cada uno de los dos hongos con *G. abietina*. Y otros en invernadero sobre plántulas de una savia de *P. halepensis* en el que se realizaron inoculaciones (simples y dobles) con todos los agentes implicados. *In vitro*, el crecimiento de *G. abietina* fue inhibido por ambos hongos al crecer juntos. En las inoculaciones simples sobre las plantas, las mayores necrosis fueron causadas por *G. abietina*, seguidas por *S. pythiophila*, mientras que *C. ferruginosum* no causó necrosis significativamente diferente a ésta observada en los controles. En las inoculaciones dobles, *C. ferruginosum* fue capaz de reducir la longitud de necrosis causada por *G. abietina* en las plantas de *P. halepensis*, refrendándose por tanto el efecto inhibitor ya observado en los ensayos *in vitro*. Por el contrario, la longitud de necrosis causada por *G. abietina* cuando éste fue inoculado junto con *S. pythiophila* fue mayor que la observada cuando *G. abietina* fue inoculado solo. Por tanto, *S. pythiophila* parece jugar un cierto papel en la expresión de los síntomas causados por *G. abietina* sobre el *P. halepensis* en España.

**H-116****UTILIZACIÓN DE FOTOGRAFÍA HEMISFÉRICA EN LA DETERMINACIÓN DEL ESTADO SANITARIO DE MASAS DE PINO****SANZ-ROS, A.V., PAJARES, J.A., Díez, J.J.**

*Laboratorio de Entomología y Patología Forestal, E.T.S. Ingenierías Agrarias, Avda. Madrid 44, 34004 Palencia. E-mail: tonisanz@pvs.uva.es*

El estado fitosanitario es uno de los criterios para la evaluación de la sostenibilidad de la gestión forestal definidos en el proceso paneuropeo de cooperación en materia de protección de bosques, y su desarrollo sostenible, mantenida en Helsinki, en 1993. Existe una gran variedad de plagas y enfermedades que inciden en el estado fitosanitario del árbol. La incidencia de éstos, junto con factores ambientales, climatológicos y selviculturales, provocan un mayor o menor desarrollo de la copa de esta coníferas. Sin embargo, la estimación del desarrollo de la copa en masas forestales presenta cierta complejidad, al utilizarse métodos de evaluación visuales, que confieren una cierta subjetividad a los resultados obtenidos. Por ello, el análisis de la defoliación mediante análisis de fotografía digital podría mejorar dicha estimación.

El estado de la copa fue estimado visualmente siguiendo la metodología del Programa Europeo para el Monitoreo Intensivo de Ecosistemas Forestales, nivel I, en 69 parcelas del Inventario Forestal Nacional (38 de *Pinus sylvestris*, 22 de *P. nigra* y 9 de *P. pinaster*), situadas en la provincia de Palencia. Las parcelas fueron seleccionadas mediante un muestreo sistemático, utilizando un malla de 2 x 2 Km, de modo que todos los tipos de suelo estuvieran representados para cada una de las especies de coníferas presentes en la zona piloto. En 30 de estas parcelas (12 de *P. sylvestris*, 13 de *P. nigra* y 4 de *P. pinaster*) se tomaron fotografías hemisféricas con una cámara Nikon 4500 coolpix y una lente conversora "ojo de pez" Nikon Fc-E9. Las fotografías fueron tomadas durante las primeras horas de la mañana desde un punto situado un metro por encima de la superficie del suelo, y niveladas en un plano totalmente horizontal, con orientación norte. El análisis de las fotografías se llevó a cabo con los programas Gap Light Analyzer (GLA), y Hemiview ®. Para encontrar la relación entre las estimaciones visuales y las obtenidas mediante el análisis de la fotografía hemisférica digital, se llevó a cabo un análisis de regresión.

Los resultados preliminares muestran ajustes de más de un 51% entre la defoliación observada y el índice de área foliar (IAF) obtenido del análisis digital de la imagen. Durante dicho análisis se pusieron en evidencia los factores que determinan la validez de cada fotografía, como son la edad de la masa, la altura dominante, el índice de Hart o la presencia de planifolias.

La puesta a punto de esta metodología podría ayudar a la evaluación del estado de la copa de un modo rápido y fiable, reduciendo la subjetividad que implica la evaluación visual, que, sin embargo, en la actualidad sigue siendo una de las mejores herramientas para la evaluación de la salud forestal a gran escala.

## H-117

**DETERMINACIÓN DE LOS GRUPOS DE COMPATIBILIDAD VEGETATIVA DE *Cryphonectria parasitica* EN CASTILLA Y LEÓN****ZAMORA, P.<sup>1</sup>, SIERRA, J.M.<sup>1</sup>, DÍEZ, J.J.<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Centro de Sanidad Forestal de Calabazanos, Consejería de Medio Ambiente, Junta de Castilla y León, Polígono de Villamuriel, 34190 Villamuriel de Cerrato (Palencia). E-mail: zambrapa@jcyl.es

<sup>2</sup>Departamento de Producción Vegetal y Recursos Forestales, ETSIIAA Palencia, Universidad de Valladolid, Avda. Madrid 57, 34004 Palencia. jdcasero@pvs.uva.es

*Cryphonectria parasitica*, es el hongo causante del chancro del castaño que afecta a gran parte de las masas de Castilla y León.

El método de control más eficaz para reducir los efectos devastadores del chancro es el control biológico mediante hipovirulencia. La diversidad de los grupos de compatibilidad vegetativa (VCG) de *Cryphonectria parasitica* es el factor que más influye en el éxito del control biológico del chancro del castaño. Este control se produce a través de la transmisión de una doble cadena de RNA (dsRNA) vírico causante de la hipovirulencia. Es preciso el conocimiento previo de los VCG presentes en las distintas poblaciones de *Cryphonectria parasitica*, ya que la transmisión de dsRNA vírico sólo se produce entre cepas del mismo VCG. La incompatibilidad entre las distintas cepas de *C. parasitica* justifica el estudio previo de los VCG como primer paso en la contención del chancro. En este trabajo se presentan los resultados obtenidos del análisis de VCG llevado a cabo mediante aislados de las provincias de León, Zamora y Salamanca. En primer lugar se confrontaron los aislados obtenidos en cada provincia y fueron reunidos en un número determinado de grupos. Una vez obtenidos los grupos de cada provincia, éstos se confrontaron entre sí con el fin de conocer la variabilidad total de las tres provincias. Por último, los grupos obtenidos fueron confrontados con la colección europea estándar de 64 aislados, con el fin de determinar las similitudes y diferencias respecto a las poblaciones europeas de este hongo. En total, fueron analizados 255 aislados, 87 de León, 160 de Zamora y 10 de Salamanca. Los grupos obtenidos fueron 4: CL1 incluye aislados de las provincias de León y Zamora (LE-I y ZA-III) y fue compatible con la cepa europea EU1; CL2 incluye aislados de Zamora (ZA-I) y fue compatible con la cepa europea EU12; CL3 incluye aislados de León, Salamanca y Zamora (LE-II, SA-I y ZA-II) y CL4 compuesto por sólo dos aislados de las provincias de Zamora y León (ZA-IV y LE-III). Los grupos CL3 y CL4 no fueron compatibles con ninguno de los 64 aislados europeos.

**H-118****HONGOS ASOCIADOS A ENFERMEDADES DE LA MADERA DE VID EN CATALUÑA****LUQUE, J.<sup>1</sup>, MARTOS, S.<sup>1</sup>, REYES, J.<sup>2</sup>, BARRIOS, G.<sup>3</sup>, GARCÍA-FIGUERES, F.<sup>4</sup>**

<sup>1</sup>Dep. Protecció Vegetal, Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentàries (IRTA), Centre de Cabrils, Ctra. de Cabrils s/n, 08348 Cabrils. E-mail: jordi.luque@irta.es

<sup>2</sup>DARP, Oficina Comarcal Alt Penedès, Comerç 41, 08720 Vilafranca del Penedès. Email: jreyes@gencat.net

<sup>3</sup>DARP, Delegació Tarragona, Avda. Catalunya 50, 43002 Tarragona. E-mail: gbarrios@gencat.net

<sup>4</sup>Laboratori de Sanitat Vegetal, DARP, Via Circulació Nord, Tram 6, 08004 Barcelona. E-mail: fgarciafigueres@gencat.net

En el período 2003-2005 se realizaron diversos muestreos en 6 DOs de Cataluña y se estudió la micoflora de plantas adultas afectadas por las enfermedades de madera más comunes: eutipiosis, yesca y brazo muerto. En cuanto a los síntomas externos, el 56% de las plantas analizadas se clasificaron como afectadas por eutipiosis y brazo muerto, dos enfermedades con muchas similitudes en su sintomatología externa. El 19% se consideró afectado por yesca y un 13% presentaron apoplejía, un síntoma relacionado inespecíficamente con las enfermedades anteriores. En cuanto a los síntomas internos, en las plantas afectadas por eutipiosis/brazo muerto se advirtió mayoritariamente la existencia de necrosis sectoriales (82%), aunque también se apreciaron signos propios de yesca (54%). De forma similar, el 94% de las plantas afectadas por yesca presentó alguno de los síntomas internos característicos de esta enfermedad, aunque en el 53% de ellas también se apreciaron necrosis sectoriales.

*Eutypa lata* se aisló con éxito del 23% de las plantas con necrosis sectorial, aunque del mismo tipo de lesión se aisló *Botryosphaeria obtusa* en un porcentaje aún mayor, el 45%. De otras necrosis vasculares, inespecíficas y distintas de las sectoriales, se aislaron *Phaeomoniella chlamydospora* (25%), *B. obtusa* (21%), *Phaeoacremonium aleophilum* (12%) y *E. lata* (10%). En cuanto a los hongos habitualmente asociados a la yesca, *P. chlamydospora* se aisló del veteado pardo de la madera en un 73% de los casos y *Fomitiporia mediterranea* del 54% de las plantas con podredumbre blanda. Otras especies identificadas durante el muestreo se incluyeron en los géneros *Cryptovalsa*, *Fusarium*, *Fusicoccum* y *Phomopsis*, entre otros.

Los resultados obtenidos reflejan la frecuencia con la que coinciden, muy a menudo y en una misma planta, algunos síntomas internos y hongos asociados a enfermedades distintas. Esta alta concomitancia sugiere que estas enfermedades podrían integrarse bajo un concepto de mayor complejidad: el decaimiento de la vid.

## H-119

**ESTUDIOS PRELIMINARES DE LA MICROBIOTA PRESENTE EN SEMILLA DE JUDÍA (*Phaseolus vulgaris*) EN LA PROVINCIA DE LEÓN****CAMPELO, M.P.<sup>1</sup>, REINOSO, B.<sup>2</sup>, GONZÁLEZ, A.J.<sup>3</sup>**<sup>1</sup>Laboratorio de Diagnóstico, Fundación Chicarro-Canseco-Banciella, E.S.T.I.Agraria, Universidad de León, Avda. de Portugal 41, 24071 León.<sup>2</sup>Departamento de Ingeniería Agraria, E.S.T.I.Agraria, Universidad de León, Avda. de Portugal 41. 24071 León.<sup>3</sup>Servicio Regional de Investigación y Desarrollo Agroalimentario (SERIDA), Ctra. de Oviedo, s/n, 33300 Villaviciosa (Asturias).

El cultivo de judía se ve afectado por numerosas enfermedades de etiología fúngica transmisibles por semilla. Los hongos patógenos, junto con otros saprofitos facultativos o parásitos de debilidad, alteran la calidad de misma, depreciando comercialmente el producto por la presencia de manchas, reduciendo o eliminando la capacidad germinativa y produciendo micotoxinas. Por ello, la previa evaluación y caracterización de la micoflora asociada a la semilla y la posterior búsqueda de métodos de saneamiento eficaces se consideran necesarios para poner a disposición de los agricultores material de siembra de las variedades locales libre de patógenos. En este trabajo se presenta el inventario de la microbiota presente en doce lotes de semilla pertenecientes a la Indicación Geográfica Protegida (IGP) "Alubia de La Bañeza-León" para las campañas de 2004 y 2005, correspondientes a cuatro variedades: cuatro de Riñón menudo, tres de Canela, cuatro de Pinta y una de Planchada. De cada uno de ellos, se sembraron 100 semillas sin desinfectar en medio agar de patata glucosado (PDA), incubándose en bancada (18-25°) durante quince días y haciéndose recuentos de semillas afectadas, colonias y géneros presentes a los seis días y al final del ensayo. Además, se evaluó *in vitro* la capacidad germinativa y en semillero la nascencia. Se obtuvieron un total de 776 colonias pertenecientes a 13 géneros fúngicos: *Penicillium* (24%), *Rhizopus* (16%), *Aspergillus* (10%), *Alternaria* (8%), *Fusarium* (3%), *Cladosporium* (2%), *Trichoderma* (1%), *Botrytis* (1%), *Stemphylium* (<1%), *Chaetomium* (<1%), *Mucor* (<1%), *Sclerotinia* (<1%) y *Ulocladium* (<1%). De los resultados cabe destacar que a pesar de que las semillas no mostraban síntomas visibles de infección, el porcentaje de las contaminadas superó en todos los lotes el 30% y, por variedades, considerando la media de los lotes correspondientes, el mínimo se registró en la Riñón menudo (44%) y máximo en la variedad Pinta (90%). Además, en esta última se constató en todos los lotes que los índices de germinación y nascencia, y el número de aislamientos guardaban relación inversa, aspecto éste que no se observó de forma tan clara en los lotes de las otras tres variedades. Aunque la mayoría de los aislamientos se consideran sólo potencialmente alterantes de la calidad en condiciones de almacenamiento, actualmente se realizan estudios encaminados a la identificación de las especies aisladas y a la verificación del poder patógeno.



## H-120

**CARACTERIZACIÓN DE AISLADOS DEL COMPLEJO QUE CAUSA LA “ASCOCHITOSIS” EN EL GUISANTE Y EN EL TIRABEQUE**

**CARRETERO, F., DIÁNEZ, F., SANTOS, M., DE CARA, M., MARÍN, F., CÓRDOBA, I., REYES, J.A., LÓPEZ, V., TELLO, J.C.**

*Departamento de Producción Vegetal, Universidad de Almería, La Cañada de San Urbano s/n, 04120 Almería. E-mail: jtello@ual.es*

En el guisante (*Pisum sativum* L. var. *vulgare*) y en el tirabeque (*Pisum sativum* L. var. *macrosperma*) hay descritos tres hongos como incitantes de la micosis conocida genéricamente como “ascochyosis”. Este complejo fúngico está formado por *Phoma medicaginis* var. *pinodella*, *Ascochyta pisi*, y *Mycosphaerella pinodes*, cuya forma picnídica es *Ascochyta pinodes*.

Se han realizado muestreos en cultivos de guisante y tirabeque con síntomas de “ascochyosis” en la costa de Granada y se ha procedido al estudio de los aislados para tratar de identificar la especie o especies del complejo que provocan esta sintomatología. Se discute la taxonomía de los aislados según los criterios de diferentes autores. Así Messiaen *et al.* (1995) establece a *Mycosphaerella pinodes* como la forma peritécica de *Ascochyta pinodes*, estando el teleomorfo aún desconocido para las otras dos especies involucradas en el “Complejo Ascochyta”; Boerema *et al.* (1965), Dorenbosh (1970) y Boerema (1976) consideran la producción de cristales de oxalato cálcico en forma de abanico como un distintivo de *Phoma medicaginis* var. *pinodella*, mientras que Punithalingam y Gibson (1976) dudan de dicha afirmación, reforzada más aún por los trabajos realizados por Tello *et al.* (1988) sobre aislados de esta especie. Boerema (1976) y Dorenbosh (1970) indican la capacidad de *Phoma medicaginis* var. *pinodella* para producir cristales y clamidosporas como criterio para diferenciarla de las otras dos especies del complejo. Boerema y Bollen (1975) hacen hincapié en la septación de conidias como criterio para separar los géneros *Phoma* y *Ascochyta*, y Dixon, Messiaen y Casini (1970) y Messiaen *et al.* (1995) plantean su diferenciación según las dimensiones de sus picnidiosporas; a lo que Tello *et al.* (1988) añaden que tanto la tabicación como el tamaño de las picnidiosporas ofrece dudas razonables en la identificación de *Phoma* y *Ascochyta* usando este criterio. Bretag y Ramsey (2001) mencionan la capacidad de producción de clamidosporas por *Ascochyta pinodes*, no siendo citada la producción de clamidosporas para el caso de *Ascochyta pisi*. Messiaen *et al.* (1995) especifican además los síntomas de *Ascochyta pisi* y *Mycosphaerella pinodes* sobre plantas de guisante para diferenciar ambas especies.

Se han estudiado 13 aislados, de los que únicamente 7 de ellos se han podido asignar con total seguridad a *Mycosphaerella pinodes*, ya que ha sido posible observar la forma peritécica, los otros 6 aislados no han podido asignarse a una especie concreta, lo que demuestra la dificultad de la identificación de estos aislados según los criterios existentes. Esta es una de las escasas veces que este patógeno se cita en los cultivos de guisante de España

## H-121

**AGENTES ASOCIADOS AL COLAPSO DEL MELÓN EN SUELOS CULTIVADOS CON MELÓN DE GUATEMALA**

**LÓPEZ, V.<sup>1</sup>, DE CARA, M.<sup>1</sup>, CÓRDOBA, M.C.<sup>2</sup>, HERRERA, J.A.<sup>2</sup>, SANTOS, M.<sup>1</sup>, DIÁNEZ, F.<sup>1</sup>, CARRETERO, F.<sup>1</sup>, RUÍZ, F.J.<sup>1</sup>, JORDÁ, C.<sup>2</sup>, TELLO, J.C.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>*Departamento de Producción Vegetal, Universidad de Almería, La Cañada de San Urbano s/n, 04120 Almería. E-mail: jtello@ual.es*

<sup>2</sup>*Universidad Politécnica de Valencia.*

En los últimos años se ha producido un notable aumento del cultivo intensivo de melón en Guatemala, concretamente en Zacapa, cuyas tierras son regadas por el río Motagua. Aumento que ha venido acompañado de un grave problema fitopatológico, el síndrome del colapso, muerte súbita o decaimiento de tallos del melón que ha crecido notablemente año tras año. Los métodos de defensa frente a este síndrome han sido la desinfección con bromuro de metilo, la solarización, la biofumigación y el injerto. En la bibliografía aparecen distintas especies fúngicas asociadas al colapso del melón: *Acremonium cucurbitacearum*, *Monosporascus cannonballus*, *Macrophomina phaseolina*, *Fusarium solani*, *Pythium* spp., *Rhizopycnis vagum* y *Oplidium bornovanus* vector del MNSV (virus de las manchas necróticas del melón).

En este trabajo se ha estudiado la microbiota fúngica asociada a las raíces de melón de 16 suelos de distinta procedencia, de explotaciones meloneras donde en las últimas campañas hubo colapso. La técnica utilizada para el estudio ha sido la "fitopatometría de suelos" (de Cara *et al*, 2005), durando los ensayos 45 días bajo temperaturas oscilando entre 24 y 28° C. Se hicieron 2 repeticiones de cada muestra. Dentro de cada repetición se evaluaron 6 subrepeticiones con 6 plantas cada una. Tras la fitopatometría, las raíces de cada planta se analizaron en medio de cultivo microbiológico general para hongos y en otro para miembros del género *Fusarium*. Se hizo una lectura de raíces bajo lupa y microscopio óptico para identificar *Monosporascus cannonballus* y bajo microscopio óptico para observar la presencia de *Oplidium bornovanus*. Se analizaron las plantas posteriormente para MNSV mediante ELISA y cuando fue necesario debido a la complejidad, se usaron técnicas moleculares. Los resultados pusieron de manifiesto que de 16 muestras, todas presentaron *O. bornovanus* asociado en su mayoría al MNSV (86,7%), el resto de los micromicetos postulados como causantes del colapso (*Acremonium* sp, *Monosporascus* sp.), no estuvieron presentes en ninguna muestra excepto *Fusarium solani* que aparece en porcentajes muy variables y reducidos. Especies de *Pythium* fueron abundantes, con síntomas bien definidos, quedando excluido del síndrome del colapso. En consecuencia *O. bornovanus* y MNSV son, según los postulados clásicos la Patología Vegetal, el único agente causal más probable del melón en las muestras estudiadas.

## H-122

**AGENTES ASOCIADOS AL COLAPSO DEL MELÓN EN SUELOS CULTIVADOS CON MELÓN DE HONDURAS**

LÓPEZ, V.<sup>1</sup>, DE CARA, M.<sup>1</sup>, CÓRDOBA, M.C.<sup>2</sup>, HERRERA, J.A.<sup>2</sup>, DIÁNEZ, F.<sup>1</sup>, ALIAGA, P.<sup>1</sup>, RUÍZ, F.J.<sup>1</sup>, SANTOS, M.<sup>1</sup>, JORDÁ, C.<sup>2</sup>, TELLO, J.C.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Producción Vegetal, Universidad de Almería, La Cañada de San Urbano s/n, 04120 Almería. E-mail: jtello@ual.es

<sup>2</sup>Universidad Politécnica de Valencia.

En los últimos años se ha producido un notable aumento del cultivo intensivo de melón en Honduras, concretamente en Choluteca y Apacilagua. Este crecimiento ha estado acompañado de un grave problema fitopatológico, el síndrome del colapso, muerte súbita o decaimiento de tallos del melón, que ha ido creciendo año tras año. Los métodos de defensa frente a este síndrome han sido la desinfección con bromuro de metilo, la solarización, la biofumigación y el injerto. En la bibliografía aparecen distintas especies fúngicas asociadas al colapso del melón: *Acremonium cucurbitacearum*, *Monosporascus cannonballus*, *Macrophomina phaseolina*, *Fusarium solani*, *Pythium* spp., *Rhizopycnis vagum* y *Olpidium bornovanus*, vector del MNSV (virus de las manchas necróticas del melón).

En este trabajo se ha estudiado la microbiota fúngica asociada a las raíces de melón de 30 suelos de distinta procedencia, de explotaciones meloneras donde en las últimas campañas hubo colapso. La técnica utilizada para el estudio ha sido la "fitopatometría de suelos" (de Cara *et al*, 2005), durando los ensayos 45 días bajo temperaturas oscilando entre 24 y 28 °C. Se hicieron 2 repeticiones de cada muestra. Dentro de cada repetición se evaluaron 6 subrepeticiones con 6 plantas cada una. Tras la fitopatometría, las raíces de cada planta se analizaron en medio de cultivo microbiológico general para hongos y en otro para miembros del género *Fusarium*. Se hizo una lectura de raíces bajo lupa y microscopio óptico para identificar *Monosporascus cannonballus* y bajo microscopio óptico para observar la presencia de *Olpidium bornovanus*. Se analizaron las plantas posteriormente para MNSV mediante ELISA y cuando fue necesario debido a la complejidad, se usaron técnicas moleculares. Los resultados pusieron de manifiesto que de 30 muestras, 27 presentaron *O. bornovanus* asociado en su gran mayoría al MNSV (excepto 2 muestras), el resto de los micromicetos postulados como causantes del colapso (*Acremonium* sp, *Monosporascus* sp....), no hacen acto de presencia en ninguna muestra excepto *Fusarium solani* que aparece en porcentajes muy variables y reducidos. Especies de *Pythium* fueron abundantes, con síntomas bien definidos, quedando excluido del síndrome del colapso. En consecuencia *O. bornovanus* y MNSV son, según los postulados clásicos la Patología Vegetal, el único agente causal más probable del melón en las muestras estudiadas.

**H-123****EVALUACIÓN DE LA SALINIDAD DEL AGUA DE RIEGO DE CABO DE GATA (ALMERIA) EN EL COMPORTAMIENTO DE *Fusarium oxysporum* EN CULTIVO DE TOMATE TIPO MARMANDE RAF**

**REYES, J.A., SEGURA, J.M., DE CARA, M., SANTOS, M., DIÁNEZ, F., CARRETERO, F., ALIAGA, P., CÓRDOBA, I., TELLO, J.C.**

*Departamento de Producción Vegetal, Universidad de Almería, La Cañada de San Urbano s/n, 04120 Almería. E-mail: jtello@ual.es*

Desde el año 2002 en la zona de producción de tomate de Cabo de Gata (Almería), se ha observado la aparición de un síndrome que nos evoca a una podredumbre de cuello y raíz de las plantas de tomate (agente causal *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-lycopersici*). Ensayos previos indican que el síndrome puede estar originado por un cambio en la patogeneidad de *Fusarium oxysporum* debido a la alta conductividad eléctrica del agua de riego (10,6 dS/m).

Con la realización de este trabajo se quiere comprobar la relación entre la habilidad parasitaria de los aislados de *Fusarium oxysporum* y la elevada conductividad eléctrica del agua de riego de Cabo de Gata.

Para ello, se ha diseñado un experimento en condiciones controladas de laboratorio que se ha realizado en dos fases. Por un lado, se han regado plántulas en diferentes estadios de desarrollo con agua de riego de la zona indicada, con el fin de observar los efectos de las sales sobre el crecimiento y desarrollo de las plántulas. Al no reproducirse las podredumbres de cuello y raíz observadas en campo, se procedió a repetir el ensayo, inoculando con aislados de *F. oxysporum* procedentes de plantas tomadas de los invernaderos de la zona, que presentaban pudrición de cuello y raíz, y los vasos xilemáticos marrones. Estos aislados fueron estudiados en un trabajo previo, observándose que no eran patógenos ya que no reprodujeron la sintomatología que mostraban las plantas en el campo.

Con la inoculación de los aislados no patógenos junto al riego con agua de alta conductividad eléctrica, se han conseguido reproducir algunos de los síntomas observados en el campo, tales como: necrosis de raíces secundarias sin manifestar pudriciones en el cuello ni el oscurecimiento de los vasos xilemáticos.

Estos resultados nos indican un comportamiento, desconocido hasta el momento, de cepas no patógenas de *Fusarium oxysporum* en condiciones de alta salinidad.

**H-124****PATOGENEICIDAD SOBRE FRUTOS DE NARANJA DE DIFERENTES ESPECIES DE *Phytophthora* AISLADAS DEL RÍO ANDARAX (ALMERÍA)**

**RUÍZ, F.J., DE CARA, M., ALIAGA, P., PEREGRINA, I., SEGURA, J.M., DIÁNEZ, F., SANTOS, M., TELLO, J.C.**

*Departamento de Producción Vegetal, Universidad de Almería, La Cañada de San Urbano s/n, 04120 Almería. E-mail: jtello@ual.es*

Durante la realización de un muestreo de las aguas del río Andarax en la provincia de Almería, se aislaron 23 cepas del género *Phytophthora* cuya especie fue posteriormente identificada mediante taxonomía clásica. Los resultados obtenidos fueron la correspondencia de 21 aislados a la especie *Phytophthora citrophthora*, un aislado a *Phytophthora cryptogea* y un último aislado correspondiente a la especie *Phytophthora nicotianae* var. *parasitica*.

Puesto que en las fincas citrícolas regadas con agua del río Andarax aledañas no se han observado síntomas de *Phytophthora* en frutos ni en árbol, se evaluó durante dos campañas la patogeneicidad de los 23 aislados sobre frutos de naranja en laboratorio, para lo cual se realizaron dos ensayos de inoculación, utilizando para el primero naranjas verdes y para el segundo naranjas en el estado de madurez fisiológica. Para cada ensayo se utilizaron 6 naranjas por cepa, siendo 3 naranjas inoculadas en el lateral de la misma y las otras 3 en la zona peduncular. Antes de realizar las inoculaciones, se procedió a realizar con lanceta un rayado de las zonas especificadas. Para la realización de cada ensayo, se dispusieron 3 naranjas con el rayado practicado como testigos sin inocular. La lectura de las naranjas se hizo considerando una escala de valoración del 1 al 5, siendo el valor de 1 equivalente aproximadamente a una podredumbre del 12,5% de la superficie total del fruto, el valor 2 del 25% aproximadamente, el valor 3 del 50% aprox., el valor 4 entre 75% aprox., y el valor 5 era equivalente a una podredumbre del 100% de la naranja.

Los resultados obtenidos para los 21 aislados de *P. citrophthora* en el primer y segundo año respectivamente, con naranjas verdes fueron de  $3,05 \pm 0,64$  y  $4,17 \pm 0,84$  en la inoculación peduncular y de  $3,59 \pm 0,43$  y  $3,97 \pm 0,77$  en la inoculación lateral, mientras que para el ensayo en naranjas maduras los resultados fueron de  $2,94 \pm 0,49$  y  $4,76 \pm 0,47$  en la inoculación peduncular y de  $2,46 \pm 0,36$  y  $3,52 \pm 0,85$  en la inoculación lateral. El aislado de *P. nicotianae* var. *parasitica* resultó con una podredumbre en frutos verdes de  $2,0 \pm 0,0$  y  $0,33 \pm 0,58$  en la inoculación peduncular y de  $3,0 \pm 0,0$  y  $2,0 \pm 1,73$  en la inoculación lateral, y en naranjas maduras de  $1,0 \pm 0,0$  en zona peduncular y  $1,67 \pm 0,58$  en zona lateral para el primer año. Por último, el aislado de *P. cryptogea* que fue inoculado sobre naranjas maduras no produjo infección alguna sobre el fruto.

**H-125****EFFECTO DEL COMPOST DE ORUJO DE VID FRENTE A *Sclerotinia sclerotiorum***

**SANTOS, M., MARTÍNEZ, P., DIÁNEZ, F., DE CARA, M., CARRETERO F., MARÍN, F., TELLO, J.C.**

*Departamento de Producción Vegetal, Universidad de Almería, La Cañada de San Urbano s/n, 04120 Almería. E-mail: jtello@ual.es*

El control de los patógenos constituye una tarea nada sencilla, y es aún más difícil cuando abordamos el control de los patógenos de origen telúrico, especialmente en sistemas de producción intensiva. El objetivo de este trabajo es determinar la capacidad supresora del compost de orujo de vid frente a *Sclerotinia sclerotiorum*. Las poblaciones microbianas de los extractos acuosos del compost son consideradas el factor más importante que contribuye a la supresión de las enfermedades. Por ello, se ha determinado la inhibición del desarrollo del crecimiento micelial a distintas concentraciones del té de compost, su efecto sobre la germinación de los esclerocios, así como el efecto inhibitor *in vivo* frente al desarrollo de la enfermedad.

La determinación de la inhibición del crecimiento micelial, así como de la germinación de esclerocios del hongo *Sclerotinia sclerotiorum* se ha ensayado utilizando té de compost a distintas concentraciones (5, 10 y 15%), filtrados, esterilizados en autoclave a 120 °C y microfiltrados con filtros de 0,22 µm. Asimismo, los té se obtuvieron incubándolos en agitación durante 1 día, 1 semana y 2 semanas.

Dicho análisis dio lugar a que sólo se detectara inhibición del crecimiento micelial de *Sclerotinia sclerotiorum* en presencia de extractos acuosos filtrados, por lo que dicha inhibición se debe a la microbiota asociada al compost. Ésta se incrementa a medida que aumentamos la concentración y el tiempo de incubación de los extractos. Los metabolitos, en consecuencia, no parecen en un principio responsables de la inhibición micelial, o por lo menos, no se detecta en las condiciones del ensayo realizadas. La germinación de los esclerocios se ve afectada por la presencia de los extractos acuosos del compost en las distintas condiciones ensayadas (filtrados, esterilizados y microfiltrados a 1 día, 1 semana y 2 semanas de incubación).

El ensayo de supresividad *in vivo* frente a *S. sclerotiorum* no se ha podido demostrar, debido a la patogenicidad del compost causado por la presencia de dos especies de *Pythium*.

**H-126****ENFERMEDADES DE ORIGEN TELÚRICO EN EL CULTIVO DE TOMATE TIPO *CHERRY* EN LA ZONA DEL EMBALSE DE LOS BERMEJALES (GRANADA)**

**PEREGRINA, I.<sup>1</sup>, DE CARA, M.<sup>1</sup>, SANTOS, M.<sup>1</sup>, DIÁNEZ, F.<sup>1</sup>, SEGURA J.M.<sup>1</sup>, REYES, J.A.<sup>1</sup>, CARRETERO, F.<sup>1</sup>, CÓRDOBA, I.<sup>1</sup>, GÓMEZ, J.<sup>2</sup>, TELLO, J.C.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Dpto. de Producción Vegetal, Universidad de Almería, La Cañada de San Urbano, 04120 Almería. E-mail: jtello@ual.es

<sup>2</sup>IFAPA La Mojonera, Junta de Andalucía, Almería.

El cultivo de tomate tipo *cherry* se ha convertido en los últimos años en una de las principales fuentes de ingresos para un buen número de poblaciones del interior de la provincia de Granada (zonas del embalse de Los Bermejales y del pantano de El Negratín, fundamentalmente). El cultivo en dichas zonas entre los meses de abril/mayo y septiembre/octubre, que se realiza bajo una estructura de malla que hace la función de umbráculo, viene a cerrar el ciclo de producción de este tomate, que tiene lugar en el resto de meses en las zonas costeras de Granada y Almería.

A partir del año 2002 (tercer año tras su primer ciclo de cultivo de tomate *cherry*), en muchas de las explotaciones de la zona de Los Bermejales se comenzaron a observar pérdidas en la producción, motivadas por problemas fitosanitarios de origen telúrico.

Desde entonces hasta la presente campaña se ha venido haciendo un inventario de las enfermedades de origen edáfico detectadas en el cultivo. Se ha muestreado aproximadamente el 30% de la superficie total destinada al cultivo de *cherry* en la zona (unas 100 ha totales), tomando muestras de suelo de las explotaciones prospectadas y plantas que manifestaban síntomas de distinta índole, a saber: necrosis en cuello y raíces, marchiteces vasculares y presencia de nódulos en las raíces. Se ha evaluado la incidencia de dichas patologías en la zona, en función del número de plantas enfermas que evidenciaron la presencia de un determinado patógeno. Posteriormente se procedió a la identificación de las especies de los microorganismos patógenos encontrados.

Asociada con los síntomas de podredumbre en raíces y cuello se aisló *Phytophthora nicotianae* var. *parasitica*, que fue hallada en el suelo del 75% de las explotaciones prospectadas, y en el 100% de las plantas con síntomas. Asociado con marchiteces vasculares se aisló *Verticillium dahliae* en el 15% de las explotaciones prospectadas. Y el nematodo nodulador *Meloidogyne* (fundamentalmente *Meloidogyne incognita*) apareció asociado a la presencia de nódulos en raíces en el 45% de las explotaciones.

La presencia de estos patógenos en los suelos y plantaciones pone en peligro el mantenimiento del cultivo de tomate *cherry* en la zona, por lo que se hace necesario estudiar la epidemiología de las enfermedades detectadas, así como resulta obligatorio encontrar los métodos de control más adecuados para estas enfermedades dentro del agrosistema en que se hallan.

**H-127****DETECCIÓN Y DISTRIBUCIÓN DE *Verticillium dahliae* EN CULTIVOS DE PATATA EN ALICANTE****ORTEGA-GEA, A., PÉREZ-GONZÁLEZ, S., RUBIO-SÁNCHEZ, C., GUIRAO-MOYA, P.**

*Universidad Miguel Hernández, Dpto. Producción Vegetal y Microbiología, Escuela Politécnica Superior de Orihuela, Ctra. Beniel Km 3,2, 03300 Orihuela (Alicante). E-mail: ana.ortega@umh.es*

En primavera de 2001 se observaron síntomas severos de amarilleamiento y falta de desarrollo en cultivos de patata de la Vega Baja del Segura en Alicante, de los que se aisló el hongo *Verticillium dahliae*, descrito en otros países como el causante primario del síndrome denominado Potato Early Dying (PED, muerte temprana de la patata), y que en zonas donde se cultiva continuamente esta especie produce importantes reducciones de cosecha.

Con la finalidad de conocer el alcance de la problemática descrita y su distribución, se llevaron a cabo prospecciones en diferentes lugares de la provincia de Alicante en patata de otoño y, sobre todo, en su ciclo temprano en primavera, en los años 2001 a 2003. Para ello se recolectaron plantas sospechosas de estar infectadas por el hongo, con las que se realizaron aislamientos de la zona de los vasos del cuello en medio de cultivo PDAS, y se identificó el hongo mediante sus rasgos morfológicos característicos. Para establecer su patogenicidad se seleccionaron dos aislados con los que se realizaron inoculaciones en patata y berenjena, mediante la inmersión de sus raíces en una suspensión de  $10^6$  conidias por ml.

Los test de patogenicidad realizados indican que los aislados de patata son patógenos en las dos especies inoculadas, siendo más temprana y severamente afectada la berenjena, mientras que los síntomas en patata fueron ligeros y aparecieron más tarde. En todos los casos se reaisló *V. dahliae* de las plantas inoculadas.

En las prospecciones se observó que *V. dahliae* se hallaba ampliamente distribuido, detectándose en 6 de las 7 zonas geográficas en las que se incluyeron los campos analizados. En Redovan-Escorratel, Orihuela Este y Orihuela Oeste el nivel de infección fue alto, detectándose el hongo en más del 75% de las plantas analizadas, coincidiendo esas zonas con lugares tradicionales en los que se cultiva más intensamente la patata, donde alterna con otros cultivos también sensibles como la alcachofa, y frecuentemente se repite el cultivo de patata, incluso en el mismo año. Se halló el hongo en alrededor del 50% de las muestras en Elche, Callosa-Cox y Formentera del Segura, donde el cultivo de patata es menos frecuente y las alternativas más variadas (cereales, alfalfa, etc). No se detectó la infección en Pilar de la Horadada, donde se cultiva la patata de manera esporádica, sólo en los últimos años y en suelos nuevos.



**H-128****PRESENCIA DE *Gaeumannomyces graminis* CAUSANTE DEL “MAL DE PIE” EN CEREALES DE INVIERNO EN CASTILLA Y LEÓN****GARCÍA BENAVIDES, P., PALOMO, J.L.**

*Centro Regional de Diagnóstico, Junta de Castilla y León, Apdo. 61, 37080 Salamanca. E-mail: pgb@usal.es*

Durante los dos últimos años se ha realizado un seguimiento de muestras de parcelas de cereales que presentaban problemas de crecimiento.

Los síntomas de las plantas afectadas en los primeros estadios de desarrollo del cereal se corresponden con rodales o corros deprimidos, con escaso crecimiento y falta de respuesta al abonado. Las raíces de las plantas afectadas eran más cortas y con zonas oscuras. Al final del ciclo del cultivo las plantas afectadas maduran antes y delimitan las zonas afectadas por la presencia de espigas blancas y de menor altura en contraste con las del resto del cultivo que permanecen aun verdes.

En las raíces afectadas se aprecia, en las zonas más oscuras, unas hifas gruesas, marrones y tabicadas que rodean la raíz y penetran en ella. Este micelio se identificó por su morfología y sintomatología como *Phialophora radicola*, no siendo posible precisar la morfología de los hifopodios en las muestras naturales estudiadas.

Manteniendo las muestras en condiciones apropiadas en laboratorio, aparecen peritecios esféricos, negros, con cuello más largo que el diámetro, repartidos irregularmente por las raíces y cuellos de las plantas. Mediante cortes al microtomo de congelación y aplastamiento de los mismos se pudo apreciar la presencia de ascas y ascosporas.

Se estudiaron muestras de trigo y cebada, y no se ha visto una correlación entre el pH del suelo y presencia de la enfermedad.

Como las estructuras fúngicas (peritecios, ascas y ascosporas) son similares en *G. graminis* var. *graminis* y var. *tritici* (cepas CMI 381 y CMI 383, respectivamente), no parece recomendable basar exclusivamente la caracterización subespecífica de este hongo en su morfología y gama de hospedadores, por lo que en una segunda fase se abordará el diagnóstico molecular con cebadores específicos y posterior secuenciación del DNA fúngico amplificado por PCR con esos cebadores.

**H-129****IDENTIFICACIÓN DE HONGOS ASOCIADOS A LA PODREDUMBRE DE LA VID-YESCA EN LA COMUNIDAD VALENCIANA**

**SÁNCHEZ-TORRES, P., HINAREJOS, R., GONZÁLEZ, V., MIRA, J.L., HINAREJOS, C., TUSET, J.J.**

*Laboratorio de Micología, Departamento de Protección Vegetal y Biotecnología, Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA), Ctra Moncada-Náquera, Km 4,5, 46113 Valencia. E-mail: palomas@ivia.es*

La vid es uno de los cultivos principales en España (1.200.000 ha) de las que 95.000 ha se ubican en la Comunidad Valenciana. Una de las enfermedades más importantes de la viña es la yesca, enfermedad parasitaria producida por un complejo de hongos que penetran en la planta a través de heridas producidas generalmente en la poda. La sintomatología es altamente variable de ahí que se le atribuyan varios nombres (rayo, apoplejía de la vid, etc.). Los síntomas pueden aparecer de forma severa produciendo el colapso con una muerte repentina o de forma suave manifestándose en las distintas partes de la vid.

En este trabajo se han examinado muestras de vid de la Comunidad Valenciana durante los períodos comprendidos entre el 2002 y el 2006 con el fin de determinar los hongos asociados a la yesca y su incidencia sobre cada una de las partes de la vid.

Las especies encontradas de forma más frecuente fueron los hongos mitospóricos: *Diplodia mutila* (Fr.) Mont., *Phaeoacremonium aleophilum* W. Gams, Crous, M.J. Wingf & L. Mugnai *Phaeomoniella chlamydospora* (W. Gams, Crous, M.J. Wingf & L. Mugnai) Crous & W Gams y *Phomopsis viticola* (Sacc.) Sacc. y los basidiomicetos *Fomitiporia mediterranea* M. Fisch. y *Stereum hirsutum* (Willd.) Pers. Los datos obtenidos de la incidencia de la yesca durante los tres primeros años mediante identificación y crecimiento tanto *in vitro* como *in vivo* han sido validados utilizando técnicas moleculares. Para ello se ha llevado a cabo la secuenciación de la región ITS de dichos hongos y de esta forma se han corroborado algunos de los resultados obtenidos por otros autores, lo que ha permitido una mejor visión de la incidencia de los hongos responsables de la yesca.

La identificación molecular de los cultivos provenientes de plantas infectadas confirma la utilidad de dichas técnicas en especial en aquellas especies cuya fructificación no resulta evidente y/o cuyos cultivos puros que no presentan suficientes caracteres diagnósticos. La disponibilidad de las secuencias ITS de los hongos implicados en el complejo de yesca, permitirá el diseño de cebadores específicos para la detección temprana y rápida de dichos táxones a partir de material asintomático.

**H-130****GRUPOS DE COMPATIBILIDAD VEGETATIVA DE *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-cucumerinum* EN LA PROVINCIA DE ALMERÍA****GARCÍA-ALCÁZAR, M.<sup>1</sup>, AÑÑOS, M.A.<sup>1</sup>, BLANCO, R.<sup>1</sup>, CIFUENTES, D.<sup>2</sup>**<sup>1</sup>EPS, Dpto. Producción Vegetal, Universidad de Almería, Cañada de San Urbano, s/n, 04120 Almería. E-mail: rblanco@ual.es<sup>2</sup>ETSIA, Dpto. Producción Vegetal, Universidad Politécnica de Cartagena, Pº Alfonso XIII 52, 30203 Cartagena (Murcia). E-mail: dina.cifuentes@upct.es

El hongo *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-cucumerinum* Vakalounakis, que causa la enfermedad conocida como "podredumbre del cuello y las raíces" en plantas de pepino (*Cucumis sativus* L.), fue detectado en España a principios del año 2000 en cultivos de pepino de la provincia de Almería. Con el objeto de conocer la variabilidad genética de este patógeno, se determinaron los grupos de compatibilidad vegetativa (VCGs) utilizando auxótrofos de la ruta del nitrato, (mutantes *nit*), de un total de 13 aislados de este hongo, colectados en la provincia de Almería, junto con un grupo de aislados de origen griego, incluidos como referencia de VCG. Todos los aislados españoles fueron colectados en plantas que presentaban podredumbre del cuello y las raíces. Doce aislados se colectaron en plantas de pepino y uno en planta de melón. Ocho aislados, uno de ellos colectado en plantas de melón, fueron asignados al VCG 0260, dos fueron incluidos en el VCG puente 0260/0261, y dos aislados no pudieron ser asignados a ningún VCG, porque no formaron heterocarión con ninguna de las cepas de referencia. Al resto de los aislados no se les pudo asignar su grupo de compatibilidad vegetativa debido a su incapacidad para producir mutantes *nit* o porque resultaron autoincompatibles. El predominio del VCG 0260 observado en el presente estudio es similar al observado en otros países, e indicaría que las poblaciones de *F. o.* f.sp. *radicis-cucumerinum* en Almería son genéticamente muy similares. Sin embargo, la presencia del VCG puente 0260/0261 y la posibilidad de que existan nuevos VCGs parece indicar que es posible esperar una mayor variabilidad genética de este hongo. La patogeneicidad de *F. o.* f.sp. *radicis-cucumerinum* en plantas de melón detectada en este estudio se ha comprobado recientemente en Grecia.

**H-131****DETECCIÓN DE ESPECIES DEL GÉNERO *Phytophthora* EN FRUTALES SUBTROPICALES EN ANDALUCÍA**

**ZEABONILLA, T., MARTÍN-SÁNCHEZ, P.M., GONZÁLEZ-SÁNCHEZ, M.A., PÉREZ-JIMÉNEZ, R.M.**

*Instituto Andaluz de Investigación y Formación Agraria (IFAPA-CICE), CIFA de Churriana, Cortijo de la Cruz s/n, 29140 Churriana (Málaga).*

El litoral de las provincias de Málaga y Granada es la principal zona productora de fruta subtropical de Europa. Por su importancia económica, el aguacate (*Persea americana* Mill.) ha recibido especial atención en cuanto a las enfermedades que le afectan y está bien establecido que la infección de raíz por *Phytophthora cinnamomi* Rands junto con la podredumbre blanca por *Rosellinia necatrix* Prill. son los factores limitantes del cultivo. Sin embargo, otros cultivos subtropicales destacados presentes en la zona son susceptibles a alguno de estos patógenos. Así, *R. necatrix* se ha aislado tanto de chirimoyo (*Anona squamosa* L.) como de mango (*Mangifera indica* L.), existiendo otras especies de *Phytophthora* asociadas con cultivos subtropicales. En este trabajo se presentan los resultados de dos especies de *Phytophthora* que recientemente se han aislado de mango y aguacate en Andalucía.

*P. citricola* Sawada se ha aislado de plantas de mango y se ha descrito como un nuevo patógeno de este cultivo. La identificación de esta especie se ha llevado a cabo mediante descripciones morfológicas junto con técnicas moleculares de diagnóstico. Las pruebas de patogenicidad han sido positivas, de tal forma que el patógeno se ha reaislado de raíces, de tronco y de hojas de mango necrosadas tras haber sido inoculadas artificialmente con un aislado de campo. Por otro lado, se ha aislado, de material de aguacate de vivero, otra especie de *Phytophthora*, aún por identificar, distinta a las anteriores. Igualmente, las inoculaciones realizadas con plantas de aguacate han confirmado la patogenicidad de este aislado al recuperarlo de raíces y observar síntomas de marchitez y muerte en las plantas inoculadas.

*P. citricola* es un patógeno polífago que infecta plantas hortícolas y distintos árboles frutales y forestales, de ahí la importancia de su detección. Las posibles repercusiones de la presencia de esta otra *Phytophthora* sp. en los cultivos de la zona se determinarán en futuros trabajos. Por otro lado, *P. cactorum* ha sido recientemente aislada de frutos de aguacate de la zona, por lo que presumiblemente también se encuentra en estos suelos. La detección de estas especies de *Phytophthora* en esta zona productora de fruta subtropical alertan del peligro potencial que supone su presencia para estos cultivos y para el resto de la vegetación existente susceptible a estos patógenos.

**H-132****CARACTERIZACIÓN DE ESPECIES DE *Phomopsis* EN VID****AROCA, A.<sup>1</sup>, LUQUE, J.<sup>2</sup>, GARCÍA-FIGUERES, F.<sup>3</sup>, RAPOSO, R.<sup>1</sup>**<sup>1</sup>CIFOR-INIA, Ctra. Coruña Km 7,5, 28040 Madrid.<sup>2</sup>IRTA, Centre de Cabrils, Dep. Protecció Vegetal, Ctra. Cabrils s/n, 08348 Cabrils (Barcelona).<sup>3</sup>Laboratori de Sanitat Vegetal, DARP, Generalitat de Catalunya, Via Circulació Nord, Tram 6, 08040 Barcelona.

La excoriosis o “Phomopsis” de la vid es una enfermedad económicamente importante. Sus síntomas característicos son lesiones necróticas en la madera de los primeros entrenudos de los brotes y lesiones cloróticas en las hojas. Los daños más importantes se producen a consecuencia de la muerte de las yemas, que impiden la brotación en los años siguientes. La planta se debilita y el rendimiento de la cosecha se reduce. Esta enfermedad ha estado siempre asociada a la presencia del hongo *Phomopsis viticola*. Sin embargo, en los últimos años se han identificado hasta 10 especies del género *Phomopsis* aisladas de vid y algunos aislados de *Phomopsis viticola* se han reclasificado en otras especies del género. El objetivo de este trabajo es la caracterización de las especies de *Phomopsis* aisladas de vid, en relación a su identificación y patogenicidad. Se obtuvieron 25 aislados procedentes de corteza de brotes, necrosis de madera, restos de poda y portainjertos asintomáticos de vid. Se amplificó y secuenció la región ITS1, 5,8S e ITS2 del ADN ribosómico utilizando los cebadores universales ITS1F/ITS4. Las secuencias obtenidas junto con otras procedentes de la base de GenBank fueron alineadas con el programa ClustalX. Se realizó un análisis filogenético por el método de “Neighbor Joining” con el programa PAUP y un “bootstrap” con 1.000 repeticiones para medir la confianza del análisis. De esta manera se han identificado 7 especies distintas de *Phomopsis*. Para comprobar la patogenicidad y virulencia de estas especies se realizó un ensayo de inoculación de brotes verdes y de hojas de *Vitis vinifera*. Después de dos semanas de incubación a 22 °C en oscuridad, se midió el tamaño de la lesión producida por cada aislado. El tamaño medio de la lesión se comparó estadísticamente mediante un test ANOVA.

**H-133****FORMULACIÓN DE MEDIOS SEMISELECTIVOS PARA EL AISLAMIENTO DE *Phaeomoniella chlamydospora* EN MUESTRAS DE MADERA DE VID Y DE SUELO****GAFORIO, L., TELLO, M.L.**

*Instituto Madrileño de Investigación y Desarrollo Rural, Agrario y Alimentario (IMIDRA), Finca "El Encín", Autovía A-2, Km. 38,2, 28800 Alcalá de Henares (Madrid). E-mail: marisa.tello@madrid.org*

El aislamiento de *Phaeomoniella chlamydospora* (Pch), agente causal de la enfermedad de Petri, a partir de tejidos de vid y de muestras de suelo, se imposibilita en muchos casos por la contaminación con bacterias y hongos saprofitos. En este estudio se analizó el efecto de cuatro compuestos químicos, folpet, captan, benomilo y rosa de bengala (RB) a diferentes concentraciones, junto con el antibiótico estreptomycin (EST). Se evaluaron los parámetros: crecimiento micelial (CM), tasa de esporulación (TE) y germinación de esporas (GE), de tres aislados de Pch y de siete géneros fúngicos: *Alternaria*, *Fusarium*, *Epiccocum*, *Rhizopus*, *Coniothyrium*, *Botryosphaeria* y *Cylindrocarpon*, que suelen aparecer en el aislamiento de este patógeno. Los resultados mostraron que el folpet disminuyó el CM de Pch en un 30% cuando se utilizó junto con EST. El RB, con y sin adición de EST, redujo el CM en un 60% y 40%, respectivamente, mientras que benomilo y captan lo inhibieron por completo. Las mayores TE de Pch se obtuvieron en los medios con altas concentraciones de folpet y RB y en sus combinaciones con EST. Por otro lado, benomilo, folpet y RB, y los dos últimos con EST, permitieron las tasas más elevadas de GE. Los medios M1 (PDA+folpet 10 ppm + EST 1g/l) y M2 (PDA+RB 0.15 g/l + EST 1g/l), que permitieron un CM y una tasa de GE de Pch aceptables, se testaron con el resto de los hongos. M1 presentó un control óptimo sobre *Coniothyrium* y *Cylindrocarpon*, mientras que M2 suprimió parcialmente el desarrollo de *Fusarium* y *Alternaria*. No se observaron diferencias en la sensibilidad de *Epiccocum* y *Botryosphaeria* frente a ambos medios, que causaron una inhibición moderada. La tasa de GE fue menor en M1 que en M2 en todos los casos menos con *Alternaria*, que ocurrió lo contrario. Al utilizarse M1 y M2 para el aislamiento de Pch a partir de muestras de madera sintomática, el aislamiento del patógeno se incrementó en un 50% y 40% respectivamente, frente al aislamiento en PDA, mientras que la tasa de contaminación descendió de un 61% en PDA a un 13% en M1 y un 19% en M2. En el reaislamiento a partir de suelos procedentes de viñedos y posteriormente inoculados, se incrementó el reaislamiento cerca de un 60% con ambos medios. Estos resultados muestran que M1 puede facilitar y mejorar el proceso de aislamiento de Pch y, en el caso de muestras altamente contaminadas con *Alternaria*, sería necesario considerar el uso de M2.

**H-134****SISTEMÁTICA Y FILOGENIA MOLECULAR DEL GÉNERO-FORMA *Rhizoctonia*****GONZÁLEZ, V.**

*Departamento de Protección Vegetal y Biotecnología, Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA), Ctra. Moncada-Náquera Km 4,5, 46113 Moncada (Valencia). E-mail: vgonzale@ivia.es*

El denominado género-forma *Rhizoctonia* es considerado como un conjunto taxonómicamente heterogéneo de hongos filamentosos que no producen esporas asexuales y que comparten un cierto nº de caracteres, referidos generalmente a aspectos macro y micromorfológicos de sus estados anamórficos. Son hongos de suelo asociados a raíces, generalmente patógenos, aunque existen también especies saprofíticas y simbiontes. *Rhizoctonia solani* (teleomorfo *Thanatephorus cucumeris*), la especie mas estudiada del grupo, es aislada habitualmente de suelos en todo el mundo y está considerada como un patógeno vegetal muy destructivo, con amplio rango de huésped, causando enfermedades en una gran variedad de cultivos de importancia agronómica, ornamental o forestal. En nuestro país, *R. solani* reduce la producción y calidad de cultivos como patata, remolacha, cereales, etc., causando *damping-off* en plántulas, necrosis en semillas y raíces, podredumbre de tallos o partes vegetales en contacto con el suelo e incluso lesiones foliares. Otras especies de *Rhizoctonia* s. lato han sido citadas como causantes de enfermedades en nuestro país, como *R. croccorum*, identificado como el agente responsable del mal vinoso en zanahoria, remolacha y azafrán. Recientes estudios sobre la estructura del aparato septal, han segregado los táxones del complejo en siete u ocho géneros según autores. Además, se han venido realizando aproximaciones filogenéticas moleculares, para la inferencia de relaciones evolutivas y taxonómicas en el complejo. La presente comunicación trata, por una parte de sistematizar y presentar una síntesis de los esquemas taxonómicos aceptados hoy en día para el género-forma *Rhizoctonia*, y de otra, establecer las relaciones filogenéticas existentes entre las distintas familias, géneros y especies que forman parte del grupo. De este modo, se realizaron reconstrucciones filogenéticas basadas en la comparación de secuencias del ADN ribosomal de: 1) una serie de géneros integrantes del complejo *Rhizoctonia* s. lato y 2) géneros y especies integrantes de la familia *Ceratobasidiaceae* (incluyendo *Ceratobasidium*, *Thanatephorus* y *Waitea*). Los resultados mostraron un alto grado de correlación entre las diversas agrupaciones resueltas en los filogramas realizados, y las clasificaciones de géneros más comúnmente aceptadas, tanto para la familia *Ceratobasidiaceae* como para todo el complejo.

## H-135

**INCIDENCIA Y CARACTERIZACIÓN DE LOS BASIDIOMICETOS *Fomitiporia mediterranea* Y *Stereum hirsutum* ASOCIADOS A YESCA EN LA COMUNIDAD VALENCIANA**

**GONZÁLEZ, V., SÁNCHEZ-TORRES, P., HINAREJOS, R., MIRA, J.L., HINAREJOS, C., TUSET, J.J.**

*Departamento de Protección Vegetal y Biotecnología, Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA), Ctra. Moncada-Náquera Km 4,5, 46113 Moncada (Valencia). E-mail: vgonzale@ivia.es*

La “yesca” es una enfermedad parasitaria de la vid, causada por un complejo de hongos, cuya etiología ha sido estudiada desde hace más de un siglo. El conocimiento de la dinámica poblacional y la sistemática de los microorganismos fúngicos asociados a la patología, es todavía motivo de controversia entre los especialistas. Los primeros estudios sobre la enfermedad pusieron de manifiesto la existencia de dos grupos de microorganismos asociados a las sintomatologías observadas, y probablemente actuando en una sucesión ecológica. Se caracterizaron especies pertenecientes a los géneros mitospóricos *Phaeoacremonium* y *Phaeomoniella*, citadas habitualmente como especies pioneras, que son probablemente sustituidas en el tiempo por basidiomicetos lignícolas pertenecientes a los géneros *Stereum* y *Fomitiporia* (= *Phellinus*). Junto a dichos géneros suelen aislarse en plantas sintomáticas cepas pertenecientes a los géneros *Phomopsis* (*P. viticola*), *Diplodia* (*Diplodia* spp.) e incluso *Trichoderma* (*T. aureoviride*). Entre los basidiomicetos, numerosos autores han atribuido una mayor incidencia en la yesca a *Fomitiporia*, sobre todo en las condiciones climáticas de la cuenca mediterránea. No obstante, en la mayoría de las localidades prospectadas en la Comunidad Valenciana se ha constatado repetidamente la presencia de *S. hirsutum* con similar o mayor incidencia. La presente comunicación se centra en la caracterización de ambos taxones, incluyendo estudios morfológicos macro y microscópicos para cada una de las dos especies a partir de muestreos realizados en la mencionada comunidad. La mayoría de detecciones de *F. mediterranea* se llevaron a cabo a partir de la caracterización molecular de cultivos obtenidos a partir de material sintomático, debido a la casi total ausencia de carpóforos de dicha especie en el campo. Además, la obtención y posterior comparación de secuencias de ADN ribosómico fue efectiva en numerosas ocasiones para discriminar entre cultivos axénicos de ambos géneros obtenidos a partir de siembras de madera infectada que no mostraba cuerpos fructíferos de ninguno de los dos táxones, y que presentaban una gran similitud morfológica en placa.



**H-136****SELECCIÓN DE PATRONES DE AGUACATE DE RAZA ANTILLANA TOLERANTE-RESISTENTES A *Phytophthora cinnamomi* PARA EL CONTROL DE LA PODREDUMBRE DE RAÍZ****GALLO-LLOBET, L.<sup>1</sup>, BAÑOS-ATANCE, A.<sup>1</sup>, RODRÍGUEZ-PÉREZ, A.<sup>1,2</sup>**<sup>1</sup>Dpto. Protección Vegetal, Instituto Canario de Investigaciones Agrarias (I.C.I.A.), Apdo. 60, 38200 La Laguna (Tenerife).<sup>2</sup>Dpto. Microbiología y Biología Celular, Facultad de Farmacia, Universidad de La Laguna, 38207 La Laguna (Tenerife).

*Phytophthora cinnamomi*, agente causal de la podredumbre de raíz, es la enfermedad más grave del aguacate a nivel mundial y la principal limitación para este cultivo en las Islas Canarias. Su erradicación es difícil una vez que el hongo se establece en el suelo, donde puede permanecer durante largos periodos de tiempo aún en ausencia de hospedador. En estas condiciones, la utilización de patrones tolerante-resistentes se presenta como una estrategia viable para el control de la enfermedad. Dentro del programa de selección de patrones tolerantes-resistentes que se viene desarrollando con material de raza Antillana aclimatado en las Islas Canarias, se ha obtenido, después de una primera fase de evaluación en campo, una selección de patrones para ser clonados y reevaluados. Los patrones fueron seleccionados por su buen comportamiento frente a la enfermedad en una parcela infestada de forma natural. Entre los patrones seleccionados se incluye material originario de diversas localidades de las islas de Tenerife y La Gomera. En la fase de reevaluación, los mejores resultados corresponden hasta el momento a los patrones Canarias-1, Canarias-2, Canarias-3 y Canarias-4, que después de 7 años de ensayo en una parcela infestada tienen un porcentaje de supervivencia del 100%. El ensayo, realizado con un diseño a bloques y 12 repeticiones, incluye los patrones mexicanos Duke 7 y Thomas como referencia de tolerancia-resistencia, y el patrón Topa-topa susceptible a la enfermedad. El porcentaje de supervivencia de los patrones Duke 7 y Thomas es, en la actualidad, inferior al 60%, y la del patrón Topa-topa no alcanza el 40%.

**H-137****ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD PEROXIDASA DE SUSPENSIONES CELULARES DE *Capsicum chinense* EN LA RESPUESTA FRENTE A *Verticillium dahliae*****SALLERES, B., NOVO, E., BERNAL, M.A., MERINO, F.***Laboratorio de Fisiología Vexetal de la Facultad de Ciencias de la Universidad de A Coruña*

*Verticillium dahliae* Kleb. es un hongo de profundidad que penetra a través del sistema radicular de la planta. Afecta a un amplio rango de cultivos hortícolas produciendo grandes pérdidas económicas. Dentro de estos cultivos se encuentran el tomate, la berengena y el pimiento, entre otros. Tiene unas condiciones óptimas de crecimiento en zonas húmedas entre 24° y 27 °C, y cuando las condiciones no son propicias forma microesclerocios como formas de resistencia, que pueden permanecer hasta 14 años en estado latente.

Para este trabajo se utilizaron como herramienta las suspensiones celulares de *C. chinense*, ya que los cultivos celulares poseen ciertas ventajas frente al uso de la planta completa y se obtiene una visión más general de la respuesta. El estudio de la actividad peroxidasa en la respuesta de estos cultivos celulares frente a *V. dahliae* fue llevado a cabo utilizando distintos métodos de inoculación y elicitación. Para ello se inocularon las suspensiones con conidios del hongo y se elicitaron con celulasas Onozuka, con paredes liofilizadas del hongo y con medio de cultivo líquido, donde había crecido el hongo, libre de células.

La inoculación con conidios, la elicitación con Onozuka y la elicitación con medio de cultivo libre de células no provocó grandes variaciones en las suspensiones celulares, detectando sólo un ligero descenso en la tasa de crecimiento y en la actividad peroxidasa con respecto a sus controles. En cambio, en las suspensiones celulares inoculadas con el micelio liofilizado se observó una reacción de dichas suspensiones que se manifestó en un aumento destacado de la actividad peroxidasa a las 72 horas tras la elicitación, probablemente como consecuencia del aumento en la expresión de una isoenzima básica.

Trabajo financiado por el proyecto de la Xunta de Galicia (PGIDIT03RAG10301PR)

**H-138****ESTRATEGIAS PARA IDENTIFICAR UN GEN DE *Botrytis cinerea* INDUCIDO *IN PLANTA* RELACIONADO CON Bde47A****BENITO-PESCADOR, D., ESLAVA, A.P., BENITO, E.P.**

*Centro Hispano Luso de Investigaciones Agrarias, Universidad de Salamanca, Edificio Departamental, Campus Unamuno, 37007 Salamanca. E-mail: daben@usal.es*

*Botrytis cinerea* es un hongo fitopatógeno con un amplio rango de especies hospedadoras. Con el fin de profundizar en la caracterización de los mecanismos de patogenidad de *B. cinerea*, se aplicó una aproximación experimental basada en el análisis de expresión génica diferencial (DDRT-PCR) durante la interacción *B.cinerea*-tomate que permitió detectar varios fragmentos de cDNA derivados de genes de *B. cinerea* cuya expresión es inducida específicamente *in planta*. Uno de estos fragmentos, ddB47, de 209 nucleótidos, incluye una región de 136 nucleótidos con un contenido en purinas del 88,5%. Cuando este fragmento fue utilizado como sonda en un análisis tipo Northern en el que se incluyeron muestras de ARN derivadas de material vegetal infectado, se comprobó que este fragmento permitía detectar dos ARNm diferentes, de tamaño 1.4 y 1.0 kb, respectivamente, ambos derivados de dos genes de *B. cinerea* expresados diferencialmente durante la interacción.

El primer gen, denominado Bde47A, fue clonado mediante hibridación utilizando condiciones altamente restrictivas y codifica una proteína mitocondrial. Los mutantes deficientes en este gen presentan una germinación de las esporas más temprana y un incremento en su agresividad sobre distintos huéspedes en relación con la cepa silvestre.

Actualmente estamos interesados en la clonación del gen codificador del ARNm de 1.0 Kb, llamado provisionalmente Bde47B. Con tal objeto se han aplicado dos estrategias experimentales. En primer lugar, hibridación en condiciones moderadamente restrictivas utilizando también como sonda el fragmento de cDNA ddB47. En segundo lugar, el análisis del genoma de *B. cinerea*, hecho público recientemente, buscando secuencias similares, pero no idénticas, a la secuencia del fragmento ddB47. Se han identificado así 12 regiones ricas en repeticiones GA que presentan similitud significativa con la secuencia del fragmento ddB47. Con esta información se han generado sondas específicas para cada secuencia que están siendo utilizadas en hibridaciones Northern para identificar la región que incluye el gen Bde47B.

Hasta el momento no ha sido posible identificar dicha región, pero los resultados obtenidos nos han permitido identificar dos nuevos genes de *B. cinerea* cuya expresión se induce o aumenta significativamente *in planta*. Uno de ellos codifica para una helicasa, y el segundo, codifica un componente específico del sistema de traducción mitocondrial. Éste es el segundo gen nuclear de *B. cinerea* que codifica una proteína mitocondrial y cuya expresión se induce fuertemente *in planta*.

## H-139

**DETECCIÓN DE BAJOS NIVELES DE AMONIO Y PATOGENICIDAD DE *Botrytis cinerea*****MARTÍN-DOMÍNGUEZ, R., BENITO-PESCADOR, D., ESLAVA, A.P., BENITO, E.P.***Centro Hispano Luso de Investigaciones Agrarias, Universidad de Salamanca, Edificio Departamental, Campus Unamuno, 37007 Salamanca. E-mail: epbenito@usal.es*

*Botrytis cinerea* es un patógeno generalista que ataca más de 200 especies vegetales diferentes. Los resultados obtenidos en la caracterización de distintas interacciones en las que participa sugieren que este patógeno puede hacer uso de un amplio abanico de mecanismos de patogenicidad. La activación de los mecanismos de patogenicidad en un hongo fitopatógeno depende del reconocimiento de una señal que éste recibe y que le informa de la presencia de un huésped susceptible. Dado el amplio rango de huéspedes de *B. cinerea* y su naturaleza necrotrófica, es posible asumir que la señal inicial reconocida por este patógeno debe ser una señal de carácter general. Es posible asumir, asimismo, que la detección de la disponibilidad de nutrientes esenciales constituye una señal de este tipo. Dado que el proceso de infección tiene lugar en condiciones de baja disponibilidad de nutrientes, los productos génicos implicados en la detección de nutrientes esenciales probablemente jueguen un papel importante en el proceso de infección.

El presente trabajo tiene por objeto analizar la capacidad de *B. cinerea* para detectar la disponibilidad de amonio como fuente de nitrógeno y valorar el papel que juega la detección de niveles bajos de amonio como señal nutricional que desencadena la activación de los mecanismos de patogenicidad del hongo. En hongos el transporte de amonio al interior celular es llevado a cabo por una familia de proteínas de membrana con función transportadora, las metilamonio permeasas. En *Saccharomyces cerevisiae* una de estas permeasas es considerada como un sensor de niveles bajos y, por lo tanto, de una baja disponibilidad, de amonio. Esta permeasa es necesaria para inducir el crecimiento pseudofilamentoso de *S. cerevisiae* en respuesta a bajas concentraciones de amonio. En *Ustilago maydis* la proteína homóloga es necesaria para inducir el crecimiento en forma de micelio en condiciones de baja disponibilidad de nitrógeno. Utilizando inicialmente la información derivada de estos sistemas y, posteriormente, la información generada en el curso de la secuenciación del genoma de *B. cinerea*, nuestro grupo ha identificado tres genes codificadores de enzimas metilamonio permeasas en este patógeno. Nuestro interés se centra, en la actualidad, en el estudio de los patrones de expresión génica de cada uno de estos tres genes, tanto durante el crecimiento saprofítico del hongo como durante su interacción con el huésped, y en la obtención y caracterización de mutantes alterados en cada uno de ellos en relación con la capacidad de infección del patógeno.

**H-140****NIVELES DE RESISTENCIA A *Fusarium circinatum* Y *Sphaeropsis sapinea* EN CONÍFERAS**

ITURRITXA, E.<sup>1</sup>, HEPPE, E.<sup>1</sup>, MESANZA, N.<sup>3</sup>, RENOBLES, G.<sup>3</sup>, DICK, M.<sup>2</sup>, GANLEY, R.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>NEIKER, Granja Modelo, Arkauste, Apdo. 46, 01080 Vitoria-Gasteiz.

<sup>2</sup>ENSIS, Te Papa Tipu Innovation Park, 49 Sala Street, Private Bag, 3020 Rotorua, New Zealand.

<sup>3</sup>Universidad del País Vasco, Facultad de Farmacia, Paseo de la Universidad 7, 01006 Vitoria-Gasteiz.

*Pinus radiata* es la especie forestal de mayor trascendencia en el País Vasco en cuanto a producción y superficie ocupada. Se trata de una especie con óptimos parámetros de desarrollo y crecimiento pero con el inconveniente de ser especialmente sensible a la enfermedad desarrollada por los hongos de chancro *Diplodia pinea* (Desm) (Kickx) (De Wet et al, 2003) y *Fusarium circinatum*.

Estas dos especies son las que mayores pérdidas generan en viveros y plantaciones de pino insignis, pero a su vez, son capaces de desarrollar la enfermedad en otras especies de coníferas y de coexistir en un mismo individuo. En estas circunstancias, el sector forestal está planteando especies que pueden considerarse alternativas a *Pinus radiata* en áreas de elevada incidencia y/o severidad.

Se realiza un estudio de los niveles de resistencia frente a *Fusarium circinatum* (Desm). (Kickx) y *Sphaeropsis sapinea* en diversas especies de coníferas de uno y dos años, con parámetros de crecimiento y producción óptimos, en las condiciones ambientales del País Vasco. Se completa este trabajo con ensayos, en condiciones de *in vitro*, evaluándose el desarrollo de estas dos especies patógenas. Los resultados preliminares obtenidos, en las condiciones de los ensayos, revelan un comportamiento distinto de las especies en estudio y sugieren los niveles más altos de resistencia a la enfermedad por parte de las especies de coníferas: *Pinus sitchensis*, *Sequoiadendron giganteum*, *Larix leptolepis* y *Pseudotsuga menziesii*. Dentro del género *Pinus* destaca el comportamiento altamente resistente de las especies *Pinus pinea* frente a *Fusarium circinatum* y especialmente sensible frente a *Sphaeropsis sapinea*.

**H-141****UTILIZACIÓN DE LA PCR EN TIEMPO REAL PARA DETERMINAR LA PRESENCIA DE *Verticillium dahliae* EN DIFERENTES CULTIVARES DE SOLANÁCEAS****GAYOSO, C.<sup>1</sup>, MARTÍNEZ DE ILÁRDUYA, O.<sup>2</sup>, POMAR, F.<sup>2</sup>, MERINO, F.<sup>1</sup>**<sup>1</sup>*Departamento de Biología Animal, Biología Vegetal y Ecología, Universidad de La Coruña, 15071 La Coruña.*<sup>2</sup>*Centro de Investigaciones Agrarias de Mabegondo, Xunta de Galicia, 15318 La Coruña. (Fax: + 34 981 673656; E-mail: federico.pomar.barbeito@xunta.es).*

La verticilosis, causada por el hongo vascular *Verticillium dahliae* Kleb., limita la producción de un amplio rango de especies muy importantes desde el punto de vista económico. Entre ellas se encuentran el tomate y el pimiento, dos especies hortícolas ampliamente extendidas en España y que figuran entre los principales cultivos de Galicia.

El objeto de este estudio ha sido comparar el grado de susceptibilidad de cuatro cultivares de *Capsicum annuum* (Luesia, Padrón, SCM331 y PI201234) y el cultivar C118 de *Capsicum chinense*, utilizando la tecnología de la PCR en tiempo real. Los síntomas observados durante la infección incluían enanismo y lesiones a nivel del cuello de la raíz, siendo más agudos en los cv. SCM331, que mostraba defoliación, y C118, que sufría enanismo severo. La cuantificación del DNA del patógeno en las raíces a los 23 y a los 34 días después de la inoculación mostraron que la relación DNA de *V. dahliae*/planta, era más abundante en C118 y menos en Luesia, presentando los cv. SCM331, Padrón y PI201234 niveles intermedios. En los hipocotilos, el DNA del hongo era más abundante en SCM331, mientras que en Luesia, Padrón y PI201234 los niveles eran mucho menores y C118 mostraba resultados intermedios.

Debido a que en el pimiento no se conoce resistencia a *V. dahliae*, se buscó una especie próxima, dentro de las solanáceas, con resistencia conocida a este patógeno para poder así comparar el comportamiento entre un sistema compatible frente a uno incompatible. Se utilizaron dos líneas casi isogénicas de tomate, *Lycopersicon esculentum*, LA3030 (susceptible) y LA3038 (resistente a *V. dahliae*). La relación DNA hongo/planta fue menor en la línea LA3038 que en la línea LA3030, además en la línea LA 3038 esta relación decrecía con el tiempo. En las raíces de la línea LA3030 esta relación de DNA permanecía constante desde los 23 a los 34 días después de la inoculación, pero aumentaba 10 veces en la zona del cuello-raíz.

**H-142****ESTUDIO DE LA VIRULENCIA DE DIFERENTES CEPAS DE *Colletotrichum acutatum* AISLADAS EN CULTIVO DE FRESA**

**GARRIDO, C., FERNÁNDEZ-ACERO, F.J., CARBÚ, M., QUERO, P., VALLEJO, I., CANTORAL, J.M.**

*Facultad de CC. del Mar y Ambientales, Lab. Microbiología, Universidad de Cádiz, Campus Puerto Real, 11510 Cádiz. E-mail: carlos.garrido@uca.es*

*Colletotrichum* spp. es uno de los géneros de hongos fitopatógenos más importantes en todo el mundo debido a las cuantiosas pérdidas económicas que ocasiona en diversos cultivos como cereales, leguminosas, alfalfa, café, patatas, pimientos, tomates, frutales, entre otros. Tres especies son de especial interés como causantes de antracnosis en fresa a nivel mundial: *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz) (teleomorfo *Glomerella cingulata*), *C. acutatum* (Simmonds) (teleomorfo *Glomerella acutata*) y *C. fragariae* (Brooks), siendo *Colletotrichum acutatum* la que causa mayores pérdidas dentro de la Comunidad Europea.

En el año 2004 se aislaron numerosas cepas de *Colletotrichum acutatum* en cultivo de fresa en el Sureste de Andalucía. La caracterización de los aislados se completó con la realización de bioensayos *in planta*, lo que nos ha permitido estudiar los distintos niveles de virulencia. Estos ensayos se realizaron durante los años 2005 y 2006 inoculando dos variedades de fresa, *Fragaria annanassa* var. Camarosa y var. Ventana, en una parcela experimental mantenida bajo condiciones normales del cultivo de la fresa.

Se han encontrado diferencias significativas en las lesiones producidas por el hongo sobre la planta, poniéndose de manifiesto la diferencia de virulencia que presentan las cepas sometidas a este estudio.

La caracterización de la virulencia de las cepas nos permitirá realizar una aproximación molecular a los mecanismos de patogenicidad de *Colletotrichum acutatum*, mediante la comparación de cepas con diferente fenotipo.

**H-143****ESTUDIO SOBRE LOS CAMBIOS ESTRUCTURALES Y BIOQUIMICOS PRODUCIDOS POR HONGOS VASCULARES EN EL XILEMA DE VIÑA****DEL RÍO, J.A., GÓMEZ, P., GONZÁLEZ, A., ORTUÑO, A.***Dpto. Biología Vegetal, Facultad de Biología, Universidad de Murcia, Campus de Espinardo, 30100 Murcia. E-mail: jadelrio@um.es*

Las enfermedades vasculares o de madera están causadas por hongos, que se ubican en el interior del tronco, lo que dificulta su tratamiento de manera directa y eficaz. En los últimos años, las enfermedades vasculares han tomado gran importancia en viña, por reducir notablemente la producción de la cosecha e incluso desencadenar la muerte de la planta. En este sentido, el decaimiento de plantas jóvenes de viña o enfermedad de Petri, es una enfermedad compleja, causada por diferentes hongos y responsable de importantes pérdidas en nuevas plantaciones. En el presente trabajo se ha realizado un exhaustivo estudio sobre la causa de esta enfermedad en diferentes portainjertos y variedades de viña, analizándose por una parte, mediante estudios de microscopia óptica y electrónica, cuales son las alteraciones fisiológicas responsables de la manifestación de la enfermedad, y por otra, cuales son las variaciones que se producen en las concentraciones de compuestos fenólicos, que pueden estar implicados en los mecanismos de resistencia. Nuestros resultados revelan que la desecación de la planta y paralización del crecimiento se produce por la formación de tilosas y agregados en el xilema que dificultan no impiden el flujo normal de agua a la parte aérea. La formación de tilosas se produce por una deformación de las paredes del xilema, invadiendo el lumen del mismo con protoplasma de las células parenquimáticas asociadas a xilema. Así mismo, se detecta la presencia de hifas de hongos en el interior del xilema, lo que sugiere que las tilosas observadas en las plantas infectadas podrían ser un mecanismo de defensa de la planta para evitar el avance del hongo. El análisis de los compuestos fenólicos en órganos y tejidos con distinto grado de infestación, revela que asociado a la obstrucción de vasos de xilema se produce un incremento en polifenoles que tienen actividad fungitóxica frente a los diferentes hongos implicados en esta enfermedad como *Phaeomoniella chlamydospora*, *Pheoacremonium aleophilum* y *Eutypa lata*.



**H-144****INDUCCIÓN DE RESISTENCIA A *Phytophthora capsici* EN PIMIENTO POR *Fusarium oxysporum* Y ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN GÉNICA ASOCIADA****SILVAR, C., MERINO, F., DÍAZ, J.**

*Departamento de Biología Animal, Biología Vegetal e Ecología, Universidade da Coruña. Campus da Zapateira s/n, 15071 A Coruña. Email: josefv@udc.es*

*Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (FOL) es un patógeno de tomate, pero no de pimiento, que ha sido utilizado con éxito para inducir resistencia en pimiento a varios patógenos (Díaz et al., 2005). En el presente trabajo se indujeron plántulas de pimiento (*Capsicum annuum* L. cv. Padrón) con *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* y 48 horas más tarde se inocularon con *Phytophthora capsici*. La inducción con FOL redujo significativamente la incidencia de la enfermedad causada por *P. capsici* y la severidad de los síntomas. El grado de colonización de los órganos de las plantas de pimiento por *P. capsici* fue determinado cuantificando la biomasa del patógeno por PCR en tiempo real. Se encontraron diferencias entre la cantidad de patógeno presente en tallos y raíces de las plantas tratadas con FOL y las plántulas control. Además, *P. capsici* no fue detectada en las hojas de las plántulas inducidas con FOL, a diferencia de lo que se observó en el control no inducido. Se estudió la expresión de cinco genes asociados a la respuesta defensiva de la planta, que codifican para una proteína PR-1, una  $\beta$ -1,3-glucanasa, una quitinasa, una peroxidasa y una sesquiterpeno ciclasa, usando como referencia un gen que codifica para la actina. Todos los genes incrementaron su expresión en raíces, tallo y hojas 48 horas tras la inducción con FOL.

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

**H-145****INDUCCIÓN DE RESISTENCIA A PATÓGENOS POR LA VANILLILNONANAMIDA EN PIMIENTO****VELOSO, J., SILVAR, C., MERINO, F., DÍAZ, J.**

*Departamento de Biología Animal, Biología Vegetal e Ecología, Universidade da Coruña, Campus da Zapateira s/n, 15071 A Coruña. E-mail: josefv@udc.es*

La capsicina es un compuesto fenólico que se sintetiza en algunas especies y variedades de pimiento, confiriéndoles un gusto picante. En un trabajo anterior se comprobó la capacidad de la capsicina para inducir resistencia a hongos patógenos en plantas de pimiento (*Capsicum annuum* L., cv. Padrón). Sin embargo, se trata de un producto extremadamente caro, lo que nos ha llevado a ensayar como alternativa un análogo sintético de la capsicina, la vanillilnonanamida. El tratamiento inductor consistió en sumergir las raíces de las plantas de pimiento durante 3 horas en una suspensión de vanillilnonanamida, inoculando las plantas 48 horas más tarde. Las plantas inducidas con capsicina e inoculadas con *Verticillium dahliae* Kleb. mostraron una importante reducción de los síntomas de la enfermedad con respecto al control. Si consideramos los parámetros de peso fresco, peso seco y longitud del epicotilo, que suelen disminuir en las plantas enfermas de verticilosis, las plantas inducidas con capsicina sufrieron una reducción significativamente menor que el control. Así, la infección por *V. dahliae* redujo el peso fresco del grupo control en un 73% con respecto a las plantas no inoculadas, en tanto que en el grupo inducido por capsicina sólo se produjo una reducción del 44%. Los datos de peso seco y longitud del epicotilo mostraron tendencias semejantes. En otros experimentos la inoculación reto se llevó a cabo con otro patógeno, *Phytophthora capsici* Leon., obteniéndose una AUDPC de las plantas inducidas con vanillilnonanamida significativamente inferior que la del control. Finalmente, se ha estudiado el efecto de la vanillilnonanamida sobre la expresión de varios genes asociados a la respuesta defensiva de la planta.

**H-146****INDUCCION DE RESISTENCIA EN PLANTAS DE FRESA MEDIANTE COMPUESTOS DE ORIGEN NATURAL****ORTEGA, J.<sup>1</sup>, DE LOS SANTOS, B.<sup>1</sup>, CORPAS, J.L.<sup>2</sup>, SOLIVERI, J.<sup>2</sup>, ROMERO, F.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Centro de Investigación y Formación Agraria "Las Torres-Tomejil", IFAPA-Junta de Andalucía, 41200 Alcalá del Río (Sevilla). E-mail: jose.ortega.ext@juntadeandalucia.es

<sup>2</sup>Departamento de Microbiología, Universidad Alcalá de Henares, Madrid.

La antracnosis, cuyo agente causal es *Colletotrichum acutatum*, es una importante enfermedad de la fresa cultivada (*Fragaria x ananassa* Duch.). Existen diversas medidas de control de la enfermedad, entre las que se encuentran unas adecuadas prácticas culturales, la utilización de plantas libres de patógenos, el uso de cultivares resistentes y la aplicación de fungicidas de síntesis química, entre otros. Muchos de estos fungicidas de síntesis química tienen una eficacia reducida en el control del patógeno causal de la antracnosis. Entre las alternativas a la utilización de estos compuestos para el control de las enfermedades de las plantas se encuentra el uso compuestos de origen natural con capacidad fungicida y bioprotectora que active y refuerce los mecanismos de defensa propios de las plantas.

En este ensayo se han utilizado diversos compuestos obtenidos a partir de extractos vegetales: DSO (destilado de subproducto del olivo), Sekanela (extracto de canela), Sekacit (extracto de cítricos), Sekamosa (extracto de mimosa tenuiflora), Puxa, Brotomax y Protek, así como una serie de liofilizados obtenidos mediante fermentación de quitina, gelidium con agar extraído, gelidium sin extraer el agar, gracilano, restos vegetales de fresa (fermentos obtenidos en el Departamento de Microbiología de la Universidad de Alcalá de Henares, Madrid) y Akadian, con el objetivo de inducir y aumentar los mecanismos de defensa frente al ataque de *C. acutatum* en condiciones de ambiente controlado. Estos compuestos han sido aplicados por pulverización a las plantas de fresa antes de la inoculación con el patógeno para determinar su capacidad inductora de resistencia sistémica adquirida (SAR). Los resultados indican que los extractos de canela y mimosa, los productos comerciales Protek y Brotomax, el control estándar, así como algunos de los liofilizados indujeron la activación de las defensas de la planta, permitiendo una reducción de la incidencia de la antracnosis.

**H-147****PATOGENICIDAD DE *Fusarium moniliforme* Y *Fusarium oxysporum* PROCEDENTES DE VIVEROS FORESTALES DE CASTILLA Y LEÓN SOBRE *Pinus sylvestris* Y *Pinus pinea*****OLAIZOLA, J., PAJARES, J.A., DíEZ, J.J.**

Universidad de Valladolid, Laboratorio de Entomología y Patología Forestal, Dpto. Producción Vegetal y Recursos Forestales, E.T.S. Ingenierías Agrarias, Avda. Madrid 44, 34004 Palencia. E-mail: jdcasero@pvs.uva.es

En Castilla y León *Fusarium moniliforme* y *Fusarium oxysporum* son los causantes fundamentales del *damping-off* y producen significativas pérdidas en los viveros forestales. La patogenicidad de 22 aislados de *Fusarium moniliforme* y *F. oxysporum* obtenidos de plantas sintomáticas fue evaluada sobre semillas y plántulas de *Pinus sylvestris* y *P. pinea*. Las esporas de los aislados de *Fusarium* spp. se inocularon ( $5 \times 10^6$ ) sobre el sustrato de crecimiento de las plántulas en el momento de la siembra con la intención de conocer el poder patogénico sobre las especies de *Pinus* y *Quercus* seleccionadas. El ensayo se diseñó por bloques (4 bloques por hospedante, con 10 plantas por bloque), y fue desarrollado en condiciones controladas en un invernadero con riego programado. Una vez finalizado el experimento, los resultados de germinación de las semillas y de mortalidad de las plántulas se analizaron estadísticamente de forma independiente respecto al control utilizado para cada tratamiento mediante un análisis de la varianza (ANOVA), para conocer la virulencia de los aislamientos.

Diecisiete aislados de *Fusarium* spp. redujeron la germinación de las semillas de *P. sylvestris* y únicamente 9 de ellos redujeron la germinación de las semillas de *P. pinea*. 18 aislados de *Fusarium* spp. ocasionaron *damping-off* de postemergencia en *P. sylvestris* y 9 de ellos produjeron *damping-off* de postemergencia sobre plántulas de *P. pinea*. También se observó la presencia de aislados de *Fusarium* spp. no patógenos. *Pinus pinea* mostró una mayor resistencia frente al *damping-off* de pre y postemergencia que *P. sylvestris*.

## H-148

**SUSCEPTIBILIDAD DE SEIS ESPECIES DE CONÍFERAS A AISLADOS ESPAÑOLES DE *Gremmeniella abietina*****SANTAMARÍA, O.<sup>1</sup>, PAJARES, J.A.<sup>2</sup>, DÍEZ, J.J.<sup>2</sup>**<sup>1</sup>Departamento de Biología y Producción de los Vegetales, Escuela de Ingenierías Agrarias, Ctra. de Cáceres s/n, 06071 Badajoz. E-mail: osantama@unex.es<sup>2</sup>Laboratorio de Entomología y Patología Forestal, E.T.S. Ingenierías Agrarias, Avda. Madrid 44, 34004 Palencia. E-mail: jdcasero@pvs.uva.es

*Gremmeniella abietina* es un hongo patógeno que causa una de las enfermedades más importantes sobre coníferas en el hemisferio norte. El objetivo principal del trabajo consistió en evaluar la susceptibilidad que presentan las principales especies de pino presentes en la Península Ibérica a aislados españoles de *G. abietina*, evaluando también la influencia de la edad de las plántulas sobre esta susceptibilidad. Para ello se llevaron a cabo dos experimentos: uno en invernadero en el que se inocularon plantas de una y dos savias de las especies: *Pinus halepensis*, *P. pinea*, *P. pinaster*, *P. sylvestris* y *P. uncinata* y plantas de 1 savia de *P. nigra* con cuatro aislados españoles de *G. abietina*. La longitud relativa de necrosis causada por el patógeno después de 130 días fue usada como variable respuesta. El otro experimento fue realizado en laboratorio sobre ramillos de 2-6 años de las especies arriba indicadas (excepto *P. uncinata*), los cuales fueron inoculados con los mismos cuatro aislados y en los que se midió la longitud de necrosis después de 6 semanas. Los resultados mostraron que todos los aislados de *G. abietina* utilizados fueron patógenos sobre las plántulas de esas 6 especies, y que las plántulas de *P. halepensis* fueron consistentemente las más susceptibles. No obstante, es importante precisar que todos los aislados procedían de esta misma especie, única en España en la que se ha detectado al patógeno hasta la fecha, por lo que se podría pensar en una cierta especificidad de *G. abietina* hacía su hospedante. La susceptibilidad del resto de especies estuvo en función de la edad de las plántulas.

**H-149****SUSCEPTIBILIDAD A *Phomopsis amygdali* EN ALMENDROS DESCENDIENTES DEL CRUZAMIENTO 'PRIMORSKIY' X 'LAURANNE'****LUQUE, J.<sup>1</sup>, MARTOS, S.<sup>1</sup>, BATLLE, I.<sup>2</sup>, CLAVÉ, J.<sup>2</sup>, ROMERO, M.<sup>2</sup>, VARGAS, F.<sup>2</sup>**<sup>1</sup>Dep. Protecció Vegetal, Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentàries (IRTA), Centre de Cabrils, Ctra. de Cabrils s/n, 08348 Cabrils (Barcelona). E-mail: jordi.luque@irta.es;<sup>2</sup>Dep. Arboricultura Mediterrània, Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentàries (IRTA), Centre de Mas Bové, Apartado 415, 43280 Reus. E-mail: francisco.vargas@irta.es

La enfermedad del chancro del almendro causada por el hongo *Phomopsis amygdali* (denominada vulgarmente fusicoccum o chancro) constituye uno de los principales problemas fitosanitarios de este cultivo en España, especialmente en zonas de humedad ambiental alta. La enfermedad es de lenta introducción (los primeros síntomas suelen aparecer cuando los árboles tienen 4-6 años de edad), pero de muy difícil erradicación. Existen diferencias muy notables entre variedades en el grado de sensibilidad al hongo, de ahí que los programas de mejora de almendro presten una gran atención a la selección de fenotipos tolerantes a la enfermedad.

Para este estudio se utilizó la descendencia del cruzamiento 'Primorskiy' (tolerante) x 'Lauranne' (sensible), que presumiblemente debería segregar para el carácter estudiado. El experimento se repitió en dos años consecutivos, empleándose 100 descendientes que se inoculaban artificialmente con *P. amygdali*. En cada árbol se tomaron dos-cuatro brotes al azar y se inoculaban, mediante incisión en la corteza, con un fragmento de micelio del hongo. Como control se emplearon brotes inoculados con fragmentos de medio PDA (agar patata-dextrosado) estériles. Se midió la longitud de las lesiones vasculares de los brotes, parámetro que puede ser un indicador de la susceptibilidad de los individuos a *P. amygdali*.

La longitud de las necrosis en los brotes inoculados osciló en un rango amplio, desde unos 20mm hasta más de 100mm. En determinados casos también se observó la muerte de los brotes, fenómeno normalmente asociado a necrosis de grandes dimensiones. Estos resultados indican la existencia de segregación del carácter en la descendencia, llegándose a establecer una primera clasificación de los individuos de la progenie en cinco clases: muy tolerantes, tolerantes, intermedios, sensibles y muy sensibles.

**H-150****CAMBIOS ESTACIONALES EN LA SUSCEPTIBILIDAD DE LA VID A HONGOS PATÓGENOS DE LA MADERA****MARTOS, S., LUQUE, J.**

*Dep. Protecció Vegetal, Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentàries (IRTA), Centre de Cabrils, Ctra. de Cabrils s/n, 08348 Cabrils (Barcelona). E-mail: tmp2102@irta.es*

Determinar posibles cambios en la susceptibilidad de la vid a hongos patógenos de la madera es útil para establecer los períodos de mayor riesgo para la infección y progresión de las enfermedades. Para ello se inocularon fragmentos de sarmientos en distintas épocas del año con diversos aislados patógenos y se empleó como indicador de la susceptibilidad del hospedante los cambios en la longitud de las lesiones vasculares. Las inoculaciones se hicieron coincidir en el tiempo con actividades realizadas en el viñedo para establecer si las heridas causadas en la planta durante estas actividades podrían actuar como vías de infección efectivas para los patógenos. Las fechas de inoculación fueron: finales de otoño (para simular una poda temprana), finales de enero (poda tardía), finales de primavera (eliminación de vegetación) y verano (vendimia). Se evaluaron los hongos patógenos *Botryosphaeria dothidea*, *B. obtusa*, *B. parva* y *Eutypa lata*, todos ellos relacionados con enfermedades causantes de la muerte de brazos. Las variedades de uva empleadas en los ensayos fueron Macabeo (blanca) y Tempranillo (tinta).

En todas las combinaciones 'patógeno' x 'tipo de uva' se observaron cambios significativos en la longitud de las necrosis a lo largo del período experimental. Para la mayoría de hongos ensayados, el período en el que se observaron las lesiones más cortas fue a finales de otoño (diciembre). Los sarmientos inoculados con *B. dothidea* y *B. obtusa* en época de vendimia (septiembre) también presentaron lesiones poco extensas. El período de mayor susceptibilidad, indicado por necrosis de mayor longitud, correspondió a finales de primavera para todos los hongos excepto para *B. parva*. Esta especie fue la más virulenta, aunque las lesiones de mayor tamaño causadas por este patógeno se registraron en los períodos de vendimia (uva blanca) y poda tardía (uva tinta). La heterogeneidad observada en los resultados podría corresponderse con características específicas de cada patógeno. En contraste con lo anterior, las dos variedades de uva mostraron, para cada patógeno ensayado y período de inoculación, unas lesiones vasculares de tamaños similares.

**H-151****PATOGENICIDAD Y VIRULENCIA DE AISLADOS DE *Verticillium dahliae* PROCEDENTES DE PATATA SOBRE DIFERENTES ESPECIES HORTÍCOLAS****ORTEGA, A., PÉREZ, S., VACA, E., GUIRAO-MOYA, P.**

*Universidad Miguel Hernández, Dpto. Producción Vegetal y Microbiología, Escuela Politécnica Superior de Orihuela, Ctra. Beniel, Km 3,2, 03300 Orihuela (Alicante). E-mail: ana.ortega@umh.es*

Para conocer el comportamiento patógeno de aislados de *Verticillium dahliae* obtenidos en plantas de patata cultivadas en el sur de la provincia de Alicante, se llevaron a cabo inoculaciones de plántulas de diferentes especies hortícolas, mediante la inmersión de sus raíces en una suspensión de esporas de cada aislado, ajustada a una concentración de  $10^6$  conidias/ml. Las plántulas inoculadas se mantuvieron en invernadero 5/6 semanas, evaluándolas periódicamente y al final de las experiencias según la sintomatología y varios parámetros indicativos del desarrollo de las plantas.

Un primer estudio trató de establecer el rango de hospedantes, en relación con especies cultivadas que pueden formar parte de las rotaciones tradicionales en la zona (sandía, melón, haba, pimiento, tomate, berenjena, coliflor y la propia patata). Se llevó a cabo con 4 aislados de *V. dahliae* y 4 repeticiones por aislado y especie vegetal. Los resultados mostraron que: Coliflor, pimiento y tomate no exhiben síntomas y no pudo ser detectado el hongo en los aislamientos realizados. En haba y melón tampoco se observaron síntomas claros, aunque sí se aisló *V. dahliae* en las plantas inoculadas. Patata, sandía y berenjena sí mostraron los síntomas típicos de verticilosis, siendo más patentes en las dos últimas especies, y reaislándose el patógeno en ellas.

El objetivo del segundo estudio fue el explorar las posibles diferencias de agresividad entre aislados, en relación con 4 especies hortícolas: patata (cultivo del que se aisló), sandía y berenjena (las dos especies que anteriormente se mostraron más susceptibles al hongo) y alcachofa, cultivo tradicional que desde hace algunos años está sufriendo graves problemas de verticilosis. Se realizaron las inoculaciones con 12 aislados de *V. dahliae* y 10 repeticiones por aislado y especie vegetal. Todos los aislados estudiados indujeron síntomas en las 4 especies inoculadas, y la mayoría de ellos también afectaron al desarrollo de las plantas. Además, se observaron diferencias en el comportamiento entre los aislados en relación con su agresividad, que en algunos casos varió en función del hospedante infectado.

Estos resultados tienen gran relevancia desde el punto de vista del manejo práctico de la verticilosis en esta zona, ya que son habituales las rotaciones de patata con las especies que se han mostrado muy sensibles (alcachofa, sandía y berenjena), y debería reconsiderarse su idoneidad con el fin de evitar el riesgo creciente que supone su cultivo continuado.



**H-152****ANÁLISIS MOLECULAR DE GENES DE *Penicillium digitatum* IMPLICADOS EN LA RESISTENCIA A FUNGICIDAS****SÁNCHEZ-TORRES, P., TUSET, J.J.**

*Laboratorio de Micología, Departamento de Protección Vegetal y Biotecnología, Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA), Ctra Moncada-Náquera Km 4,5, 46113 Valencia. E-mail: palomas@ivia.es*

*Penicillium digitatum* es el principal agente patógeno de herida causante de la podredumbre verde en los frutos cítricos durante la post-cosecha. El uso de forma continuada de determinados fungicidas ha derivado en el desarrollo de resistencias a los mismos, lo que conlleva la ineficacia de los sistemas de control. La idea más extendida para explicar la resistencia a los fungicidas es la presencia de transportadores ABC y los MFS, que proporcionan un amplio rango de protección frente a productos tóxicos, incluyendo compuestos de defensa de la planta y por ello pueden actuar también como factores de virulencia.

En nuestro grupo se dispone de un gran número de aislados de *P. digitatum* con diferente sensibilidad frente a distintos fungicidas. Se ha iniciado la caracterización molecular del gen *CYP51* y estudios preliminares han permitido observar que no siempre existe una correlación directa entre el número de repeticiones de la secuencia de 126 pb y la adquisición de resistencia a DMIs, como describen Hamamoto y col. (2001). Diferentes aislados de *P. digitatum* resistentes a los distintos fungicidas presentaron una única copia (indicativo de sensibilidad) de esta secuencia en la región promotora. Estos resultados nos inducen a pensar que existen otros genes implicados en el mecanismo de resistencia y que los genes estudiados hasta la fecha son responsables de algunas de las resistencias descritas pero no constituyen el mecanismo exclusivo de las mismas. Además se han caracterizado los genes *PMR1* y *PMR5* de *P. digitatum*, que codifican transportadores ABC, en aislados sensibles y resistentes. Se ha realizado la comparación de las regiones tanto promotoras como estructurales de cada uno de los genes mediante RFLPs, evidenciando la no existencia de diferencias atribuibles a los distintos niveles de resistencia o sensibilidad. Así mismo, se está llevando a cabo el estudio de las diferencias de expresión entre los distintos genes en los diferentes aislados con el fin de profundizar en el mecanismo de resistencia y contribuir en el diseño de nuevas estrategias de control.

**H-153****ANÁLISIS COMPARATIVO DE LA SENSIBILIDAD AL OÍDIO (*Microsphaera alphitoides*) EN HOJAS DE DIFERENTES CLONES DE *Quercus robur*. ESTUDIO MACRO Y MICROSCÓPICO****VÁZQUEZ-RUIZ DE OCENDA, R. A.<sup>1</sup>, IGLESIAS-DÍAZ, I.<sup>2</sup>**<sup>1</sup>Departamento de Botánica, E-mail: bvocenda@lugo.usc.es<sup>2</sup>Departamento de Producción Vexetal, E-mail: beligiaz@lugo.usc.es

Escola Politécnica Superior, Universidade de Santiago de Compostela, Campus de Lugo, 27002 Lugo.

La importancia de seleccionar clones de *Quercus robur* L. poco sensibles al oídio (*Microsphaera alphitoides* Griphon & Maublanc) viene determinada por el hecho de que en plantaciones monoculturales o en situaciones como las que se dan en los viveros, el hongo se propaga con gran facilidad. Por otro lado, la enfermedad merma considerablemente la calidad de las plantas utilizadas con fines ornamentales. Los tratamientos químicos a base de azufre son eficaces pero presentan el inconveniente de que pueden resultar costosos y afectar tanto a la flora fúngica foliar como a la del suelo, con los problemas que de ello se derivan para el establecimiento de micorrizas.

Se partió de una plantación experimental en campo de 100 clones de *Q. robur*, para la selección como planta ornamental de aquellos con un porte fastigiado y mayor resistencia al oídio. A lo largo de 5 años se ha valorado en campo el progreso en el grado de intensidad y severidad de ataque durante la estación de crecimiento. Por sus diferencias en cuanto a sensibilidad y porte, fueron seleccionados 13 clones a los que se añadió un cultivar con hábito fastigiado procedente de Holanda (*Q. robur* Fastigiata Koster) y un roble adulto localizado en un bosque en las inmediaciones de la plantación.

En laboratorio se llevó a cabo un estudio detallado de estos 15 clones con respecto a algunos aspectos anatómicos de la superficie foliar relacionados con procesos de resistencia (índice estomático y densidad de tricomas) mediante preparaciones al microscopio óptico. Asimismo, se llevó a cabo en ellos un análisis comparativo de la población fúngica foliar con el fin de poner de manifiesto posibles interacciones que pudiesen establecer cierto control biológico. Finalmente, en el último año de seguimiento, mediante microscopía electrónica de barrido (SEM) se han intentado establecer diferencias ultraestructurales en cuanto a densidad y distribución de las ceras en las superficies foliares de los 6 clones considerados más representativos: 2 muy sensibles y 2 poco sensibles de la plantación, *Q. robur* adulto y *Q. robur* Fastigiata Koster.

Los análisis muestran diferencias significativas en cuanto a los índices estomáticos y de densidad de tricomas. También muestran variaciones en cuanto a las poblaciones fúngicas foliares. Sin embargo, las imágenes obtenidas al SEM no permiten apreciar grandes diferencias entre los clones seleccionados.

**H-154****ESTUDIO DE LA MICOFLORA EPIFITA DEL FOLLAJE DE PLANTAS DE KIWI (*Actinidia deliciosa*) AFECTADAS POR *Phomopsis* sp.****VÁZQUEZ-RUIZ DE OCENDA, R.A.<sup>1</sup>, LASTRA, B.<sup>2</sup>, GALLEGRO, P.P.<sup>3</sup>**<sup>1</sup> Departamento de Botánica, E-mail: bvocenda@lugo.usc.es<sup>2</sup> Departamento de Producción Vexetal, Escola Politécnica Superior, Universidade de Santiago de Compostela, Campus de Lugo, 27002 Lugo. E-mail: bvlastra@usc.es<sup>3</sup> Departamento de Fisiología y Biotecnología Vegetal, Facultad de Biología Universidad de Vigo, 36200 Vigo (Pontevedra). E-mail: pgallego@uvigo.es

Los organismos habitantes de la superficie foliar tienen una profunda influencia en el desarrollo de los procesos de infección de las plantas huésped y, en muchos casos, pueden estar también involucrados en procesos de control. Por ello, el estudio de la flora fúngica epifita sobre hojas de plantas de kiwi (*Actinidia deliciosa* Liang & Ferguson) nos permite poner de manifiesto la presencia de hongos patógenos y no patógenos en estas superficies y analizar sus posibles consecuencias en el transcurso del cultivo.

Para este estudio se seleccionaron plantas de kiwi localizadas en una plantación ya adulta de O Rosal (Pontevedra, España) y en las que se había detectado en ensayos previos la presencia de *Phomopsis* sp. Los muestreos se llevaron a cabo en 3 épocas del año, coincidiendo con las etapas clave del cultivo: floración (mayo-junio); cuajado (julio) y fructificación (septiembre- noviembre). Estos muestreos se repitieron durante dos años consecutivos (2004 y 2005).

*Phomopsis* apareció en todos los muestreos de 2004 mientras que sólo pudo ser aislado en 2005 durante el cuajado. Presentes en todos los muestreos han estado: *Alternaria*, *Botrytis*, *Cladosporium* y *Fusarium*. De ellos sólo *Botrytis* ha sido descrito como un patógeno en kiwi que puede afectar tanto a la producción (por atacar a las flores durante la floración) como a la conservación (al inducir y/o acelerar procesos de pudrición durante el almacenamiento).

Entre los hongos aislados con mayor frecuencia se encuentran: *Epicoccum*, *Ulocladium* y *Stemphylium*. Los dos primeros han sido descritos como controladores biológicos de *Botrytis* y podrían estar relacionados con la ausencia de *Phomopsis* durante la floración de 2005 (no se detectaron durante la floración de 2004, en que sí aparece *Phomopsis*).

Finalmente, otros hongos aislados en distintos muestreos fueron: *Acremoniella*, *Arthrinium*, *Aspergillus*, *Aureobasidium*, *Chaetomium*, *Dreschlera*, *Gliocladium*, *Gloeosporium*, *Mucor*, *Penicillium*, *Pestalotiopsis*, *Phialophora*, *Phoma*, *Torula* y *Trichoderma*, los cuales conforman la biodiversidad fúngica foliar del kiwi y cuyo papel e importancia no ha sido todavía definido.

**H-155****DINÁMICA DE SUPERVIVENCIA DE *Phaeomoniella chlamydospora* EN SUELO: INFLUENCIA DE LAS VARIABLES HUMEDAD Y TEMPERATURA****GAFORIO, L., TELLO, M.L.**

*Instituto Madrileño de Investigación y Desarrollo Rural, Agrario y Alimentario (IMIDRA), Finca "El Encín", Autovía A-2, Km 38,2, 28800 Alcalá de Henares (Madrid). E-mail: marisa.tello@madrid.org*

El hongo *Phaeomoniella chlamydospora* (Pch) está asociado tanto a la yesca como a la enfermedad de Petri en vid. Para desarrollar estrategias de control de este patógeno es necesario estudiar sus posibles formas de dispersión, contemplándose el suelo como una de ellas. En este estudio se analizó la supervivencia de Pch en un sustrato homogéneo durante 12 meses, en distintas condiciones de humedad: 10, 25 y 100% de la capacidad de campo (Cc); y de temperatura: 10, 25 y 30 °C. Los niveles de ambas variables se fijaron teniendo en cuenta los valores óptimos de desarrollo fúngico así como valores que, pudiendo darse en condiciones naturales, pudieran ser limitantes para el mismo. El sustrato, esterilizado e inoculado con una suspensión de conidias, se mantuvo en placas Petri selladas. La evolución del hongo se midió mediante el recuento de las unidades formadoras de colonia (ufc) recuperadas semanalmente, durante los dos primeros meses, y mensualmente durante el resto del experimento.

La tendencia media a lo largo del ensayo mostró que los sustratos mantenidos al 100% Cc dieron lugar a una mayor cantidad de ufc que los del 50 y 10% Cc. La temperatura que más favoreció el desarrollo fúngico fue 25 °C, coincidiendo con el óptimo de crecimiento micelial en medio de cultivo, seguida de 10 °C, tratamientos en los cuales, la cantidad de conidias recuperadas al final del ensayo superó a las inicialmente inoculadas. Doce meses después de la inoculación, el nivel de conidias recuperadas en todos los tratamientos se mantuvo por encima de  $10^5$  conidias por gramo de suelo seco, excepto en los tratamientos 30 °C-25%Cc y 30 °C-10%Cc, en los que este nivel descendió por debajo de  $10^5$  y  $10^4$  conidias, respectivamente. La mayor concentración de UFC se registró en el tratamiento 25 °C-100%Cc, 29 semanas después de la inoculación, superando la concentración de  $10^9$  conidias por gramo de suelo.

Estos datos muestran que, en ausencia de otra microflora, Pch es capaz de persistir en un sustrato durante un tiempo equivalente al menos a una campaña de cultivo de la vid o a un ciclo de propagación de material vegetal en vivero, manteniéndose al final de ese periodo en concentraciones considerables de inóculo. Por ello, el suelo puede ser un elemento importante a tener en cuenta en el desarrollo de estas enfermedades.

**H-156****EL GEN *fost12* DE *Fusarium oxysporum* ES UN FACTOR DE PATOGENICIDAD REGULADO POR pH**

**GARCÍA-SÁNCHEZ, M.A., RAMOS, B., MARTÍN-RODRÍGUES, N., DE VEGA, J.J., ESLAVA, A.P., DÍAZ-MÍNGUEZ, J.M.**

*Area de Genética, Centro Hispano-Luso de Investigaciones Agrarias (CIALE), Universidad de Salamanca, 37007 Salamanca. Teléfono y Fax: 923 294663. E-mail: josediaz@usal.es*

*Fusarium oxysporum* Schlechtend: Fr. es un hongo ubicuo del suelo de considerable importancia agrícola por su capacidad para causar enfermedades vasculares y podredumbres de raíz en un rango muy amplio de plantas cultivadas. Durante el proceso de infección el hábitat de los patógenos facultativos cambia drásticamente. Este cambio de medio debe de ser detectado por el hongo con el fin de activar los genes que gobiernan los procesos necesarios para el comienzo de la infección. En eucariotas algunos de los principales canales de transducción de señales extracelulares son aquellos en los que interviene una familia de serín-treonín quinasas denominadas MAP quinasas (MAPK). En hongos se han encontrado varias cascadas de transducción sensorial, en las que intervienen MAPK, que regulan las respuestas de genes implicados en apareamiento, crecimiento filamentosos y respuesta a stress osmótico. Dos elementos fundamentales de estas rutas de transducción sensorial son las proteínas Ste20, una quinasa activada por p21 (PAK) que actuaría en el inicio de la transducción, y la proteína Ste12, que es el factor de transcripción principal que se une al elemento de respuesta a señales extracelulares presente en el promotor de buena parte de los genes de respuesta.

Hemos aislado y clonado los genes homólogos de *F. oxysporum*, denominados *fost20* y *fost12*, y obtenido los mutantes defectivos correspondientes mediante interrupción génica. Estos mutantes no presentan alteraciones en crecimiento o conidiación *in vitro*. Los resultados de los ensayos de patogenicidad, realizados en plantas de judía, muestran que los mutantes interrumpidos en *fost20* no presentan alteraciones en su capacidad infectiva; sin embargo, los mutantes interrumpidos en *fost12* muestran una capacidad claramente menor que el tipo silvestre. La expresión de ambos genes está regulada por pH, mostrando cambios que también dependen de las condiciones de ayuno de nitrógeno y glucosa. Asimismo, se ha analizado mediante PCR cuantitativa la expresión de ambos genes *in planta* durante estadios tempranos de la infección.

## V-1

**INCIDENCIA Y TRANSMISIÓN DE *Potyvirus* EN SEMILLAS DE JUDÍA DE LA INDICACIÓN GEOGRÁFICA PROTEGIDA “ALUBIA DE LA BAÑEZA-LEÓN”****CAMPELO, M.P.<sup>1</sup>, REINOSO, B.<sup>2</sup>, GONZÁLEZ, A.J.<sup>3</sup>**<sup>1</sup>Laboratorio de Diagnóstico, Fundación Chicarro-Canseco-Banciella, E.S.T.I. Agraria, Universidad de León, Avda. de Portugal, 41, 24071 León.<sup>2</sup>Departamento de Ingeniería Agraria, E.S.T.I. Agraria. Universidad de León, Avda. de Portugal 41, 24071 León.<sup>3</sup>Servicio Regional de Investigación y Desarrollo Agroalimentario (SERIDA, Ctra. de Oviedo, s/n, 33300 Villaviciosa (Asturias).

La alubia (*Phaseolus vulgaris* L.), leguminosa grano tradicional en los regadíos leoneses, fue reconocida en el año 2005 mediante la Indicación Geográfica Protegida (I.G.P.) “Alubia de La Bañeza-León”, figura de calidad que protege cuatro de las variedades locales más apreciadas: Riñón menudo, Canela, Pinta y Plancheta. Uno de los principales problemas sanitarios en este cultivo es la incidencia de virus, citándose como los más importantes el *mosaico común* (BCMV), detectado en campo en estudios previos realizados en las tres primeras variedades mencionadas, y el *mosaico común necrótico* (BCMNV). En este trabajo se presentan los resultados de los análisis realizados para conocer la incidencia de *Potyvirus* en los lotes de semilla de siembra de la mencionada I.G.P., así como la pérdida de rendimiento en plantas infectadas por BCMV. Los análisis se realizaron mediante ELISA-Indirecto con anticuerpos monoclonales anti-poty sobre muestras de 100 semillas de cada uno de los lotes de las campañas 2004 y 2005: cuatro de Riñón menudo, tres de Canela, cuatro de Pinta y uno de Planchada. De los resultados cabe destacar el hecho de que ninguna de las 400 alubias de Riñón menudo dio resultado positivo en el análisis llevado a cabo, detectándose infección viral en el resto de los lotes, con un máximo del 28% en uno de la variedad Pinta. Los cuatro lotes del año 2005 se analizaron simultáneamente utilizando además anticuerpos monoclonales anti-BCMV, constatándose que los 41 positivos para *Potyvirus* de los dos lotes infectados lo eran también para BCMV. Por lo tanto, en la serie en estudio no se ha detectado la presencia de BCMNV a pesar de que en campo se observan síntomas que se suelen atribuir a este virus. De forma complementaria, se tomaron de cada uno de estos lotes, uno de la variedad Pinta y el otro de la Canela, cinco plantas infectadas y cinco sanas que fueron mantenidas en invernadero y testadas periódicamente hasta el momento de la cosecha; la comparación de parámetros de rendimiento mostró en ambos casos una reducción que llegó hasta el 40% y el análisis serológico de toda la descendencia de las plantas viróticas permitió aproximar al 30% el porcentaje de transmisión de virus por semilla en estas variedades.

**V-2****OBTENCIÓN DE PLANTAS LIBRES DE VIRUS DE LA VARIEDAD DE UVA DE MESA DON MARIANO MEDIANTE EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA**

**DABAUZA, M., GARCÍA DE ROSA, B., LÓPEZ-PÉREZ A.J., HITA, I., PADILLA, C., PADILLA, V.**

*Instituto Murciano de Investigación y Desarrollo Agrario y Alimentario (IMIDA), c/ Mayor s/n, 30150 La Alberca (Murcia). E-mail: mercedes.dabauza@carm.es*

La vid (*Vitis vinifera* L.) es uno de los cultivos de mayor importancia económica en España. Este cultivo tiene un número considerable de patógenos que pueden ocasionar graves pérdidas de rendimiento y calidad de la cosecha. Entre ellos existe un grupo, en el que se incluyen virus, viroides y fitoplasmas, que resultan imposibles de eliminar mediante tratamientos convencionales, teniendo que solucionar el problema merced a procesos como son la selección clonal-sanitaria, lucha contra los vectores transmisores, termoterapia, quimioterapia, o incluso mediante biotecnología a través del cultivo *in vitro* de meristemos o de extremos apicales fragmentados, del microinjerto o de la regeneración de plantas mediante embriogénesis somática. La obtención de plantas sanas es de gran interés para el mantenimiento de los recursos fitogenéticos locales que, al estar contaminados por virus, no son utilizados por los agricultores ni se incluyen, generalmente, en los programas de mejora genética.

En el presente estudio nos hemos centrado principalmente en el saneamiento frente al virus del enrollado de la vid (GLRaV), de una variedad de uva de mesa de gran calidad y autóctona de la Región de Murcia, como es Don Mariano. Siguiendo el protocolo desarrollado en nuestro laboratorio, se han regenerado plantas mediante embriogénesis somática, a partir de callos embriogénicos obtenidos de anteras y ovarios inmaduros procedentes de plantas infectadas con el GLRaV. El análisis mediante el test ELISA para detectar la presencia de los tipos 1, 2 y 3 del virus del enrollado reveló que una planta, de las 47 plantas analizadas, estaba infectada con el serotipo 1, otra estaba infectada con los serotipos 1 y 3, y 26 con el serotipo 3. En 19 plantas no se detectó ninguno de éstos dos serotipos y en ninguna de las 47 se detectó el serotipo 2. Las plantas que han dado resultados negativos se han trasplantado a campo y se irán realizando seguimientos tanto mediante el test ELISA como mediante RT-PCR haciendo también injertos sobre Cabernet Sauvignon para detectar y comprobar la ausencia del virus del enrollado, GLRaV.

**V-3****SELECCIÓN CLONAL-SANITARIA DEL CULTIVAR DE UVA PARA TRANSFORMACION MONASTRELL. EVALUACIÓN AGRONÓMICA Y ENOLÓGICA**

**PADILLA, V.<sup>1</sup>, MARTINEZ, A.<sup>1</sup>, HITA, I.<sup>1</sup>, GARCÍA DE ROSA, B.<sup>1</sup>, PADILLA, C.<sup>1</sup>, FERNÁNDEZ, J.I.<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>IMIDA, 30150 La Alberca (Murcia).

<sup>2</sup>Estación Enológica de Jumilla, 30250 Jumilla (Murcia).

Después de un preámbulo en el que se hace una sucinta historia de la preselección clonal del cv. Monastrell, nos referimos al diagnóstico sanitario al que fueron sometidos las posibles cabezas de clon y estudio posterior de las características agronómicas y enológicas.

Tras ser analizados frente a virosis (*entrenudo corto infeccioso, enrollado y jaspeado*), quedaron 16 clones que una vez sometidos a los citados controles agronómicos y enológicos se redujeron a 8, que constituye la actual disponibilidad de material inicial a partir del cual se configurará la certificación de dicho material vegetal, conforme a lo establecido en el Reglamento técnico de control y certificación de plantas de vivero de vid (RD 208/2003 de 21 de febrero).



**V-4****EXPANSIÓN DE LAS INFECCIONES POR *Tomato chlorosis virus* (ToCV) EN PIMIENTO EN EL SUR DE ESPAÑA****FORTES, I.M., MORIONES, E., NAVAS-CASTILLO, J.**

*Estación Experimental "La Mayora", CSIC, 29750 Algarrobo-Costa (Málaga). E-mail: jnavas@eelm.csic.es*

En 1999 se encontraron plantas de pimiento (*Capsicum annuum* L.) infectadas de forma natural por el crinivirus (género *Crinivirus*, familia *Closteroviridae*) del amarilleo del tomate (*Tomato chlorosis virus*, ToCV) en invernaderos de la provincia de Almería. Estas plantas mostraban síntomas de amarilleo internervial y deformación de hojas así como reducción en el porte. Las infecciones se confirmaron mediante clonaje y secuenciación de la región del genoma viral correspondiente al gen Hsp70h. Esta fue la primera descripción del pimiento como huésped natural de ToCV [Lozano *et al.*, Plant Disease 88:224 (2004)]. En regiones donde los cultivos de pimiento coexisten con los de tomate, la presencia de este nuevo huésped podría tener consecuencias epidemiológicas considerables. Por otra parte, se desconoce la relación precisa entre la infección viral y la sintomatología observada en las plantas de campo muestreadas.

En 2005, se observaron plantas de pimiento cultivadas al aire libre en la provincia de Málaga con síntomas de "amarilleo". El análisis de estas plantas mediante hibridación molecular utilizando una sonda correspondiente al gen de la proteína de la cápsida de ToCV, así como experimentos de RT-PCR y secuenciación, pusieron de manifiesto que estaban infectadas por este virus, confirmando los indicios de que las infecciones de pimiento no se encontraban limitadas a la provincia de Almería. En esta comunicación se presentan los datos disponibles sobre incidencia de las infecciones por ToCV en cultivos de pimiento en las provincias de Almería y Málaga en 2006.

Ensayos de transmisión en laboratorio utilizando el insecto vector *Bemisia tabaci* biotipo Q, han permitido la infección experimental de 5 variedades de pimiento a partir de tomates infectados con aislados de ToCV procedentes de pimiento. El rango de eficiencia de transmisión obtenido sugiere la existencia de diferencias en la susceptibilidad de las diferentes variedades a la infección por el virus. Este sistema experimental nos permitirá determinar la asociación entre la infección por ToCV y los síntomas observados en este nuevo huésped.

## V-5

**BEGOMOVIRUS EN POBLACIONES NATURALES DE *Ipomoea indica* DE ESPAÑA E ITALIA****TRENADO, H.P., NAVAS-CASTILLO, J.**

*Estación Experimental "La Mayora", CSIC, 29750 Algarrobo-Costa (Málaga). E-mail: jnavas@eelm.csic.es*

*Ipomoea indica* es una especie de la familia *Convolvulaceae*, originaria de los países tropicales y subtropicales de América que en la actualidad está distribuida en todas las zonas de clima templado del mundo. En España, está ampliamente naturalizada por la zona costera del sur y sudeste peninsular, donde también se le da un uso ornamental. En 1999 se describió una nueva especie de begomovirus en poblaciones de *I. indica* de la costa de la provincia de Málaga, *Ipomoea yellow vein virus* (YIVV). Posteriormente, este virus se ha reclasificado como la cepa "lpo" de *Sweet potato leaf curl virus* (SPLCV), un virus que infecta a batata (*I. batatas*), una especie cultivada del mismo género. En los últimos años se han observado plantas de *I. indica* en las provincias de Almería, Granada y Málaga con síntomas virales que en algunos casos correspondían a los asociados con SPLCV-lpo, pero que también incluían otros síntomas foliares como fruncido, abullonamiento y acucharamiento. En este trabajo hemos analizado el contenido en begomovirus de plantas de *I. indica* recogidas en estas tres provincias del sur peninsular, así como en las localidades de Messina y Calabria en Sicilia (Italia). Por una parte, se llevaron a cabo experimentos de PCR utilizando por una parte iniciadores degenerados correspondientes al gen de la proteína de la cápsida diseñados para detectar los begomovirus descritos en especies del género *Ipomoea* y por otra, iniciadores capaces de amplificar la región intergénica de los genomas de los begomovirus *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV) y *Tomato yellow leaf curl Sardinia virus* (TYLCSV), dos especies causantes del rizado amarillo del tomate y ampliamente distribuidas por la zona de estudio. La secuenciación de los fragmentos de DNA amplificados por PCR indicaron la presencia de TYLCSV y SPLCV en las plantas de *I. indica* de Sicilia y de SPLCV-lpo y una nueva especie de begomovirus no descrito previamente en plantas de *I. indica* de España. Este nuevo begomovirus también ha sido detectado en plantas de batata cultivadas en la misma zona. Se discute la posible importancia epidemiológica que las infecciones por begomovirus encontradas en *I. indica* pueden tener sobre los cultivos de batata.

## V-6

**DIVERSIDAD GENÉTICA ENTRE AISLADOS DE *Cucumber vein yellowing virus* (CVYV) EN ESPAÑA**

**JANSSEN, D., MARTÍN, G., VELASCO, L., SEGUNDO, E., CANO, M., LÓPEZ, M.C., BELMONTE, A., GIL, F., CUADRADO, I.M.**

*Centro de Investigación y Formación Agraria, I.F.A.P.A., C.I.C.E. (Junta de Andalucía), Autovía del Mediterráneo, Km 420, 04745 La Mojonera (Almería). Email: dirkjanssen@telefonica.net*

En España, *Cucumber vein yellowing virus* (CVYV) (género *Ipomovirus*, familia *Potyviridae*) fue encontrado por primera vez en plantas de pepino en los invernaderos de El Ejido (Almería) durante el otoño del 2000 y posteriormente otras zonas productoras de cucurbitáceas se han visto afectadas.

Este virus tiene un genoma RNA de cadena simple con una organización genómica deducida característica de los *Potyviridae*, pero su secuencia codificante carece de la proteína componente helper/proteinasa.

El propósito del presente trabajo fue el de investigar la variabilidad genética del virus en España y determinar si una sola ó múltiples cepas están implicadas en el reciente brote epidémico. Desde el año 2001 al 2005, se tomaron muestras de CVYV procedentes de pepino de invernaderos distribuidos en las provincias de Almería y Granada. Se prepararon extracciones de RNA total y, mediante RT-PCR utilizando primers específicos, se amplificaron dos regiones genómicas: la región C (436 b), que contiene la zona conservada C-terminal del gen de la proteína de la cápsida, y la región P (447 b), que contiene parte de las zonas codificantes de la proteinasa P1 (P1-Pro) y de la proteína P3. Los productos de RT-PCR fueron clonados y secuenciados. Las secuencias nucleotídicas de todos los aislados y de cada región genómica fueron alineadas y se calcularon las distancias genéticas y la media de las sustituciones de nucleótidos no sinónimas y sinónimas. El análisis mostró una baja diversidad genética (0,0026, 0,0013 y 0,0012 para las regiones P1-Pro, P3 y CP respectivamente). Las relaciones entre sustituciones no sinónimas y sinónimas fueron de las menores encontradas entre los virus de plantas, sugiriendo que existe una presión selectiva negativa sobre las regiones analizadas. El resultado apoya la hipótesis de que la población española de CVYV podría derivar de una sola variante genética y, además, de reciente introducción.

## V-7

**PERSISTENCIA DEL VIRUS DE LA SHARKA EN *Myzus persicae*: COMPARACIÓN ENTRE TRANSMISIÓN Y DETECCIÓN EN EL VECTOR****MORENO, A., MARTÍNEZ, D., CAMBRA, M.***Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA), 46113 Moncada (Valencia). E-mail: azmoreno@ivia.es*

En la transmisión por pulgones de tipo no persistente el virus se asocia de forma no permanente al estilete del pulgón, transmitiéndose mediante un mecanismo de ingestión-salivación. La fase de latencia no es necesaria para la transmisión, siendo el periodo de retención en el vector de minutos a horas. Una única prueba del pulgón es suficiente para que la transmisión tenga lugar, complicándose la aplicación de medidas fitosanitarias para evitar o disminuir su dispersión. Uno de estos virus es *Plum pox virus* (PPV, género *Potyvirus*). PPV es el causante de la *sharka*, principal enfermedad de los frutales de hueso, tanto por su impacto agronómico como económico. Existen dos tipos principales de *sharka* según sus características biológicas, serológicas y moleculares: el tipo Dideron (D) o común, que afecta principalmente a albaricoquero y ciruelo, y el tipo Marcus (M), más agresivo en todos los huéspedes, dispersándose también en melocotonero. En este estudio se comparó la transmisión de dos aislados de PPV-D y PPV-M por *Myzus persicae* L. en *Nicotiana benthamiana* y los periodos de retención de cada uno de ellos en el vector. Además, la tasa de transmisión obtenida con cada uno de ellos se comparó con el porcentaje de pulgones en los que se pudo detectar el virus mediante PCR a tiempo real. Para ello, se realizaron ensayos de transmisión secuenciales del virus siguiendo un protocolo no persistente, en paralelo con los de su detección en el vector. Los pulgones, después de alimentarse sobre plantas infectadas con PPV durante 10 minutos, eran empleados en sucesivos pases de inoculación de 2 horas cada uno sobre plantas receptoras, entre los cuales se seleccionaban pulgones que fueron escachados en papel para la detección de dianas de PPV. Así se relacionó la transmisión obtenida en cada uno de los pases del virus con la detección lograda en los pulgones empleados en el pase de transmisión anterior. Los resultados obtenidos muestran como, a pesar de que el virus es detectado en el pulgón tras varios pases de inoculación sobre las plantas receptoras, la transmisión del PPV por pulgones sólo se logró en el primer periodo de inoculación. Además, el porcentaje de detección en el pulgón en los sucesivos pases de inoculación fue comparable. Es decir, aunque fuera posible detectar dianas virales en el vector tras las dos primeras horas de acceso sobre una planta receptora, el virus retenido en el estilete del pulgón capaz de transmitirse y de originar infección en la planta receptora fue inoculado en su totalidad a lo largo de ese periodo.

## V-8

**EPIDEMIOLOGÍA DEL VIRUS DE LA SHARKA EN VIVERO Y SUSCEPTIBILIDAD DE PATRONES DE MELOCOTONERO A LA INFECCIÓN NATURAL**

**VIDAL, E., MORENO, A., BERTOLINI, E., GORRIS, M.T., MARTÍNEZ, M.C., CAPOTE, N., CAMBRA, M.**

*Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA), 46113 Moncada (Valencia). E-mail: evidal@ivia.es*

El melocotonero es la especie frutal de mayor importancia económica en España. Los aislados del virus de la *sharka* (*Plum pox virus* - PPV) presentes, aparentemente no se dispersan entre cultivares de melocotonero. Para tratar de conocer el origen de casos positivos en este cultivo, se está estudiando la influencia de la susceptibilidad natural a la infección por PPV-D de los principales patrones empleados: Nemaguard, *Prunus marianna*, mirabolán, Garmen, Puebla de Soto (pollizo de Murcia), híbrido melocotonero x almendro GF677 y Cadaman. Datos iniciales indican la susceptibilidad de todos ellos excepto la del híbrido GF677. Uno de los períodos más importantes del ciclo de cultivo de frutales es su fase en vivero, y concretamente el período en el cual se encuentran en campo, a la espera de ser injertados con la variedad correspondiente. En esa época el patrón debe salvaguardarse de agentes patógenos que pudieran infectar la variedad injertada, entre ellos PPV que se transmite de forma no persistente por pulgones. Para valorar la reducción de la infección se están probando tratamientos con aceite. En este trabajo además, se relacionó positivamente la dinámica poblacional de pulgones presentes en viveros con la superficie de aterrizaje disponible en diferentes especies de *Prunus*. Los muestreos de pulgones se realizaron con trampas de Moericke amarillas y el método del árbol pegajoso, durante todo el período vegetativo incluido el invierno. *Aphis spiraecola* Pagenstecher seguido de *A.gossypii* Glover resultan ser las especies mayoritarias. El número de pulgones PPV-virulíferos que visitó las diferentes especies de patrones fue evaluado mediante PCR a tiempo real. El porcentaje de pulgones virulíferos es consistente con el porcentaje de infección en campo. Los análisis de plantas se realizaron conforme al protocolo OEPP (2004) para PPV: ELISA- DASi (anticuerpo monoclonal 5B-IVIA). Los resultados obtenidos se confirmaron mediante PCR a tiempo real.

## V-9

## VIROSIS EN JUDIA VERDE

**SEGUNDO, E.<sup>1</sup>, CARMONA, M.P.<sup>1</sup>, SÁEZ, E.<sup>2</sup>, ALFÉREZ, M.D.<sup>2</sup>, AGUILAR, L.<sup>2</sup>, BELMONTE, A.<sup>1</sup>, JANSSEN, D.<sup>1</sup>, CUADRADO, I.M.<sup>1</sup>,**

<sup>1</sup>CIFA, (IFAPA-CICE), La Mojonera (Almería).

<sup>2</sup>Laboratorio de Producción y Sanidad Vegetal de Almería (Consejería de Agricultura-JA). E-mail: eduardosegundo@teleline.es

En el periodo 2000-2004, se estudió la presencia de virosis en plantas de judía verde con síntomas atribuibles a virus, procedentes de 432 cultivos (en su mayoría de invernaderos) de distintas poblaciones de Almería y Granada. Adicionalmente, en los años 2002 y 2005 se hicieron muestreos al azar sobre 22 y 15 invernaderos de judía respectivamente, para estudiar la incidencia de los virus identificados hasta la fecha.

La detección se realizó mediante ELISA, inoculación mecánica en gama de huéspedes, extracción de dsRNA, y/o (RT)PCR con cebadores específicos o generales de cada virus o género que se encontró.

Como resultado del muestreo dirigido se comprobó que el 30% de plantas analizadas tenía una patología de origen vírico y el 70% restante la sintomatología se atribuyó a fitotoxicidades, o alteraciones fisiológicas, culturales, ambientales y/o genéticas.

Entre los virus identificados se encuentran los fitopatógenos: TYLCV (*Tomato yellow leaf curl virus*), TSWV (*Tomato spotted wilt virus*), BCMV (*Bean common mosaic virus*), descritos en España afectando a este cultivo y SBMV (*Southern bean mosaic virus*), BnYDV (*Bean yellow disorder virus*) y CPMMV (*Cowpea mild mottle virus*), encontrados por primera vez en España en durante el desarrollo de este trabajo. Entre las muestras que fueron positivas para el begomovirus TYLCV no se evaluó la presencia de TYLCMaIV (*Tomato yellow leaf curl Malaga virus*), especie que ha aparecido por recombinación natural con el begomovirus TYLCSV (*Tomato yellow leaf curl Sardina virus*) y que, este último, no infecta a judía.

Además se ha detectado otro virus, por RT-PCR y secuenciación, que no se ha relacionado a ninguna patogenicia, *Phaseolus vulgaris endornavirus*, que está asociado a la presencia de una banda de aprox. 20 kb de dsRNA.

Tanto los muestreos dirigidos como los realizados al azar mostraron que durante el periodo estudiado hubo un incremento de la presencia en campo de SBMV, una disminución de TYLCV, y una brusca irrupción en el año 2004 de BnYDV. La presencia de TSWV se mantuvo constante, mientras que la de BCMV y CPMMV fueron anecdóticas.

**V-10****INCIDENCIA DEL VIRUS DEL MOSAICO DE LA ALFALFA (AMV) EN SEMILLA Y CULTIVOS DE ALFALFA EN ARAGÓN****BERGUA, M., VARGAS-MAINAR, M.E., LUIS-ARTEAGA, M., ESCRIU, F.***Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria de Aragón (CITA, Apartado 727, 50080 Zaragoza. E-mail: fescriu@aragon.es*

El virus del mosaico de la alfalfa (AMV) está presente con incidencias elevadas en prácticamente todas las zonas de producción de alfalfa, su principal huésped natural. Aunque los síntomas que el virus causa en este cultivo pasan frecuentemente desapercibidos, se han descrito pérdidas de rendimiento considerables (del 10 al 60%), que en parte, podrían relacionarse con efectos indirectos de la infección, como el aumento de la susceptibilidad al frío o la reducción de la capacidad de nodulación y fijación de nitrógeno. AMV se transmite de forma no persistente por varias especies de pulgones, y también por la semilla de alfalfa, cultivo que permanece en el terreno hasta seis años. Por ello, además de las pérdidas directas en el cultivo, la infección de alfalfa por AMV puede constituir una importante fuente de inóculo y un riesgo potencial para otros cultivos que coexisten con la alfalfa, como muchos horticolas (tomate, pimiento, borraja, etc.) en los que el virus también puede tener efectos graves, tanto en el rendimiento como en la calidad y valor económico del producto cosechado.

Se está analizando la incidencia de AMV en cultivos de alfalfa de Aragón, comunidad en la que se obtiene casi el 50% de la producción española. Los muestreos se realizan de forma sistemática en parcelas que representan alfalfares de 1 a 5 años de edad desde la implantación, situadas en cinco zonas de cultivo distintas. Los resultados indican porcentajes de infección muy elevados, que dependen de la edad del alfalfar (cerca del 100% en parcelas de 5 años) y de la zona de cultivo, y siempre son superiores a lo estimado por observación visual de síntomas. La incidencia aumenta claramente con la edad del alfalfar a un ritmo que no difiere en las distintas zonas de cultivo, lo que sugiere que las diferencias de incidencia entre zonas están determinadas por la tasa de infección inicial de la semilla. También se ha estimado la tasa de infección de lotes de semilla comercial de distintos orígenes, obteniéndose porcentajes que varían entre el 0,6% y el 4,2%. Durante los muestreos también se ha detectado infección por AMV en cultivos de tomate y haba situados en zonas de producción de alfalfa.

## V-11

**CARACTERÍSTICAS MOLECULARES, INCIDENCIA Y TRANSMISIÓN DE EFV1, UN TOTIVIRUS QUE INFECTA AL HONGO ENDOFÍTICO *Epichloë festucae*****ROMO, M.<sup>1</sup>, LEUCHTMANN, A.<sup>2</sup>, GARCÍA, B.<sup>1</sup>, ZABALGOGEAZCOA, I.<sup>1</sup>**<sup>1</sup>*Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología, CSIC, Apartado 257, 37071 Salamanca.*<sup>2</sup>*Plant Ecological Genetics, Institute of Integrative Biology, ETH Zürich, Universitätsstrasse 16, 8092 Zürich, Switzerland.*

*Epichloë festucae* es un ascomiceto endofítico que infecta sistémicamente los órganos aéreos de la gramínea *Festuca rubra*. Las plantas infectadas no muestran síntomas, pero sí un aumento de la resistencia a herbívoros y otros beneficios. En poblaciones naturales de *F. rubra*, cerca del 70% de las plantas están infectadas por el endofito. Al mismo tiempo, en el 76% de los aislados de *E. festucae*, se han detectado dos moléculas de RNA bicatenario (dsRNA) de 5 y 3 kbp cuya presencia no induce ningún síntoma obvio en los hongos. El dsRNA de mayor tamaño es el genoma de un virus de la familia *Totiviridae* llamado *Epichloë festucae virus 1* (EfV1). EfV1 posee un genoma de 5053 nt que contiene dos fases de lectura (ORF) solapadas y desplazadas en su marco de lectura (-1). ORF1 codifica una proteína de cápsida de 765 aminoácidos y ORF2 codifica una polimerasa de RNA de 826 aminoácidos. Tanto EfV1 como el dsRNA de 3kbp se transmiten al 100% de los conidios producidos por aislados infectados, sin embargo, ninguno de estos virus se transmite a ascosporas resultantes de cruzamientos entre aislados infectados y libres de infección. En esta triple interacción la asociación planta-hongo es muy similar a la asociación hongo-virus: en ambos casos la incidencia de infección es elevada y el huésped no muestra síntomas.



**V-12****MUESTREOS PARA LA DETECCIÓN DEL VIRUS *Iris yellow spot virus* (IYSV) EN LA PROVINCIA DE ALBACETE****MUÑOZ, R.M.<sup>1</sup>, LERMA, M.L.<sup>1</sup>, JORDÁ, C.<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Servicio de Diagnóstico y Asistencia Fitosanitaria (SEDAF) del Instituto Técnico Agronómico Provincial de Albacete (ITAP), Apdo. Correos 451, 02080 Albacete. E-mail: [rmg.itap@dipualba.es](mailto:rmg.itap@dipualba.es); [mll.itap@dipualba.es](mailto:mll.itap@dipualba.es)

<sup>2</sup>Departamento de Patología Vegetal-Unidad de Virología, Universidad Politécnica de Valencia, Camino de Vera s/n, 46022 Valencia. E-mail: [mjordag@eaf.upv.es](mailto:mjordag@eaf.upv.es)

Durante el año 2005 se llevaron a cabo en parcelas cultivadas de cebolla muestreos con el objeto de detectar la presencia del virus IYSV. En el periodo comprendido entre el 1 de junio y el 5 de septiembre de 2005 se visitaron un total de 35 parcelas, cuatro de ellas en dos ocasiones. En general, de cada parcela se eligieron entre 5 y 10 plantas que fueron trasladadas al laboratorio tras anotar su situación mediante GPS.

El diagnóstico también se efectuó en 12 plantas de cebolla procedentes de consultas del Servicio de Diagnóstico y Asistencia Fitosanitaria (SEDAF) del ITAP.

El número total de plantas de cebolla analizadas fue de 343. El diagnóstico fue realizado mediante test ELISA.

De las 35 parcelas muestreadas, en 9 de ellas se detectaron plantas infectadas, mientras que las muestras de cebolla testadas de consultas del SEDAf fueron todas negativas. El porcentaje total de plantas infectadas de cebolla fue del 16%.

Según los resultados obtenidos, la época de muestreo influye en la detección del virus, obteniéndose mayor número de diagnósticos positivos en la época cercana a la recolección del cultivo.

Entre las parcelas muestreadas destaca una que presentó elevada infección precoz del virus con presencia significativa de *Thrips tabaci* adultos. Esta parcela fue trasplantada a partir de semillero y en ella los rendimientos fueron escasos.

## V-13

**ANÁLISIS CUANTITATIVO DE LA INCIDENCIA Y PROGRESIÓN DE LAS ENFERMEDADES CAUSADAS POR ToCV Y TYLCV/TYLCSV BAJO DIFERENTES CUBIERTAS DE INVERNADERO****VELASCO, L.<sup>1</sup>, SIMÓN, B.<sup>1</sup>, JANSSEN, D.<sup>2</sup>, CENIS, J.L.<sup>1</sup>**<sup>1</sup>*Departamento de Biotecnología y Protección Vegetal, Instituto Murciano de Investigación y Desarrollo Agrario y alimentario (IMIDA), c/ Mayor s/n, 30150 La Alberca (Murcia).*<sup>2</sup>*CIFA Almería (IFAPA, CICE, Junta de Andalucía), Autovía del Mediterráneo, Km 420, 04745 La Mojonera (Almería).*

Las epidemias en tomate causadas por ToCV y TYLCSV/TYLCSV transmitidos por mosca blanca comienzan en el sureste español en los años 90. Durante el año 2003 se realizó una prospección en 40 invernaderos diferentes, mallas y estructuras mixtas con objeto de establecer una relación entre la incidencia de la enfermedad y la calidad de las cubiertas de los mismos. En estos invernaderos comerciales las variedades de tomate cultivadas fueron mayoritariamente tolerantes a TYLCD. Las diferentes estructuras de invernaderos y mallas o combinaciones de los mismos se clasificaron en cinco tipos de acuerdo con diferentes criterios de protección frente a la entrada de insectos. La evaluación de la incidencia de ambas patologías se realizó combinando la inspección visual de los síntomas junto con hibridaciones moleculares con sondas específicas no radiactivas.

En el caso de ToCD, la incidencia se correlacionó con la calidad de las cubiertas del invernadero, existiendo diferencias significativas entre los distintos tipos de estructura. Sin embargo, la incidencia en el caso de TYLCD resultó significativamente menor únicamente en los invernaderos de máxima calidad, mientras que en los demás tipos de estructuras las incidencias eran estadísticamente equivalentes. La incidencia de TYLCD en los tomates tolerantes fue inferior al 100% durante los cinco meses de duración del muestreo, a pesar de que la tasa de progreso en la etapa inicial del cultivo era más alta en comparación con ToCD, la cual alcanzó eventualmente una incidencia del 100% en muchos invernaderos. De acuerdo con el análisis de regresión, los modelos monomolecular y Gompertz describieron adecuadamente el progreso de ToCD y TYLCD, respectivamente, en la mayor parte de los invernaderos. La incidencia de ToCD correlacionaba con los niveles de los insectos vectores observados en los invernaderos, mientras que no lo era en el caso de TYLCD, debido a que los tratamientos con insecticidas desvirtúan el seguimiento de la presencia del vector en cultivos comerciales.

**V-14****VIRUS QUE AFECTAN CULTIVOS DE CUCURBITÁCEAS EN LA COMUNIDAD VALENCIANA****JUÁREZ, M., MARTÍNEZ, J.A., LEGUA, P.**

*Escuela Politécnica Superior de Orihuela, Universidad Miguel Hernández de Elche, Ctra. de Beniel, Km 3,2, 03312 Orihuela (Alicante). E-mail: miguel.juarez@umh.es*

En la Comunidad Valenciana existen varias comarcas donde tradicionalmente se han cultivado cucurbitáceas, destacando en la actualidad los cultivos de sandía y melón. Con el objetivo de detectar virus de cucurbitáceas y determinar su incidencia e importancia relativa, hemos llevado a cabo muestreos en cultivos de cucurbitáceas de varias comarcas hortícolas (El Baix Maestrat, La Plana Alta, El Camp de Túria, La Ribera Alta, La Rivera Baixa, L'Horta Nord, L'Horta Sud, La Vall D'Albaida, Camp D'Elx, Vega Baja del Segura y Pilar de la Horadada) durante la campaña 2005. Las muestras se analizaron para detectar la presencia del virus del falso amarilleo de la remolacha (BPYV), el virus del amarilleo de las cucurbitáceas transmitido por pulgones (CABYV), el virus del mosaico del pepino (CMV), el virus del amarilleo de las venas del pepino (CVYV), el virus del amarilleo y enanismo de las cucurbitáceas (CYSDV), el virus de las manchas anulares de la papaya (PRSV), el virus del mosaico de la sandía (WMV), el virus del mosaico amarillo del calabacín (ZYMV) y el virus de las manchas necróticas del melón (MNSV). Se recogieron de entre 53 parcelas de cultivo, 276 muestras de sandía, 254 de melón, 52 de calabaza, 44 de pepino y 18 de calabacín. Los virus que han prevalecido en este muestreo fueron CABYV para las muestras que presentaban síntomas de amarilleos, y WMV para aquellas con síntomas de mosaicos. También se determinó una incidencia elevada de infecciones mixtas.

## V-15

**RELACIÓN ENTRE LAS DINÁMICAS DE LA INCIDENCIA DE VIRUS TRANSMITIDOS POR PULGONES, Y DE LAS POBLACIONES DE VECTORES, EN CULTIVOS Y EN FLORA ARVENSE**

**PULIDO, L.<sup>1</sup>, DE MENTHEM, N.<sup>1</sup>, VIÑUELA, E.<sup>2</sup>, DEL MONTE, J.P.<sup>2</sup>, GARCÍA-ARENAL, F.<sup>1</sup>, FRAILE, A.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>*Departamento de Biotecnología*

<sup>2</sup>*Departamento de Producción Vegetal, Botánica y Protección Vegetal, E.T.S.I. Agrónomos, Universidad Politécnica de Madrid, Av. Complutense s/n, 28040 Madrid.*

La disminución del inóculo primario mediante buenas prácticas agrícolas es una estrategia común en el control de las epidemias de enfermedades virales. Sin embargo, si el cultivo no está aislado de otros hábitats y se trata de virus con múltiples huéspedes, las infecciones fuera del cultivo deben considerarse en esta estrategia. Por ello la dinámica de las epidemias en huéspedes externos al cultivo puede determinar el flujo de inóculo al mismo. En virus que se transmiten por pulgones, los vuelos de estos entre las poblaciones de los distintos huéspedes, condicionarán los flujos de inóculo. A pesar de la importancia de este aspecto de la epidemiología de las virosis, pocos estudios consideran simultáneamente las dinámicas poblacionales de virus y vectores.

Se ha estudiado la evolución de las epidemias causadas por virus transmitidos por pulgones en el principal cultivo hortícola de la vega del Tajo-Tajuña, el melón. El estudio se ha centrado en virus de los géneros *Cucumovirus* y *Potyvirus* que son los más importantes para el cultivo de melón en esta zona, y se ha desarrollado durante tres ciclos de cultivo. La variación de la incidencia de los virus se ha seguido tanto en melonares como en la flora arvense de hábitats con distinto grado de intervención humana dentro de la zona, durante y entre las estaciones de cultivo. Además, se ha determinado la dinámica de las especies de pulgones presentes en el cultivo y en la flora arvense mediante captura de alados con trampas tipo Irwin, y mediante conteo de colonias de formas ápteras. El análisis de estos datos nos ha permitido estudiar la relación entre las dinámicas de las virosis en el melonar y los vuelos de los pulgones vectores. La dinámica de la infección viral en la flora arvense no permite identificar especies principales que sean reservorio y fuente de inóculo para los melonares. Los vuelos de pulgones durante el verano se relacionan con el aumento de la incidencia de virus en el cultivo del melón y en las malas hierbas del melonar, que podrían ser reservorios de inóculo para la siguiente estación. Sin embargo, los picos de vuelo de pulgones hacia el melonar al principio de la época de cultivo se relacionan con el inicio de las epidemias. El conjunto de los datos sugiere que las fuentes de inóculo primario para el cultivo del melón son externas al cultivo, y no las malas hierbas internas en las que el virus se transmite por semilla o inerva en órganos vegetativos.

**V-16****TRANSMISIÓN DEL *Pepino mosaic virus* (PepMV) MEDIANTE EL HONGO VECTOR *Olpidium brassicae*****ALFARO-FERNÁNDEZ, A., CÓRDOBA, M.C., CEBRIÁN, M.C., JORDÁ, C.***Instituto Agroforestal Mediterráneo (IAM), Universidad Politécnica de Valencia, Camino de Vera s/n, 46022 Valencia. E-mail: mjordag@eaf.upv.es*

Se demostró la transmisión del *Pepino mosaic virus* (PepMV) por el hongo vector *O. brassicae* mediante ensayo de infectividad y análisis mediante técnicas moleculares (RT-PCR) y serológicas de raíces y hojas de plántulas de tomate 45 días después de la inoculación. Se emplearon dos cultivos masales de *O. brassicae*, uno procedente de lechuga recolectado en Benicarló (Castellón) y otro procedente de Murcia de cultivo de tomate, con cuyos lixiviados se regaron plantas de tomate sanas e infectadas con PepMV. El mismo número de plantas sanas e infectadas se regó con agua estéril. Con los lixiviados de cada una de estas plantas se regaron plantas de tomate sanas crecidas sobre sustrato estéril. Solo se logró transmitir el PepMV mediante el riego inoculativo con el cultivo de *O. brassicae* procedente de Murcia, obteniéndose una tasa de transmisión de éste virus del 8%. Ninguna planta regada con el lixiviado procedente de plantas infectadas con PepMV y regadas con agua estéril resultó infectada con el virus, demostrando así que el vector es capaz de transmitir el PepMV.

**V-17****AVANCES EN EL ESTUDIO DE LA VARIABILIDAD PRESENTADA POR AISLADOS DEL VIRUS DE LAS MANCHAS NECRÓTICAS DEL MELÓN (MNSV) EN ESPAÑA Y CENTROAMÉRICA****HERRERA, J.A., CEBRIÁN, M.C., JORDÁ, C.**

*Instituto Agroforestal Mediterráneo (IAM), Universidad Politécnica de Valencia, Camino de Vera s/n, 46022 (Valencia). E-mail: mjordag@eaf.upv.es*

El virus de las manchas necróticas del melón (*Melon necrotic spot virus*, MNSV), perteneciente al género *Carmovirus* (*Tombusviridae*), se describe frecuentemente afectando a melón, pepino y sandía, tanto en invernadero como al aire libre. Este virus es transmitido por semilla, por el hongo del suelo *Opidium bornovanus*, por crisomélidos (*Diabrotica undecimpunctata undecimpunctata* y *D. balteata*) y de manera experimental es fácilmente transmisible de forma mecánica. Se tienen pocos conocimientos sobre la variabilidad que pueda presentar este virus y el alcance de su extensión. Se ha realizado un estudio de variabilidad de la población del MNSV, a partir de una colección de 20 aislados de campo procedentes de distintas áreas de producción de melón en España y Centro América (Panamá, Honduras y Guatemala), y de sandía y pepino en España, obtenida entre los años 1999 a 2006, a los cuales se añadieron 3 aislados más procedentes de semilla comercial de melón. Los análisis se realizaron mediante RT-PCR amplificando un fragmento parcial del gen de la proteína de cubierta (p42) del MNSV. Las secuencias obtenidas se analizaron filogenéticamente en orden a establecer la posible variabilidad en la zona del genoma estudiada, aspecto relevante a la hora del diseño de estrategias de control y búsqueda de resistencia para este virus.

## V-18

**HAIRPIN dsRNA COMO HERRAMIENTA PARA CONFERIR RESISTENCIA A GFLV EN LA VARIEDAD DE UVA DE MESA *CRIMSON SEEDLESS* Y EN *Nicotiana benthamiana*****DABAUZA, M., VELASCO, L.**

*Departamento de Biotecnología y Protección Vegetal, Instituto Murciano de Investigación y Desarrollo Agrario y Alimentario (IMIDA), c/ Mayor s/n, 30150 La Alberca (Murcia). E-mail: mercedes.dabauza@carm.es*

*Grapevine fanleaf nepovirus* es el causante de la enfermedad vírica más severa para la industria vitivinícola a pesar de intensos programas de control para limitar la difusión del virus. En el programa español de la selección clonal un 8% de los clones analizados son positivos para GFLV, teniendo en cuenta que se descartan muchos clones por inspección visual previa al análisis sanitario. Por tanto, la presencia de GFLV en los clones españoles está infravalorada. Por otra parte, la presencia del vector *Xiphinema index* se ha incrementado como consecuencia del aumento de la superficie fertirrigada. No existen fuentes de resistencia naturales a GFLV tanto para patrones como para variedades. Una de las estrategias de control de GFLV propuestas ha sido el empleo de la transformación genética basada en la resistencia derivada patógeno. Actualmente, la transformación de la vid con genes de GFLV, tales como el gen de la proteína de la cápsid tanto en su forma traducible como no traducible, así como el gen de la RNA polimerasa o de la proteína de movimiento, ha sido descrita en varios laboratorios; incluso se encuentra en algún caso en la fase de ensayos de campo.

En nuestro laboratorio hemos adoptado esta metodología con la intención de conferir resistencia a GFLV en un patrón de vid muy difundido en España como es el caso de Paulsen 1103 y también, a una variedad de uva de mesa (*Crimson seedless*). Para ello, se ha obtenido una construcción derivada de pHellsgate8 (Helliwell & Waterhouse, 2003): pHEgflv1103, que contiene parte del gen de la proteína de la cápside (implicado también en el movimiento viral) en forma de repetición invertida, de un aislado de GFLV. Con objeto de estudiar la capacidad de esta estrategia en conferir resistencia a GFLV, hemos empleado un huésped herbáceo de este virus como es *Nicotina benthamiana*. Tras la regeneración de plantas transformadas mediante *Agrobacterium tumefaciens* con pHEgflv1103, se han obtenido 30 líneas transgénicas en las que se ha comprobado la presencia del transgén mediante PCR y la ausencia de contaminación por *Agrobacterium*. Doce de estas líneas se han analizado mediante Southern blot para estudiar el número de copias del transgén y la estabilidad del mismo, confirmando los resultados de la PCR. Además se han transformado callos embriogénicos de *crimson seedless* con la construcción pHEgflv1103. Las plantas regeneradas están actualmente en estudio.

**V-19****EVOLUCIÓN DE LA POBLACIÓN DE *Maize dwarf mosaic virus* (MDMV)****ALONSO-DUEÑAS, N., ACHÓN, M.A.**

*Area de Protecció de Conreus, Centre UdL-IRTA, Av. Alcalde Rovira Roure 177, 25198 Lleida. E-mail: Achon@pvcf.udl.es*

*Maize dwarf mosaic virus* (MDMV) es el virus de maíz más difundido en España y es endémico en la zona del Valle del Ebro, donde presenta incidencias medias del 20%. Para poder establecer medidas de control adecuadas es necesario un estudio en profundidad de la estructura genética y evolución de la población de MDMV. Para ello se analizan mediante polimorfismos de longitud de los fragmentos de restricción (RFLPs) y secuenciación, los genes de la proteína de cubierta (CP) y del factor de transmisión (HC) de aislados recogidos durante nueve años obtenidos de maíz y, de su reservorio perenne *Sorgo halepense*. Los resultados obtenidos hasta el momento indican que la estructura de la población de MDMV en España consiste en unos pocos haplotipos mayoritarios más un juego de haplotipos que se encuentran a bajas frecuencias o son de frecuencia única. Estos resultados además evidencian la importancia de la selección asociada a huésped en la estructura poblacional de MDMV así como la existencia de una cierta división geográfica en subpoblaciones de los aislados estudiados.



**V-20****BROTOS EPIDÉMICOS DE *Maize rough dwarf virus* (MRDV) EN ESPAÑA****ALONSO-DUEÑAS, N., SUBIRAS, J., SERRANO, L., ACHÓN, M.A.**

*Area de Protecció de Conreus, Centre UdL-IRTA, Av. Alcalde Rovira Roure 177, 25198 Lleida. E-mail: Achon@pvcf.udl.es*

El virus del enanismo rugoso del maíz (*Maize rough dwarf virus*, MRDV) pertenece al género *Fijivirus* uno de los tres géneros de la Fam. *Reoviridae* que infectan a plantas. Desde la detección de MRDV en España (1982), su presencia ha fluctuado notablemente, hasta prácticamente desaparecer en la década de los 90. A partir de 1999 se está observado un incremento creciente de la presencia de este virus, con mayores incidencias en las zonas de nuevos regadíos de Monegros y fuertes brotes epidémicos en las últimas campañas. Estos datos indican que la ecología de MRDV ha cambiado y que su emergencia coincide con el cultivo de las variedades transgénicas a BT. En este trabajo se presentan los primeros resultados sobre la epidemiología de MRDV y los factores implicados en su emergencia tales como reservorios de MRDV, niveles poblacionales de su insecto vector (*Laodelphax striatellus*), análisis de otros posibles vectores e influencia de las prácticas culturales actuales.

## V-21

**IDENTIFICACIÓN DE NUEVAS VARIANTES DE APSCAVIROIDES EN CÍTRICOS****MURCIA, N., SERRA, P., DURÁN-VILA, N.**

*Departamento de Protección Vegetal y Biotecnología, Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias, Apartado Oficial, 46113 Moncada (Valencia). E-mail: nduran@ivia.es*

En cítricos se han descrito varios viroides, todos ellos dentro de la familia *Pospiviroidae* que incluye especies con Region Central Conservada (CCR) y sin ribozimas de cabeza de martillo. El viroide de la hoja curvada de los cítricos (CBLVd) y el viroide III de los cítricos (CVd-III) incluidos dentro del género *Apscaviroid* presentan un rango de huéspedes restringido a los cítricos y sus relativos, y aunque no causan enfermedades conocidas, pueden incidir en el vigor de los árboles infectados y en la producción. Estos efectos, que dependen de la sensibilidad de los árboles infectados, de las variantes del viroide y de la climatología de la zona de cultivo, han despertado interés por su posible utilización para controlar el tamaño de los árboles en plantaciones comerciales. Aunque todavía no se hallan incluidos como nuevas especies de viroides, se han descrito otros dos viroides (CVd-OS y CiLVd) con las características de las especies del género *Apscaviroid*.

En este trabajo, se describen una serie de estrategias basadas en la utilización de RT-PCR y parejas de cebadores de las zonas conservadas para identificar mediante el análisis del polimorfismo de conformación del DNA monocatenario (SSCP) nuevas variantes de secuencia y/o nuevos viroides. Por el momento se ha identificado una nueva variante de CVd-III, no descrita previamente, cuyos cambios de secuencia conllevan una nueva estructura del dominio terminal izquierdo. La caracterización biológica de esta variante se encuentra en curso.

**V-22****DETERMINANTES MOLECULARES QUE CONTROLAN LA TRANSMISIBILIDAD DEL VIRUS DEL MOSAICO DEL NABO (TuMV) POR PULGONES****TOURINO, A., FERRERES, A., PONZ, F., SÁNCHEZ, F.***INIA, Dpto. de Biotecnología, Autopista A6, Km 7. 28040 Madrid. E-mail: tourino@inia.es*

El virus del mosaico del nabo (TuMV), miembro del género *Potyvirus*, se transmite por pulgones de una manera no persistente con la ayuda de dos proteínas codificadas por el virus, la proteína de la cápsida (CP) y el componente auxiliar (HC-Pro). El proceso de transmisión, por analogía con otros potyvirus, depende de la presencia de tres motivos específicos de secuencia y altamente conservados en estas dos proteínas: un motivo Asp-Ala-Gly (DAG) en el extremo amino de la proteína de la cápsida (CP) y otros dos motivos: Lys-Ile-Thr-Cys (KITC) y Pro-Thr-Lys (PTK) en el extremo amino y en el tercio central respectivamente de la proteína HC-Pro.

La hipótesis mas aceptada sobre el mecanismo de transmisión, la “hipótesis del puente”, postula la interacción específica de HC-Pro tanto con el virión como con el pulgón, anclando la partícula viral al estilete del vector y permitiendo su posterior inoculación en la planta.

Para determinar la implicación de los motivos KITC y PTK en el proceso de transmisión de TuMV por pulgones se realizaron mutaciones puntuales en dichos motivos utilizando el clon infectivo del virus del mosaico del nabo. La transmisibilidad de los distintos mutantes obtenidos (PAK, EITC y EKITC –mutación G/E en la posición –1 del motivo KITC-) se ensayó con el principal vector de dicho virus, *Myzus persicae*. Estos experimentos se realizaron con un solo mutante o con la adquisición secuencial consecutiva de dos mutantes. La identificación del virus transmitido se realizó mediante la detección de la mutación con SNPs (Single Nucleotide Polymorphisms) y análisis del producto SNP con marcaje fluorescente en un secuenciador automático. Los resultados indicaron que los cambios de Lys (K) a Glu (E) en el motivo KITC, de Thr (T) a Ala (A) en el motivo PTK y de Gly (G) a Glu (E) en el motivo GKITC anulan totalmente la transmisibilidad de los virus mutantes cuando se ensayaron individualmente. Sin embargo en ensayos de adquisición secuencial de dos mutantes, se conseguía un rescate parcial de la transmisibilidad. Se discutirán los resultados en el contexto de la estructura multimérica propuesta para esta proteína en diferentes potyvirus.

**V-23****PRIMERA DETECCIÓN EN ESPAÑA DE UN VIRUS CAUSANTE DE LA ENFERMEDAD DE LA “PIEL DE SAPO” EN PEPINO****ARAMBURU, J.<sup>1</sup>, GALIPIENSO, L.<sup>1</sup>, TORNOS, T.<sup>2</sup>, MATAS, M.<sup>3</sup>**<sup>1</sup>IRTA, Crt. de Cabrils s/n, 08348 Cabrils (Barcelona).<sup>2</sup>Laboratorio de Sanidad Vegetal, Vía Circulación Norte, Tramo 6, Calle 3, Zona Franca, 08040 Barcelona.<sup>3</sup>ADV del Baix Maresme, Mercado de la Flor, 08340 Vilassar de Mar (Barcelona).

Durante la primavera del 2005 se localizaron plantaciones de pepino en la costa norte de Barcelona en los cuales algunas plantas mostraban síntomas similares a los descritos para la enfermedad de la “piel de sapo”, caracterizados por hojas deformadas, aclaración nervial, abolladura internervial, frutos decolorados y deformados y un raquitismo generalizado de la planta. La proporción de plantas afectadas no llegó a superar el 5% en ningún caso. Ensayos biológicos de transmisión a diferentes huéspedes y pruebas de detección mediante la técnica ELISA demostraron que la enfermedad estaba asociada a la presencia del virus causante del moteado enanizante de la berenjena (EMDV).

El EMDV es un virus de apariencia baciliforme perteneciente al grupo de los *Rhabdovirus* que se describió por primera vez en el sur de Italia en el año 1969 infectando plantas de berenjena. Actualmente está presente en la mayoría de los países del Mediterráneo y en algunos de los países del Este infectando una gran variedad de especies como berenjena, pimiento, pepino, melón, tabaco, patata, tomate y alfalfa, así como especies de malas hierbas pertenecientes a la familia de las *Solanáceas*. El virus se puede transmitir mediante inoculación o por injerto aunque con gran dificultad y de forma natural a través del insecto chupador *Agallia vorobjevi*, perteneciente a la familia *Cicadellidae*, que lo transmite de manera persistente. Las tasas de infección parecen estar relacionadas directamente con la población del insecto transmisor más que con la eficacia de la transmisión.

De los huéspedes antes mencionados, el EMDV solamente se ha detectado en nuestro país infectando de manera natural plantas de pepino y berenjena, que además son los únicos huéspedes en los que se ha podido demostrar la transmisión mecánica.

## V-24

**GENERACIÓN DE UN CLON INFECCIOSO DEL VIRUS DEL ARABESCO DEL *Pelargonium*****CASTAÑO, A., HERNÁNDEZ, C.***Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas (CSIC-UPV), Universidad Politécnica de Valencia, Avenida de los Naranjos s/n, 46022 Valencia. E-mail: cahernan@ibmcp.upv.es*

Una prospección realizada recientemente en España ha puesto de manifiesto que el virus del arabesco del *Pelargonium* (*Pelargonium line pattern virus*, PLPV) es el agente de tipo viral más frecuente en geranio con porcentajes de incidencia que oscilan entre el 40 y el 90% dependiendo del área geográfica examinada. Una situación similar es previsible en países de nuestro entorno y, probablemente, en otros más alejados, pero a pesar de la relevancia que el PLPV está adquiriendo como patógeno, los datos acerca de sus características biológicas y moleculares son aún bastante limitados. Se trata de un virus con partículas isométricas y un genoma monopartido de RNA de simple cadena y polaridad positiva cuyas infecciones naturales parecen restringidas a especies del género *Pelargonium*. La labor previa realizada en nuestro laboratorio ha revelado que tanto la organización de ORFs en el genoma del PLPV como la mayoría de sus productos potenciales se asemejan mucho a los de miembros del género *Carmovirus* dentro de la familia *Tombusviridae*. Sin embargo, el PLPV presenta algunas características peculiares que le distinguen claramente de los carmovirus como son la presencia de marcos abiertos de lectura (ORFs) de función desconocida o la generación de un solo RNA subgenómico para la expresión de los ORFs en posición 5'-distal. Con el fin de disponer de la herramienta necesaria para llevar a cabo un análisis detallado de las relaciones estructura-función en el PLPV, en este trabajo hemos fusionado un cDNA viral de longitud completa al promotor de la RNA polimerasa del fago T7 y lo hemos ligado a un vector de clonación de alto número de copias. Los transcritos generados *in vitro* a partir de la construcción resultante se han inoculado mecánicamente en el huésped natural, geranio, y en distintos huéspedes experimentales incluyendo a *Nicotiana tabacum*, *N. benthamiana*, *N. clevelandii*, judía, guisante o tomate. Las distintas plantas inoculadas se inspeccionaron periódicamente para evaluar la posible aparición de síntomas, y la presencia/ausencia del virus se analizó mediante hibridación molecular. Los resultados han mostrado que los RNAs del PLPV sintetizados *in vitro* dan lugar a infecciones indistinguibles de aquellas establecidas por el aislado viral de partida. Esta es la primera descripción de la generación de un clon biológicamente activo del PLPV y su disponibilidad nos está permitiendo desarrollar estrategias para obtener información tanto acerca del papel de determinadas ORFs en el ciclo biológico del virus como de los mecanismos de expresión génica utilizados por este patógeno.

## V-25

**SECUENCIA COMPLETA DEL GENOMA DEL VIRUS DEL AMARILLEO DEL TOMATE, *Tomato chlorosis virus* (ToCV)****LOZANO, G., MORIONES, E., NAVAS-CASTILLO, J.**

*Estación Experimental "La Mayora", CSIC, 29750 Algarrobo-Costa (Málaga). E-mail: jnavas@eelm.csic.es*

A finales de los años 80 del siglo pasado se describió un síndrome en Florida que afectaba a cultivos de tomate y que se denominó "desorden de la hoja amarilla" o "amarilleo", que estaba causado por el crinivirus (género *Crinivirus*, familia *Closteroviridae*) *Tomato chlorosis virus* (ToCV) o virus del amarilleo del tomate. En los últimos años, ToCV se ha encontrado en numerosos países incluida España, donde fue detectado por primera vez en 1997, afectando a cultivos de tomate bajo plástico en las provincias de Almería y Málaga. Actualmente, ToCV está presente en las principales zonas costeras productoras de tomate de la península, Islas Baleares e Islas Canarias. Además, ToCV se ha encontrado infectando a cultivos de pimiento en las provincias de Almería y Málaga. ToCV se transmite en la naturaleza por las moscas blancas *Bemisia tabaci* y *Trialeurodes vaporariorum*. Los síntomas que produce en tomate consisten en manchas cloróticas foliares internerviales y las hojas suelen engrosarse, enrollarse longitudinalmente y volverse quebradizas al tacto. Este síndrome comienza en la parte basal de la planta y se extiende hacia la parte apical. Además, la infección por ToCV provoca un menor cuajado de frutos así como alteraciones en la maduración. El genoma de ToCV está constituido por dos moléculas de RNA de cadena sencilla, lineal y de polaridad positiva, denominadas RNA1 y RNA2. En este trabajo hemos establecido la secuencia completa y organización del genoma de un aislado de ToCV. El RNA1 tiene 8594 nucleótidos y se identifican cuatro marcos abiertos de lectura (ORFs). Las proteínas potencialmente codificadas por el RNA1 desde el extremo 5' son una proteína multifuncional de 221 kDa implicada en la replicación del RNA viral, que contiene dominios conservados de proteinasas, metiltransferasas y helicasas; una proteína de 59 kDa que correspondería a la RNA polimerasa dependiente de RNA; una proteína de 22 kDa y una pequeña proteína de 5 kDa de naturaleza hidrofóbica. El RNA2 tiene 8244 nucleótidos y contiene nueve ORFs potenciales que incluyen genes característicos de la familia *Closteroviridae* que codifican la proteína Hsp70h, una proteína de 59 kDa, la proteína de la cápsida y una copia duplicada de ésta última. Las otras proteínas potencialmente codificadas por el RNA2 son una proteína de 27 kDa y cuatro proteínas de pequeño tamaño y naturaleza hidrofóbica. Los análisis filogenéticos realizados confirman que ToCV pertenece al género *Crinivirus* y que posee la mayor similitud con *Sweet potato chlorotic stunt virus* (SPCSV) y *Cucurbit yellow stunting disorder virus* (CYSDV).

## V-26

**DETECCIÓN DIRECTA DE *Plum pox virus* (PPV) MEDIANTE PCR A TIEMPO REAL****CAPOTE, N., BERTOLINI, E., OLMOS, A., CAMBRA, M.***Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA), Departamento de Protección Vegetal y Biotecnología, 46113 Moncada (Valencia). E-mail: ncapote@ivia.es*

La *sharka*, causada por *Plum pox virus* (PPV) es la enfermedad más grave de los frutales de hueso. Afecta principalmente a albaricoquero, ciruelo y melocotonero, causando graves daños en la producción e importantes pérdidas económicas. PPV se propaga por multiplicación vegetativa y se transmite por distintas especies de pulgones. El control de esta enfermedad depende de una detección temprana y eficaz del virus. En este trabajo se presenta un nuevo método rápido, fiable y sensible de detección de PPV (spot-RT-PCR a tiempo real). El método consiste en la obtención de extractos convencionales de plantas y su fijación (5µl) en papel de filtro. La muestra se introduce en un tubo eppendorf y se añaden 100µl de Tritón X-100 al 0,5% para extraer el RNA viral. Cinco µl de esta solución se utilizan directamente como muestra para la reacción de RT-PCR a tiempo real, evitándose así la tediosa y costosa extracción de RNA de la muestra. Esta técnica se ha comparado con los métodos oficiales de detección de PPV, ELISA-DASI y Co-PCR (EPPO, 2004) así como con PCR a tiempo real usando RNA total extraído (Qiagen). Se ha aplicado para el diagnóstico de PPV en 310 árboles de ciruelo japonés, albaricoquero, melocotonero, almendro e híbrido melocotonero x almendro muestreadas en invierno y primavera. Los resultados obtenidos mostraron un 78% de fiabilidad de la técnica en muestras de invierno (cuando el título viral es bajo) y de un 96% en primavera. La escasa pérdida de sensibilidad comparada con la obtenida mediante PCR a tiempo real convencional la hacen recomendable como método de detección en prospecciones de rutina y a gran escala. Se han desarrollado dos variantes de este método (print- y squash-RT PCR a tiempo real) que permiten la detección de PPV en impresiones de tejido o pulgones escachados en papel sin necesidad de hacer extractos. La escasez de muestra en una impronta de tejido o en un pulgón individual se ve solventada por la alta sensibilidad de la PCR a tiempo real. La variante squash-RT-PCR ha sido aplicada no sólo a la detección de PPV, sino también a la de otros virus como *Citrus tristeza virus* (CTV). Una de las ventajas de este método es que permite conservar muestras fijadas en papel durante largo tiempo a temperatura ambiente o congeladas sin pérdida de sensibilidad en la detección.

## V-27

***Capsicum annuum*, NUEVO HUÉSPED NATURAL DEL *Pelargonium zonate spot virus* (PZSV)****ESCRIU, F.<sup>1</sup>, CAMBRA-ÁLVAREZ, M.A.<sup>2</sup>, LUIS-ARTEAGA, M.<sup>1</sup>**<sup>1</sup>Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria (CITA,) Apartado 727, 50080 Zaragoza.<sup>2</sup>Centro de Protección Vegetal del Gobierno de Aragón, Apartado 727, 50080 Zaragoza. E-mail: fescriu@aragon.es

Durante la primavera del 2006, en un invernadero comercial cercano a la ciudad de Huesca aparecieron plantas de tomate distribuidas al azar, que presentaban síntomas similares a los descritos como producidos por el *Pelargonium zonate spot virus* (PZSV), encontrado en España en cultivos de tomate de invernadero situados en Santa Engracia (Zaragoza) en 1996. En un cultivo de pimiento cv. Estilo F1 del mismo invernadero, se detectaron tres plantas que en las hojas apicales manifestaban mosaicos en forma de dibujos de color verde oscuro-verde claro, distribuidos por todo el limbo y similares a los observados en las plantas de tomate. Dichos síntomas, que no habían sido observados anteriormente en pimiento, hacían sospechar una etiología similar a la del tomate.

A partir de tejido foliar de las plantas enfermas de pimiento y tomate, se realizaron análisis por ELISA-DAS utilizando un antisuero policlonal comercial frente a PZSV (Agdia Inc.). También se analizaron plantas de las especies arvenses: *Cardaria draba*, *Diplotaxis eruroides*, *Lactuca* sp., *Rubia tinctoria*, *Sonchus* sp. *Sisymbrium irio* y *S. sophia*, recogidas en las inmediaciones del invernadero, y que no manifestaban síntomas sospechosos de infección por virus. Como testigos negativos se usaron extractos de planta sana de *N. glutinosa*, tomate cv. San Pedro, pimiento cv. Yolo Wonder, y de muestras de las citadas especies arvenses procedentes del herbario del Dr. Zaragoza Larios. Como testigos positivos se usaron extractos de plantas de *N. glutinosa* inoculadas con los aislados T-3-96 y T-2-05 de PZSV, el primero obtenido a partir de tomate en 1996, y el segundo procedente de frutos de tomate de industria cultivado al aire libre en Navarra en 2005. Los aislados procedentes de pimiento, tomate y *R. tinctoria*, que resultaron positivos, se inocularon mecánicamente a una gama de especies indicadoras en invernadero de ambiente controlado. Los resultados obtenidos, tanto por serología como por inoculación en especies indicadoras, indican que PZSV está asociado a la enfermedad del tomate y pimiento del invernadero de Huesca. Que sepamos, esta es la primera cita del PZSV en pimiento y en *R. tinctoria* a nivel mundial.



## V-28

**DETECCIÓN Y DIFERENCIACIÓN DE ESPECIES DEL GÉNERO *Fabavirus* MEDIANTE RT-PCR CON UN ÚNICO PAR DE PRIMERS****FERRER, R.M.<sup>1</sup>, LUIS-ARTEAGA, M.<sup>2</sup>, GUERRI, J.<sup>1</sup>, MORENO, P.<sup>1</sup>, RUBIO, L.<sup>1</sup>**<sup>1</sup>*Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA), Apdo. Oficial, 46113 Moncada (Valencia). E-mail lrubio@ivia.es*<sup>2</sup>*Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria de Aragón (CITA), Apdo. 727, 50080 Zaragoza. E-mail mpluis@aragon.es*

El género *Fabavirus*, de la familia *Comoviridae*, tiene tres especies reconocidas: el virus 1 del marchitamiento del haba (*Broad bean wilt virus*, BBWV-1), BBWV-2 y el virus del mosaico suave del lamium (*Lamium mild mosaic virus*, LMMV). Recientemente se ha propuesto una cuarta especie denominada virus del mosaico de la gentiana (*Gentian mosaic virus*, GeMV). Estos virus producen daños en un gran número de cultivos agrícolas (legumbres, alcachofa, lechuga, tomate, tabaco, pimiento, etc), son transmisibles por pulgón, tienen partículas isométricas compuestas de dos proteínas capsídicas y dos ARNs genómicos monocatenarios. Para LMMV y GeMV, solamente se ha descrito un aislado (obtenidos en Inglaterra y Japón, respectivamente); mientras que se han encontrado numerosos aislados de BBWV-1 y BBWV-2 por todo el mundo. El análisis de secuencias nucleotídicas de aislados de BBWV-1 y BBWV-2, y del aislado de GeMV confirma la clasificación de éstos como distintas especies y muestra una gran variabilidad genética en BBWV-1 y BBWV-2 con respecto a otros virus vegetales. No se dispone de ninguna secuencia del aislado de LMMV. En este trabajo, se diseñaron un par de iniciadores correspondientes a secuencias conservadas en todos los aislados secuenciados del género *Fabavirus*, para amplificar mediante RT-PCR la única zona del genoma (region no traducible del extremo 5' del ARN 1) cuyo tamaño varía entre BBWV-1 (354-356 nt), BBWV-2 (386-391 nt) y GeMV (320 nt). Esto constituye un método sencillo, rápido y sensible para identificar estos virus, y posiblemente descubrir nuevas especies del género *Fabavirus*.

## V-29

**DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE PATÓGENOS DE CÍTRICOS APLICADO AL PROGRAMA DE MEJORA DE VARIEDADES DE CÍTRICOS EN ESPAÑA****VIVES, M.C.<sup>1</sup>, PINA, J.A.<sup>2</sup>, DURÁN-VILA, N.<sup>1</sup>, MORENO, P.<sup>1</sup>, GUERRI, J.<sup>1</sup>, NAVARRO, L.<sup>1</sup>**<sup>1</sup>*Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias, Apartado Oficial, 46113 Moncada (Valencia). E-mail: cvives@ivia.es*<sup>2</sup>*Área de Protección de los Cultivos, Consellería de Agricultura y Pesca, Plaza Alcalde Domingo Torre, 2, 46020 Valencia.*

El control sanitario de las plantas madre de los viveros de cítricos es uno de los parámetros más importantes para la producción de plantones de gran calidad. Los cítricos pueden resultar afectados por muchas enfermedades causadas por hongos, bacterias, espiroplasmas, fitoplasmas, virus, viroides y otros patógenos transmisibles por injerto, cuyo diagnóstico es clave para propagar plantas sanas. En la última década, los avances en biología molecular y biotecnología han permitido desarrollar nuevos métodos sensibles, específicos y rápidos para la detección fiable de agentes patógenos, algunos de los cuales han podido aplicarse a patógenos de cítricos.

En este trabajo se describen los procedimientos de detección molecular usados en el Programa de Mejora de Variedades de Cítricos. Los árboles procedentes de los programas de Cuarentena y Saneamiento se someten a un diagnóstico completo que incluye la técnica electroforética sPAGE para la detección de viroides, DAS-ELISA para detección de tristeza, TAS-ELISA para detección de psoriasis, análisis de ácidos nucleicos de doble cadena (dsRNAs) para la detección de virus conocidos o desconocidos que producen este tipo de moléculas durante su proceso de replicación y RT-PCR para detección de psoriasis, tristeza o del virus del manchado foliar. Por otro lado, los árboles incluidos en el programa de Certificación se analizan periódicamente mediante inmunoimpresión-ELISA para tristeza, mediante hibridación con improntas para caquexia y mediante RT-PCR para el virus del manchado foliar de los cítricos. Durante el último año se ha puesto a punto la detección de huanglongbing (*Candidatus Liberibacter* spp.), stubborn (*Spiroplasma citri*) y escobas de bruja (*Candidatus Phytoplasma aurantifolia*) mediante PCR y la detección de leprosis, tatter leaf y del marafivirus asociado a la muerte súbita de los cítricos mediante RT-PCR. Todos estos métodos se están empezando a aplicar de forma rutinaria en el programa.

**V-30****RAJADO DE LA SANDÍA: DETECCIÓN DE VIROSIS IMPLICADAS EN EL SÍNDROME**

**CEBRIÁN, M.C., CÓRDOBA, M.C., ALFARO-FERNÁNDEZ, A., GARCÍA-RANDEZ, A., FONT, M.I., JORDÁ, C.**

*Instituto Agroforestal Mediterráneo (IAM), Universidad Politécnica de Valencia, Camino de Vera s/n, 46022 Valencia. E-mail: mjordag@eaf.upv.es*

En el periodo de producción de sandía del 2001 se manifestó, en distintas zonas de España, el rajado de las sandías con varios tipos de sintomatología en hoja. Síntomas de mosaico, amarilleos marginales, necrosis suaves y abullonado de las hojas (tipo 1); amarilleo internervial, necrosis marginal de las hojas que avanzaba hasta necrosar la rama completa (tipo 2). En algunas variedades los frutos no llegaban a rajar pero quedaban deformados, y en algunos frutos rajados la pulpa se encontraba muy deteriorada pudiendo aparecer patentes manchas necróticas.

Se realizó el diagnóstico para la detección de las virosis descritas hasta ese momento en España que afectan a las cucurbitáceas, tanto por técnicas serológicas como moleculares. Las muestras asociadas a la sintomatología tipo 1 presentaron infección mixta de *Cucumber vein yellowing virus* (CVYV) y *Papaya ringspot virus* (PRSV). Las muestras con sintomatología tipo 2 resultaron estar siempre infectadas con *Cucumber green mottle mosaic virus* (CGMMV), y en algún caso presentaban infección mixta con PRSV y/o *Watermelon mosaic virus II* (WMV-II). El CGMMV es un *Tobamovirus* de reciente detección en España y que se encuentra distribuido por la región Euroasiática, India, Japón y Reino Unido. Para nuestro conocimiento esta es la primera vez que el CGMMV es relacionado en España con el síndrome del rajado de sandía. En este trabajo se discute la presencia del rajado y la detección de diferentes agentes patógenos.

## V-31

***Iris yellow spot virus (IYSV): UN NUEVO TOSPOVIRUS EN ESPAÑA***

**CÓRDOBA, M.C.<sup>1</sup>, CEBRIÁN, M.C.<sup>1</sup>, ALFARO-FERNÁNDEZ, A.<sup>1</sup>, MUÑOZ, R.M.<sup>2</sup>, ESPINO, A.<sup>3</sup>, JORDÁ, C.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Instituto Agroforestal Mediterráneo (IAM), Universidad Politécnica de Valencia, Camino de Vera s/n, 46022 Valencia. E-mail: mjordag@eaf.upv.es

<sup>2</sup>Servicio de Diagnóstico y Asistencia Fitosanitaria (SEDAF), Instituto Técnico Agronómico Provincial de Albacete (ITAP), Apdo. Correos 451, 02080 Albacete.

<sup>3</sup>Servicio de Sanidad Vegetal. Tenerife.

Durante Septiembre del 2003 se observó en cebollas (*Allium cepa* L.) procedentes de Albacete la aparición en las hojas y escapo floral de lesiones de color pajizo en forma de diamante, y en ocasiones lesiones necróticas y deformación de las hojas. Las muestras se analizaron por técnicas serológicas y moleculares para la detección de las principales virosis que están descritas en el cultivo de la cebolla: *Onion yellow dwarf virus* (OYDV), *Leek yellow stripe virus* (LYSV), *Cucumber mosaic virus* (CMV), *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) e *Iris yellow spot virus* (IYSV), resultando positivas únicamente a la presencia de IYSV. Posteriormente se comprobó mediante RT-PCR empleando cebadores específicos de la secuencia de la nucleocapside del virus. El producto de PCR de 790 pb se secuenció verificándose que se trataba de este virus. El IYSV es un *Tospovirus* transmitido por *Thrips tabaci* y está ampliamente extendido en Estados Unidos, Israel, Australia, Brasil, Chile, Eslovenia, Holanda e Irán. En España recientemente se ha diagnosticado un nuevo foco de la enfermedad en Canarias afectando a cultivos de cebolla y puerro. Está es la primera vez que se detecta este *Tospovirus* en España.

**V-32****CITOPATOLOGÍA ASOCIADA CON EL SÍNDROME DEL “TORRAO”**

**MEDINA, V., CÓRDOBA, M.C., ALFARO-FERNÁNDEZ, A., FONT, M.I., CEBRIÁN, M.C., JORDÁ, C.**

*Instituto Agroforestal Mediterráneo (IAM), Universidad Politécnica de Valencia, Camino de Vera s/n, 46022 Valencia. E-mail: mjordag@eaf.upv.es*

En la primavera del 2001 hace su aparición en los campos de producción de tomate de la zona de Murcia una sintomatología típica que comienza con un amarilleo de la base del foliolo, de las hojas del brote, avanzando a la aparición de un cribado con necrosis posterior que se extiende por toda la hoja, peciolo, ramilletes florales y en la parte apical del tallo, llegando, incluso, a la muerte de la planta. Los frutos presentan manchas marrones o negras, circulares o lineales. El fruto puede presentar grietas y deformaciones. El síndrome descrito recibe el nombre gráfico de “Torrao” por parte de los productores.

En un principio las plantas afectadas no superaban el 3% y se encontraban localizadas mayoritariamente en los bordes o junto a los pasillos del invernadero, la proporción ha ido aumentando de forma preocupante extendiéndose por diferentes zonas y sistemas de cultivo, presentando manifestaciones cada vez más agresivas.

El presente trabajo relaciona los síntomas descritos en las diferentes muestras analizadas con sus aspectos citopatológicos y los agentes virales detectados en las mismas, abordándose el estudio por diferentes técnicas microscópicas.

**V-33****INCIDENCIA DE LAS PRINCIPALES VIROSIS DE LA VID EN EL PRINCIPADO DE ASTURIAS****LOUREIRO, M.D., FERNÁNDEZ, N., SUÁREZ, B.***SERIDA, Ctra. Oviedo s/n, 33300 Villaviciosa (Asturias). E-mail: mdolorlr@serida.org*

El viñedo asturiano se caracteriza por su antigüedad y el estado de abandono en que estuvo hasta hace pocos años. La realización de nuevas plantaciones y el reconocimiento de la denominación *Vino de la Tierra de Cangas* están propiciando su recuperación. No obstante, las nuevas plantaciones se están realizando con madera procedente de los antiguos viñedos sin un control sanitario adecuado.

En este trabajo se ha realizado un estudio sanitario del viñedo en cuanto a las virosis de detección obligatoria para la certificación de planta de vid (Enrollado-GLRaV, tipos 1 y 3; Entrenudo corto-GFLV y Jaspeado-GFKV) y del Enrollado tipo 2 por su alta incidencia en los viñedos españoles.

El estudio se llevó a cabo sobre 132 ejemplares de vid procedentes de 8 parcelas enclavadas en los municipios de Cangas del Narcea e Ibias y pertenecientes a las variedades: Albarín tinto, Carrasquín, Verdejo tinto, Mencía, Albarín blanco, Moscatel blanco y Godello. La toma de muestra para la detección de la virosis del Entrenudo corto y Jaspeado se realizó en hoja joven (junio), y en hoja adulta (septiembre) para los virus del Enrollado. La hoja se recogió de un mínimo de 4 pámpanos en las 4 direcciones del espacio. El diagnóstico sobre el estado sanitario de las cepas se determinó en el laboratorio mediante la técnica DAS-ELISA.

El virus más frecuente en los viñedos prospectados fue el del Jaspeado (17,4%), seguido por el Enrollado tipo 1 (16,7%) y por el Enrollado tipo 2 (8,3%). El Enrollado tipo 3 y Entrenudo corto (4,5%) presentaron un menor porcentaje de infección. Las variedades Albarín blanco y Verdejo tinto presentaron un porcentaje de virosis superior al 50%. Se observó también distinta incidencia de los virus en función de la variedad. Así, el Jaspeado fue el virus más frecuente en los ejemplares de Albarín blanco, Carrasquín y Mencía, mientras que el Enrollado tipo 1 mostró una mayor incidencia en las variedades Albarín y Verdejo tinto. El Godello presentó como virus más frecuente el del Enrollado tipo 3.

El elevado porcentaje de virosis detectado en alguna de las variedades y la no existencia de material comercial certificado de las variedades autóctonas acogidas a la denominación *Vino de la Tierra de Cangas*, puede ocasionar el riesgo de propagación de las virosis a las nuevas plantaciones influyendo de forma negativa sobre la producción y calidad de la vendimia.

## V-34

**DISTRIBUCIÓN ACTUAL DE ToCV Y TICV EN ESPAÑA. LECHUGA (*Lactuca sativa*), UN POSIBLE HOSPEDANTE DE TICV EN ESPAÑA****FONT, M.I., GARCÍA, A., JORDÁ, C.**

*Instituto Agroforestal Mediterráneo, Departamento de Ecosistemas Agroforestales, Patología Vegetal, Universidad Politécnica de Valencia, Camino de Vera s/n, 46022 Valencia. E-mail: mjordag@eaf.upv.es*

*Tomato chlorosis virus* (ToCV) y *Tomato infectious chlorosis virus* (TICV) son virus del género *Crinivirus* (familia *Closteroviridae*) transmitidos por mosca blanca de forma semipersistente y limitados al floema. ToCV fue identificado por primera vez en España en 2000 (con material muestreado en 1997) infectando cultivos del tomate de Málaga y Almería que presentaban amarilleo internervial de hojas de la parte intermedia y baja de la planta, manchas color púrpura, rojizas o necróticas, enrollado de las hojas basales que tomaban un aspecto quebradizo. El TICV fué detectado por primera vez en España en 2001 en cultivos de tomate de Castellón que presentaban una sintomatología similar. Desde la identificación de estos dos crinivirus en España sus áreas de distribución año tras año se han visto ampliadas y su incidencia incrementada. Actualmente el ToCV ha sido detectado en: Barcelona, Castellón, Valencia, Alicante, Murcia, Almería, Granada, Málaga, Sevilla, Badajoz, Pontevedra, incluyendo las islas Baleraes y Canarias. En cambio TICV únicamente ha sido detectado en: Castellón, Valencia, Alicante y Murcia. El rango de hospedantes de estos virus, recogido en la bibliografía, incluye varios cultivos hortícolas importantes, especies ornamentales así como diversas especies silvestres. En España y hasta la fecha los cultivos hortícolas hospedantes naturales del ToCV han sido tomate y pimiento. Sin embargo, el TICV, que hasta hace poco únicamente se había detectado infectando al cultivo de tomate de forma natural podría también ser huésped del cultivo de lechuga. En la primavera del 2003 y 2006 se analizaron muestras de lechuga procedentes de Castellón y que mostraban amarilleo internervial de las hojas más viejas y manchas color púrpura para comprobar la presencia de TICV mediante RT-PCR y empleando cebadores específicos (TICV-31/TICV-532). En todas las muestras analizadas se amplificó un fragmento de 501 pb, tamaño que corresponde con el esperado para TICV. Si este estudio preliminar se confirmarse mediante secuenciación, ésta podría ser la primera cita de lechuga como hospedante natural del TICV en España y podría tener importantes consecuencias epidemiológicas en zonas donde tomate y lechuga son cultivados.

## V-35

**DETECCIÓN DEL *Fijivirus* DEL MAL DE RÍO CUARTO (MRCV) EN SUS INSECTOS VECTORES MEDIANTE METODOLOGÍAS DE DIAGNÓSTICO DE ALTA SENSIBILIDAD****GIMÉNEZ-PECCI, M.P.<sup>1</sup>, LUNELLO, P.<sup>2</sup>, TRUOL, G.<sup>1</sup>, PONZ, F.<sup>2</sup>**<sup>1</sup>IFFIVE-INTA, Camino 60 Cuadras, Km 51/2 X 5020ICA Córdoba, Argentina.<sup>2</sup>Departamento de Biotecnología, INIA, Autopista A6, Km 7. 28040 Madrid. E-mail: mpazg@correo.inta.gov.ar

El mal de río cuarto virus (MRCV) produce epidemias al igual que otros miembros del género *Fijivirus*, tales como el virus del enanismo de las rayas negras del arroz (*Rice black streak dwarf virus*-RBSDV) en Asia o el virus del enanismo rugoso del maíz (*Maize rough dwarf virus*-MRDV) en áreas del Mediterráneo (Marzachí *et al.*, 1995, Hibino, 1996, Fang *et al.*, 2001; Zhang *et al.*, 2001; Dovas *et al.*, 2006). Es transmitido por *Delphacodes kuscheli* y *D. haywardi*, en forma persistente propagativa (Truol *et al.*, 2001, Velázquez *et al.*, 2003). El desarrollo de técnicas rápidas y sensibles que permitan detectar bajas concentraciones del virus en diferentes hospedantes y en insectos vectores es una necesidad para el diagnóstico, la caracterización biológica y estudios epidemiológicos de esta enfermedad. En la detección de MRCV en insectos, hasta el presente se han empleado las técnicas de ELISA, hibridaciones moleculares y microscopía electrónica (Arneodo *et al.*, 2002; Ornaghi *et al.*, 1999; Presello *et al.*, 1997,) requiriéndose aún técnicas de mayor precisión y resolución para detectar bajos niveles de virus y minimizar reacciones inespecíficas.

Las técnicas IC-RT-PCR convencional en gel e IC-RT-PCR en tiempo real ajustadas han permitido detectar el virus en plantas sintomáticas de diferentes regiones geográficas, diferentes hospedantes, tejidos, muestras de campo y de transmisiones experimentales, demostrando ser procedimientos simples y ágiles para amplificar eficientemente fragmentos genómicos de dsRNA del MRCV. La IC-RT-PCR en gel incrementa en 3 órdenes la sensibilidad de DAS-ELISA y la IC-RT-PCR cuantitativa con sondas TaqMan<sup>®</sup>, lo hace en 7 órdenes (Giménez Pecci *et al.*, 2004).

En este trabajo se presenta la factibilidad del empleo de ambas alternativas de diagnóstico molecular en la detección del virus en sus vectores naturales.

Los resultados obtenidos indican que la IC-RT-qPCR con sondas TaqMan<sup>®</sup> ajustada permite detectar el agente causal en su vector, *D. kuscheli*, en grupos de 3, 4 y 5 insectos a los que se les había permitido alimentarse de plantas enfermas y cumplir los tiempos de la transmisión persistente propagativa. Además con ésta técnica pudimos detectar el virus en insectos virulíferos, que no fueron capaces de transmitir el patógeno en las condiciones empleadas. Los ensayos de detección utilizando la técnica de IC-RT-PCR convencional (en gel) fueron negativos.

Estos resultados abren la posibilidad del estudio de nuevos vectores con bajos títulos virales, en infecciones tempranas y como reservorios alternativos en estudios epidemiológicos.



## V-36

**IDENTIFICACIÓN DE VIRUS EN VARIEDADES ANTIGUAS DE PATATA EN CANARIAS****RAVELO, M.<sup>1</sup>, LUNELLO, P.<sup>2</sup>, VALDÉS, F.<sup>1</sup>, SÁNCHEZ, F.<sup>2</sup>, RODRÍGUEZ, B.<sup>1</sup>, PONZ, F.<sup>2</sup>**<sup>1</sup>Dpto de Biología Vegetal, UDI Fisiología Vegetal, Universidad de La Laguna, Tenerife.<sup>2</sup>Departamento de Biotecnología, INIA, Autopista A6, Km 7. 28040 Madrid.

El cultivo de patata en las Islas Canarias proviene del Perú, en la forma *S. tuberosum* sp. andígena, caracterizada por tubérculos con ojos numerosos y de profundidad media, de ciclo de cultivo y período de latencia largos. Actualmente conocidas como variedades antiguas de Tenerife, su cultivo se realiza en pequeñas explotaciones ubicadas en zonas rurales, con una población envejecida y escasa mecanización. Posteriormente “nuevas” variedades procedentes de Europa, con un ciclo de cultivo más corto y un escaso periodo de latencia se incorporaron a la gama existente de variedades en las islas, formando el grupo de las *S. tuberosum* sp. *tuberosum*, considerado uno de los principales cultivos isleños.

En la actualidad el cultivo de patata en la isla de Tenerife ocupa alrededor de unas 3.175 hectáreas. Durante los últimos años este cultivo se ha visto sumido en una fuerte crisis. Los factores responsables de la misma son varios: el abandono del campo y el envejecimiento de la mano de obra agrícola como consecuencia de la presión de otras actividades económicas sobre los terrenos de cultivo; la menor productividad y escasa rentabilidad económica de los cultivos en gran medida causada por fitopatógenos.

En este escenario es importante considerar el concepto ecológico de “ISLA” que en este caso confluye con el de “ZONA AISLADA”, ideal para el estudio de poblaciones de virus en las variedades antiguas de patata. En este trabajo presentamos: 1-Identificación de las especies virales que infectan las variedades en estudio; 2-Clonado y secuenciación de las especies virales existentes y 3-Ubicación taxonómica y grado de similitud con variantes virales previamente secuenciadas.

En primer lugar se detectaron, mediante IC-RT-PCR con cebadores específicos, PVA, PVY (Potyvirus), PVS (Carlavirus), PLRV (Polerovirus), PVX (Potexvirus). Además, utilizando cebadores degenerados, en algunos casos se logró identificar mediante clonado y secuenciación, una secuencia parcial de CP (686 nt) de Carlavirus, con un 98% de similitud en aa a PVS, y otra secuencia parcial (441 nt y 310 nt) correspondiente al ORF6 de Carlavirus con un 79% de similitud a PVS. PVX y PVY (raza N) se identificaron con un 100% de homología con secuencias preexistentes (563 nt para PVX y 1802 nt para PVY). Además se obtuvo una secuencia parcial (448 nt) con un 28% de similitud con Nepovirus. La diversidad de virus encontrada, además de la escasa similitud, de algunos clones secuenciados es una puerta abierta para continuar la caracterización viral en estas antiguas (históricas) variedades de patata.

**V-37****LA CALIDAD DEL MATERIAL VEGETAL VITICOLA EN ESPAÑA**

**PADILLA, V., GARCÍA DE ROSA, B., HITA, I., PADILLA, C., CRETAZZO, E., VELASCO, L., SALMERÓN, E.**

*Instituto Murciano de Investigación y Desarrollo Agrario y Alimentario (IMIDA), 30150 La Alberca (Murcia). E-mail: ventura.padilla@carm.es*

El presente trabajo es fruto de más de veinte años de proyectos de selección clonal-sanitaria, llevados a cabo en las diferentes Comunidades Autónomas en relación a las variedades autóctonas, así como algunos casos de viníferas foráneas y portainjertos.

Tras una introducción que hace referencia a la legislación europea y española, sobre producción de planta de vid ( directivas de la Unión Europea: 68/193/CE, 2002/11/CE y 2005/43/CE, y Ordenes Ministeriales Españolas: 24/junio/1991 y 21/febrero/2003), se hace mención de los principales métodos de diagnóstico (indexage y ELISA) que utilizamos en nuestro laboratorio para establecer la calidad sanitaria de aquellos cultivares que habiendo sido sometidos a trabajos de prospección clonal por parte de los equipos de viticultura correspondientes, nos envían los pertinentes centros de control de las CCAA.

Por otra parte, citamos la técnica PCR, con la que estamos trabajando tratando de lograr su puesta a punto para llevar a cabo una cantidad de análisis similar a la que actualmente nos proporciona ELISA. También nos referimos al manejo de las muestras recibidas para su análisis, y exponemos la situación sanitaria (referida a número de clones) de las principales viníferas cultivadas en España, así como de los portainjertos más utilizados. Y concluimos con la presentación de nuestro laboratorio como de referencia en el ámbito de las virosis de vid.

## V-38

**CONTROL FITOSANITARIO DEL BANCO DE GERMOPLASMA DEL GÉNERO *Fragaria* DEL IFAPA-CIFA DE CHURRIANA**

**PÉREZ-JIMÉNEZ, R.M.<sup>1</sup>, SEGUNDO, E.<sup>2</sup>, CARMONA, M.P.<sup>2</sup>, ZEA-BONILLA, T.<sup>1</sup>, SORIA, C.<sup>1</sup>, LÓPEZ-ARANDA, J.M.<sup>1</sup>, SÁNCHEZ-SEVILLA, J.F.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>CIFA de Churriana (IFAPA-CICE), Cortijo de la Cruz s/n, Churriana, 29140 Málaga.

<sup>2</sup>CIFA La Mojonera (IFAPA-CICE), Autovía del Mediterráneo, Km 420, 04745 La Mojonera (Almería).

En el CIFA de Churriana (Málaga) se mantiene uno de los principales bancos de germoplasma del género *Fragaria* existentes en España, que cuenta con unas 480 entradas. Para confirmar que el material que se mantiene en esta colección de referencia se encuentra libre de aquellos virus y hongos patógenos de suelo de importancia en el cultivo, o que figuran en la normativa comunitaria, recientemente se ha iniciado un control interno del estado fitosanitario de esta la colección. De esta forma, se está llevando a cabo el diagnóstico de estos patógenos en plantas madre durante el proceso de refresco, antes de su paso a la colección *in vitro*. Por otro lado, se ha iniciado el control sanitario de entradas y salidas de material y se analizan las plantas sintomáticas que se detectan en la colección mantenida *in vivo*.

Para realizar este estudio se han puesto a punto técnicas de diagnóstico moleculares y/o inmunoserológicas de los virus transmitidos por nemátodos: *Arabidopsis mosaic nepovirus* (ArMV), *Tomato black ring nepovirus* (TBRNV), *Raspberry ringspot nepovirus* (RpRSV), *Strawberry latent ringspot sadwavirus* (SLRSV); y de los virus transmitidos por pulgones: *Strawberry vein banding caulimovirus* (SVBV), *Strawberry mottle sadwavirus* (SMoV), *Strawberry crinkle cytorhabdovirus* (SCV), *Strawberry mild yellow edge potyvirus* (SMYEV). El diagnóstico de los principales hongos de suelo patógenos del cultivo (entre otros: *Phytophthora* spp., *Rhizoctonia* spp., *Verticillium* spp.) se está realizando mediante técnicas convencionales de aislamiento en medios selectivos e identificación morfológica. Paralelamente, se están utilizando cebadores específicos para poner a punto métodos de un diagnóstico molecular de estos patógenos.

Hasta la fecha, los resultados muestran que la mayoría del germoplasma analizado se encuentra libre de virus y hongos patógenos. Cabe destacar que se han interceptado los virus SMoV y SMYEV de dos plantas procedentes de Italia. Se ha secuenciado un fragmento del genoma de estos aislados virales y comparado con los existentes en Genbank presentando una homología de (100% y 89% respectivamente).

Proyecto: INIA Recursos Fitogenéticos de Interés Agroalimentario. 2004-00043

## V-39

**DETECCIÓN DEL VIRUS DE CUARENTENA *Potato yellow vein virus* (PYVV) MEDIANTE RT-PCR CONVENCIONAL Y RT-PCR A TIEMPO REAL (TECNOLOGÍA TAQMAN®)****LÓPEZ, R.<sup>1</sup>, ASENSIO, C.<sup>1</sup>, GUZMÁN, M.M.<sup>3</sup>, BOONHAM, N.<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>*Instituto Tecnológico Agrario de Castilla y León, Junta de Castilla y León, 47071 Valladolid.  
E-mail: lopperru@itacyl.es*

<sup>2</sup>*Central Science Laboratory, Sand Hutton, York YO41 1LZ, UK.*

<sup>3</sup>*Laboratorio de Virus Vegetales, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia.*

*Potato yellow vein virus* (PYVV) está considerado como un patógeno de cuarentena en la zona EPPO (European and Mediterranean Plant Protection Organization). En la actualidad se trata de uno de los virus de patata de origen sudamericano para el cual se han de establecer estrictas medidas de control en los procedimientos de importación/exportación. Este virus origina graves pérdidas en su centro de origen en Sudamérica (Ecuador y Colombia). El crecimiento del comercio no regulado de semillas de patatas, así como la creciente expansión de las poblaciones de su insecto vector (*Trialeurodes vaporariorum* L.), están favoreciendo la dispersión de este virus a otros países de la región. Los métodos de detección disponibles actualmente son demasiado laboriosos (RT-PCR a partir de extracciones de ds-RNA) o difíciles de interpretar (dot-blot).

El objetivo de este trabajo fue desarrollar un método de detección para PYVV mediante RT-PCR a tiempo real basado en tecnología TaqMan® que ofreciera una alta sensibilidad. Este método se combinó con la amplificación, en la misma reacción de RT-PCR, de un control interno diseñado para detectar el gen citocromo oxidasa de patata. Este control interno permite confirmar si la extracción de ARN a partir de tejido de patata ha sido exitosa, evitando, así, falsos negativos. Así mismo, se ha desarrollado también un método de detección para PYVV mediante RT-PCR convencional. Aunque menos sensible, requiere de una tecnología menos sofisticada por lo que podría ser una buena alternativa para aquellos laboratorios menos equipados tecnológicamente. La especificidad de estos dos métodos es comparable, si bien, la detección mediante RT-PCR a tiempo real demostró ser 1000 veces más sensible que el método basado en RT-PCR convencional.

**V-40****ELECTROFORESIS DE dsRNA COMO MÉTODO PARA EVALUAR LA CAPACIDAD INFECTIVA DE DIFERENTES AISLADOS DE CMV EN ENSAYOS DE COMPETITIVIDAD****ARAMBURU, J.<sup>1</sup>, LÓPEZ, C.<sup>2</sup>, GALIPIENSO, L.<sup>1</sup>**<sup>1</sup>*IRTA, Crta. de Cabrils s/n, 08348 Cabrils (Barcelona).*<sup>2</sup>*UPV-COMAV, Camino de Vera s/n, 46022 Valencia.*

El virus del mosaico del pepino (CMV) es uno de los virus mas ampliamente distribuido en el mundo. Es transmitido de manera no persistente por más de 75 especies de áfidos y capaz de infectar a más de 1000 especies de plantas. Posee un genoma tripartito y puede hospedar un RNA satélite que puede alterar los síntomas producidos por el virus.

La caracterización de un gran número de aislados de CMV ha permitido clasificarlos dentro de los grupos I y II con una identidad genómica entre ellos en torno al 75%. Dentro del grupo I se diferencian los subgrupos A y B con identidades genómicas comprendidas entre el 92-95%. El análisis de la población de diferentes aislados de CMV en España en la primera mitad de los años 90 demostró la presencia mayoritaria de aislados pertenecientes al grupo I y que los aislados pertenecientes al grupo II se localizaban fundamentalmente en el norte de España. No obstante, se ha observado que con cierta periodicidad se producen brotes epidémicos de la enfermedad como consecuencia de desequilibrios en la predominancia de ciertas variantes del virus, determinados por diversos aspectos, entre ellos la capacidad infectiva en relación con el huésped.

En este trabajo se presenta un estudio de la capacidad infectiva de aislados de CMV sobre dos huéspedes diferentes, tabaco y tomate. El ensayo comparativo se realiza mediante electroforesis en geles de poliacrilamida de extractos purificados de RNA de doble cadena (dsRNA), obtenidos a partir de mezclas infectivas estudiadas en diferentes ensayos de competitividad. Las mezclas consisten en parejas de aislados pertenecientes a los grupos IA, IB y II, ya que la distinta movilidad de sus respectivos dsRNAs permite obtener patrones de bandas claramente diferenciados, lo que hace posible comparar la predominancia de unos aislados respecto de otros.

**V-41****CARACTERIZACIÓN MOLECULAR Y DISCRIMINACIÓN MEDIANTE ANÁLISIS DEL TIPO RT-PCR-RFLP DE AISLADOS DEL VIRUS DEL BRONCEADO (TSWV) QUE ROMPEN LA RESISTENCIA DEL GEN *Sw-5* EN TOMATE****LÓPEZ, C.<sup>1</sup>, ARAMBURU, J.<sup>2</sup>, GALIPIENSO, L.<sup>2</sup>, SOLER-ALEIXANDRE, S.<sup>1</sup>, NUEZ, F.<sup>1</sup>**<sup>1</sup>UPV-COMAV, Camino de Vera s/n, 46022 Valencia.<sup>2</sup>IRTA, Crta. de Cabrils s/n, 08348 Cabrils (Barcelona).

El virus del bronceado del tomate (TSWV) causa cuantiosas pérdidas económicas en los cultivos hortícolas de España, siendo un factor limitante para la producción de especies tan importantes como tomate, pimiento o lechuga. En condiciones naturales, el TSWV se transmite mediante algunas especies de insectos de la familia *Thripidae*, pero debido a la dificultad que entraña su control mediante tratamientos químicos, la estrategia más eficaz para controlar la enfermedad del bronceado se basa en la utilización de híbridos resistentes. Una de las resistencias más utilizadas en tomate frente a la infección por TSWV la proporciona el gen *Sw-5* procedente de *Solanum peruvianum*, que ha demostrado ser muy estable en el tiempo y eficaz frente a distintas especies de tospovirus. La comercialización a partir del año 1995-1996 de híbridos de tomate que incorporaban el gen *Sw-5* mejoró considerablemente el rendimiento económico respecto a las variedades sensibles. Sin embargo, desde el año 2002 se ha detectado la presencia de aislados de TSWV capaces de romper la resistencia conferida por el gen *Sw-5*.

En este trabajo se presenta un estudio sobre la variabilidad molecular de los segmentos M (5 kb) y S (3 kb) de 20 aislados de TSWV, 10 de los cuales rompen la resistencia conferida por el gen *Sw-5*. A partir de aislados clonales multiplicados en *Datura stramonium* se obtuvieron mediante RT-PCR, los cDNAs correspondientes a ambos segmentos y se determinó su secuencia completa. La comparación de dichas secuencias permitió diferenciar los aislados mediante análisis del tipo RT-PCR-RFLP, debido a la presencia de un punto de corte específico para la enzima de restricción *Xba* I únicamente presente en la secuencia de los aislados que rompen la resistencia y de un punto de corte específico para la enzima de restricción *Hind* III sólo en la secuencia de los aislados que no rompen la resistencia.

## V-42

**INFLUENCIA DE LAS CONDICIONES DE MADURACION EN LOS EFECTOS DE LOS VIRUS DEL ENROLLADO DE LA VID EN EL CULTIVAR ALBARIÑO****CABALEIRO, C.<sup>1</sup>, ENRIQUEZ, M.<sup>1</sup>, GARCÍA-BERRIOS, J.<sup>1</sup>, PEREIRA, S.<sup>2</sup>, SEGURA, A.<sup>2</sup>***Departamentos de Producción Vexetal<sup>1</sup> y Fisioloxía Vexetal<sup>2</sup>. Universidade de Santiago de Compostela, Campus Universitario s/n, 27002 Lugo. E-mail: pvcabsob@lugo.usc.es*

Desde 1992 se han evaluado los efectos del *Grapevine leafroll associated virus 3* (GLRaV-3) en el cultivar Albariño en Rías Baixas. Las alteraciones fisiológicas que induce el virus dan lugar a retrasos en la maduración y por tanto a mostos con menor contenido en azúcares solubles y mayor acidez que los de las cepas libres de virus. Los primeros datos apuntaban a que en los años con condiciones ambientales poco favorables a la maduración de la uva, los efectos del virus eran mayores.

Se han calculado los índices de Winkler que permiten determinar las condiciones de maduración en una zona y año concreto para relacionarlas con los efectos del virus. Se dispone de datos de 6 cosechas (1992-1994 y 2003-2005) en una parcela en Meaño (Pontevedra) dentro de la subzona de "O Salnés" de la D.O. Rías Baixas y de 6 cosechas consecutivas (2000-2005) en una parcela en plena producción en Goian (Pontevedra) dentro de la subzona "O Rosal". En esta última se ha detectado, en plantas asintomáticas, la presencia de GLRaV-2, por lo que se dispone de los primeros datos sobre los efectos de este virus del enrollado que hoy se sabe que tiene una incidencia casi tan alta como el GLRaV-3 en muchas zonas y que ha sido recientemente excluido de la normativa que regula la producción de planta certificada de vid.

El GLRaV-3 da lugar, casi todos los años y en las dos fincas estudiadas, a una caída de entre 1 y 2 °Brix en el contenido en azúcar y un incremento de 0,5 a 1,5 g/L de tartárico en el mosto. Los efectos son mayores a medida que pasan los años y aunque no se detectan interacciones entre virus y año, como las variaciones en los parámetros de calidad varían considerablemente de un año a otro en función de las condiciones ambientales y el nivel de cosecha, algunos años, los mostos de las plantas virosadas no alcanzarían los mínimos de calidad exigidos. El considerable aumento de la producción de Albariño en la D.O. Rías Baixas hace que las bodegas sean cada vez más exigentes en la calidad de la uva y por tanto, algunos años (2002, 2004), la disminución en el contenido en azúcar puede dar lugar a rechazo de las partidas o a disminución importante del precio.

La ausencia de síntomas de enrollado en las plantas de Albariño con GLRaV-2 se corresponde con mostos con características semejantes a los de las plantas sanas, para todos los parámetros y todas las cosechas evaluadas.

## V-43

**APLICACIÓN DE LA TÉCNICA DEL *EcoTILLING* EN UNA COLECCIÓN DE GERMOPLASMA DE MELÓN Y ESPECIES AFINES (*Cucumis* sp.)**

NIETO, C.<sup>1,3</sup>, DALMAIS, M.<sup>3</sup>, PIRON, F.<sup>3</sup>, MARCO, C.F.<sup>4</sup>, MORIONES, E.<sup>4</sup>, GÓMEZ-GUILLAMÓN, M.L.<sup>4</sup>, GARCÍA-MAS, J.<sup>2</sup>, ARANDA, M.A.<sup>1</sup>, BENDAHMANE, A.<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Centro de Edafología y Biología Aplicada del Segura (CEBAS)-CSIC, Apdo. Correos 164, 30100 Espinardo (Murcia). E-mail: m.aranda@cebas.csic.es

<sup>2</sup>Departament de Genètica Vegetal, Laboratori de Genètica Molecular Vegetal CSIC-IRTA, Carretera de Cabriels s/n, 08348 Cabriels (Barcelona).

<sup>3</sup>Unité de Recherche en Génomique Végétale (INRA/CNRS/UEVE) 2, rue Gaston Crémieux CP 5708, 91057 Evry Cedex, Francia

<sup>4</sup>Estación Experimental La Mayora (EELM)-CSIC, 29750 Algarrobo-Costa (Málaga).

El *EcoTILLING* es una técnica basada en el *TILLING* (*T*argeted *I*nduced *L*ocal *L*esions *I*n *G*enomes) empleada para detectar polimorfismos de un solo nucleótido (Single Nucleotide Polymorphism, SNP) en colecciones de genotipos. Con respecto a otras técnicas empleadas para la detección de SNPs, el *EcoTILLING* tiene un alto rendimiento y un bajo coste. En este trabajo, el *EcoTILLING* ha sido puesto a punto y aplicado por primera vez en una colección de *Cucumis* spp. con el objetivo de analizar la variabilidad del gen que codifica el factor 4E de iniciación de la traducción en eucariotas (eIF4E). El factor eIF4E es responsable de la resistencia del melón al Virus de las manchas necróticas del melón (*Melon necrotic spot virus*, MNSV). La colección de entradas de *Cucumis* spp. utilizada fue previamente caracterizada mediante un escrutinio fenotípico con respecto a su susceptibilidad a MNSV y a otros virus.

A partir de la secuencia del DNA genómico de *eIF4E* de melón se diseñaron varios iniciadores sobre las regiones no codificantes del gen para caracterizar sus 5 exones. El análisis de 120 entradas de *Cucumis* spp. permitió identificar 9 haplotipos diferentes, con polimorfismos solamente en los exones 1 y 5. Noventa y siete entradas, es decir, la mayoría, presentaron el mismo haplotipo que el de referencia. Veintitrés entradas tuvieron un haplotipo distinto al de referencia. Todas las entradas que resultaron resistentes a MNSV en la evaluación fenotípica correspondieron al haplotipo H.1, que contiene un SNP en la posición 683 del cDNA; asimismo, H.1 no incluye ninguna entrada que no sea resistente a MNSV. Es decir, existe una correlación perfecta entre pertenencia a H.1 y resistencia a MNSV. Por el contrario, no se pudo observar ninguna clara correlación entre haplotipos y resistencia/susceptibilidad a virus distintos de MNSV.



## V-44

**FUENTES DE RESISTENCIA A *Tomato chlorosis virus* (ToCV) EN TOMATE****GARCÍA-CANO, E.<sup>1</sup>, FERNÁNDEZ-MUÑOZ, R.<sup>2</sup>, MORIONES, E.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Lab. Virología Vegetal, <sup>2</sup>Depto. Mejora Vegetal; Estación Experimental "La Mayora", CSIC, 29750 Algarrobo-Costa (Málaga). E-mail: moriones@eelm.csic.es.

El cultivo de tomate (*Solanum lycopersicum*) se ve afectado por un buen número de enfermedades causadas por virus que originan elevadas pérdidas económicas en todo el mundo. En España, el tomate es el cultivo hortícola de mayor importancia económica y, en las zonas de horticultura intensiva del sur y sudeste peninsular, las virosis son el factor limitante de la producción. En los últimos años, se ha manifestado una nueva enfermedad que es un caso típico de enfermedad emergente: el amarilleo transmitido por mosca blanca. Esta enfermedad está causada por especies de closterovirus (familia *Closteroviridae*) del género *Crinivirus* y, en España, se ha demostrado la implicación de *Tomato chlorosis virus* (ToCV) en su etiología. Hasta el momento no se ha descrito ninguna fuente de resistencia a esta enfermedad. El objetivo del presente estudio ha sido la búsqueda de fuentes de resistencia genética a ToCV en tomate. Para ello, se evaluaron durante tres años sucesivos en el ciclo de primavera-verano, hasta un total de 306 entradas de tomate y de especies silvestres de *Solanum* secc. *Lycopersicon*, en las que se analizó la incidencia y la gravedad de síntomas de la enfermedad producida por ToCV en condiciones de infección natural bajo invernadero. Plantas seleccionadas de los materiales interesantes por su resistencia o susceptibilidad fueron autofecundados y sus progenies evaluadas para verificar si la respuesta observada tenía un componente ambiental o genético. En los casos en los que había un componente genético se realizaron inoculaciones de ToCV en condiciones controladas y posterior estudio de desarrollo de síntomas y acumulación de virus mediante diagnóstico por hibridación molecular de improntas de tejidos. Se encontraron diversos grados de resistencia en entradas de *S. lycopersicum*, *S. chmielewskii*, *S. peruvianum* y *S. chilense*. Las dos entradas más prometedoras fueron EELM-821 (*S. chmielewskii*) y EELM-802 (una línea derivada de un cruce *S. lycopersicum* x *S. peruvianum*). EELM-821 posee una resistencia intermedia, con aparición de síntomas muy leves y baja acumulación viral a fechas tardías. EELM-802 posee resistencia completa a ToCV, sin aparición de síntomas ni acumulación del virus. El siguiente paso a seguir será el estudio de la genética de estas dos fuentes de resistencia.

## V-45

**CONTROL GENÉTICO DE LA RESISTENCIA A *Tomato yellow leaf curl virus* EN UNA LÍNEA DE TOMATE CON RESISTENCIA A BEGOMOVIRUS BIPARTITOS DE BRASIL**

**GARCÍA-CANO, E.<sup>1</sup>, RESENDE, R.O.<sup>2</sup>, BOITEUX, L.S.<sup>3</sup>, GIORDANO, L.B.<sup>3</sup>, FERNÁNDEZ-MUÑOZ, R.<sup>1</sup>, MORIONES, E.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>E.E. "La Mayora", CSIC, 29750 Algarrobo-Costa (Málaga). E-mail: moriones@eelm.csic.es

<sup>2</sup>Universidade de Brasília, CEP 70.910-970, Brasília-DF, Brasil.

<sup>3</sup>Centro Nacional de Pesquisa de Hortaliças (CNPq), Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA Hortaliças), CP 218, 70359-970 Brasília-DF, Brasil.

La enfermedad del rizado amarillo del tomate (TYLCD) constituye un factor limitante para la producción de tomate (*Solanum lycopersicum*) en muchas zonas del mundo. Está causada por diversos begomovirus (género *Begomovirus*, familia *Geminiviridae*) transmitidos por la mosca blanca *Bemisia tabaci*, la mayoría monopartitos, siendo el más extendido, *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV). El empleo de variedades resistentes es la estrategia más deseable para el control de TYLCD. La línea de mejora de *S. lycopersicum* 'TX468-RG', derivada del híbrido comercial Tyking, ha sido identificada como una buena fuente de resistencia a begomovirus bipartitos presentes en Brasil y en un cruce con la variedad susceptible Ohio 8245, se ha observado herencia monogénica y recesiva (Giordano et. al, 2005. Euphytica 143:27-33).

En este trabajo hemos demostrado la resistencia de esta línea también a begomovirus monopartitos causantes de TYLCD presentes en la cuenca mediterránea, TYLCV entre otros, tanto por inoculación con el vector natural *B. tabaci* como por medio de *Agrobacterium tumefaciens* (agroinoculación) empleando clones infectivos de los virus. En este estudio hemos realizado un análisis detallado del control genético de la resistencia de TX 468-RG a TYLCV. Para ello se empleó una familia genética del cruce Ohio 8245 x TX468-RG consistente de parentales, F<sub>1</sub>, F<sub>2</sub> y los retrocruces F<sub>1</sub> x Ohio 8245 (BC<sub>1</sub>S) y F<sub>1</sub> x TX 468-RG (BC<sub>1</sub>R). Las plantas de esta familia se enfrentaron a TYLCV mediante agroinoculación. Se evaluó la gravedad de síntomas de TYLCD por observación y la acumulación de virus por hibridación molecular de improntas de tejido joven.

El análisis cualitativo indicaba un control recesivo de la resistencia, monogénico si se estudiaba la segregación de la F<sub>2</sub> pero no en el caso del BC<sub>1</sub>R. Puesto que no era posible ajustar el modelo a dos genes recesivos, se estudiaron los resultados mediante un análisis de genética cuantitativa. Las distribuciones de frecuencias en F<sub>2</sub> y BC<sub>1</sub>R para ambos caracteres eran bimodales, lo que sugería la implicación de un gen mayor. Análisis detallados implicaban 1-2 genes en la acumulación de virus y en la expresión de síntomas. Se postula que la resistencia en el cruce Ohio 8245 x TX 468-RG esté gobernada por un gen mayor con interacciones epistáticas con, al menos, un gen menor de forma que cuando ambos están en heterocigosis se produce reducción de síntomas y de acumulación viral debido a los componentes dominantes x dominantes negativos.

## V-46

**UNA PEQUEÑA REGIÓN DEL GENOMA DE *Tomato yellow leaf curl virus* CANDIDATA A CONTENER EL DETERMINANTE DE AVIRULENCIA PARA LA RESISTENCIA DEL TOMATE SILVESTRE *Solanum habrochaites*****TOMÁS-GARCÍA, D.<sup>1</sup>, FERNÁNDEZ-MUÑOZ, R.<sup>2</sup>, ABAD, J.<sup>3</sup>, MORIONES, E.<sup>1</sup>**<sup>1</sup>Lab. Virología, <sup>2</sup>Depto. de Mejora Vegetal, Estación Experimental "La Mayora", CSIC, 29750 Algarrobo-Costa (Málaga). E-mail: moriones@eelm.csic.es<sup>3</sup>Zeta-Seeds, 04710 Sta. María del Águila (Almería).

El uso de resistencia genética es actualmente el mecanismo de control más eficaz frente a la enfermedad de rizado amarillo del tomate (TYLCD) causada por begomovirus (género *Begomovirus*, familia *Geminiviridae*). Sin embargo, la naturaleza dinámica de las poblaciones virales hace necesaria la búsqueda de nuevas fuentes de resistencia en previsión de una eventual superación de las utilizadas. Las nuevas resistencias deben ser puestas a prueba para determinar si su rango de acción es suficientemente amplio como para tener éxito en condiciones naturales. Durante esta fase de caracterización de la resistencia, el uso de variantes virales recombinantes o de quimeras artificiales, además de permitir comprobar su fortaleza, puede ayudar a comprender los mecanismos de interacción entre el virus y el huésped.

En este estudio se ha evaluado el rango de resistencia a virus asociados con TYLCD de dos entradas de *Solanum habrochaites* (antiguo *Lycopersicon hirsutum*), EELM-388 y EELM-889, que han mostrado resistencia a la cepa tipo de *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV) tanto por infección a través de su vector natural *Bemisia tabaci* como vía *Agrobacterium tumefaciens* portadora de una copia infectiva de este virus. Para ello, estas entradas se inocularon con aislados de los diferentes tipos virales asociadas a TYLCD descritos en la zona mediterránea: la cepa ES de *Tomato yellow leaf curl Sardinia virus* (TYLCSV-ES), la cepa tipo de TYLCV, la cepa Mld de TYLCV (TYLCV-Mld), *Tomato yellow leaf curl Málaga virus* (TYLCMaIV) (siendo éste un recombinante entre TYLCSV-ES y TYLCV-Mld) y *Tomato yellow leaf curl Axarquia virus* (TYLCAxV) (siendo éste un recombinante entre TYLCSV-ES y TYLCV).

Tanto EELM-388 como EELM-889 mostraron resistencia (no detectándose síntomas ni acumulación viral) a TYLCV y TYLCAxV, mientras que fueron tolerantes (con acumulación viral pero sin síntomas) a TYLCSV, TYLCV-Mld y TYLCMaIV. A la vista del comportamiento de los diferentes tipos virales durante las inoculaciones, la comparación de sus secuencias ha permitido asociar una pequeña región genómica de TYLCV (también presente en TYLCAxV) con la incapacidad de infectar las dos entradas de *S. habrochaites* resistentes. Dicha región proviene de un intercambio genético con *Tomato leaf curl virus* (TLCV), otro begomovirus que también afecta a tomate, y comprende la mitad 5' terminal de la región no codificante IR y la parte 5' terminal del marco abierto de lectura de la proteína Rep. Por tanto, esta región, que se ha descrito que tiene un papel fundamental en los reconocimientos asociados con los procesos de replicación viral, es candidata a contener el determinante de avirulencia de TYLCV para las resistencias estudiadas.

**V-47****TSWV EN CULTIVOS DE PIMIENTOS RESISTENTES DE ALMERIA**

**SEGUNDO, E.<sup>1</sup>, CARMONA, M.P.<sup>1</sup>, CASTILLO, P.<sup>2</sup>, HERRERO DE HARO, R.I.<sup>3</sup>, RODRÍGUEZ-RODRÍGUEZ, M.D.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>CIFA (IFAPA-CICE), La Mojonera (Almería).

<sup>2</sup>Laboratorio de Producción y Sanidad Vegetal de Almería (Consejería de Agricultura, JA),

<sup>3</sup>CABASC, S.C.A. (Balanegra, Almería). Email: eduardosegundo@teleline.es.

La resistencia en pimientos comerciales (*Capsicum* spp.) a *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) procede de un único gen dominante llamado *Tsw*, que induce una reacción de hipersensibilidad que limita la dispersión del virus.

En el año 2004 se describió en España la presencia natural, en cultivos de Almería, de una nueva cepa de TSWV que rompe la resistencia conferida por el gen *Tsw* introgresado en *Capsicum* spp.

Hasta el momento no se han encontrado diferencias moleculares ni biológicas entre la “cepa común” (la hasta ahora habitual en la zona), que no infecta pimientos con el gen *Tsw*, y la que rompe la resistencia, por lo que para identificarlas se ha de recurrir a bioensayos de inoculación mecánica en pimientos portadores y no portadores del gen de resistencia.

Para comenzar con un estudio de la prevalencia de esta nueva raza en los cultivos de Almería se han analizado muestras de plantas de pimiento (recolectadas a lo largo de más de dos años) con síntomas atribuibles a virus de 126 invernaderos de Almería: 38 cultivos de pimientos sensibles y 88 de pimientos resistentes, todos ellos resultaron positivos para TSWV por ELISA.

Entre los pimientos resistentes, 31 cultivos presentaban un porcentaje de incidencia estimado del 10% al 100%, lo que hace suponer que no son escapes de la resistencia sino que presentan la nueva cepa.

Además, los bioensayos de resistencia realizados a 9 aislados de TSWV de distintos cultivos de pimiento (3 resistentes y 6 sensibles) han mostrado resultados contundentes: 8 aislados presentaban la cepa viral que rompe la resistencia, ya que en pocos días desarrollaron la enfermedad tanto los pimientos sensibles, inoculados mecánicamente, como los resistentes, no apareciendo en ninguno de ellos reacción de hipersensibilidad. El noveno aislado manifestó la “cepa común” produciendo reacción de hipersensibilidad sin pasar a infección sistémica en los 5 pimientos resistentes inoculados, mientras que los pimientos sensibles rápidamente adquirieron infección sistémica, desarrollando la enfermedad.

Estos datos sugieren que la nueva raza de TSWV está ampliamente distribuida en los cultivos almerienses y coexiste con la cepa común.

**V-48****VARIABILIDAD MOLECULAR DE *Southern bean mosaic virus* (SBMV) EN ESPAÑA Y MARRUECOS****CARMONA, M.P., SEGUNDO, E. JANSSEN, D. CUADRADO, I.M.**

*CIFA La Mojonera (IFAPA-CICE), Autovía del Mediterráneo, Km 420, 04745 La Mojonera (Almería). Email: eduardosegundo@teleline.es*

*Southern bean mosaic virus* (SBMV), perteneciente al género Sobemovirus, fue descrito por primera vez, infectando cultivos de judía verde, en invernaderos de las principales zonas productoras de España (Almería y Granada) en 2002 y de Marruecos (Agadir) en el 2004.

La herencia de la resistencia a SBMV se ha encontrado que está gobernada por un único gen. Las plantas que presentan el alelo dominante son susceptibles a una infección de tipo lesión local, que no causa daño en la planta y puede ser considerada comercialmente resistente, mientras que plantas homocigotos recesivos son susceptibles de una infección sistémica que causa enfermedad. La intensidad de esta enfermedad está influenciada por la cepa del virus, por la variedad de judía y por las condiciones ambientales.

En este contexto, el estudio de la diversidad de cepas de SBMV presentes en cultivos de judías de España y Marruecos es un paso previo para seleccionar el aislado o aislados a utilizar en programas de mejora.

Es por ello que se han caracterizado genéticamente 32 aislados de SBMV de diferentes variedades de judía, recolectados entre los años 2000 y 2004, de distintos cultivos de Almería, Granada y Agadir. Se comenzó realizando la amplificación por RT-PCR de un fragmento del genoma de unos 900 pb de la RdRp de 10 aislados, comprobándose la presencia de 2 grupos claramente diferenciados y con una similitud nucleotídica de aproximadamente el 85%, mientras que dentro de cada uno de estos grupos la identidad era próxima al 100%. Entre los aislados de Marruecos se podían distinguir las dos razas genéticas identificadas mientras que en los aislados españoles solo se identificó una. Posteriormente se diseñó un análisis RFLP para la identificación rápida de las dos razas.

## V-49

**INFLUENCIA DE DIFERENTES FACTORES EN LA TRANSMISIÓN POR INOCULACIÓN MECÁNICA ARTIFICIAL DEL VIRUS DEL MARCHITAMIENTO DEL HABA-1 (BBWV-1)****SAGRARIO, J., ESCRIBU, F., LUIS-ARTEAGA, M.**

*Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria de Aragón (CITA), Apartado 727, 50080 Zaragoza. E-mail: jsagrario@aragon.es*

El virus del marchitamiento del haba 1 (BBWV-1) es la especie tipo del género *Fabavirus*, familia *Comoviridae*. Se transmite de forma no persistente por una veintena de especies de pulgones. Posee un rango de huéspedes amplio, que incluye numerosas especies hortícolas pertenecientes a las familias de las fabáceas, solanáceas, asteráceas y apiáceas, entre otras. En España se ha encontrado infectando pimiento en Badajoz, Castellón, Huesca, León, Logroño, Murcia, Navarra, Valencia y Zaragoza, de forma aislada o en infecciones mixtas con CMV, AMV y PVY. En esta especie produce mosaicos foliares, mosaico y alteraciones del color en frutos que impiden su comercialización. Su incidencia es variable entre zonas y años.

La transmisión por inoculación mecánica de este virus sobre especies indicadoras presenta problemas, ya que la reacción de éstas es irregular. Además, se desconoce la existencia de resistencia en pimiento, por lo que se ha puesto a punto un método de inoculación del virus que sea utilizable en la búsqueda de material resistente. Para ello, a partir del aislado Ben de BBWV-1 procedente de Benicarló (Castellón), se estudió la influencia de varios factores ambientales y de inoculación en la frecuencia de infección, en la sintomatología, y en la velocidad de aparición de síntomas sistémicos en pimiento (cvs. Doux des Landes y Yolo Wonder) y en una gama de especies indicadoras.

Se observaron diferencias en el número de plantas infectadas en función de la especie utilizada como fuente de inóculo. Las frecuencias de infección más elevadas se consiguieron con inóculo procedente de *Vigna unguiculata* y *Petunia hybrida*, mientras que las menores se obtuvieron con el de pimiento. Por tanto, no conviene utilizar pimiento para la caracterización biológica de aislados, aunque sí puede utilizarse para evaluación de material de pimiento. El estado vegetativo de las plantas, la temperatura e intensidad de luz de crecimiento, y el pH del inóculo produjeron variaciones significativas en la velocidad de aparición de los síntomas en pimiento. Las condiciones idóneas para la inoculación mecánica de BBWV-1 en pimiento fueron: plantas en estado vegetativo entre 2 y 6 hojas verdaderas, incubadas a 25 °C y 80 PAR (radiación fotosintéticamente activa,  $\mu\text{mol CO}_2/\text{m}^2\text{s}$ ).

**V-50****CARACTERIZACIÓN BIOLÓGICA Y MOLECULAR DE AISLADOS DEL VIRUS DE LAS VENAS AMARILLAS DEL PEPINO (CVYV)****GALIPIENSO, L., ARAMBURU, J., DEL CUETO-GINZO, A.***Institut de Recerca y Tecnologia Agroalimentàries (IRTA), Ctra. Cabrils s/n, 08348 Cabrils (Barcelona).*

El virus de las venas amarillas del pepino (*Cucumber vein yellowing virus*, CVYV) es el agente causal de una enfermedad que afecta a cucurbitáceas (pepino, melón calabacín y sandía). Los síntomas se caracterizan por la aparición de mosaico y clorosis en las nerviaduras de las hojas, raquitismo de la planta y necrosis y deformaciones del fruto, que hacen que éste no tenga valor comercial. CVYV se encuentra presente en varios países de la cuenca mediterránea y fue detectado en España por primera vez en el año 2001. Actualmente se comercializan híbridos de pepino que incorporan resistencias a CVYV, aunque este virus sigue produciendo importantes pérdidas en la producción de este cultivo, así como en melón y sandía. CVYV pertenece al género *Ipomovirus*, familia *Potyviridae*, es transmitido por mosca blanca (*Bemisia tabaci*) de manera semipersistente, su genoma es de cadena simple de RNA con un tamaño de 9.734 nucleótidos, y carece de la región que codifica para la proteínasa HC-Pro (Helper-Component).

En este trabajo se ha realizado una caracterización biológica y molecular de tres aislados de CVYV: los aislados CVYV-Jor y CVYV-Isr correspondientes a un aislado jordano e israelita respectivamente (cedidos por JJ López-Moya) y el aislado CVYV-AL02 recogido en Almería en otoño del 2002. Se han podido observar diferencias en la agresividad de los tres aislados en híbridos de pepino y melón, siendo más agresivo el aislado CVYV-Jor que el resto. Este aislado inducía también intensos síntomas de clorosis nervial y mosaico en todos los híbridos comerciales de pepino ensayados con resistencia al virus.

Los estudios genéticos realizados en un fragmento de 408 nucleótidos correspondientes a la región carboxilo terminal de la proteína de cubierta (CP) y de un fragmento de 892 correspondiente a la proteína 1b (P1b) (derivada por procesamiento de la P1) revelaron identidades nucleotídicas en torno al 95 y 92% respectivamente. Estudios realizados recientemente parecen demostrar que la proteína 1b tiene capacidad de supresión del mecanismo de silenciamiento génico postranscripcional en plantas de *Nicotiana benthamiana* (JJ López Moya, comunicación personal). En este trabajo también se ha intentado determinar si las diferencias moleculares encontradas en la región correspondiente a P1b de los aislados de CVYV van acompañadas de diferencias en la capacidad de supresión de silenciamiento.

**V-51****IDENTIFICACIÓN DE LOS DETERMINANTES DE PATOGENICIDAD DEL VIRUS DEL MOTEADO SUAVE DE LA PÁPRIKA (PaMMV) EN *N. tabacum* cv Sansumg**

**BONILLA-MARTÍNEZ, A., MORAGA-QUINTANILLA, A., SERRA-YOLDI, M.T., GARCÍA-LUQUE, I.**

*Centro de Investigaciones Biológica, CSIC, c/ Ramiro de Maeztu 9, 28040 Madrid. E-mail: igarcia@cib.csic.es*

El tobamovirus del moteado suave de la paprika (PaMMV) es el agente causal de enfermedades que afectan a cultivos de pimiento en distintas partes del mundo. Estudios llevados a cabo en nuestro grupo han establecido que PaMMV es incapaz de establecer una infección sistémica en plantas de tabaco cv. Sansumg.

Con el fin de identificar el o los determinantes de patogenicidad en este huésped, hemos determinado la secuencia completa del genoma de la cepa holandesa (aislado P1.1) de PaMMV, y obtenido clones de cDNA que contienen su genoma, a partir de los cuales se pueden obtener transcritos infectivos virales. En algunos de ellos hemos introducido el gen delator de la GFP, con el fin de efectuar el seguimiento de la infección en la planta. Asimismo, hemos construido diversos genomas quimeras sustituyendo en el genoma de PaMMV las regiones codificadoras de cada una de las proteínas virales correspondientes al virus del mosaico del tabaco (TMV).

Hemos establecido que todos los virus inoculados –parentales y quimeras- infectan de forma sistémica plantas de *Nicotiana benthamiana*, si bien las tasas de acumulación viral, y de movimiento local y sistémico dependen de cada uno de los virus.

Por el contrario, sólo los virus TMV y las quimeras que contienen las regiones correspondientes a la proteína 183K (replicasa) o de cubierta efectúan la invasión sistémica de las plantas de *Nicotiana tabacum* cv. Sansumg. Los datos revelan que cualquiera de las dos proteínas pueden promover el movimiento sistémico en este huésped.



**V-52****LA TEMPERATURA NO ES UN FACTOR PREDOMINANTE EN LA EXPRESIÓN DEL PARARETROVIRUS DEL ACLARAMIENTO DE VENAS DEL TABACO (TVCV)****RUIZ, L., ROMERO, J.**

*Departamento de Protección vegetal, INIA, Carretera de La Coruña Km 7,0, 28040 Madrid.  
E-mail: romero@inia.es*

Recientemente se han descrito numerosas secuencias de pararetrovirus integradas en el genoma de diversas plantas de importancia económica, secuencias que han sido denominadas pararetrovirus endógenos (EPRVs). Los EPRVs pueden ser componentes neutrales del genoma de las plantas o pueden ser infecciosos, expresando partículas virales y causando enfermedades en plantas, tal y como sucede con el virus del estriado del plátano (*Banana streak virus*, BSV), el virus del aclaramiento de las venas de petunia (*Petunia vein clearing virus*, PVCV) y el virus del aclaramiento de las venas del tabaco (*Tobacco vein clearing virus*, TVCV).

Trabajos realizados en varios laboratorios sugieren que la activación de los EPRVs es debido a diversos estreses que sufren las plantas durante su cultivo como: sequía, heridas, altas y bajas temperaturas etc., pero ninguno de estos factores ha sido estudiado en detalle.

En este trabajo analizamos el efecto de la temperatura en la expresión episomal del TVCV en plantas de *Nicotiana edwardsonii*, que tiene integrado en su genoma la secuencia del virus. Plantas de *N. edwardsonii* fueron mantenidas en cámaras de cultivos con 16/8 h de luz/oscuridad a 32-35 °C ó a 12-15 °C. Cada semana se evaluó la posible presencia de síntomas en las hojas y a los dos meses se realizó la extracción de ácidos nucleicos totales para analizar la posible expresión del virus mediante "Northern y Southern blots", usando como sonda el genoma completo del TVCV marcado con P<sup>32</sup> ó Dioxigenina.

En todos los análisis realizados sólo observamos la presencia del producto marcado asociado al DNA genómico, sin detectar la posible presencia de DNA viral, lo que nos permite concluir que la temperatura no es un factor determinante en la expresión episomal del TVCV.

## V-53

**LA PROTEÍNA DE MOVIMIENTO DEL VIRUS DEL MOSAICO DE LA ALFALFA ES FUNCIONALMENTE INTERCAMBIABLE PARA EL TRANSPORTE A CORTA Y LARGA DISTANCIA POR EL CORRESPONDIENTE GEN DE VIRUS PERTENECIENTES A LOS GÉNEROS: *Tobamovirus*, *Comovirus*, *Bromovirus*, *Ilarvirus* Y *Cucumovirus***

**FAJARDO, T.V.M.<sup>1</sup>, SÁNCHEZ-NAVARRO, J.A.<sup>2</sup>, PALLÁS, V.<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>*Embrapa Uva e Vinho, Rua Livramento 515. Bento Gonçalves –RS- Brasil CEP 95.700-000. E-mail: thor@cnpuv.embrapa.br*

<sup>2</sup>*Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas (CSIC-UPV, Av. de los Naranjos s/n., 46022 Valencia. E-mail: jesanche@ibmcp.upv.es*

Una vez iniciada la infección, los virus de plantas necesitan ser transportados hacia las células adyacentes a través de los plasmodesmos para una vez invadido el sistema vascular, alcanzar las partes distales de la planta. Para realizar esta función, los virus de plantas codifican una o varias proteínas denominadas de movimiento (MP). La mayoría de MPs virales se han agrupado dentro de la Superfamilia 30K o familia de MPs, pertenecientes a 20 géneros virales, que están relacionadas con la MP del *virus del mosaico del tabaco*. La posibilidad de que las MPs de la familia 30K realicen su función a través de un mecanismo similar, convertiría a estas moléculas en candidatos excelentes para diseñar estrategias de control de amplio espectro.

*El virus del mosaico de la alfalfa* (AMV) es el miembro tipo del género *Alfamovirus* dentro de la familia *Bromoviridae*. Su genoma está constituido por tres RNAs de polaridad positiva. Los RNAs monocistrónicos 1 y 2 codifican las proteínas P1 y P2 del complejo de la RNA polimerasa. El RNA 3 contiene dos pautas de lecturas abierta que codifican la MP y la proteína de cubierta (CP), la cual es expresada a través de un RNA subgenómico o RNA 4. Análisis previos pusieron de manifiesto que el gen de la MP de AMV es funcionalmente intercambiable para el transporte entre células, o transporte a corta distancia, por el correspondiente gen de los virus: virus del mosaico del tabaco, virus del mosaico del chícharo, virus del mosaico del pepino, virus del mosaico del bromo y virus de las manchas necróticas de los prunus (Sánchez-Navarro y col., 2006; Virology 341: 66-73). En el presente trabajo hemos analizado la capacidad de las diferentes MPs virales de mediar el transporte de AMV a las partes distales de la planta, o transporte a larga distancia. Los resultados obtenidos han puesto de manifiesto que todas las MPs virales ensayadas son funcionalmente intercambiables para el transporte a larga distancia de AMV sugiriendo la utilización de una misma ruta de translocación intercelular.

## V-54

**CAMBIOS EN EL TRANSCRIPTOMA DE LOS CÍTRICOS INDUCIDOS POR DOS AISLADOS DEL VIRUS DE LA TRISTEZA DE LOS CÍTRICOS CON DISTINTA VIRULENCIA**

**GANDÍA, M.<sup>1</sup>, CONESA, A.<sup>1</sup>, ANCILLO, G.<sup>1</sup>, GÓMEZ, G.<sup>2</sup>, PALLÁS, V.<sup>2</sup>, HERNÁNDEZ, C.<sup>2</sup>, FLORES, R.<sup>2</sup>, DURÁN-VILA, N.<sup>1</sup>, MORENO, P.<sup>1</sup>, GUERRI, J.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>*Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias, Apartado Oficial, 46113 Moncada (Valencia). E-mail: mgandia@ivia.es.*

<sup>2</sup>*Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas UPV-CSIC, Avda. de los Naranjos s/n, 46022 Valencia.*

Los virus son parásitos obligados del huésped y dependen de la maquinaria celular de éste para completar su ciclo biológico. La infección sistémica de la planta requiere una serie de interacciones compatibles entre el huésped y el virus en un proceso que incluye la penetración del virus, la expresión y replicación del genoma viral en las células infectadas y el movimiento del virus célula a célula y a larga distancia a través del sistema vascular. En el curso de estos procesos se inducen en la planta cambios fisiológicos y citológicos que pueden dar lugar a síntomas. Las plantas se protegen frente a la infección por virus usando diferentes mecanismos, como aquellos mediados por genes de resistencia o por silenciamiento génico postranscripcional. Con objeto de analizar los cambios en la expresión génica de lima Mexicana inducidos por la infección de un aislado de CTV poco agresivo (T385) o uno muy virulento (T-305), se ha utilizado una micromatriz de cDNA que contiene 12.672 ESTs correspondientes a 6875 unigenes (<http://citrusgenomics.ibmcp-ivia.upv.es>). La infección por el aislado T305 indujo cambios significativos ( $P < 0.001$ ) en la expresión de 337 genes, mientras que no se observaron cambios en plantas infectadas por el aislado T-385. De los 337 genes, 145 no mostraron similitud con otros genes conocidos y los restantes se clasificaron en 7 categorías funcionales. La mayoría de los genes afectados (28%) han sido implicados previamente con la respuesta a estrés biótico y abiótico. Los cambios detectados en la expresión mediante el análisis con micromatrices se confirmaron en algunos casos mediante RT-PCR a tiempo real. La ausencia de cambios en la expresión génica de plantas inoculadas con el aislado asintomático T385 puede ser debida a que: i) los genes del huésped asociados con la replicación del genoma viral o con los movimientos célula a célula y a larga distancia no estén representados en la micromatriz. ii) los cambios de expresión sean pequeños o limitados a ciertas células y por tanto indetectables con el método usado en este trabajo. Los cambios en el transcriptoma producidos por el aislado sintomático T305 pueden ser de respuesta inespecífica a distintos tipos de estrés o, alternativamente, estar asociados con la expresión de síntomas y/o a mecanismos específicos de defensa de la planta frente al virus.

## V-55

**LAS CINCO PROTEÍNAS CODIFICADAS EN EL GENOMA DEL VIRUS DEL CRIBADO DEL MELÓN (MNSV) CONTROLAN LA REPLICACIÓN, EL MOVIMIENTO CÉLULA A CÉLULA, EL SILENCIAMIENTO GÉNICO Y LA INFECCIÓN SISTÉMICA****GENOVÉS, A., NAVARRO, J.A., PALLÁS, V.**

*Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas (IBMCP), UPV-CSIC, Avda. de los Naranjos s/n, 46022 Valencia. E-mail: agenoves@ibmcp.upv.es; janavarr@ibmcp.upv.es; vpallas@ibmcp.upv.es*

El virus del cribado del melón (*Melon necrotic spot virus*, MNSV) afecta esencialmente a plantas de melón, pepino y sandía ocasionando la aparición de manchas cloróticas en las hojas jóvenes que con el tiempo pasan a ser necróticas, dando el aspecto característico de cribado. Además, se manifiestan en otras partes vegetativas de la planta y en los frutos dando lugar a pérdidas de producción y calidad de los mismos. En los casos más graves la enfermedad puede provocar la muerte de la planta.

El MNSV se clasifica taxonómicamente dentro de la familia *Tombusviridae*, género *Carmovirus* (Brunt y col, 1996). Las partículas virales son isométricas con un diámetro de 30 nm (Hibi y Furuki, 1985) y están formadas por un único tipo de proteína de cubierta de 42 kDa. Presenta un genoma de RNA (gRNA) de aproximadamente 4,3 kb y polaridad positiva (Kishi, 1985). Este gRNA contiene hasta cinco pautas de lectura abierta (*open reading frames*, ORFs). En la ORF del extremo 5' se localiza una proteína de 29 kDa (p29) que termina en un codón ambar el cual podría ser leído a través para producir una proteína de 89 kDa (p89). En la región central del genoma hay dos pequeñas ORFs que codifican dos proteínas de 7kDa (p7A y p7B); el codón ambar en que acaba p7A podría ser obviado dando lugar a una proteína de 14 kDa (p14). La proteína 7A posee propiedades de unión a RNA mientras que la 7B presenta un dominio transmembrana funcional (Navarro *et al*, 2006), ambas características son consistentes con el modelo de transporte célula-célula propuesto para los *Carmovirus* (Marcos y col, 1999., Vilar y col, 2001.). La ORF del extremo 3' codifica la proteína de cubierta viral (CP) o p42.

En el presente trabajo, se ha estudiado la función de las proteínas codificadas en el genoma de MNSV. Para ello, a partir de un clon completo del gRNA del aislado MNSV-AI (pMNSV-AI) y de una construcción recombinante del mismo que expresa GFP (pMNSV-Δcp-GFP) se obtuvieron mutantes deficientes en la síntesis de las diferentes proteínas. La infectividad de los clones fue ensayada sobre plantas de melón. Los resultados revelaron que tanto p29 como p89 están implicados en la replicación del virus y que las proteínas p7A y p7B son suficientes para el movimiento local, siendo éstas capaces de complementar su función en trans. Por otro lado, hemos puesto de manifiesto que la CP, además de su papel estructural, participa en la determinación de la sintomatología y es prescindible en el movimiento local pero se requiere en el movimiento a larga distancia del virus. Además, se ha determinado la capacidad de p42 y p7B de retrasar el silenciamiento génico en experimentos de expresión transitoria sobre plantas *N. benthamiana* 16c (transgénicas que expresan GFP). Por último, la presencia de la CP favorece el movimiento local del virus en plantas de melón, de manera análoga al componente auxiliar de los potyvirus (HC-Pro), probablemente debido a su capacidad de supresión del silenciamiento.

## V-56

**ENSAYOS DE RESISTENCIA A ENFERMEDADES PARA EL REGISTRO O PROTECCION DE VARIEDADES HORTÍCOLAS****ELVIRA-RECUENCO, M., SANTOS, S., MOYANO, C.**

*Estación de Ensayos de Semillas y Plantas de Vivero, Dirección Técnica de Evaluación de Variedades y Laboratorio, Laboratorio de Sanidad, INIA-SGIT. Ctra. La Coruña, Km 7,5, 28040 Madrid. E-mail: sanvar@inia.es*

La Dirección Técnica de Evaluación de Variedades y Laboratorio (DTEVV) ubicada en INIA realiza entre otros trabajos los ensayos de identificación de variedades, preceptivos para el registro de variedades comerciales o para la protección de obtenciones vegetales, por encargo de la Oficina Española de Variedades Vegetales. Para ello, es necesario la determinación de la distinción, homogeneidad y estabilidad de las variedades lo cual engloba una serie de ensayos, entre los que se encuentran los de determinación de la resistencia a enfermedades que se realizan en el Laboratorio de Sanidad. En la actualidad, se realizan ensayos de resistencias en las especies tomate, pepino, melón, lechuga, judía y pimiento para diferentes enfermedades causadas por hongos, bacterias, virus y nematodos. Estos ensayos también se ofertan a las empresas de semillas que puedan estar interesadas en enviar muestras para conocer sus resistencias.

Los ensayos de resistencia se realizan utilizando como guía los protocolos desarrollados por la CPVO (Oficina Comunitaria de Variedades Vegetales) en los que se detallan las razas del patógeno, métodos de inoculación, condiciones ambientales, controles y en algunos casos evaluación e interpretación de síntomas. Estos protocolos, sin embargo, no están actualizados en ciertos patógenos y en otros la información no está lo suficientemente detallada, por lo que son adaptados según los distintos países, resultando diferentes métodos de evaluar la resistencia a enfermedades. El Laboratorio de Sanidad participa en un ensayo comparativo con Francia y Holanda en judía con las enfermedades *Colletotrichum lindemuthianum*, BCMV y *Pseudomonas savastanoi* pv. *phaseolicola*, y en tomate con *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*, ToMV y *Verticillium* para armonizar los protocolos utilizados y probar la efectividad de los distintos inóculos. El proyecto está mostrando diferencias relevantes entre países en evaluación e interpretación de síntomas de la enfermedad y ha detectado la necesidad de mejorar la caracterización de las razas de patógenos y la actualización con las nuevas razas que van apareciendo. Estos aspectos son de gran importancia para que la declaración de resistencia a una enfermedad en el Registro sea homogénea entre países. El proyecto se ampliará a otras especies y enfermedades en los próximos años.

## V-57

**IMPLICACIÓN DE LAS RUTAS DE SILENCIAMIENTO GÉNICO EN EL DESARROLLO DE LA INFECCIÓN SISTEMICA DEL VIRUS DEL CASCABELEO DEL TABACO EN *Arabidopsis*****DONAIRE, L.<sup>1</sup>, MARTÍNEZ-PRIEGO, LL.<sup>1</sup>, BARAJAS, D.<sup>1</sup>, MARTÍNEZ-GARCÍA, B.<sup>2</sup>, LLAVE, C.<sup>1</sup>**<sup>1</sup>*Centro de Investigaciones Biológicas, CSIC, Departamento de Biología de Plantas, Ramiro de Maeztu 9, 28040 Madrid. E-mail: ldonaire@cib.csic.es*<sup>2</sup>*Instituto de Biología Molecular de Barcelona, CSIC, Departamento de Regulación de la Expresión Génica, Jordi Girona 18-26, 08034 Barcelona. E-mail: bmabmc@ibmb.csic.es*

En plantas, el silenciamiento génico mediado por pequeños ARNs es un mecanismo de regulación génica que gobierna procesos de crecimiento y desarrollo, de adaptación a condiciones de estrés y de defensa frente a patógenos. Diversas evidencias sugieren que el silenciamiento génico juega un papel determinante en la patogénesis viral. De hecho, los virus codifican proteínas con el potencial de suprimir el silenciamiento como mecanismo de defensa de la planta y de interferir con procesos de regulación génica mediados por micro ARNs. Sin embargo, se desconoce la implicación de esta interferencia en el desarrollo de la infección sistémica. Si el desenlace final del proceso infectivo depende parcialmente de rutas celulares de silenciamiento génico, esperaríamos observar diferencias en el patrón de acumulación viral y de producción de pequeños ARNs virales entre plantas de genotipo silvestre y plantas que presentan deficiencias en la biosíntesis y/o actividad de pequeños ARNs.

En este trabajo, hemos estudiado los niveles de acumulación del virus del cascabeleo del tabaco (TRV) mediante el uso de mutantes de *Arabidopsis* de pérdida de función para genes implicados en las rutas de biosíntesis y/o actividad de micro ARNs (*dcl1-9*, *hen 1-1*) o pequeños interferentes ARNs (*dcl2-1*, *dcl3-1*, *dcl2/dcl3*, *dcl2/dcl4*, *dcl4*, *rdr1*, *rdr2-1*, *rdr6-13*, *ago4*), con el fin de determinar el papel que pudieran tener las proteínas claves implicadas en el silenciamiento génico de la planta en el establecimiento y mantenimiento de la infección viral.

Por otro lado, mediante northern blot de ARN de bajo peso molecular, hemos identificado y cuantificado los pequeños ARNs derivados de TRV durante la infección viral en estos mutantes y determinado así el papel de estas proteínas de la planta en la formación de los pequeños ARNs virales.

## V-58

**EFFECTO DE LA TEMPERATURA SOBRE LA INFECCIÓN DEL VIRUS DEL MOTEADO SUAVE DEL PIMIENTO (PMMoV) EN *Nicotiana benthamiana*****MOLINA-GALDEANO, M., GARCÍA-LUQUE, I., SERRA-YOLDI, M.T.***Centro de Investigaciones Biológicas-CSIC, c/ Ramiro de Maeztu 9, 28040 Madrid. E-mail: mserra@cib.csic.es*

El virus del moteado suave del pimiento (PMMoV) pertenece al género *Tobamovirus*. En el huésped *Capsicum chinense* ( $L^3L^3$ ), se habían observado diferencias de acumulación viral entre la cepa española (PMMoV-S) y la cepa italiana (PMMoV-I) en plantas cultivadas a 32 °C, temperatura a la que no es activa la resistencia conferida por el gen  $L^3$ , así como un efecto negativo de la temperatura de cultivo de 32 °C, sobre la acumulación de PMMoV-I en hojas superiores no inoculadas a tiempos tardíos de la infección viral.

En este trabajo, hemos determinado que este diferente comportamiento entre las dos cepas de PMMoV se produce también en el huésped experimental *Nicotiana benthamiana*, si bien, en este huésped, PMMoV-S alcanza niveles de acumulación superiores a PMMoV-I en todos los casos analizados. Experimentos de infección de protoplastos de *N.benthamiana* revelaron que no existen diferencias en la replicación a nivel celular de ambas cepas a una misma temperatura, 25 °C o 32 °C.

Para analizar las regiones de PMMoV que determinan este diferente comportamiento a ambas temperaturas, hemos utilizado los virus quimeras THI-1, THI-3 y THI-5 (Berzal-Herranz *et al.*, 1995. *Virology* 209:498), en los que distintas regiones del genoma de PMMoV-S han sido sustituidas por las correspondientes de PMMoV-I. Los resultados mostraron que en *N. benthamiana*, la introducción en el genoma de PMMoV-I de las distintas regiones de PMMoV-S, revierte sólo en parte, el efecto negativo de la temperatura sobre la acumulación de PMMoV-I, siendo los niveles de acumulación de los virus quimeras inferiores a los de PMMoV-S en los casos analizados. El estudio sintomático de las plantas infectadas con los virus parentales y los virus quimeras a tiempos tardíos de la infección reveló que, a las dos temperaturas de cultivo, se produjo una recuperación de los síntomas de mosaico y del crecimiento de los entrenudos en las plantas infectadas con el virus PMMoV-I y con los virus quimeras. Sin embargo, las plantas infectadas con el virus PMMoV-S no experimentaron dicho proceso de recuperación a ninguna de las dos temperaturas ensayadas. Las regiones C-terminal de la CP y 3'UTR del genoma de PMMoV-I parecen ser suficientes para que exista una recuperación de los síntomas. Los resultados indicaron también que existía una correlación entre los menores niveles de acumulación viral en plantas de *N. benthamiana* y la recuperación de síntomas.

## V-59

**CARACTERIZACIÓN BIOLÓGICA Y MOLECULAR DE UN AISLADO DE TOMATE DEL VIRUS DEL MOSAICO DEL PEPINO DULCE (PepMV) QUE INFECTA PLANTAS DE *Nicotiana tabacum***

**SÁNCHEZ-FERNÁNDEZ, A., VILA-CAMBRA, G., GILARDI-NAVARRO, P., PAGÁN, I., GARCÍA-LUQUE, I., DÍAZ-RUIZ, J.R., SERRA-YOLDI, M.T.**

*Centro de Investigaciones Biológicas, CSIC, c/Ramiro de Maeztu 9, 28040 Madrid. E-mail: mserra@cib.csic.es.*

El virus del mosaico del pepino dulce (PepMV) pertenece al género *Potexvirus*, cuyo miembro tipo es el virus X de la patata (PVX). Este virus se detectó por primera vez en cultivos de pepino dulce en el valle de Cañete en Perú (Jones, *et al.* 1980. *Ann. Appl. Biol.* 94:61), siendo esta planta considerada como su único hospedador. A partir del año 2000, PepMV fue identificado como el agente causal de una nueva enfermedad que afecta a los cultivos de tomate en Europa y en Estados Unidos. Los aislados identificados en Europa presentan una elevada homología de secuencia, si bien se han observado diferencias en los síntomas producidos en tomate por distintos aislados del virus.

En un estudio de 18 muestras de plantas de tomate, procedentes de Murcia y Canarias, se identificó un aislado del virus PepMV (To201), en un cultivo de Murcia del año 2001, que, a diferencia de lo observado para el resto de los aislados analizados, producía síntomas sistémicos de clorosis de venas y moteado clorótico en plantas de *Nicotiana tabacum* cv. Xanthi nc. El virus fue purificado y su caracterización biológica permitió establecer que el aislado To201 infectaba plantas de *N. tabacum* y tenía un rango de huéspedes similar al del aislado BBA99-550 de Alemania (Verhoeven *et al.* 2003. *Eur. J. Plant Pathol.* 106:419). Un aislado de tomate de Canarias (To299), utilizado como referencia, no produjo infección sistémica en *N. tabacum* y presentó un patrón de infección semejante al de otros aislados europeos. Este comportamiento patogénico se producía también a nivel celular, sólo el aislado To201 infectó de forma eficiente los protoplastos de *N. tabacum* cv. Xanthi nc., mientras que ambos aislados infectaron los protoplastos de *N. benthamiana*.

Se ha determinado la secuencia nucleotídica completa del RNA genómico del aislado To201 que tiene un 99% de identidad con la de los aislados europeos secuenciados. Las proteínas codificadas por el virus tienen elevados porcentajes de identidad (99%-100%) con las codificadas por dichos aislados. La replicasa viral, con un 99% de identidad, presenta tres cambios aminoacídicos no conservativos, S496F, E505V y T542I, en aminoácidos conservados en los restantes aislados europeos, si bien los cambios están localizados en una región variable de la replicasa de los potexvirus.



## V-60

**CARACTERIZACIÓN Y EFECTO DE UN AISLADO DE VIROIDES DE CÍTRICOS EN ÁRBOLES DE NARANJO DULCE Y CLEMENTINO INJERTADOS EN CITRANGE CARRIZO****BANI HASHEMIAN, M., SERRA, P., PINA, J.A., DURÁN-VILA, N.**

*Departamento de Protección Vegetal y Biotecnología, Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias, Apartado Oficial, 46113 Moncada (Valencia). E-mail: nduran@ivia.es*

En 1988 se estableció un ensayo de campo para evaluar el efecto de una aislado común de viroides de cítricos sobre el comportamiento de árboles de naranjo dulce Navelina y clementino de Nules ambos injertados en citrange Carrizo y la calidad/cantidad de la cosecha.

Se ha determinado que el aislado contenía 4 especies de viroides, *Citrus exocortis viroid* (CEVd), *Hop stunt viroid* (HSVd), *Citrus bent leaf viroid* (CBLVd) y *Citrus viroid III* (CVd-III). La secuenciación de estos viroides a partir de la fuente de inóculo conservada en la colección de virus del IVIA ha mostrado que: i) el CEVd contiene en los dominios P y V las regiones P<sub>L</sub> y P<sub>R</sub> características de las razas agresivas (clase A) de CEVd; ii) el HSVd contiene en las hebras superior e inferior del dominio V los cambios característicos de las razas que no inducen caquexia; iii) el CBLVd es muy homólogo a las variantes tipo CVd-Ia; y iv) el CVd-III es muy homólogo a las variantes tipo CVd-IIIb. La estabilidad de estos cambios en los árboles inoculados se comprobó mediante la secuenciación de muestras de 3 árboles de cada especie.

Se ha demostrado el efecto de este aislado en la altura de los árboles, el tamaño de la copa y la cosecha. Inesperadamente, no se observaron en los árboles infectados las descamaciones características que induce el CEVd en citrange Carrizo. El arranque de los árboles permitió observar la presencia de pequeñas descamaciones y chancros en las raíces principales así como un desarrollo muy pobre del sistema radicular. A nivel histológico, no se ha observado ningún tipo de malformación en las raicillas de los árboles afectados, pero sí una menor acumulación de almidón en las mismas. La falta de desarrollo del sistema radicular y la menor acumulación de almidón en las raíces ilustra la existencia de un desequilibrio raíz/copa en los árboles afectados lo que conlleva un crecimiento deficiente. Se ha estudiado mediante cultivo *in vitro* el efecto de este aislado de viroides en la formación de masa radicular.

**V-61****CARACTERIZACIÓN DE UNA NUEVA RAZA DEL VIROIDE DE LA EXOCORTIS DE LOS CÍTRICOS (CEVd)****BERNAD, L., DURÁN-VILA, N.**

*Departamento de Protección Vegetal y Biotecnología, Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias, Apartado Oficial, 46113 Moncada (Valencia). E-mail: nduran@ivia.es*

El CEVd es el agente causal de la enfermedad conocida como la exocortis de los cítricos. En base a la virulencia de distintos aislados de CEVd en tomate, Visvader y Symons propusieron clasificar las secuencias de CEVd que diferían en al menos 26 nucleótidos localizados en dos regiones del genoma ( $P_L$  y  $P_R$ ), en agresivas (Clase A) y suaves (Clase B).

El análisis de una serie de muestras procedentes del Sultanato de Omán ha permitido identificar secuencias de CEVd que difieren de las de las Clase A y Clase B en el número y tipo de cambios nucleotídicos en las regiones  $P_L$  y  $P_R$ . Los tres tipos de razas inducen síntomas específicos en *Gynura aurantiaca*: i) Epinastia fuerte, enanismo acusado y arrugamiento de las hojas (Clase A); ii) Enanismo suave, marchitamiento y necrosis del borde de las hojas (Clase B); iii) Asintomático (nueva Clase C). Se han determinado las propiedades biológicas de los tres tipos de razas en otros huéspedes (tomate, crisantemo, pepino, petunia y cidro) y se ha confirmado la estabilidad de los cambios que las caracterizan en cada uno de estos huéspedes.

Para determinar la contribución de las regiones  $P_L$  y  $P_R$  localizadas en los dominios P y V respectivamente, en la manifestación de síntomas y el título del viroide, se han construido viroides quiméricos que contienen todas las combinaciones posibles de estas regiones. Todas las construcciones han resultado infectivas en *Gynura aurantiaca* y la progenie ha mantenido la composición de las regiones  $P_L$  y  $P_R$  de las construcciones inoculadas. Los resultados confirman que efectivamente la nueva raza de CEVd procedente del Sultanato de Omán constituye una nueva clase, que denominamos Clase C, con genotipo y propiedades biológicas específicas.

**V-62****EVALUACIÓN DE LA RESISTENCIA AL PPV EN ALBARICOQUERO MEDIANTE EL ESTUDIO DEL MOVIMIENTO A LARGA DISTANCIA DEL VIRUS****RUBIO, M., MARTÍNEZ-GÓMEZ, P., DICENTA, F.**

*Departamento de Mejora Vegetal, Centro de Edafología y Biología Aplicada del Segura, Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CEBAS-CSIC), Apdo. Correos 164, 30100 Espinardo (Murcia). E-mail: fdicenta@cebas.csic.es; pmartinez@cebas.csic.es*

Se ha estudiado el movimiento del PPV a través de los tejidos de una variedad de albaricoquero susceptible (cv. Real Fino), otra resistente (cv. Stark Early Orange) y del melocotonero susceptible GF305. Para ello se injertaron las variedades a evaluar sobre el patrón indicador GF305. Se siguieron dos modelos, inoculando el patrón o la variedad. Las variedades Real Fino y GF305 mostraron una gran susceptibilidad al PPV, manifestando síntomas de la enfermedad en hoja, siendo ELISA positivo y permitiendo el paso del PPV a través de sus haces vasculares. Ocasionalmente, estas variedades susceptibles no mostraron síntomas pero siempre permitieron el paso del virus a su través, que parece una característica menos variable. Por otro lado, Stark Early Orange se mostró resistente al virus, con ausencia de síntomas, ELISA negativo e impidiendo el paso del PPV a su través.

Los resultados han puesto de manifiesto que la resistencia al movimiento del virus a través de una variedad dada puede ser un criterio de evaluación de la resistencia más fiable que la observación de síntomas, con la ventaja de que, con independencia del genotipo evaluado, la observación de síntomas y el ELISA se realizarían sobre la planta indicadora donde ya conocemos el comportamiento frente al virus.

## V-63

**ANÁLISIS DE INTERACCION DE LAS PROTEÍNAS HC-PRO Y CP DEL VIRUS DEL GRABADO DEL TABACO (TEV) EN MUTANTES NO TRANSMISIBLES**

**GOYTIA, E.<sup>1</sup>, FERNÁNDEZ-CALVINO, L.<sup>1</sup>, LLAVE, C., LÓPEZ-ABELLA, D.<sup>1</sup>, LÓPEZ-MOYA, J.J.<sup>2</sup>, VALKONEN, J.P.<sup>3</sup>**

<sup>1</sup>*Centro de Investigaciones Biológicas (CIB)-CSIC, c/ Ramiro de Maeztu 9, 28040 Madrid. E-mail: elisa@cib.csic.es*

<sup>2</sup>*Institut de Biologia Molecular de Barcelona (IBMB)-CSIC, c/ Jordi Girona 18-26, 08034 Barcelona. E-mail: jlmgmy@ibmb.csic.es*

<sup>3</sup>*University of Helsinki, Faculty of Forestry and Agriculture, Latokartanonkaari 7, 00014 Helsinki.*

El virus del grabado del tabaco (TEV) es un potyvirus transmitido en la naturaleza por pulgones que ha sido ampliamente utilizado como modelo en estudios de transmisión. La transmisión de potyvirus es un proceso complejo en el que se ven implicadas dos proteínas de origen viral: la proteína de la cápsida (CP) y el factor de transmisión (HC-Pro). Para explicar el modo de transmisión por pulgones de potyvirus la hipótesis de “puente” es la más aceptada. Según esta propuesta, el factor HC-Pro actuaría a modo de puente entre el estilete del pulgón y la partícula viral. Diversos estudios han analizado los dominios de interacción implicados en transmisión de cada una de las proteínas. Sin embargo, a pesar de todos los esfuerzos realizados hasta la fecha, el mecanismo no es aún del todo comprendido. Asimismo estudios estructurales sobre la proteína HC-Pro de TEV han permitido determinar que la forma funcionalmente activa en transmisión es, al menos, un homodímero, por lo que la interacción de la proteína HC-Pro consigo misma es posiblemente un requerimiento necesario durante el proceso.

Nuestro laboratorio dispone de una colección de mutantes no transmisibles del virus TEV. Estas variantes virales presentan mutaciones puntuales en el extremo amino terminal de la proteína HC-Pro, son capaces de infectar sistémicamente y acumularse a niveles similares a los producidos en una infección natural, pero no son transmitidos por pulgón, . Utilizando la técnica del doble híbrido de levadura se ha abordado el estudio de interacción de la proteína HC-Pro de estos mutantes consigo misma así como con la CP para dilucidar si la pérdida de transmisión se debe a problemas en estas interacciones. Los resultados obtenidos se han contrastado con un sistema de interacción de proteínas *in vitro*, y apuntan a que las alteraciones de estos mutantes no impiden ni la interacción de HC-Pro consigo misma ni con la CP, por lo que la falta de transmisibilidad podría ser causada por un fallo de interacción con el estilete del vector.

## V-64

**RESISTENCIA A DISTINTOS AISLADOS DEL VIRUS DEL MOSAICO DEL TOMATE EN UNA ENTRADA DE *Solanum habrochaites*****SOLER-ALEXANDRE, S.<sup>1</sup>, ARAMBURU, J.<sup>2</sup>, LÓPEZ, C.<sup>1</sup>, GALIPIENSO L.<sup>2</sup>, NUEZ, F.<sup>1</sup>**<sup>1</sup>UPV-COMAV, Camino de Vera s/n, 46022 Valencia.<sup>2</sup>IRTA, Crta. de Cabrils s/n, 08348 Cabrils (Barcelona).

El virus del mosaico del tomate (ToMV) es uno de los virus mas ampliamente distribuido en el mundo. Aunque las variedades comerciales portan genes de resistencia (*Tm-1*, *Tm-2* y *Tm2<sup>2</sup>*), se han identificado aislados capaces de superarlos. Es por tanto de interés la identificación de fuentes de resistencia a los distintos aislados de este virus.

La inoculación mecánica con ToMV de dos líneas de mejora de la especie *Solanum lycopersicum* (NE-1 y BGV-013683) y una entrada de *S. habrochaites* (BGV-006289) ha permitido caracterizar su comportamiento frente a 3 aislados correspondientes a los tipos 0, 1 y 2, así como al aislado TM04-1 del tipo 2<sup>2</sup>, detectado recientemente por primera vez en España y que es capaz de romper la resistencia del gen *Tm2<sup>2</sup>*. Como control susceptible se empleó la línea Fortuna-C de *L. esculentum*.

Las plantas de Fortuna-C mostraron síntomas acusados o moderados de mosaico, filimorfismo y deformación de hojas, y elevadas acumulaciones virales en todos los casos.

La línea NE-1 presentó acumulaciones virales muy bajas y ausencia de síntomas, es decir tolerancia, cuando fue inoculada con los aislados del tipo 0, 2 y el TM04-1. No ocurrió lo mismo cuando se inoculó con el aislado tipo 1, ya que se observaron síntomas de mosaico moderados y una acumulación viral mayor. La línea BGV-013683 parece muy prometedora al mostrar tolerancia con todos los aislados probados. La entrada BGV-006289 ha mostrado un comportamiento variable. Frente al aislado tipo 0 un grupo de plantas muestran síntomas acusados de la enfermedad y elevadas acumulaciones virales mientras que otro grupo muestra ausencia de síntomas y acumulaciones virales muy bajas. Con el aislado TM04-1 se observó de nuevo heterogeneidad en cuanto a la acumulación viral. Sin embargo ninguna planta mostró síntomas. Cuando se inoculan las plantas con el aislado tipo 1 y 2 las plantas presentan síntomas inapreciables, si bien la acumulación viral es mucho mayor con el primero que con el segundo. La línea BGV-013683 y la entrada BGV-006289 parecen muy prometedoras, aunque en la segunda habría que profundizar en las causas de la variabilidad de la respuesta.

## V-65

**ANÁLISIS MUTACIONAL DE UN MOTIVO DE CREMALLERA DE LEUCINA PRESENTE EN UNA PROTEÍNA DE MOVIMIENTO DEL VIRUS DE LA ROTURA DEL COLOR DE LA FLOR DEL *Pelargonium*****MARTÍNEZ, S., HERNÁNDEZ, C.***Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas (CSIC-UPV), Universidad Politécnica de Valencia, Avenida de los Naranjos s/n, 46022 Valencia. E-mail: cahernan@ibmcp.upv.es*

El virus de la rotura del color de la flor del *Pelargonium* (*Pelargonium flower break virus*, PFBV) causa infecciones frecuentes en geranio que repercuten negativamente en la producción y comercialización de esta planta ornamental. El PFBV está adscrito al género *Carmovirus* dentro de la familia *Tombusviridae* y, al igual que los otros miembros de este grupo, presenta partículas isométricas y un genoma monopartido de RNA de simple cadena y polaridad positiva. Dicho genoma, de aproximadamente 4 kb, contiene cinco marcos abiertos de lectura que codifican proteínas presuntamente implicadas en replicación (p27 y p86), movimiento, (p7 y p12) y encapsidación (p37). Una de ellas, la p12, posee un motivo tipo cremallera de leucina que no está presente en proteínas homólogas pero que se encuentra conservado en todos los aislados del virus analizados hasta el momento. Para estudiar la posible relevancia biológica de este motivo, en este trabajo se han introducido, mediante mutagénesis dirigida sobre un clon infeccioso del PFBV, cambios en las leucinas críticas de la putativa cremallera procurando que la alteración de los residuos tuviera un efecto mínimo sobre la estructura global de la proteína. Los clones mutados se utilizaron para inocular plantas del huésped local *Chenopodium quinoa* observándose un retraso en la aparición de síntomas y una disminución drástica en el número de lesiones inducidas en comparación con la construcción silvestre. En concordancia con esta observación, un análisis *Northern* mostró que las plantas inoculadas con los mutantes presentaban niveles prácticamente indetectables del RNA viral. El bioensayo de las distintas construcciones en protoplastos de *C. quinoa* no mostró efectos de las mutaciones en la p12 sobre la acumulación del virus. Globalmente, los resultados sugieren que la cremallera de leucina de la p12 desempeña un papel clave durante el ciclo infeccioso del PFBV y que dicho papel no está relacionado con el proceso de replicación del patógeno.

## V-66

**LA TRASLOCACION AL NUCLEO DE p19 INDUCIDA POR PROTEINAS ALY DE LA PLANTA, COMPROMETE SU ACTIVIDAD SUPRESORA DE SILENCIAMIENTO****CANTO, T.<sup>1</sup>, UHRIG, J.F.<sup>2</sup>, SWANSON, M.<sup>1</sup>, WRIGHT, K.M.<sup>1</sup>, MACFARLANE, S.<sup>1</sup>**<sup>1</sup>*Scottish Crop Research Institute (SCRI), Invergowrie, Dundee DD2 5DA, Escocia, Reino Unido. E-mail: tcanto@scri.sari.ac.uk*<sup>2</sup>*Botanisches Institut III, Universitat zu Koln, Gyrhofstr 15, 50931 Colonia, Alemania*

La proteína P19 de *Tomato bushy stunt virus* (TBSV) es un potente supresor del silenciamiento de ARN en plantas y, dependiendo de la planta huésped, es necesaria también para el movimiento viral local y a larga distancia. Tanto en *Nicotiana benthamiana* como en *Arabidopsis thaliana* la P19 interacciona con una familia de cuatro proteínas de planta, denominadas ALY, relocalizando dos de ellas del núcleo al citoplasma celular (Uhrig et al., 2004. *Plant Physiology* 135, 2411-2423).

Mediante experimentos de agroinfiltración y análisis de silenciamiento local mostramos aquí que la coexpresión de P19 con las proteínas ALY que no son traslocadas al citoplasma compromete la actividad del supresor viral. Utilizando técnicas de microscopía confocal y marcadores fluorescentes demostramos que esta interferencia se correlaciona con la relocalización de la P19 desde el citoplasma al núcleo-nucleolo, y mediante el uso de quimeras entre las distintas proteínas ALY demostramos que el dominio central RRM (RNA Recognition Motif) de ALY interacciona con la P19, y es el que determina la distribución subcelular de ambas proteínas, resultante de dicha interacción. Finalmente Mediante el uso de Complementación Fluorescente Bimolecular (BiFC) mostramos también que ALY y P19 se asocian físicamente en el núcleo.

## V-67

**ESTUDIO DEL MECANISMO ASOCIADO CON EL SINERGISMO ENTRE *Tomato spotted wilt virus* Y *Tomato chlorosis virus* QUE DERIVA EN RUPTURA DE RESISTENCIA**

**CAÑIZARES, M.C.<sup>1</sup>, GARCÍA-CANO, E.<sup>1</sup>, RESENDE, R.O.<sup>2</sup>, LOZANO, G.<sup>1</sup>, NAVAS-CASTILLO, J.<sup>1</sup>, MORIONES, E.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Lab. Virología Vegetal, Estación Experimental "La Mayora", CSIC, 29750 Algarrobo-Costa (Málaga). E-mail: moriones@eelm.csic.es

<sup>2</sup>Dept. Biología Celular, Universidade de Brasília, CEP 70.910-970, Brasília-DF, Brazil.

El cultivo del tomate (*Solanum lycopersicum*) se ve afectado por virus de los géneros *Begomovirus*, *Tospovirus* y *Crinivirus*, que ocasionan importantes pérdidas económicas.

Uno de los métodos de control de estas virosis es el empleo de variedades resistentes. En condiciones naturales es frecuente encontrar infecciones mixtas en las que las interacciones entre virus pueden manifestarse como sinergismos que podrían tener como consecuencia la superación de una determinada resistencia. Resultados preliminares han puesto de manifiesto que en plantas de tomate portadoras del gen *Sw-5* resistentes al tospovirus *Tomato spotted wilt virus* (TSWV; género *Tospovirus*, familia *Bunyaviridae*), la presencia de *Tomato chlorosis virus* (ToCV; género *Crinivirus*, familia *Closteroviridae*) resulta en ruptura de la resistencia. Cada vez son más frecuentes los casos en los que se ha visto que la supresión de la respuesta defensiva de la planta basada en silenciamiento por RNA puede ser desencadenante de interacciones sinérgicas.

Para conocer si éste es el mecanismo que pudiera estar asociado con el sinergismo ToCV-TSWV que deriva en ruptura de resistencia se están evaluando cada una de las proteínas codificadas en el genoma de ToCV como posibles supresores del silenciamiento por RNA y/o determinantes de patogenicidad viral utilizando como hospedador experimental *Nicotiana benthamiana*. Las secuencias identificadas como supresoras de silenciamiento génico podrían estar implicadas en la ruptura de la resistencia proporcionada por el gen *Sw-5*.



## V-68

**ESTUDIO DE LA VARIABILIDAD GENÉTICA Y EVOLUCIÓN TEMPORAL DE DOS AISLADOS DE CTV INOCULADOS SOBRE DISTINTAS VARIEDADES COMERCIALES DE CÍTRICOS****MOYA, P.<sup>1</sup>, GUERRI, J.<sup>1</sup>, MORENO, P.<sup>1</sup>, AMBRÓS, S.<sup>1</sup>**<sup>1</sup>*Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA), Ctra Moncada a Náquera, Km 4,5, 46113 Moncada (Valencia). E-mail: pmoya@ivia.es*

El virus de la tristeza de los cítricos (*Citrus tristeza virus*, CTV) causa decaimiento y muerte de árboles injertados sobre patrón naranjo amargo y ha forzado la utilización de patrones tolerantes. Sin embargo, algunas variantes de CTV pueden causar enanismo, acanaladuras en la madera y baja producción con independencia del patrón. En contraste con otros países, los aislados de CTV más comunes en España no causan síntomas en las variedades comerciales propagadas sobre patrón tolerante. Las plantas infectadas con CTV contienen una población de variantes de secuencia, cuya composición puede determinar el grado de afección en distintas variedades. Se ha observado que la transmisión por pulgones o el cambio de huésped pueden dar lugar a cambios en la población viral, pero no se sabe si las distintas variedades comerciales cultivadas pueden seleccionar con el tiempo variantes de secuencia diferentes y contribuir a la variación genética del virus. Para intentar responder a esta cuestión se inocularon los aislados de CTV T385 (asintomático) y T388 (muy virulento), en plantas de mandarino (vars. satsuma Owari y Clemenules), naranjo dulce (vars. Washington navel y Berna) y pomelo (vars. Marsh y Star Ruby) propagadas sobre patrón citrange Carrizo, reproduciendo así la situación normal en el campo. Se analizó periódicamente a lo largo de dos años el polimorfismo conformacional de DNA monocatenario (SSCP) de cDNA de los genes *p20* y *p23*, y se observó que los perfiles para cada aislado y gen permanecían generalmente estables entre variedades y a lo largo del tiempo. En el primer análisis (4 meses post-inoculación), por cada aislado, variedad y gen, se seleccionó el cDNA de una de las plantas que presentaban el perfil mayoritario de SSCP y el de aquellas que daban un perfil diferente. Tras clonar estos cDNAs, se analizaron al menos 20 clones por gen y planta y se compararon sus perfiles de SSCP. Las secuencias de los clones con el perfil predominante y las de aquellos con perfil diferente fueron muy similares, excepto en unos pocos clones que eran aparentemente recombinantes. Estas secuencias se utilizaron para estimar la diversidad genética, considerando la frecuencia de cada tipo de variante. La estructura poblacional y diversidad genética en las distintas variedades fueron similares a las de los aislados fuente. Estos datos se comparan con los obtenidos dos años después de la inoculación.

## V-69

**IDENTIFICACIÓN DE GENES DEL HOSPEDADOR NECESARIOS PARA LA INFECCIÓN POR *Tomato yellow leaf mosaic* VIRUS MEDIANTE EL USO DE PLANTAS TRANSGÉNICAS DE *Nicotiana benthamiana* 2IRGFP**

**LOZANO-DURÁN, R., CASTILLO, A.G., SÁNCHEZ-DURÁN, M.A., MORILLA, G., BEJARANO, E.R.**

*Unidad de Genética, Dpto. Biología Celular, Genética y Fisiología, Universidad de Málaga, Facultad de Ciencias, Campus Teatinos, Málaga.*

*Tomato yellow leaf curl Sardinia virus* (TYLCSV) es un begomovirus (familia *Geminiviridae*) agente causal de la enfermedad del rizado amarillo del tomate. Su genoma está formado por una sola molécula circular de ADN monocatenario en la que se distinguen seis fases abiertas de lectura. Como el resto de geminivirus, TYLCSV no codifica para polimerasas de DNA ni de RNA, por lo que depende de la maquinaria celular para expresar sus genes y replicar sus genomas. Su rango de hospedadores incluye varias especies de solanáceas, entre las que se incluyen *Lycopersicon esculentum* y *Nicotiana benthamiana*.

En nuestro laboratorio se ha desarrollado un sistema que permite la monitorización en el tiempo y el espacio de la infección por TYLCSV. Esta herramienta se basa en una construcción que contiene un casete para la expresión de la proteína verde fluorescente (GFP) flanqueado por copias de la región intergénica (IR) del virus. Las plantas transgénicas que contienen esta construcción (plantas 2IRGFP) presentan una expresión basal de GFP en todos los tejidos, que aumenta al ser infectada con TYLCSV. Este incremento correlaciona con la acumulación de copias extracromosómicas del transgén, cuya formación es dependiente de la interacción de la proteína viral asociada a replicación Rep con las IR. Estas plantas, en combinación con la tecnología de VIGS (*virus-induced gene silencing*), son una herramienta excelente para la identificación de genes del hospedador necesarios para el desarrollo de la infección viral mediante genómica inversa.

Para validar el sistema se ha utilizado una proteína esencial para la replicación del virus: PCNA (*Proliferating cellular nuclear antigen*). Cuando se silencia la expresión de PCNA utilizando los vectores desarrollados en TRV (*Tobacco rattle virus*) no se detecta aumento en la expresión de GFP en las plantas infectadas con TYLCSV. En la actualidad se están ensayando distintos genes candidatos que codifican para proteínas: (i) implicadas en procesos biológicos potencialmente requeridos para la infección (replicación de DNA, tráfico celular etc.); (ii) cuya interacción con proteínas del virus ha sido comprobada. El primer gen descrito como necesario para la infección mediante este método ha sido Ubc9, enzima que conjuga una proteína similar a ubiquitina llamada SUMO-1.

**B-1****ESTUDIO DE GENES RELACIONADOS CON LA PRODUCCIÓN DE MANGOTOXINA Y SU PAPEL EN VIRULENCIA Y SUPERVIVENCIA EPIFÍTICA**

**ARREBOLA, E.<sup>1</sup>, CAZORLA, F.M.<sup>1</sup>, PÉREZ-GARCÍA, A.<sup>1</sup>, LAKHSSASSI, N.<sup>1</sup>, MURILLO, J.<sup>2</sup>, DE VICENTE, A.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>*Departamento de Microbiología, Facultad de Ciencias, Universidad de Málaga, 29071 Málaga. E-mail: adevicente@uma.es*

<sup>2</sup>*Laboratorio de Patología Vegetal, ETS Ingenieros Agrónomos, Universidad Pública de Navarra, 31006 Pamplona. E-mail: jesus@unavarra.es*

El amplio rango de hospedadores de *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* (Pss) junto con la capacidad de producir una gran variedad de factores de virulencia, hacen de esta bacteria fitopatógena una de las más estudiadas. En trabajos anteriores de nuestro grupo se ha demostrado la producción de un nuevo factor de virulencia llamado mangotoxina por el 87,6% de cepas de Pss aisladas de mangos con síntomas de necrosis apical. Esta toxina tiene como diana a la enzima Ornitina acetil-transferasa (OAT) y actúa como antimetabolito en la ruta de biosíntesis de ornitina y arginina. A partir de la cepa silvestre Pss UMAF0158 productora de mangotoxina, se han construido y seleccionado mutantes miniTn5Km2 defectivos en la producción de esta toxina antimetabolito. Analizando secuencias flanqueates al miniTn5 en estos mutantes, se ha localizado genes putativamente relacionados con la producción de mangotoxina. A partir del mutante defectivo 6γF6 y empleando una genoteca de ADN genómico de UMAF0158, se ha localizado una región genómica relacionada con la biosíntesis de mangotoxina, ya que restaura la producción de la misma en aquellos mutantes que presentan la inserción del miniTn5Km2 en esta región. Este fragmento del genoma de 11,1kb, está clonado en el vector pblueSTAR constituyendo el plásmido pCG2-6. La secuenciación de este fragmento ha revelado la presencia de 6 ORFs completos, cuatro de los cuales parecen construir un operón. Uno de los genes del operón codifica para una peptidosintetasa no ribosomal que es el gen interrumpido por la inserción del miniTn5, mutación que da lugar al déficit en la producción de mangotoxina. También se está analizando la implicación del resto de los ORFs presentes en este clon, en la producción de mangotoxina, mediante la obtención de mutantes dirigidos a cada uno de ellos.

Se ha llevado a cabo experimentos que han puesto de manifiesto que la producción de mangotoxina es un factor de virulencia; y así los mutantes defectivos muestran un retraso y disminución en los síntomas necróticos inducidos. También se está realizando estudios de supervivencia sobre folíolos de tomate, utilizando los mutantes defectivos en la producción de mangotoxina y la cepa parental UMAF0158, con objeto de establecer si existe relación entre la capacidad de supervivencia epifítica y la producción de este factor de virulencia.

**B-2****PAPEL DE LOS ANTIBIÓTICOS DE *Bacillus subtilis* EN EL CONTROL BIOLÓGICO DE ENFERMEDADES BACTERIANAS DE CUCURBITÁCEAS****ZERIOUH, H., ROMERO, D., CAZORLA, F.M., DE VICENTE, A., PÉREZ-GARCÍA, A.***Grupo de Microbiología y Patología Vegetal, Departamento de Microbiología, Universidad de Málaga, 29071 Málaga. E-mail: aperez@uma.es*

*Bacillus subtilis* es una bacteria Gram-positiva ampliamente descrita como agente de biocontrol de numerosas enfermedades de origen fúngico en diversos hospedadores. En nuestro laboratorio se han seleccionado varias cepas de *B. subtilis* por su gran capacidad antifúngica y de biocontrol de oídio de las cucurbitáceas, una de las principales enfermedades que afectan a estos cultivos. El objetivo de este estudio fue evaluar la capacidad de estas cepas para controlar otras posibles enfermedades de la filosfera de cucurbitáceas, como la mancha bacteriana causada por *Xanthomonas campestris* pv. *cucurbitae* o la podredumbre blanda por *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*, y establecer las bases moleculares de la actividad de biocontrol de estas cepas de *B. subtilis* sobre dichas enfermedades. La evaluación de la capacidad antibacteriana fue llevada a cabo mediante ensayos de inhibición de crecimiento de *X. campestris* con filtrados libres de células procedentes de cultivos líquidos de las cepas de *Bacillus*. La caracterización bioquímica de la molécula/s responsable de la actividad antibacteriana mediante la exposición de dichos filtrados a diferentes tratamientos, sugiere que se trata de una o dos moléculas, una menor y otra mayor de 3 kDa, hidrofóbicas, y resistentes a altas temperaturas y a la degradación proteolítica. Estas cepas de *Bacillus* producen varias sustancias antifúngicas conocidas como los lipopéptidos surfactina, fengicina, iturina y bacilomicina y se dispone de mutantes deficientes en su producción. Para establecer una relación directa entre la actividad antibacteriana de los filtrados y la producción de lipopéptidos, se realizaron extracciones en n-butanol a partir de filtrados libres de células procedentes de cultivos líquidos de las cepas salvajes y de los diversos mutantes, que fueron analizadas mediante cromatografía en capa fina (TLC) y ensayos de inhibición de crecimiento de *X. campestris* y *E. carotovora*. Los resultados indican que las bacilomicinas son las principales moléculas responsables de la actividad antibacteriana, ya que los mutantes correspondientes perdieron totalmente dicha actividad. Actualmente se están realizando ensayos de biocontrol con el modelo de hoja cortada de melón para comparar la capacidad de biocontrol de *X. campestris* y *E. carotovora* de las cepas de *Bacillus* y de los mutantes en bacilomicinas y confirmar la implicación de la antibiosis como principal mecanismo de acción de estas cepas. También hemos descartado la implicación del “quorum quenching” en la capacidad de biocontrol ya que estas cepas no presentan actividad lactonasa por carecer del gen *aiiA*.

**B-3****MEJORA DE LA TOLERANCIA AL ESTRÉS, SUPERVIVENCIA Y EFICACIA DE AGENTES DE BIOCONTROL MEDIANTE OSMOADAPTACIÓN****BONATERRA, A., CAMPS, J., MONTESINOS, E.**

*Instituto de Tecnología Agroalimentaria-CeRTA-CIDSAV, Universidad de Girona, Campus Montilivi, 17071 Girona. E-mail: anna.bonatterra@udg.es*

La aplicación de agentes de biocontrol en la superficie de las plantas puede ser en ocasiones inefectiva, especialmente cuando el tratamiento y la inoculación del patógeno se encuentran separados por un periodo de condiciones ambientales desfavorables. Esto es debido a la rápida disminución de la viabilidad de los agentes de biocontrol introducidos en las superficies de las plantas o en los frutos. También, durante la formulación de los agentes de biocontrol mediante procesos de secado industrial como atomización o lecho fluido se producen condiciones de estrés térmico y osmótico que disminuyen la supervivencia de las células.

Se ha desarrollado un proceso de osmoadaptación en bacterias durante su cultivo para la producción del inóculo que tiene como objetivo incrementar la viabilidad de las células cuando están sometidas a condiciones desfavorables. El método consiste en la combinación del estrés salino con la adición de osmolitos en el medio de cultivo. Se han realizado distintos experimentos con *Pantoea agglomerans* EPS125 agente de biocontrol de enfermedades de poscosecha y *Pseudomonas fluorescens* EPS62e agente de biocontrol del fuego bacteriano.

En condiciones de estrés osmótico las células acumulan intracelularmente distintos solutos compatibles pero crecen muy lentamente por lo que se obtienen producciones muy bajas. Entre los osmolitos acumulados intracelularmente se encuentran trehalosa, N-acetilglutaminilglutamina amida y glucosil-glicerol. La adición de glicina betaina al medio de cultivo salino permite restaurar los parámetros de crecimiento hasta niveles equivalentes a los observados en ausencia de estrés. Los cultivos osmoadaptados muestran un incremento significativo en la tolerancia a la desecación y estrés térmico. Además, la osmoadaptación también mejora su supervivencia en la superficie de las plantas y la eficiencia en el biocontrol en condiciones de baja humedad relativa. La osmoadaptación de *P. agglomerans* EPS125 mejoró significativamente la eficacia en el control de la podredumbre azul en manzana causada por *Penicillium expansum*, en condiciones en que el tratamiento estándar no osmoadaptado se mostró inefectivo.

**B-4****ESTRATEGIAS PARA EL ANÁLISIS DE LA DIVERSIDAD GENÉTICA DE CEPAS DE *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* PRODUCTORAS DE LA NECROSIS APICAL DEL MANGO**

**GUTIÉRREZ, J.A.<sup>1</sup>, ARREBOLA, E.<sup>1</sup>, PÉREZ-GARCÍA, A.<sup>1</sup>, MURILLO, J.<sup>2</sup>, DE VICENTE, A.<sup>1</sup>, CAZORLA, F.M.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Grupo de Microbiología y Patología Vegetal, Departamento de Microbiología, Facultad de Ciencias, Universidad de Málaga 29071 Málaga. E-mail: cazorla@uma.es

<sup>2</sup>Laboratorio de Patología Vegetal, ETS de Ingenieros Agrónomos, Universidad Pública de Navarra, 31006 Pamplona.

La principal enfermedad que afecta al mango, es la Necrosis Apical del Mango producida por la bacteria *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* (Pss). Durante más de 10 años se han obtenido aislados de esta bacteria fitopatógena en distintas fincas y épocas del año de la principal zona productora, la Axarquía (Málaga). También se han obtenido aislados de otras zonas como la Costa del Sol, Huelva, Canarias, Italia, Israel y Portugal. En este trabajo se están poniendo a punto distintas técnicas basadas principalmente en la reacción de la polimerasa en cadena (PCR) para poder analizar la diversidad genética existente entre los aislados.

En una primera fase catorce cepas han sido seleccionadas para poner a punto las distintas herramientas moleculares.

La diversidad genética de las 14 cepas de Pss seleccionadas ha sido abordada por dos técnicas principales: rep-PCR y PCR-RFLP del DNAr 16 S. La rep-PCR es una herramienta molecular que se basa en la amplificación de secuencias repetitivas que se encuentran en el genoma repartidas al azar. Existen muchos cebadores diferentes que amplifican este tipo de secuencias. En este estudio se están ensayando siete tipos diferentes de secuencias repetitivas (ERIC1R-ERIC2, BOXA1R, (GTG)<sub>5</sub>, IS50, PUC-FORWARD, PUC-REVERSE y (CAG)<sub>5</sub>). Para abordar desde otro punto de vista el estudio de la diversidad genética nos basamos en la PCR-RFLP del DNAr 16 S, donde observaremos polimorfismos de secuencias de genes cromosómicos.

Por último también se aborda el estudio de los perfiles de plásmidos nativos de las cepas seleccionadas. Existen varios plásmidos descritos, destacando principalmente la frecuente presencia de plásmidos de 62 Kb que presentan homología con secuencias importantes para la supervivencia de la bacteria, como la del operón *copABCD*.

El análisis de los datos obtenidos tendrá un valor epidemiológico importante a la hora de determinar el origen de los aislados patógenos y su distribución.

**B-5****CARACTERIZACIÓN MOLECULAR Y TRANSMISIÓN DE DOS AISLADOS DE STOLBUR EN VIÑA****SABATÉ, J., LAVIÑA, A., BATLLE, A.**

*Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentàries (IRTA), Ctra de Cabrils s/n, 08348 Cabrils (Barcelona). E.mail. assumpcio.batlle@irta.es*

La enfermedad del bois noir o madera negra de la viña esta causada por el stolbur fitoplasma o *Candidatus Phytoplasma solani* (grupo 16S rXII-A). Distintas especies de cicadelidos, fulgoridos y psilidos han sido identificados como portadores del fitoplasma, pero solo *Hyalesthes obsoletus* ha sido identificado como transmisor de stolbur en viña. Debido al gran numero de especies vegetales que son huéspedes de este fitoplasma, la diversidad genética del mismo puede ser importante. La utilización de cebadores para la amplificación del gen de elongación Tu ha permitido distinguir tres aislados de stolbur, dos de ellos presentes en viña.

Los resultados de los estudios epidemiológicos llevados a cabo con anterioridad mostraron que la incidencia del Bois Noir era alta en parcelas de Navarra y La Rioja, mientras que en Cataluña era baja.

En este estudio se han comparado los vectores potenciales del stolbur de ambas zonas y se ha realizado la caracterización molecular de los aislados presentes en plantas e insectos. Por otro lado, se ha estudiado la transmisión de ambos aislados a viñas sanas. Los experimentos de transmisión a plantas de vid se realizaron *in vitro*, con insectos capturados en las parcelas y pertenecientes a especies identificadas en estudios previos como portadoras de este fitoplasma. Algunas de estas especies habían mostrado su capacidad de transmitir el fitoplasma a un medio nutritivo. La detección del fitoplasma en plantas e insectos se realizó mediante PCR-nido, con cebadores universales y específicos de stolbur. La caracterización de aislados se realizó mediante PCR-nido con cebadores del gen de elongación Tu y posterior digestión con la enzima HpaI.

*H. obsoletus* se identificó en todas las parcelas de La Rioja muestreadas, mientras que en Cataluña su presencia fue baja o nula, por tanto se observa una correlación entre la presencia de esta especie y la incidencia de la enfermedad. Los análisis de restricción del producto de amplificación obtenido con los cebadores Tuf AY, han mostrado la presencia de los aislados I y II en La Rioja y del aislado I en Cataluña.

En los ensayos de transmisión realizados, el aislado II fue transmitido por *H.obsoletus*, *Issus* sp y *Aphrodes* sp. Los individuos de *Euscelis obsoletus* y *Euscelidius variegatus* procedentes de La Rioja transmitieron el aislado I, mientras que los individuos de *E. obsoletus* capturados en Cataluña transmitieron el aislado II. *E. obsoletus* podría transmitir la enfermedad en aquellas áreas donde *H. obsoletus* no es común.

**B-6****EPIDEMIOLOGIA DE LOS EUROPEAN STONE FRUIT YELLOWS (CANDIDATUS PHYTOPLASMA PRUNORUM) EN DISTINTAS ÁREAS FRUTÍCOLAS DE ESPAÑA****LAVIÑA, A.<sup>1</sup>, SABATÉ, J.<sup>1</sup>, SANTIAGO, R.<sup>2</sup>, BATLLE, A.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Dpt. Protecció Vegetal, Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentàries (IRTA), Ctra Cabrils s/n, 08348 Cabrils (Barcelona). E-mail: amparo.lavina@irta.es

<sup>2</sup>Servicio de Sanidad Vegetal, Ctra. de San Vicente, Km 3, 06071 Badajoz.

El fitoplasma causante de amarilleos en frutales de hueso (European stone fruit yellows) o *Candidatus Phytoplasma prunorum*, perteneciente al grupo Apple Proliferation (AP) o 16SrRNA (X), se ha identificado en distintas áreas frutícolas de España, afectando a ciruelo, melocotonero, albaricoquero y nectarina. Aunque distintas especies de cicadelidos estuvieron ligados a la presencia de la enfermedad, la única especie identificada como capaz de transmitirla, es el psyllido, *Cacopsylla pruni*. Esta especie tiene como huésped primario únicamente especies del género *Prunus*, tanto cultivados como silvestres, presenta una generación por año e hiberna como adulto en plantas refugio, probablemente coníferas u otras especies de bosque. A principios de primavera los adultos depositan los huevos de la próxima generación en los *Prunus* cultivados o silvestres

Con el fin de determinar la presencia e importancia de este vector en las principales áreas frutícolas de nuestro país y su relación con la incidencia de la enfermedad, se ha realizado un seguimiento de las poblaciones de esta especie en parcelas de Extremadura, Aragón y Cataluña. Para ello, se colocaron placas amarillas pegajosas, en tres parcelas de Extremadura, seis de Aragón y seis de Cataluña. Las placas se reemplazaban quincenalmente. Una vez clasificados los insectos se analizaban mediante PCR.

Las poblaciones más significativas de *C. pruni* se encontraron en las parcelas de Extremadura de la zona Vegas Altas y en las parcelas de Cataluña del área del Llobregat, sin embargo las poblaciones fueron muy bajas en las parcelas de Aragón y en la parcela de Cataluña del área de Tarragona (Ribera d'Ebre). El porcentaje de individuos de *C. pruni* portadores del fitoplasma fue de alrededor del 10% en los individuos procedentes de Extremadura, del 15% en los del área del Llobregat (Cataluña) y del 7% en los capturados en la parcela de Ribera d'Ebre (Cataluña).

Se identificaron individuos de *C. pruni* en las parcelas, desde marzo hasta julio, pero las máximas poblaciones se encontraron durante la primera quincena de mayo en Extremadura y durante la primera quincena de junio en Cataluña.

Por el momento no se ha identificado este vector en el área frutícola de Lérida, donde la incidencia de la enfermedad es muy baja, aunque si se han identificado otras especies de insectos portadoras de fitoplasmas. La presencia del vector en Extremadura, donde existen un gran número de nuevas plantaciones es preocupante, ya que puede producirse una expansión importante de la enfermedad.



**B-7****FORMACIÓN DE BIOPELÍCULAS POR ESPECIES PATÓGENAS DE *Agrobacterium*****ABARCA-GRAU, A.M., PEÑALVER, R., LÓPEZ, M.M., MARCO-NOALES, E.***Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA), Apdo. Oficial, 46113 Moncada (Valencia). E-mail: anabarca@ivia.es*

Distintas especies del género *Agrobacterium* causan tumores en numerosas especies de plantas cultivadas. Cuando la bacteria encuentra una herida en la planta, el primer paso en el proceso de infección es la unión a los tejidos vegetales. Las células de *Agrobacterium* sintetizan material extracelular, formando agregados entre bacterias y los tejidos de la planta huésped. Cuando estos agregados bacterianos se estructuran constituyen biopelículas, que pueden contribuir a la supervivencia de las bacterias en distintos hábitats. Se ha estudiado la capacidad de formar biopelículas de tres especies fitopatógenas de *Agrobacterium* sobre distintos materiales inertes (poliestireno y polipropileno). *A. tumefaciens*, *A. rhizogenes* y *A. vitis* difirieron en su capacidad para unirse a cada superficie, siendo *A. vitis* la que mostró generalmente valores más altos de adhesión. Además, la formación de biopelículas estuvo modulada por la composición del medio de cultivo utilizado. También se realizaron ensayos *in vitro* de colonización de raíces de tomate, utilizando plántulas inoculadas con cepas mutantes marcadas con GFP y sus respectivas cepas parentales. Los agregados celulares, observados al microscopio, sobre la superficie radicular representan un primer estadio en la formación de biopelículas durante la interacción de la bacteria con su planta huésped. Estos resultados sugieren que la formación de biopelículas puede contribuir a la supervivencia de *Agrobacterium* spp. en la planta.

**B-8****PERSISTENCIA DE *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* EN RAÍCES DE TOMATE**

ELORRIETA, M.A.<sup>2</sup>, GONZÁLEZ, J.M.<sup>1</sup>, LÓPEZ, O.<sup>1</sup>, URRUTIA, M.T.<sup>1</sup>, AGUILAR, M.I.<sup>1</sup>, GÓMEZ, R.<sup>1</sup>, GÓMEZ, V.M.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio de Sanidad Vegetal, Unidad de Hongos y Bacterias, La Mojonera (Almería).

<sup>2</sup>Laboratorio de Coexphal, El Viso, Almería.

En el otoño de la campaña 2002-2003 se produjo, tanto en Almería como en otras zonas de Andalucía, Canarias, y del levante español, un brote epidémico de *Clavibacter michiganensis* subsp. *Michiganensis*. Por este motivo se han estudiado aspectos tales como el tiempo de permanencia en las raíces y su capacidad de actuar como fuente de inóculo.

Se realizó un estudio de la presencia de *Cmm* en raíces durante 6 meses. Se recogieron muestras de plantas infectadas cultivadas en tierra, lana de roca o fibra de coco. Sus raíces se mantuvieron en contenedores con el sustrato de procedencia en un invernadero con condiciones ambientales semicontroladas. Se tomaron muestras de raíces al inicio, a los 3 y a los 6 meses. La detección de *Cmm* se realizó por aislamiento en medios de cultivo y por inmunofluorescencia. Con los sustratos del estudio se realizó un bioensayo para estimar su capacidad infectiva.

En el tiempo inicial se detectó el patógeno en un 76% de los sistemas radiculares en contenedores con tierra, en el 100% en fibra de coco y en un 83% en lana de roca. A los seis meses se detectaba sólo en lana de roca (67%) y fibra de coco (33%). El bioensayo resultó negativo tras 40 días de crecimiento de las plántulas en los sustratos estudiados, salvo en el caso de los testigos positivos.

Con el fin de conocer la eficacia de los distintos métodos de control, se recogió información a través de una encuesta realizada a entidades agrícolas afectadas. Se recopilaron datos relacionados con el desarrollo de la enfermedad, su aparición en cultivos posteriores, así como los métodos de control aplicados durante y después del cultivo. En el 87% de las fincas afectadas, el principal episodio de la enfermedad se dio en el otoño del 2002. De ellas sólo un 2% volvió a mostrar síntomas en la campaña siguiente. Entre las medidas tomadas para el control de la enfermedad lo más común fue la eliminación de plantas enfermas, aislamiento de los focos y desinfección de herramientas con hipoclorito sódico. Al finalizar el cultivo, la mayoría eliminó la planta, incluidas raíces, aplicó tratamientos químicos al suelo y estructuras (91%) y/o solarizó (34%). Las estrategias de control fueron variadas y el resultado final efectivo en casi todos los casos.

**B-9****CAPACIDAD INFECTIVA DE *Clavibacter michiganensis* spp. *michiganensis* EN RAICES DE TOMATE**

**GÓMEZ, V.M.<sup>1</sup>, GONZÁLEZ, J.M., LÓPEZ, O.<sup>1</sup>, URRUTIA, M.T.<sup>1</sup>, AGUILAR, M.I.<sup>1</sup>, GÓMEZ, R.<sup>1</sup>, ELORRIETA, M.A.<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Laboratorio de Sanidad Vegetal, Unidad de Hongos y Bacterias, La Mojonera (Almería).

<sup>2</sup>Laboratorio de Coexphal, El Viso, Almería.

La “quema bacteriana del tomate”, causada por *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, es una enfermedad con poca o nula incidencia en la región hortícola de Almería. En el otoño de la campaña 2002-2003 se produjo un brote epidémico que afectó tanto a Almería como a otras zonas de Andalucía, Canarias, y del levante español. La situación generada y las preguntas planteadas pusieron de manifiesto la necesidad de conocer aspectos tales como la presencia de *Cmm* en las raíces y su capacidad de actuar como fuente de inóculo a través del suelo.

Inicialmente se determinó la metodología más adecuada para la detección de *Cmm* en raíces, comparando la eficacia de las técnicas de siembra en medios de cultivo generales y semiselectivos, microscopía de inmunofluorescencia (IF), DAS-ELISA y PCR. Para esto se mezclaron las raíces de 10 plantas infectadas en campo y se prepararon 3 submuestras con las que se realizó un dilacerado en PBS estéril. Paralelamente se preparó una suspensión del cultivo de una cepa testigo de *Cmm*. Además se estudió el posible papel inhibitor del extracto de las raíces en la detección de *Cmm* en los medios de cultivo o por IF. Los resultados obtenidos mostraron que los medios semiselectivos aseguran la recuperación de *Cmm* en extractos de raíces, ya que inhiben el desarrollo de la abundante microbiota rizosférica. La IF destacó por su gran eficacia en la detección de *Cmm* en cualquier tipo de muestra, mientras que la técnica ELISA-DAS y la PCR no dieron lugar a resultados fiables en los análisis de extractos de raíces.

La capacidad patogénica de *Cmm* a través del suelo se determinó mediante un bioensayo en cámara de ambiente controlado en el que las plántulas se inoculaban mediante la adición al sustrato de raíces infectadas naturalmente, así como de tallos o raíces de plantas infectadas artificialmente. La aparición de síntomas empezó a los 34 días con un desarrollo mayoritario a los 41 días. Entre un 68% y un 44% de las plantas inoculadas con raíces infectadas naturalmente o con tallos infectados artificialmente resultaron enfermas, mostrando claramente que la infección se puede dar por vía radicular. Los testigos positivos se infectaron y no lo hicieron los negativos.

**B-10****EL ANÁLISIS FILOGENÉTICO DEL GEN *gyrB* EN AISLADOS DE *Xylella fastidiosa* DE DIFERENTES HUÉSPEDES Y ORÍGENES GEOGRÁFICOS ES CONGRUENTE CON INFECCIONES CRUZADAS DE SUS HUÉSPEDES****LANDA, B.B.<sup>1,2</sup>, LOPES, J.R.S.<sup>3</sup>, ZAMBOLIM, L.<sup>4</sup>; JIMÉNEZ-DÍAZ, R.M.<sup>1,2</sup>**<sup>1</sup>Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos y Montes, Universidad de Córdoba, Edificio C4-Celestino Mutis, Ctra. Madrid, Km 396, Campus de Rabanales, 14071 Córdoba.<sup>2</sup>Instituto de Agricultura Sostenible, CSIC, Apdo. 4084, 14080 Córdoba.<sup>3</sup>ESALQ-Universidad de São Paulo, Piracicaba, São Paulo, Brasil.<sup>4</sup>Universidad Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, Brasil.

*Xylella fastidiosa* es el agente causal de la clorosis variegada del naranjo dulce (CVC) y de la quemazón de las hojas o “crespera” del cafeto (CLS), entre otras enfermedades. En Brasil, dichas enfermedades concurren en varias regiones geográficas, y a menudo se encuentran plantaciones de cafeto afectadas por CLS adyacentes a plantaciones de naranjo con CVC. Ello ha sugerido que ambos cultivos pueden actuar como fuentes de inóculo para infecciones cruzadas, y que la bacteria es transmitida por especies de *Cicadellidae* vectores comunes a aquéllos.

El objetivo de este trabajo ha sido analizar la diversidad genética en una colección de 69 cepas de *X. fastidiosa* obtenidas de árboles de cafeto (43) y naranjo dulce (26) afectados por CLS o CVC, respectivamente en Brasil, en 17 localidades de los Estados de Goiás (1), Minas Gerais (5) y São Paulo (11). Los aislados de *X. fastidiosa* se obtuvieron de savia de pecíolos de hojas sintomáticas en medio PW, y su identidad específica se confirmó mediante ensayos PCR utilizando los iniciadores 272-1-int/272-2-int y FXYgyr499/RXYgyr907 que amplifican específicamente el gen *gyrB* de *X. fastidiosa*. La diversidad genética en las secuencias de los 69 aislados de *X. fastidiosa* de cafeto y naranjo dulce se comparó con 23 secuencias de otros aislados de *X. fastidiosa* procedentes de diversas partes del mundo y diversos huéspedes (adelfa, almendro, melocotonero, morera, olmo, vid, etc.), mediante análisis filogenético del gen *gyrB* utilizando los métodos Neighbour Joining y Maximun Parsimony (Programa Bionumerics 4.5).

Los resultados indican que los aislados de *X. fastidiosa* procedentes de cafeto difieren de los de naranjo dulce en un único nucleótido (SNP), y estos dos grupos se diferencian claramente de otros tres grupos formados por aislados obtenidos de adelfa (I), vid (II), y varios huéspedes herbáceos y leñosos (III). Además, se ha constatado la infección cruzada de naranjo dulce y vid por aislados procedentes de cafeto y almendro, respectivamente. La ocurrencia del SNP está siendo investigada para desarrollar un procedimiento diagnóstico mediante la técnica SSCP, que permita diferenciar los aislados de naranjo dulce de los de cafeto y ser de utilidad para estudios epidemiológicos de la CVC y la CLS.

Investigación financiada por el Proyecto ICA4-CT-2001-10005

**B-11****BIOGEOGRAFÍA DE *Pseudomonas* spp. FLUORESCENTES PRODUCTORAS DE FLOROGLUCINOL****LANDA, B.B.<sup>1,2</sup>, WELLER, D.M.<sup>3</sup>, JIMÉNEZ-DÍAZ, R.M.<sup>1,2</sup>**<sup>1</sup>ETSIAM, Universidad de Córdoba, Apdo. 3048, 14080 Córdoba.<sup>2</sup>Instituto de Agricultura Sostenible, CSIC, Apdo. 4084, 14080 Córdoba.<sup>3</sup>USDA-ARS, Root Disease and Biological Control Research Unit, WSU, Pullman, WA 99164-6430, USA.

Las bacterias pertenecientes a especies de *Pseudomonas* fluorescentes que producen el antibiótico 2,4-diacetilfloroglucinol ( $\text{phlD}^+$ ) son algunos de los agentes de control biológico (ACB) más efectivos que se conocen de microorganismos fitopatógenos (bacterias, hongos y nematodos) que residen en el suelo, y para los que se ha demostrado un papel clave en la supresividad de ciertos suelos a enfermedades en cultivos. En la actualidad, se conoce que en las poblaciones naturales de *Pseudomonas* spp. fluorescentes existe gran diversidad genética, que se ha evaluado mediante diferentes técnicas basadas en "fingerprintings" tales como ARDRA, RAPD, DGGE, rep-PCR y RFLP del gen *phlD*, o mediante análisis filogenéticos del gen *phlD* y del gen 16S del rDNA. Hasta la fecha, hemos demostrado que las técnicas BOX-PCR, RFLP-*phlD*, y el análisis filogenético del gen *phlD* presentan resultados muy concordantes, que han permitido identificar hasta 22 genotipos de dichas bacterias (denominados A a T y PfY & PfZ) y ampliar esta relación con al menos 6 nuevos genotipos. La importancia de la identificación de estos genotipos reside en que la naturaleza de ellos puede ser predictiva de su capacidad y especificidad en colonizar una determinada planta huésped, lo cual tiene importantes implicaciones para la aplicación efectiva de estas bacterias en su uso como ACB. Aunque nuestros estudios han reflejado que ciertos genotipos pueden ser endémicos de un país o área geográfica, este hecho puede reflejar el muestreo limitado que se ha realizado hasta la fecha a nivel mundial. Así, mientras que los genotipos A, D, L, M (y quizás F y J) son cosmopolitas, y se han localizado en diferentes continentes (África, América del Norte y Sur, y Europa), otros genotipos parecen ser endémicos sólo de algunos de éstos. La descripción detallada de la diversidad genotípica y distribución geográfica de este grupo de bacterias, unida a información acerca del tipo de suelo, huésped de origen y región climática, es extremadamente importante y ayudará en el futuro a comprender el papel que estas rizobacterias juegan en la supresividad natural de los suelos a enfermedades y en la defensa de las plantas en los ecosistemas naturales y agrícolas frente al ataque de agentes fitopatógenos.

**B-12****IS53, UNA HERRAMIENTA PARA ANALIZAR LA DIVERSIDAD GENÉTICA DE *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*****QUESADA, J.M.<sup>1</sup>, PÉREZ-MARTÍNEZ, I.<sup>2</sup>, RAMOS, C.<sup>2</sup>, LÓPEZ, M.M.<sup>1</sup>, PEÑALVER, R.<sup>1</sup>**<sup>1</sup>*Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA), Carretera Moncada-Náquera, Km 4,5, 46113 Moncada (Valencia). E-mail: rpenal@ivia.es*<sup>2</sup>*Sección de Genética, Facultad de Ciencias, Universidad de Málaga, Campus de Teatinos s/n, 29071 Málaga. E-mail: crr@uma.es*

Las mutaciones y reorganizaciones genéticas causadas por elementos de inserción son unos de los mecanismos más importantes para generar diversidad genética. Los elementos de inserción se han descrito también como herramientas de gran utilidad para la tipificación molecular y caracterización de aislados bacterianos. Además, conocer la estabilidad del elemento de inserción es crucial para la interpretación de los resultados en los estudios epidemiológicos y de tipificación molecular.

El elemento genético IS53 es una secuencia de inserción de 2.568 pares de bases inicialmente identificada en el plásmido pIAA2, portador de los genes responsables de la síntesis del ácido 3-indolacético, en una cepa de *Pseudomonas savastanoi* aislada de adelfa.

El análisis mediante hibridación del ADN genómico de una colección mundial de 62 cepas de *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* (Pss) aisladas de olivo con una sonda específica del elemento de inserción revelará que el IS53 estaba presente en múltiples copias (de 3 a 10) en todas las cepas ensayadas. Las hibridaciones del ADN plasmídico de 5 cepas de olivo con las sondas *repA* e IS53, revelaron que el elemento de inserción estaba presente en el cromosoma en las cepas de olivo pero no en algún plásmido, como fue inicialmente descrito en la cepa de adelfa. Aunque las cepas de Pss compartieron un alto grado de polimorfismo en los fragmentos de restricción que contenían el IS53, la transposición de este elemento fue un suceso extremadamente raro, tanto *in vitro* (en 4 cepas de Pss crecidas en cultivo líquido durante aproximadamente 490 generaciones), como *in vivo*, después de la recuperación a partir de tumores (un año después de la inoculación en plantas de olivo). La localización de las copias del IS53 en el genoma de Pss fue variable entre cepas, mostrando un alto grado de polimorfismo. El análisis de la diversidad genética de las 62 cepas de Pss, basada en los 48 patrones IS53 encontrados, permitió agruparlas en 7 grupos y dos de ellos estuvieron formados sólo por cepas españolas. En resumen, el patrón de hibridación del ADN cromosómico con sondas del IS53 puede ser una excelente herramienta de tipificación molecular de las cepas de la bacteria causante de la tuberculosis del olivo, para estudios epidemiológicos.

**B-13*****Pseudomonas* FLUORESCENTES CON PERFILES BIOQUÍMICOS ATÍPICOS: PATÓGENOS EMERGENTES DE KIWÍ EN ASTURIAS****GONZÁLEZ, A.J.<sup>1</sup>, ARGUDÍN, M.A.<sup>2</sup>, RODICIO, M.R.<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Laboratorio de Fitopatología, Servicio Regional de Investigación y Desarrollo Agroalimentario (SERIDA), Carretera de Oviedo s/n, 33300 Villaviciosa (Asturias). E-mail: anagf@serida.org.

<sup>2</sup>Dpto. de Biología Funcional (Área de Microbiología), Universidad de Oviedo.

En el laboratorio de Fitopatología del SERIDA se realiza un seguimiento de las bacteriosis que afectan a cultivos de interés en el Principado de Asturias. Las bacterias encontradas con mayor frecuencia son dos especies de *Pseudomonas* fluorescentes con amplio rango de hospedador: *P. syringae* y una variante de *P. viridiflava* con perfil LOPAT atípico. Además, a partir de plantas sintomáticas de kiwi se recuperaron 9 aislamientos de *Pseudomonas* fluorescentes cuyas propiedades bioquímicas no permitieron asignarlas a ninguna de las especies mencionadas. En esta comunicación se presenta la caracterización de dichos aislamientos. Todos ellos dieron negativa las pruebas de la oxidasa y la arginina dihidrolasa y positiva la hipersensibilidad en plantas de tabaco. La variabilidad en cuanto a otras propiedades (producción de levano, actividad pectinolítica, liquefacción de gelatina y utilización de L-lactato y adonitol) permitió diferenciar 6 biotipos. Se detectó una fuerte correlación entre biotipos y perfiles obtenidos en la diferenciación intraespecie mediante la técnica RAPD, utilizando distintos iniciadores.

El análisis de restricción de los ADNr 16S con las endonucleasas *SacI* e *HinfI* generó perfiles idénticos a los presentados por *P. syringae* pv *syringae*, utilizada como control. Además, 4 de los 9 aislamientos (incluidos 3 con actividad pectinolítica) inhibieron el crecimiento de *Rhodotorula mucilaginosa*, (utilizada en bioensayos para la detección de siringomicina, toxina característica de *P. syringae* pv *syringae*), y dieron amplificación positiva para los genes *syrB* y *syrD* (de la ruta de síntesis de esta toxina). Aunque 5 aislamientos dieron negativa la prueba del bioensayo, sólo dos fueron también negativos para *syrB* y *syrD*. Otros dos fueron positivos para *syrB* y negativos para *syrD* y uno positivo para ambos genes. Estos resultados apoyan la adscripción de, al menos, 7 aislamientos a *P. syringae*. Sin embargo, el intento de identificación mediante secuenciación de los ADNr 16S no fue concluyente. Se obtuvo una similitud muy elevada con patovares de *P. syringae* pertenecientes a diferentes genomoespecies (*glycinea*, *coryli* y *pisii*), así como con *P. congelans*. Por ello, la identificación definitiva de los aislamientos requerirá la aplicación de otras técnicas.

Finalmente, indicar que infecciones experimentales en el laboratorio confirmaron la elevada patogenicidad de los aislamientos en kiwi. Sin embargo, el daño causado en plántulas de judía y lechuga fue prácticamente nulo. Estos resultados sugieren una cierta especificidad de hospedador.

**B-14****CARACTERIZACIÓN DE AISLAMIENTOS DE *Erwinia persicina* CAUSANTES DE AMARILLO Y NECROSIS EN JUDÍA VERDE****GONZÁLEZ, A.J.<sup>1</sup>, GONZÁLEZ-VARELA, G.<sup>1</sup>, TELLO, J.C.<sup>2</sup>, JORDÁ, C.<sup>3</sup>, RODICIO, M.R.<sup>4</sup>**

<sup>1</sup>Laboratorio de Fitopatología, Servicio Regional de Investigación y Desarrollo Agroalimentario, Carretera de Oviedo s/n, 33300 Villaviciosa (Asturias). E-mail: anagf@serida.org.

<sup>2</sup>Dpto. Producción Vegetal, Universidad de Almería.

<sup>3</sup>Grupo de Virología, Universidad Politécnica de Valencia.

<sup>4</sup>Dpto. de Biología Funcional (Área de Microbiología), Universidad de Oviedo.

En cultivos de judía verde en invernaderos del sudeste español (Almería, Granada y Málaga) se han observado síntomas de clorosis y necrosis en hojas y deformación de vainas que se han podido asociar con la presencia de la bacteria *Erwinia persicina*.

Para profundizar en el estudio de esta bacteria se seleccionaron diez aislamientos recogidos en distintas explotaciones y tiempos, identificados mediante secuenciación del ADNr 16S. La caracterización bioquímica de estos aislamientos (API CH50 con el medio APICHB/E) reveló tres perfiles distintos, observándose diferencias en la utilización de la rafinosa, el adonitol y el eritritol. Mediante la técnica RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) de tipificación genética también se encontraron distintos perfiles. La heterogeneidad genética y bioquímica sugiere que la bacteria ha tenido tiempo de evolucionar, diversificándose, por lo que no sería de nueva introducción. Esta hipótesis vendría avalada por el descubrimiento reciente de *E. persicina* en biofilms localizados en pinturas del paleolítico en el interior de la cueva de los murciélagos en Zuheros (Córdoba). Quedaría por explicar qué ha ocurrido en el pasado reciente para que se detecte asociada a una patología observada únicamente a partir de finales de 2003.

Un problema observado cuando se inocularon experimentalmente estas bacterias en plantas de judía fue la constante contaminación de los testigos, utilizados como control, en la misma cámara de incubación. Sin embargo, los testigos mantenidos en las mismas condiciones, pero separados físicamente de las plantas inoculadas, permanecían sanos. Para explicar este hecho se investigaron posibles vectores de la bacteria, analizándose las moscas presentes en la turba así como larvas de trips presentes en las plantas de judía (mediante maceración en agua estéril durante dos horas y siembra posterior en medio King B). El resultado fue el aislamiento de una bacteria que muestra las características de *E. persicina*, aunque todavía no se ha realizado su identificación genética. Bacterias próximas a *Erwinia* se han descrito en la literatura como simbioses de insectos. Este aspecto es de gran interés y será uno de los puntos a estudiar en el futuro.



**B-15****DETECCIÓN DE *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* Y *Dickeya chrysanthemi* EN AGUAS DE RIEGO EN ARAGÓN****PALACIO-BIELSA, A.<sup>1</sup>, BEZOS-CAMPS, R.<sup>1</sup>, CAMBRA-ÁLVAREZ, M.A.<sup>2</sup>**<sup>1</sup>*Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria de Aragón, Apdo. 727, 50080 Zaragoza. E-mail: apalaciob@aragon.es*<sup>2</sup>*Centro de Protección Vegetal, Apdo. 727, 50080 Zaragoza. E-mail: mcambra@aragon.es*

Las bacterias pectolíticas antes incluidas en el género *Erwinia*, y ahora en los géneros *Pectobacterium* y *Dickeya*, son responsables de podredumbres blandas en distintas especies vegetales, afectando a un amplio rango de plantas cultivadas y ocasionando graves pérdidas en las cosechas.

Estas bacterias son frecuentes en aguas superficiales de lagos, ríos, pantanos, y también en el mar. Diversos estudios realizados en Estados Unidos, Australia, y en distintos países de la Unión Europea, han demostrado que también están presentes en aguas de riego de campos cultivados, encontrando una relación entre el uso de aguas contaminadas para el riego y la incidencia de podredumbres blandas en patata y maíz, entre otros cultivos.

Por ello, ante la incidencia de este tipo de podredumbres en ambos huéspedes, se analizó la presencia de las bacterias pectolíticas *Pectobacterium* (*Erwinia*) *carotovorum* subsp. *carotovorum*, *Dickeya* (*Erwinia*, *Pectobacterium*) *chrysanthemi* y *Pectobacterium* (*Erwinia*) *atrosepticum* en las aguas de cinco ríos de Aragón, así como en canales destinados al riego de plantaciones de maíz y cebolla infectadas de la misma zona, que fueron recogidas durante 2005. Los aislamientos se realizaron mediante enriquecimiento de las muestras de agua en medio Doble-PEM en condiciones de anaerobiosis y posterior siembra en el medio selectivo cristal violeta pectato (CVP) modificado. Se seleccionaron colonias con morfología característica y se purificaron en medio King B para su caracterización. Los análisis bioquímicos y moleculares (PCR) confirmaron la identificación de aislados de *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* y *D. chrysanthemi* en todas las fuentes de agua analizadas. Sin embargo, la mayoría de los aislados de *D. chrysanthemi* no fueron reconocidos por anticuerpos comerciales policlonales y monoclonales en análisis ELISA. No se aisló *P. atrosepticum* en ninguna de las muestras de agua. Todas las cepas de aguas de riego estudiadas de las especies citadas fueron capaces de causar podredumbres blandas en tubérculos de patata inoculados.

Los resultados de este trabajo indican que las aguas de los ríos y canales de riego de Aragón pueden constituir una fuente de inóculo de estas bacterias patógenas y, por tanto, favorecer la diseminación de estas enfermedades en distintos cultivos.

**B-16****DETECCIÓN DE FITOPLASMAS EN PLANTAS DE ALCACHOFA CON SÍNTOMAS DE DEGENERACIÓN****BATLLE, A., SABATÉ, J., LAVIÑA, A.**

*Dpt. Protecció Vegetal, Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentàries, IRTA, 08348 Cabrils (Barcelona). E-mail: assumpcio.batlle@irta.es*

La presencia de plantas con hojas rizadas, enanismo y producción tardía, es un problema que afecta considerablemente el rendimiento del cultivo de la alcachofa. Los estudios realizados durante un gran número de años para relacionar la presencia de estos síntomas con distintos virus, como el ADV (*Artichoke degeneration virus*), ALV (*Artichoke latent virus*), BBWV (*Broad bean wilt virus*), CMV (*Cucumber mosaic virus*) y muchos otros, no fueron concluyentes. Otros autores relacionaron este fenómeno como una involución de la variedad hacia la especie de origen.

En una prospección realizada en las principales áreas de cultivo de alcachofa de Cataluña, se observó que la distribución de las plantas degeneradas en las parcelas y la presencia de plantas con una parte normal y otra degenerada, podía estar relacionada con la presencia de algún fitoplasma.

Para ello se tomaron muestras de 30 plantas con síntomas y de 30 sin síntomas, en tres parcelas del Baix Llobregat y en dos del Delta del Ebro, las cuales se analizaron por PCR. La extracción de ADN se realizó a partir del floema de los pecíolos y de las nervaduras principales de las hojas. La detección del fitoplasma se llevó a cabo mediante PCR-nido con los cebadores diseñados para el gen ribosómico 16S rRNA, fP1/rTint y fU5/rU3. Así mismo se realizó otra PCR-nido con los cebadores Tuf 1 f/r en la primera etapa y TufAY f/r en la segunda, los cuales amplifican un fragmento del gen de elongación Tu, de los fitoplasmas pertenecientes a los grupos Aster yellows y stolbur.

Los resultados obtenidos han mostrado que existe una correlación entre la presencia de síntomas y la detección de fitoplasmas, ya que estos se detectaron en el 100% de las plantas con síntomas (30/30) y solo en una de las plantas asintomáticas. Mediante PCR se obtuvo amplificación en todas las muestras de ADN procedentes de plantas con síntomas, tanto con los cebadores universales como con los específicos del gen Tu. La digestión con diferentes enzimas de restricción del producto de amplificación obtenido con los cebadores universales mostró tres perfiles, correspondiendo el mayoritario al grupo de los Aster yellows. Estos resultados indican que la presencia de fitoplasmas puede contribuir por si sola o en conjunción con otros patógenos al desarrollo de esta patología. Estudios más extensivos se están llevando a cabo para confirmar estos resultados.

**B-17****CUANTIFICACION DE LA INFECCIÓN POR FITOPLASMAS DEL GRUPO 16S rRNA-X, MEDIANTE PCR A TIEMPO REAL, EN DISTINTAS VARIEDADES DE PERAL Y CIRUELO****TORRES, E.<sup>1</sup>, LAVIÑA, A.<sup>2</sup>, SABATÉ, J.<sup>2</sup>, VALLEJO, R.<sup>1</sup>, BATLLE, A.<sup>2</sup>**<sup>1</sup>Laboratori de Sanitat Vegetal, DARP, Generalitat de Catalunya, 08040 Barcelona.<sup>2</sup>Dpt. Protecció Vegetal, Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentàries, IRTA, 08348 Cabrils (Barcelona).

Las enfermedades producidas por fitoplasmas son difíciles de controlar ya que no hay disponibles medidas directas de control. Uno de los medios para evitar o minimizar los daños producidos por estas enfermedades es disponer de material vegetal resistente o tolerante. Para las enfermedades producidas por fitoplasmas se ha observado que la menor expresión de síntomas esta ligada muchas veces a la falta de reinfecciones y por tanto a una menor concentración de la población de fitoplasmas. Este hecho se constata también en la dificultad de detectar el fitoplasma en las variedades tolerantes aunque estén infectadas. Para las especies del genero *Prunus* se han citado importantes diferencias de susceptibilidad frente al fitoplasma causante de los *European stone fruit yellows* (ESFY), así por ejemplo el albaricoquero, los ciruelos japoneses y el melocotonero son más susceptibles que el *Prunus cerasifera* (Myrabolan) y que los genotipos de *Prunus domestica*. Así mismo en un seguimiento de la detección mensual del fitoplasma asociado al Pear decline (*Candidatus Phytoplasma pyri*) en árboles infectados de dos variedades de peral (cv. Blanquilla y cv. Bartlett), el fitoplasma se detectaba con una única PCR en los árboles de la variedad Bartlett, mientras que en la variedad Blanquilla era necesario la realización de la PCR-nido. Esto estaba también relacionado con la presencia de síntomas que fueron mucho más evidentes en la variedad Bartlett.

Los objetivos de este trabajo han sido, aplicar la técnica de la PCR a tiempo real, con la finalidad de poder cuantificar la concentración fitoplasmática en árboles de distintas variedades de peral y ciruelo, infectadas con PD y ESYF respectivamente y determinar la relación existente entre concentración fitoplasmática y la presencia de síntomas. Para ello, se han utilizado árboles de dos variedades de peral (Bartlett y Blanquilla) y árboles de 5 patrones de ciruelo. Los árboles se han analizado por un lado mediante PCR-nido con cebadores universales y específicos y por otra mediante PCR cuantitativa.

Los primeros resultados obtenidos con PCR cuantitativa han indicado una mayor concentración fitoplasmática en la variedad de peral que presentaba menor tolerancia a la enfermedad, obteniéndose un número de copias del gen 16Sr que osciló entre 40 y 3.100, lo que equivale a un número de fitoplasmas por gramo de tejido de 200 a 155.000.

Trabajo financiado con el proyecto INIA RTA04-066

**B-18****SINTOMATOLOGÍA Y ETIOLOGÍA DE LA NECROSIS APICAL DE LA NUEZ EN PLANTACIONES DE NOGAL DE CATALUÑA****MORAGREGA, C., PICO, P., SANTAMARÍA, G., MONTESINOS, E.**

*Institut de Tecnologia Agroalimentària, CeRTA-CIDSAV, Universitat de Girona, Avda Lluís Santaló s/n, 17071 Girona. E-mail: cmorag@intea.udg.es*

La necrosis apical de la nuez es una enfermedad de aparición reciente que en los últimos años ha provocado importantes pérdidas en la producción de nuez en los países mediterráneos (Italia, Francia, Portugal y España). La enfermedad se observó por primera vez en España en 1997 y en Italia en 1998 como consecuencia de una caída severa de frutos que en algunas plantaciones podía superar el 20% de la producción. En algunas fincas de nogal de las comarcas de Tarragona la elevada incidencia de la enfermedad llegó a producir la pérdida total de la producción de nuez. De hecho, el efecto más importante de la enfermedad es la caída prematura de los frutos.

Los síntomas de la enfermedad consisten en manchas necróticas de color marrón en los frutos que se originan exclusivamente en la zona apical de la nuez y que interiormente se manifiestan en podredumbre y ennegrecimiento de los tejidos. Estos síntomas difieren de los producidos por la bacteria *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis*, causante de la necrosis bacteriana del nogal, caracterizados por manchas necróticas, a menudo de aspecto aceitoso, que pueden localizarse en toda la superficie del fruto, no sólo en la zona apical. A pesar de los trabajos realizados por grupos de investigación de los países afectados por la enfermedad, hasta el momento el agente o agentes causantes no se han identificado de forma clara.

En los aislamientos realizados por el Instituto de Tecnología Agroalimentaria de la Universitat de Girona a partir de frutos afectados por la enfermedad procedentes de fincas de Tarragona no se obtuvieron resultados concluyentes sobre el agente o agentes causantes de la enfermedad ya que se identificaron diversas especies de hongos de los géneros *Fusarium* y *Alternaria* y la bacteria *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis*. La presencia consistente de *X. a.* pv. *juglandis* en los aislados realizados en diversos años demuestran que las dos enfermedades pueden coexistir, aunque la necrosis bacteriana se manifiesta también con manchas laterales y en las hojas y brotes. En base a estos resultados, hasta el momento la necrosis apical de la nuez debe considerarse como una enfermedad de etiología compleja en la que pueden estar implicados distintos microorganismos fitopatógenos.

**B-19****NUEVAS TÉCNICAS MOLECULARES PARA LA DETECCIÓN DE *Verticillium dahliae* Y *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* EN OLIVO. APLICACIONES A LA CERTIFICACIÓN DE MATERIAL VEGETAL****BERTOLINI, E.<sup>1</sup>, MORERA, B.<sup>2</sup>, CAMBRA, M.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA), Carretera Moncada-Náquera, Km 5, 46113 Moncada (Valencia). E-mail: ebertoli@ivia.es

<sup>2</sup>Servicio de Producción Agrícola, Laboratorio de Producción y Sanidad Vegetal de Sevilla, Apdo 121, 41089 Montequinto (Sevilla). E-mail: beatriz.morera.ext@juntadeandalucia.es

*Verticillium dahliae* y *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* (Pss) causan la verticilosis y la tuberculosis del olivo, respectivamente, las dos enfermedades más importantes del cultivo del olivo, que provocan pérdidas en la producción y en casos severos, incluso la muerte del árbol. Son una grave amenaza para el cultivo del olivo por su creciente expansión en nuevas plantaciones intensivas y por la dificultad que presenta su control. La principal medida para evitar la dispersión de éstas enfermedades a nuevas plantaciones es el uso de material vegetal libre de estos patógenos. Los métodos de detección de *V. dahliae* están basados en técnicas de aislamiento en medio de cultivo y de “nested PCR” en dos tubos. El aislamiento es complicado y sólo se logra con material sintomático. Además, “nested PCR” en dos tubos supone un alto riesgo de contaminación debido a la manipulación de amplificadores. En el caso de Pss, se han descrito previamente métodos de “nested PCR” y “multiplex nested PCR” en un solo tubo cerrado que permiten la detección de concentraciones muy bajas de esta bacteria (1 ufc/ml). En este trabajo se ha desarrollado un sistema de PCR cooperativa (Co-PCR) para la detección de *V. dahliae* y un sistema “duplex nested PCR” en un solo tubo cerrado para la detección simultánea y sensible de *V. dahliae* y de Pss. En el caso de *V. dahliae* la sensibilidad alcanzada por la Co-PCR y por “duplex nested PCR” es similar que la de “nested PCR” en dos tubos, pero sin los riesgos de contaminación. En el caso de Pss la sensibilidad de los métodos descritos anteriormente (1 ufc/ml) se mantiene en el “duplex nested-PCR”. Estos métodos están siendo validados con muestras de campo y serán comercializados en forma de estuches liofilizados, listos para su uso directo, para facilitar su utilización en los análisis necesarios para la certificación de material vegetal de olivo.

**B-20****UTILIZACIÓN DE HIDRÓXIDO POTÁSICO (KOH) COMO INHIBIDOR PARA FACILITAR EL AISLAMIENTO DE *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*****PALOMO, J.L.<sup>1</sup>, ROSELLÓ, M.<sup>2</sup>, GARCÍA-BENAVIDES, P.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Centro Regional de Diagnóstico, Junta de Castilla y León, Apdo. 61, 37080 Salamanca. E-mail: jlp@usal.es

<sup>2</sup>Laboratorio de Diagnóstico, Generalitat Valenciana, Ctra. Alicante-Valencia, Km 276,5, 46460 Silla (Valencia). E-mail: rosello\_monper@gva.es

*Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* (*Cms*), bacteria Gram + causante de la podredumbre anular de la patata, es un organismo de cuarentena incluido en la lista A-II de la Unión Europea (R.D. 58/2005). La metodología oficial de análisis (Directiva 93/85/EEC) exige el aislamiento e identificación de la bacteria. Sin embargo, el hecho de que *Cms* sea una bacteria de crecimiento muy lento, que se inhibe en presencia de otras bacterias de crecimiento más rápido, unido a la ausencia de medios selectivos eficaces, hace que su aislamiento sea complejo y que se necesite una inoculación previa en planta de berenjena, lo que incrementa la duración de los análisis. El efecto agresivo del KOH sobre las paredes celulares de las bacterias Gram -, se ha utilizado en análisis microbiológico de alimentos para facilitar el aislamiento de bacterias Gram +.

El objetivo de este trabajo ha sido evaluar la posible utilización del KOH como inhibidor de crecimiento de bacterias Gram - en extractos de patata para facilitar el aislamiento de *Cms*, así como comparar su efectividad frente a la utilización de medios de cultivo semiselectivos.

En primer lugar se comprobó el efecto inhibidor del KOH frente a bacterias Gram - y la tolerancia de *Cms* a determinadas concentraciones de KOH. A continuación se determinó la concentración de KOH óptima en la cual se produjo una inhibición total de bacterias Gram - permitiendo el crecimiento de *Cms*. Para ello se ensayaron distintas cepas de *Cms* y diferentes especies de bacterias Gram -, cuantificando el número de ufc ante concentraciones variables de KOH en diferentes condiciones (agua, extracto de patata, etc.). Finalmente se pudo determinar que los mejores resultados se alcanzaron con 20-40 µl de KOH 1N por cada 250 µl de extracto de patata. A estas concentraciones se produjo una inhibición total del crecimiento de las especies Gram - ensayadas mientras que los niveles de crecimiento de *Cms* se mantuvieron entre el 60 y el 90%. Por último, para comprobar la eficacia real del método contra la flora bacteriana presente en extractos de patata, se compararon siembras de diferentes extractos de patata en medios semiselectivos (NCP-88, MTNA) con siembras en medio general (NBY) previamente tratadas con KOH.

**B-21****COMPARACIÓN DE LA SEPARACIÓN INMUNOMAGNÉTICA CON TÉCNICAS SEROLÓGICAS, MOLECULARES Y DE AISLAMIENTO PARA LA DETECCIÓN DE *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* EN SEMILLAS DE TOMATE****DE LEÓN, L.<sup>1</sup>, RODRÍGUEZ, A.<sup>1,2</sup>, LÓPEZ, M.M.<sup>3</sup>, SIVERIO, F.<sup>4</sup>**

<sup>1</sup>Dpto. Protección Vegetal, Instituto Canario de Investigaciones Agrarias (ICIA), Apdo. 60, 38200 La Laguna (Tenerife).

<sup>2</sup>Dpto. Microbiología y Biología Celula, Facultad de Farmacia, Universidad de La Laguna, 38207 La Laguna (Tenerife).

<sup>3</sup>Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA), Carretera Moncada-Náquera, Km 4,5. 46113 Moncada (Valencia).

<sup>4</sup>Sección de Laboratorio de Sanidad Vegetal de la Consejería de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentación del Gobierno de Canarias.

Se comparó la sensibilidad de la separación inmunomagnética (IMS) en la detección de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, agente causal del chancro bacteriano en tomate, con métodos clásicos de siembra en medio de cultivo general (LPGA) y semiselectivo (mSCM), enriquecimiento en medio semiselectivo, ELISA-DAS, inmunofluorescencia indirecta (IF) y PCR. Estas técnicas fueron evaluadas con suspensiones de la bacteria, extractos de semilla inoculados y muestras de semilla infectadas de forma natural. La aplicación de la IMS antes de la siembra en medio LPGA permitió detectar concentraciones inferiores a 10 ufc/ml del patógeno en todas las muestras analizadas. La siembra directa en medio mSCM detectó entre 10 y 10<sup>2</sup> ufc/ml, lo que mejoró considerablemente los resultados obtenidos en medio LPGA con extractos de semilla, aunque las colonias no pudieron ser identificadas hasta 14 días después de la siembra. El enriquecimiento de las muestras en mSCM líquido, previo a la siembra en placas de agar, no incrementó la sensibilidad en la detección respecto a la siembra directa. La IF detectó 10<sup>3</sup> ufc/ml, mientras que mediante ELISA-DAS se detectaron en extractos de semillas inoculados y en extractos de semillas infectadas de forma natural 10<sup>5</sup> y 10<sup>4</sup> ufc/ml, respectivamente. Mediante PCR se amplificó la secuencia específica para la bacteria en suspensiones del patógeno hasta 10<sup>3</sup> ufc/ml. La IMS demostró la mayor sensibilidad y especificidad entre las técnicas evaluadas para la detección de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, al favorecer su aislamiento selectivo y permitir así la caracterización de los aislados y la verificación de su poder patógeno.

**B-22****DETECCIÓN DE *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* EN FRUTOS DE CÍTRICOS IMPORTADOS**

**PEÑALVER, J.<sup>1</sup>, LLOP, P.<sup>1</sup>, QUESADA, J.M.<sup>1</sup>, MORENTE, M.C.<sup>1</sup>, GOLMOHAMMADI, M.<sup>1</sup>, LÓPEZ, M.M.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>*Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA), Carretera de Moncada-Náquera, Km 4,5, 46113 Moncada (Valencia). E-mail: jpenal@ivia.es*

La cancrrosis causada por *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*, es una de las enfermedades más graves de los cítricos, de fácil diseminación y de difícil erradicación y control. Por ello, esta bacteria está considerada como un organismo de cuarentena en la legislación de la U.E. Los síntomas característicos de esta bacteriosis son la aparición de lesiones en hojas, ramas y frutos. La cancrrosis de los cítricos en la actualidad se encuentra muy extendida por países asiáticos y africanos y en Sudamérica tiene gran importancia en Brasil, Argentina, Paraguay y Uruguay. Esta enfermedad no se ha descrito en ningún país europeo, pero ante el riesgo de introducción de la bacteria por la importación de frutos procedentes de países en los que está presente dicho patógeno, la legislación de la U.E. prohíbe la comercialización de frutos con síntomas.

Para detectar *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* se han analizado frutos con lesiones sospechosas, importados de distintos países, en el Laboratorio de Referencia de Bacterias Fitopatógenas (IVIA), siguiendo una metodología basada en el protocolo de la OEPP. Las técnicas utilizadas han sido las siguientes: a) aislamiento directo del extracto en distintos medios de cultivo sólidos (NGA, YPGA), b) PCR convencional utilizando iniciadores de Hartung *et al.* (1993), con extracción previa del ADN según el protocolo de Llop *et al.* (1999), c) PCR a tiempo real (Cubero and Graham, 2005) y d) bioensayo mediante inoculación en hojas de pomelo. La sensibilidad de las distintas técnicas ha sido evaluada tanto en suspensiones de cultivos puros, como en extractos de frutos inoculados, llegándose a detectar 1 célula bacteriana/ml. de extracto mediante PCR a tiempo real.

Los resultados de los análisis de frutos importados en 2005 han confirmado la validez del protocolo aplicado. Mediante PCR a tiempo real se detectó *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* en el 11,1% de las muestras, mediante PCR convencional en el 8,2% y en el 4,8% se aislaron células vivas y patógenas de *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*.



**B-23****CARACTERIZACIÓN DE CEPAS ESPAÑOLAS DE *Agrobacterium* spp. AISLADAS DE TUMORES DE VID**

**PALACIO-BIELSA, A.<sup>1</sup>, GONZÁLEZ-ABOLAFIO, R.<sup>2</sup>, LASTRA, B.<sup>3</sup>, CAMBRA-ÁLVAREZ, M.A.<sup>4</sup>, SALCEDO, C.I.<sup>2</sup>, MARCO-NOALES, E.<sup>2</sup>, PEÑALVER, R.<sup>2</sup>, LÓPEZ, M.M.<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria de Aragón, Apdo. 727, 50080 Zaragoza. E-mail: apalaciob@aragon.es

<sup>2</sup>Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA), Carretera Moncada-Náquera, Km 4,5, 46113 Moncada (Valencia). E-mail: mlopez@ivia.es

<sup>3</sup>Escuela Politécnica Superior, Universidad de Santiago de Compostela, 27002 Lugo. E-mail: bvlastra@usc.es

<sup>4</sup>Centro de Protección Vegetal, 50080 Zaragoza. E-mail: mcambra@aragon.es

Los tumores bacterianos de la vid están causados principalmente por *Agrobacterium vitis* (biovar 3), aunque también se han aislado, con menor frecuencia, en varios países y también en España, cepas de la especie *A. tumefaciens* (biovar 1).

En este trabajo se han aislado y caracterizado fenotípica y genotípicamente una colección de 70 cepas representativas de distintas zonas vitivinícolas de España. Se han analizado las características fisiológicas, bioquímicas, serológicas, moleculares, y se han realizado ensayos de patogenicidad en distintos huéspedes, incluida la vid.

La clasificación en biovares de todas las cepas ha mostrado que la mayoría de los aislados corresponden al biovar 3, pero también se han aislado algunas cepas del biovar 1. Además, por primera vez en España se han aislado cepas de la especie *A. rhizogenes* (biovar 2) a partir de tumores de vid. También se han encontrado infecciones mixtas de *A. vitis* y *A. tumefaciens* en la misma planta.

Los ensayos de patogenicidad han mostrado que la mayoría de las cepas son de amplio rango de huéspedes, pero se encontraron algunas cepas de *A. vitis* de limitado rango de huésped, siendo capaces de producir tumores únicamente en plantas de vid.

La secuenciación parcial del 16S rDNA y los patrones de utilización de fuentes de carbono (BIOLOG) han confirmado la identificación de aislados de las tres especies.

El análisis de amplificación mediante PCR con siete parejas de iniciadores, basados en secuencias cromosómicas y en diferentes regiones del plásmido Ti, demuestran la existencia de variabilidad genética entre los aislados españoles de *A. vitis*.

**B-24****BÚSQUEDA DE EFECTORES DEL SISTEMA HRP DE SECRECIÓN TIPO III EN PATOVARES DE *Pseudomonas syringae*****MACHO, A.P., GUEVARA, C.M., RUIZ-ALBERT, J., BEUZÓN, C.R.***Departamento de Biología Celular, Genética y Fisiología, Área de Genética, Universidad de Málaga, Campus de Teatinos, 29071 Málaga.*

Las bacterias patógenas han desarrollado numerosas estrategias para colonizar y multiplicarse en sus hospedadores eucariotas. Una de las más importantes en la patogénesis tanto de plantas como de animales es la capacidad de secretar proteínas (efectores) en el citosol de la célula hospedadora mediante complejos sistemas de secreción conocidos como sistemas de secreción tipo III. Una vez en el interior de la célula hospedadora estos efectores son capaces de modificar procesos del hospedador de muy diversas maneras, con un fin común: permitir la supervivencia y multiplicación de la bacteria. La identificación y posterior caracterización funcional de dichos efectores es por tanto de gran interés en la caracterización de los procesos de infección, y la identificación de los procesos y implicados en el hospedador. En la actualidad, la caracterización bioquímica y celular de la función de efectores en bacterias patógenas de animales está muy avanzada, sin embargo solo unos pocos han sido caracterizados en bacterias fitopatógenas. La reciente finalización de la secuenciación de los genomas de varias bacterias fitopatógenas ha supuesto un notable incremento en el número de efectores identificados, que supera los 50 en *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000. Sin embargo, son muchos los patovares de esta especie para los cuales el número de efectores identificados hasta la fecha es muy inferior, ya que estos son específicos de patovar o incluso de estirpe. En este trabajo, hemos utilizado dos estrategias complementarias para la búsqueda de efectores en otros patovares de *Pseudomonas syringae*. Por una parte, hemos analizado la secuencia del genoma de *P. syringae* pv. *phaseolicola* buscando similitud de secuencia total o parcial con efectores identificados en otras bacterias patógenas, identificando 18 candidatos a efectores en esta bacteria. De ellos, 9 han sido posteriormente confirmados como efectores por otro laboratorio, por lo que este trabajo nos hemos centrado en el análisis de los 9 restantes. La segunda estrategia ha consistido en la búsqueda, mediante análisis bioinformático en las bases de datos disponibles, de genes de bacterias fitopatógenas que estén asociados a TTSS y que pudieran actuar en la planta como proteasas específicas de SUMO. La interferencia con los sistemas de sumolización (unión reversible del péptido SUMO) propios de células eucariotas por parte de proteínas de virulencia secretadas por TTSS de patógenos bacterianos ha sido descrita en bacterias patógenas de animales y de plantas. Hemos identificado 17 genes en diversos géneros de bacterias fitopatógenas, de los cuales cinco pertenecen a distintos patovares de *P. syringae*. De las proteínas codificadas por estos cinco genes, solo dos han sido confirmadas como secretadas por TTSS, por lo que nos hemos centrado en estudiar la secreción de los tres restantes. Para determinar si nuestros candidatos son efectores, estamos utilizando un ensayo funcional basado en el uso de un efector heterólogo, AvrRpt2, que dispara respuesta de hipersensibilidad (HR) de *Arabidopsis*, como reporter de translocación.

**B-25****ÍNDICE DE COMPETITIVIDAD: UN MÉTODO PRECISO Y SENSIBLE PARA EL ANÁLISIS DE LA VIRULENCIA EN *Pseudomonas syringae*****MACHO, A.P., ZUMAQUERO, A., ORTIZ-MARTÍN, I., BEUZÓN, C.R.***Departamento de Biología Celular, Genética y Fisiología, Área de Genética, Universidad de Málaga, Campus de Teatinos, 29071 Málaga*

La supervivencia y replicación de una bacteria patógena en un hospedador susceptible depende de un gran número de factores y está directamente relacionada con su capacidad patogénica. La pérdida de uno o varios de esos factores conlleva en muchos casos una reducción del crecimiento de la bacteria *in vivo*, que lleva asociado una atenuación de los síntomas que ésta causa en el hospedador. La determinación del papel que estos factores juegan en la infección precisa métodos sensibles de cuantificación y análisis genético de la virulencia. En sistemas animales, las infecciones mixtas han permitido llevar a cabo este tipo de análisis, así como la puesta a punto de métodos de alto rendimiento para la búsqueda de nuevos factores de virulencia. De este modo se ha conseguido establecer relaciones funcionales entre factores de virulencia, incluyendo su asignación a circuitos de regulación, secreción o transporte en patógenos como *Salmonella* o *Streptococcus*. La aplicación más extendida de las infecciones mixtas es su uso en la determinación de índices de competitividad, en infecciones en las que el inoculo está compuesto a partes iguales de la estirpe silvestre, y de una estirpe isogénica, portadora de una mutación en el gen cuyo papel en virulencia queremos analizar. En el análisis de virulencia en plantas, son muy pocas las aproximaciones basadas en infecciones mixtas que se ha utilizado, pero su potencial es al menos tan amplio como lo es en sistemas animales. En este trabajo, hemos puesto a punto las condiciones experimentales que permiten el uso de índices de competitividad como ensayo para el análisis genético de la virulencia in planta utilizando como modelos de análisis la interacción entre *Pseudomonas syringae* pv *phaseolicola* (1448a) y *Phaseolus vulgaris* (judía), así como de la estirpe modelo *P. syringae* pv. *tomato* (DC3000) con *Arabidopsis thaliana* y tomate. Hemos demostrado la validez del método mediante el análisis de la virulencia de mutantes afectados en el sistema Hrp de secreción tipo III o de sus efectores, atenuados o causantes de respuesta de hipersensibilidad (HR) en judía, y establecido su sensibilidad, y precisión, superiores a los ensayos habitualmente utilizados en estos modelos.

**B-26****RESISTENCIA A *Pseudomonas syringae* pv. *pisi* EN CULTIVARES DE GUISANTE (*Pisum sativum*)****MARTÍN, A., GARCÍA, C.A., CAMINERO, C.**

*Departamento de Producción Vegetal y Agronomía, Instituto Tecnológico Agrario de Castilla y León (ITACyL), Ctr. Burgos–Portugal, Km 119, Finca Zamadueñas, 47071 Valladolid. E-mail: camsalco@itacyl.es*

Bajo los condicionantes de siembras otoño-invernales de guisante proteaginoso (*Pisum sativum* L.) en Castilla y León, la bacteriosis se ha mostrado como la enfermedad más agresiva. El patógeno que más frecuentemente se ha aislado es *Pseudomonas syringae* pv. *pisi* (*Psp*), desconociéndose la resistencia al mismo en la mayoría de las variedades comerciales empleadas en España. Por este motivo nos hemos propuesto la evaluación de los cultivares más empleados en nuestra región por su resistencia a *Psp*. Se ha descrito una relación gen a gen entre las siete razas definidas hasta el momento de este patógeno y un conjunto de variedades de guisante. Esta interacción se ha utilizado para postular la presencia de genes de resistencia a *Psp* en cultivares de guisante tras observar la respuesta ofrecida por los mismos a las siete razas tipo del patógeno en cámara de ambiente controlado. Hasta el momento se ha completado la evaluación para 41 cultivares, y actualmente, está siendo ampliada con más variedades comerciales, una colección nuclear mundial de *Pisum* sp y otra de variedades locales de origen español. Según trabajos de nuestro grupo de investigación, hemos encontrado que las razas de *Psp* mayoritarias en Castilla y León son, por este orden, la 4, la 6, la 2 y la 5. Ninguna de las variedades evaluadas ha sido resistente a todas estas razas en conjunto. Todas han sido susceptibles a la raza 6, para la cual las fuentes de resistencia dentro de *P. sativum* son muy limitadas. Tan sólo ha habido dos cultivares resistentes conjuntamente a la raza 2 y a la 4, aunque no parecen ser los más adecuados para los ambientes castellano-leoneses. Ha habido otras tres variedades comerciales resistentes a la raza 4 y otras 10 lo han sido a la 2. Al considerar los cultivares evaluados por su fecha de siembra recomendada, encontramos que de las 12 variedades resistentes a la raza 2, nueve son de invierno. De este modo, se podría considerar que la baja incidencia de esta raza en Castilla y León, que es la predominante a nivel mundial, podría deberse a este motivo, ya que aquí se incluyen algunas de las más empleadas en nuestra región. La carencia detectada en el material evaluado en lo referente a acumulación de genes de resistencia para las distintas razas de *Psp* presentes en nuestra región, se revela de esta forma como un problema crucial a ser resuelto para permitir la implantación definitiva del cultivo de guisante proteaginoso en los secanos castellano-leoneses.

El presente estudio ha sido financiado por el proyecto ITACyL 2004/845. Alberto Martín es beneficiario de una beca predoctoral del INIA.

**B-27****LAS ACTIVIDADES POLIFENOL OXIDASAS EXPRESADAS POR LA BACTERIA FITOPATÓGENA *Ralstonia solanacearum* LE CONFIEREN RESISTENCIA A COMPUESTOS FENÓLICOS**

**HERNÁNDEZ-ROMERO, D.<sup>1</sup>, MARCO-NOALES, E.<sup>2</sup>, LÓPEZ, M.M.<sup>2</sup>, SOLANO, F.<sup>3</sup>, SANCHEZ-AMAT, A.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>*Departamento de Genética y Microbiología, Facultad de Biología, 30100 Murcia. E-mail: antonio@um.es*

<sup>2</sup>*Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA), Carretera Moncada-Náquera, Km 5, 46113 Moncada (Valencia).*

<sup>3</sup>*Departamento de Bioquímica y Biología Molecular B, Universidad de Murcia, 30100 Murcia.*

Las polifenol oxidasas (PPO) son cuproproteínas capaces de oxidar compuestos fenólicos utilizando oxígeno. Se encuentran distribuidas en toda la escala filogenética, incluyendo animales, plantas y microorganismos. Se distinguen dos grupos: tirosinasas y lacasas. Estas últimas pertenecen al grupo de las multicobre-proteínas azules. En procariotas son escasos los ejemplos de microorganismos que expresan actividades PPO y la función fisiológica de estas enzimas es en gran medida desconocida.

*Ralstonia solanacearum* es una bacteria fitopatógena capaz de infectar plantas solanáceas. La secuenciación del genoma de este microorganismo reveló la existencia de hasta cuatro genes que podrían codificar actividades PPO, dos tirosinasas y dos multicobre proteínas. Mediante mutagénesis dirigida de cada uno de los genes de interés, caracterización de los mutantes obtenidos y purificación de las enzimas, se ha observado la expresión de tres de estas proteínas y se ha confirmado que poseen actividad PPO. Con el fin de caracterizar la función fisiológica de las enzimas obtenidas se ha estudiado la respuesta a la adición de compuestos fenólicos (tirosina, ácido clorogénico, ácido cafeico y ácido *p*-cumárico) de la cepa silvestre y de los mutantes obtenidos. Se ha observado que la adición de estos compuestos induce las actividades PPO y que las cepas mutantes son más sensibles que la cepa parental a compuestos fenólicos “in vitro” independientemente del gen mutado. Esto indica que las actividades PPO son importantes en la resistencia de la bacteria a los compuestos fenólicos producidos por la planta y que podrían jugar un papel en el proceso infeccioso. Sin embargo, experimentos preliminares de infección de plantas de tomate no han permitido poner de manifiesto una relación directa entre capacidad infectiva y una PPO en particular. Los resultados serán discutidos en el contexto de la interacción planta-patógeno, ya que la planta también expresa actividades PPO y sintetiza melaninas como mecanismo de resistencia.

**B-28****HISTOLOGÍA DE LA INFECCIÓN DE *Ralstonia solanacearum* BIOVAR 2 EN DISTINTAS ESPECIES CULTIVADAS**

ÁLVAREZ, B.<sup>1</sup>, VASSE, J.<sup>2</sup>, LE-COURTOIS, V.<sup>2</sup>, TRIGALET-DEMERY, D.<sup>2</sup>, LÓPEZ, M.M.<sup>1</sup>, TRIGALET, A.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA), Carretera Moncada-Náquera, Km 4,5, 46113 Moncada (Valencia). E-mail: mlopez@ivia.es

<sup>2</sup>Laboratoire des Interactions Plantes Micro-organismes, UMR CNRS/INRA 2594/441, Chemin de Borde Rouge, BP 52627, 31326 Castanet-Tolosan Cedex, France. E-mail: trigalet@toulouse.inra.fr

*Ralstonia solanacearum* causa marchitez en especies de 53 familias botánicas. El biovar 2 afecta a solanáceas, siendo primordial la identificación de nuevos huéspedes para controlar la enfermedad. Por ello, los estudios histológicos de la infección pueden ayudar a determinar el estatus de huésped de una planta, junto con el aislamiento de la bacteria y la observación de los síntomas. Para evaluar distintas plantas cultivadas, éstas se inocularon por riego con un derivado *gusA* de la cepa IPO 1609 de *R. solanacearum* biovar 2. La incubación se realizó en condiciones óptimas para el desarrollo de la enfermedad y se cortaron las plantas tras 4-5 semanas. Se realizaron ensayos de actividad GUS en raíz y parte baja del tallo y en cortes ultrafinos de estas zonas se aplicó una técnica de tinción con azul de toluidina y de metileno. La localización del patógeno en estos tejidos se determinó por microscopía. También se realizaron aislamientos de la bacteria patógena en la parte media del tallo.

En tomate y patata (controles positivos), el derivado *gusA*-1609 produjo una intensa colonización en los haces del xilema de raíces primarias y secundarias y del tallo. En los tubérculos, la actividad GUS se concentró en los ojos y estolones. En col, la mayor o menor presencia de la bacteria en el xilema de la parte inferior del tallo estuvo relacionada con la variedad. En maíz, se observó colonización intercelular en el cortex radicular. En guisante, haba, rábano negro y rábano picante, la única zona invadida fue el cortex de la raíz. En judía, la infección tuvo lugar mayoritariamente en el xilema y también en el cortex, en la parte baja del tallo. En endivia, se observó colonización del cortex en raíz y también del xilema en la parte baja del tallo. En nabo sueco, se observó la bacteria en cortex y xilema de raíces y partes bajas del tallo. En cebada, calabaza, cebolla, apio, zanahoria, alfalfa, hinojo y lino, no se observó actividad GUS en ninguno de los tejidos y todos los aislamientos fueron negativos. Los resultados obtenidos con esta metodología podrían ayudar a decidir los cultivos en rotación más adecuados en parcelas donde *R. solanacearum* biovar 2 haya sido detectada.

**B-29****EFFECTO DE LA SOBREEXPRESIÓN DEL SISTEMA DE SECRECIÓN TIPO III HRP EN LA VIRULENCIA DE *Pseudomonas syringae*****ORTIZ-MARTÍN, I., BEUZÓN, C.R.**

*Departamento de Biología Celular, Genética y Fisiología, Área de Genética Facultad de Ciencias, Universidad de Málaga, Campus de Teatinos s/n, 29071 Málaga.*

*Pseudomonas syringae*, como numerosas bacterias Gram negativas, patógenas de animales y plantas, utiliza un sistema de secreción tipo III (TTSS), para introducir proteínas de virulencia (efectores) directamente al citosol de la célula hospedadora. En bacterias fitopatógenas estos efectores bacterianos interfieren con distintos procesos celulares eucariotas, lo que permite el crecimiento de la bacteria en la planta y el establecimiento de una infección productiva en un hospedador sensible, o dispara una respuesta de hipersensibilidad (HR) que determina el fallo de la infección en un hospedador resistente. La expresión de los genes que codifican los componentes del sistema de secreción y de sus efectores se induce en planta y está regulada por un complejo sistema de regulación. En el participan tres activadores transcripcionales: HrpR y HrpS, que constituyen un sistema de regulación de dos componentes del tipo NtrC, y que activan la expresión de HrpL, un factor  $\sigma$  alternativo que activa la expresión de los genes *hrp*. HrpA, el componente estructural del pilus Hrp, necesario para la secreción y translocación de efectores, ha sido además identificado como necesario para la expresión de los genes *hrp*, aunque el mecanismo por el cual esto ocurre se desconoce. En el sistema participan además dos reguladores negativos, HrpV y Lon. Mutantes en *hrpV* parecen tener un incremento en los niveles de expresión de algunos genes *hrp* en condiciones de laboratorio, y su sobreexpresión parece reducirlos. Asimismo, mutantes en la proteasa Lon presentan un incremento en los niveles de transcripción de *hrpL*, así como en la cantidad de HrpR. La sobreexpresión de los genes Hrp nos proporciona una excelente herramienta para caracterizar los procesos de secreción del TTSS, así como los mecanismos de regulación de la expresión de sus genes. Con el fin de conseguir unos niveles de expresión elevados y ver cómo afectan a la capacidad patogénica de la bacteria hemos construido mutantes sencillos por disrupción de los genes *hrpV* y *lon* en *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*, el mutante doble combinación de ambos ( $\Delta hrpV \Delta lon$ ) y plásmidos para sobreexpresar las proteínas HrpV, Lon y HrpL y hemos analizado sus efectos *in vivo* e *in vitro*.

**B-30****PAPEL EN VIRULENCIA DEL OPERÓN DE BIOSÍNTESIS DE INDOL-3-ACÉTICO LISINA EN *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*****MATAS, I.M., RAMOS, C.***Área de Genética, Universidad de Málaga, 29071 Málaga. E-mail: crr@uma.es*

Dentro de la especie *Pseudomonas savastanoi* se reconocen actualmente 3 patovares diferenciables por su espectro de huéspedes: los aislados incluidos dentro de los pv. *savastanoi* (Pss) y *fraxini* son infectivos únicamente en olivo y fresno, respectivamente; los aislados pertenecientes al pv. *nerii* (Psn) proceden de adelfa pero son infectivos también en olivo. La capacidad de estas bacterias para producir tumores en olivo y adelfa depende de la producción de ácido indol-3-acético (IAA). Además, la virulencia de cepas de Psn se ha relacionado también con la biosíntesis del conjugado indol-3-acético lisina (IAA-L), dependiente del producto del gen *iaaL*. Aunque se ha demostrado que *iaaL* está presente en Pss y en diversas cepas de *P. syringae*, como p. ej. en *P. syringae* pv. *tomato* DC3000 (Pto), la función de este conjugado en la virulencia de estos aislados es desconocida. Utilizando hibridación *Southern*, hemos determinado que la mayoría de las cepas de Pss contienen dos alelos de este gen de localización cromosómica. La secuencia de uno de estos alelos en cepas de Pss, *iaaL-psn*, es 98-100% idéntica al que se encuentra en Psn; el otro alelo, *iaaL-pss*, es similar en secuencia aunque diferenciable de *iaaL-psn* y del que contiene Pto (*iaaL-ptn*). Clonación y secuenciación de los dos alelos *iaaL* de Pss reveló que la región codificante de *iaaL-pss* contiene una secuencia de 3 nucleótidos (TAC) repetida en tándem de número variable (3 a 19) en distintos aislados. Análisis de secuencia del locus *iaaL* en Pss, Psn y Pto, mostraron que corriente arriba de todos estos alelos se localiza un marco abierto de lectura homólogo con las secuencias codificantes de transportadores pertenecientes a la familia MATE (*Multidrug And Toxic compound Extrusion*). Utilizando RT-PCR, hemos comprobado que en la cepa Pss48, que contiene 5 repeticiones TAC en el alelo *iaaL-pss*, cada uno de los alelos del gen *iaaL* forma un operón con el gen codificante del transportador MATE. Actualmente, estamos analizando la expresión del gen *iaaL* en aislados de Pss que contienen un número mayor de repeticiones TAC en *iaaL-pss*. Además, y con objeto de determinar el posible papel de este operón en la virulencia de estas cepas, estamos construyendo mutantes de pérdida de función en los dos genes de este operón mediante la inserción dirigida de un plásmido integrativo.



**B-31****ANÁLISIS DE LA RELEVANCIA DEL SISTEMA DE SUMOILACIÓN DE LA PLANTA EN LA PATOGÉNESIS DE *Pseudomonas syringae***

**GUEVARA, C.M., SÁNCHEZ-DURÁN, M.A., BEUZÓN, C.R., BEJARANO, E.R., RUIZ-ALBERT, J.**

*Departamento de Biología Celular, Genética y Fisiología, Área de Genética, Facultad de Ciencias, Universidad de Málaga, Campus de Teatinos s/n, 29071 Málaga.*

La sumoilación es un proceso eucariota de modificación postraducciona similar a la ubiquitinización, que consiste en la unión covalente a ciertas proteínas de un pequeño péptido denominado SUMO (Small Ubiquitin-related MOdifier), lo que puede alterar diversas características funcionales de la proteína modificada. La sumoilación es un proceso celular esencial, tanto en animales como en plantas, y que constituye una diana para proteínas de virulencia de virus, hongos y bacterias. En bacterias gram negativas se ha descrito una familia de proteínas que son secretadas directamente al citosol de su hospedador eucariota a través de sistemas de secreción tipo III (TTSS), y que parecen actuar como proteasas específicas de SUMO. Entre las bacterias fitopatógenas estas proteínas solo se han caracterizado parcialmente en algunas estirpes de *Xanthomonas*, y poco se sabe en otros géneros bacterianos de su contribución a la virulencia o a la inducción de reacciones de defensa en planta.

En este trabajo caracterizamos, en función de la tasa relativa de multiplicación bacteriana, la interacción de las plantas modelo *A. thaliana* y *N. benthamiana* con estirpes pertenecientes a cinco patovares de la bacteria fitopatógena *Pseudomonas syringae* (pvs. *tomato*, *phaseolicola*, *syringae*, *pisi* y *maculicola*), las tres últimas capaces de secretar proteínas que pueden actuar como proteasas de SUMO en la planta. Primero se determina la interacción compatible o incompatible entre estos patovares y plantas silvestres mediante inoculación y cálculo de la tasa de replicación bacteriana, para después analizar el impacto que sobre dicha interacción pueda tener el sistema de sumoilación de la planta, mediante la inoculación de *A. thaliana* mutantes en diversos componentes del sistema de sumoilación, o sobre *N. benthamiana* transgénicas con niveles alterados de estos mismos componentes.

**B-32****MODIFICACIÓN DEL PERFIL DE COMPUESTOS FENÓLICOS INDUCIDA POR LA TUBERCULOSIS EN OLIVO****CAYUELA, J.A., RADA, M., RÍOS, J.J., ALBI, T., GUINDA, A.**

*Instituto de la Grasa-CSIC, Avda. Padre García Tejero, 4, 41012 Sevilla. Email: jacayuela@ig.csic.es*

Se ha llevado a cabo un estudio para conocer los cambios inducidos por la infección de tuberculosis en olivos en la composición fenólica en hojas, nódulos y brotes. Se compararon cuatro extractos etanólicos en dos años consecutivos: 1) Hoja de olivo de brotes afectados por *Pseudomonas savastanoi* pv. *Savastanoi*; 2) Nódulos inducidos por esta bacteria; 3) Hoja de brotes sanos (asintomáticos); 4) Brotes. Entre las diferencias encontradas, es significativa la presencia de un compuesto fenólico en los nódulos en cantidades muy superiores a las presentes en hojas o en brotes. El análisis de espectrometría de masas ha mostrado que este compuesto es verbascosido. El aumento de su biosíntesis podría estar relacionado con los mecanismos de defensa del árbol en los nódulos inducidos por *P. Savastanoi* y sugiere la posibilidad de exploración de fuentes naturales y biotecnológicas de este compuesto, que es interesante por sus propiedades y actividad biológica.

**B-33****PAPEL EN VIRULENCIA DEL RECEPTOR DE DICITRATO FÉRRICO FecA EN *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*****RODRÍGUEZ-MORENO, L., RAMOS, C.**

Área de Genética, Facultad de Ciencias, Universidad de Málaga, Campus de Teatinos s/n, 29071 Málaga. E-mail: crr@uma.es

A pesar de la abundancia del hierro en la corteza terrestre, su biodisponibilidad es escasa lo que dificulta el crecimiento y la patogenicidad bacteriana. Aunque los mecanismos de captación de hierro se han estudiado ampliamente en patógenos animales, el papel que juega este metal en las interacciones planta-bacteria se ha descrito únicamente en relación a la capacidad de biocontrol de ciertos aislados bacterianos frente a enfermedades fúngicas de plantas, así como en la bacteria fitopatógena *Erwinia chrysanthemi*. Hasta donde hemos podido llegar, la captación de hierro no se ha relacionado hasta la fecha con la patogenicidad o virulencia de *Pseudomonas* fitopatógenas. Durante la caracterización de una colección de aproximadamente 5.300 mutantes de *P. savastanoi* pv. *savastanoi* (Pss), agente causante de la tuberculosis del olivo, obtenidos mediante transposición de un mini-Tn5, se aislaron 3 cepas auxótrofas para triptófano, molécula precursora de la fitohormona ácido indol-3-acético (IAA). Amplificación de la región flanqueante al extremo 5' del transposon en una de estas cepas, seguida de secuenciación e hibridación *Southern*, mostraron que la inserción del mini-Tn5 se había producido en un secuencia cromosómica 98% idéntica a la región codificante del transportador de dicitrato férrico FecA de *P. syringae* pv. *phaseolicola* (Pph)1448A. Análisis de la secuencia de este *locus* en Pph y en el genoma de *P. syringae* pv. *tomato* (Pto) DC3000, revelaron que, en estas cepas, los genes *fec* se organizan en dos operones diferentes; uno de ellos, compuesto por los genes *fecA* y los reguladores *fecR* y *fecI*; y otro, en el que se agrupan los genes estructurales del transportador de membrana *fecB*, *fecC* y *fecD*, así como el codificador de la hidrolasa de ATP *fecE*. Por el contrario, en enterobacterias, todos los genes *fec* se organizan conjuntamente en un mismo operón. En la actualidad estamos estudiando la organización del operón *fec* en Pss, para ello, disponemos de un cósmido aislado de una genoteca de Pss que contiene al menos los genes *fecA*, *fecR* y *fecI*. Ensayos de virulencia en plantas de olivo cultivadas *in vitro* y en plantones de 2 años mostraron una reducción drástica en la supervivencia del mutante *fecA* en los tejidos vegetales. La formación de tumores en plantas inoculadas con el mutante se redujo drásticamente en los dos sistemas vegetales ensayados en comparación con la cepa silvestre.

**B-34****MODIFICACIONES EN LA CRISTALIZACIÓN DE SACAROSA DE CAÑA DE AZÚCAR INDUCIDAS POR XANTANOS DEL PATÓGENO *Xanthomonas albilineans*****BLANCH, M.<sup>1</sup>, RODRÍGUEZ, C.W.<sup>2</sup>, LEGAZ, M.E.<sup>1</sup>, VICENTE, C.<sup>1</sup>.**<sup>1</sup>Laboratorio de Fisiología Vegetal, Facultad de Biología, Universidad Complutense, 28040 Madrid. E-mail: mblanchr@bio.ucm.es<sup>2</sup>Laboratorio de Fisiología Vegetal, Facultad de Biología, Universidad de La Habana, Cuba. E-mail: carlos\_miriam2003@yahoo.es

*Xanthomonas albilineans* es el patógeno responsable de la escaldadura foliar de la caña de azúcar. El patógeno produce albicidina, una sustancia inhibidora de la transcripción en células eucarióticas, y xantanos, polisacáridos formados por repetición del tetrámero glucosa-glucosa-manosa-ácido glucurónico, una goma que obstruye los conductos floemáticos y xilemáticos y produce desecación progresiva de la planta.

Se ha descrito que ciertos tipos de polisacáridos, principalmente heterofructanos producidos por la propia caña de azúcar, son capaces de modificar la secuencia de cristalización de la sacarosa, producto de interés comercial primario de este cultivo. Por ello, se ha ensayado si el xantano producido por el patógeno y acumulado en los elementos conductores de tallo y hojas del huésped, puede tener un efecto similar.

En una primera aproximación, se ha ensayado el efecto de la concentración de xantano y tiempo de contacto en la recristalización de sacarosa a partir de disoluciones saturadas del disacárido extraído de caña. De la observación microscópica del proceso durante 24 h se deduce un doble efecto: 1) El número de cristales de sacarosa formados disminuye drásticamente como función de la concentración de xantano en la disolución y con el tiempo de contacto entre xantano y sacarosa y 2) Los escasos cristales formados muestran la típica aglomeración de prismas en complejos de forma estrellada aunque los núcleos son amorfos, o, por el contrario, los prismas individuales muestran escaso grado de agregación (4 o 5), lo que significaría que el xantano bloquea los centros de adhesión de los cristales individuales.

La infección experimental de individuos del cultivar Barbados (sensible a la escaldadura foliar) conduce al desarrollo de plantas con hojas escaldadas (bandas amarillas paralelas a la nervadura principal) y con tendencia a la desecación. La cristalización de la sacarosa obtenida de los jugos de los tallos de dichas plantas infectadas muestra cambios semejantes a los descritos en los experimentos de recristalización.

**B-35****CAMBIOS EN LA CONCENTRACIÓN DE ÁCIDOS FENÓLICOS, ACTIVIDAD FENILALANINA AMONIO-LIASA Y PEROXIDASA EN HOJAS DE CAÑA DE AZÚCAR INDUCIDOS POR ELICITORES AISLADOS DE *Xanthomonas albilineans*****SANTIAGO, R.<sup>1</sup>, DE ARMAS, R.<sup>2</sup>, LEGAZ, M.E.<sup>1</sup>, VICENTE, C.<sup>1</sup>**<sup>1</sup>*Departamento de Fisiología Vegetal, Facultad de Biología, Universidad Complutense, 28040 Madrid. E-mail: rocsanti@bio.ucm.es*<sup>2</sup>*Departamento de Botánica, Facultad de Biología, Universidad de la Habana, Cuba.*

La escaldadura foliar es una enfermedad de la caña de azúcar producida por *Xanthomonas albilineans*. Los síntomas varían desde la aparición de una línea blanco-amarillenta paralela a la nervadura principal de las hojas, hasta la muerte de la planta por blanqueamiento y necrosis de las mismas. *Xanthomonas albilineans* no presenta genes de avirulencia (*avr*), ni de hipersensibilidad o patogeneidad (*hrp*) que son habituales en otras bacterias fitopatógenas.

En el experimento llevado a cabo se relaciona la resistencia a la escaldadura foliar con cambios en la concentración de compuestos fenólicos, actividad enzimática de las enzimas fenilalanina amonio-liasa (PAL), y peroxidasa (POX), en hojas de caña de azúcar incubadas con distintas fracciones de un elicitor aislado de *Xanthomonas albilineans*.

Existen distintas respuestas a la enfermedad según la variedad de caña de azúcar, diferenciando variedades resistentes como Mayarí 55-14, y susceptibles como Louissiana 55-5. La interacción se ha estudiado en discos de hoja de plantas de ambos cultivares.

Se ha observado que las fracciones proteicas del elicitor aumentan la producción de ácidos hidroxicinámicos en el cultivar Mayarí, y las fracciones de carbohidratos aumentan la producción de ácidos hidroxibenzoicos en el cultivar Louissiana. Según los resultados obtenidos, se puede plantear que en el cultivar resistente, las fracciones proteicas del elicitor mantienen un nivel de actividad PAL que hace que incremente la concentración de los ácidos *p*-cumárico y cafeico, y que el ácido ferúlico sintetizado se está usando para la síntesis de ácido siríngico que, mediante la activación de la enzima POX, se polimeriza para reforzar las paredes celulares. Esto justifica el incremento en la concentración de los ácidos *p*-cumárico, cafeico y siríngico, y el descenso en la concentración de ácido ferúlico.

En el cultivar susceptible, las fracciones de carbohidratos elicitán la acumulación de *p*-cumárico, pero inducen la síntesis y acumulación de algunos ácidos hidroxibenzoicos (ácidos gálico, protocatéquico y siríngico), y no la producción de sustancias con capacidad antibacteriana.

**B-36****EVALUACIÓN DE MÉTODOS DE INOCULACIÓN DE *Erwinia amylovora* PARA ESTUDIOS DE VIRULENCIA Y SENSIBILIDAD DE HUESPED****RUZ, L., MORAGREGA, C., MONTESINOS, E.**

*Institut de Tecnologia Agroalimentària, CeRTA-CIDSAV, Universitat de Girona, Avda Lluís Santaló s/n, 17071 Girona. E-mail: lruz@intea.udg.es*

Se evaluaron cuatro métodos de inoculación *in planta* de *Erwinia amylovora* para realizar estudios de virulencia y sensibilidad varietal en condiciones controladas. Los métodos evaluados consistieron en 1) inoculación de las hojas con pinzas dentadas impregnadas con una suspensión de la bacteria; 2) corte de la hoja con tijeras impregnadas en la suspensión bacteriana, 3) aplicación de una suspensión bacteriana con un pincel sobre una herida realizada en la hoja y 4) microinfiltración localizada de la suspensión bacteriana en las hojas. Los diferentes métodos se compararon mediante análisis dosis-respuesta y tiempo-respuesta. El modelo Gompertz modificado se utilizó para los estudios tiempo-enfermedad, utilizando los parámetros velocidad de progresión de la enfermedad ( $rg$ ) y tiempo de aparición de los primeros síntomas ( $t_0$ ). Para los análisis dosis-respuesta se utilizó el modelo de saturación hiperbólica comparando la dosis efectiva mediana ( $DE_{50}$ ) y el nivel máximo de síntomas de la enfermedad ( $y_{max}$ ) obtenidos con los distintos métodos. La infiltración localizada de la suspensión bacteriana fue el método que mostró una menor velocidad en la progresión de los síntomas (baja  $rg$ ) y una rápida aparición de éstos (bajo  $t_0$ ), mientras que con el método del corte con las tijeras se desarrollan los síntomas de la enfermedad rápidamente (elevado  $rg$ ) y muy pronto (corto  $t_0$ ) y mostró valores de  $y_{max}$  (severidad máxima) elevados y una dosis efectiva mediana reducida. A partir de los resultados obtenidos se propone el método de corte con tijeras impregnadas con suspensiones de la bacteria para estudios de virulencia de cepas y de sensibilidad del huésped en condiciones de ambiente controlado, ya que reproduce los síntomas de la enfermedad y su progreso y niveles finales permiten identificar y comparar tratamientos con distintos niveles de enfermedad de una forma objetiva y cuantitativa.

**N-1****CONTROL INTEGRADO DE *Meloidogyne incognita* EN PIMIENTO**

**ROS, C.<sup>1</sup>, GUERRERO, M.M.<sup>1</sup>, MARTÍNEZ, M.A.<sup>1</sup>, TORRES, J.<sup>1</sup>, MARTÍNEZ, M.C.<sup>1</sup>, LACASA, A.<sup>1</sup>, BELLO, A.<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>*Biotechnología y Protección de Cultivos, IMIDA, c/ Mayor s/n, 30150 La Alberca (Murcia).*

<sup>2</sup>*Agroecología, Centro de Ciencias Medioambientales, Serrano, 115 dpdo. 28006 Madrid.*

*Meloidogyne incognita* está ampliamente extendido por los invernaderos del Sureste peninsular donde se realizan monocultivos de pimiento, siendo uno de los principales problemas fitosanitarios. La desinfección anual del suelo con bromuro de metilo ha sido la forma usual de control en los cultivos convencionales. En la producción de pimiento ecológico se utiliza la biosolarización para la desinfección, siendo variables con los años y con los suelos los niveles de eficacia frente al nematodo. La utilización reiterada de patrones resistentes en el mismo compromete la eficacia de la resistencia, al seleccionar poblaciones virulentas del nematodo en dos años.

En un invernadero experimental se planteó un ensayo de bloques al azar con tres repeticiones y tres años de duración, donde se integraba el uso de plantas injertadas en un patrón resistente y la biosolarización o la biofumigación, tomando como elementos de comparación la desinfección con bromuro de metilo y el suelo no desinfectado. Para la evaluación de las actuaciones integradas se midieron: la incidencia del nematodo, la altura de la planta y las producciones comercial y total.

En el tercer año de reiteración, el control del nematodo en la combinación de biosolarización e injerto fue (13,3% de plantas infestadas y 0,13 de índice de nodulación) similar al del bromuro de metilo (20% y 0,8), mientras que en la biofumigación con injerto (100% y 6,1) no difirió del testigo (100% y 6,3). No hubieron diferencias entre tratamientos en el desarrollo de las plantas injertadas. La producción comercial en la biosolarización con injerto fue (9,2 kg/m<sup>2</sup>) superior a la del bromuro de metilo (7,2 kg/m<sup>2</sup>), no habiendo diferencias entre el testigo (6,9 kg/m<sup>2</sup>) y la biofumigación con injerto (6,9 kg/m<sup>2</sup>), ni entre éstos y el bromuro de metilo. En todos los casos, el injerto proporciona un aumento en la producción total. Las pautas de comportamiento en las dos primeras campañas fueron similares, si bien no fue hasta la segunda campaña que la resistencia fue remontada, siendo similar la incidencia del nematodo en las plantas injertadas puestas en suelo no desinfectado y en el biofumigado.

**N-2****USO REITERADO DE 1,3-DICLOROPROPENO Y CLOROPICRINA EN LA DESINFECCIÓN DE SUELOS DE INVERNADERO DE PIMIENTO**

**GUERRERO, M.M.<sup>1</sup>, ROS, C.<sup>2</sup>, MARTÍNEZ, M.A.<sup>1</sup>, TORRES, J.<sup>1</sup>, MARTÍNEZ, M.C.<sup>1</sup>, BIELZA, P.<sup>3</sup>, CONTRERAS, J.<sup>3</sup>, LACASA, A.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Biotechnología y Protección de Cultivos, IMIDA, c/ Mayor s/n, 30150 La Alberca (Murcia).

<sup>2</sup>Programa de colaboración FECOAM-Consejería de Agricultura y Agua, c/ Caballero 13, 30002 Murcia.

<sup>3</sup>Producción Vegetal, ETSIA. UPCT, Paseo Alfonso XIII s/n, 30203 Cartagena (Murcia).

Las mezclas de 1,3-dicloropropeno (1,3-D) y cloropicrina (Pic) aplicadas en el agua de riego se considera son una alternativa al bromuro de metilo para la desinfección de los suelos de invernadero donde se practica el monocultivo de pimiento. La sustitución del bromuro de metilo requiere de una alternativa que mantenga la eficacia frente a patógenos cuando se usa de forma reiterada en el mismo suelo. En tres invernaderos con diferente problemática fitosanitaria: uno con *Phytophthora*, *Meloidogyne* y 15 años de antigüedad del monocultivo, otro con *Meloidogyne* y 12 años y otro sin patógenos y 3 años de monocultivo, se plantearon ensayos a 1, 2 y 7 años, respectivamente, de reiteración de la aplicación del 1,3-D (60,8%) + Pic (33,3%) a 50 kg/m<sup>2</sup> con PE, en un diseño de bloques al azar con tres repeticiones, comparándolo con bromuro de metilo (98:2 a 60 g/m<sup>2</sup> PE o 30 g/m<sup>2</sup> VIF) y un testigo no desinfectado. EL control de *Phytophthora* con el 1,3-D + Pic fue similar al del bromuro de metilo en los dos invernaderos al tercer año de reiteración, habiendo diferencias en uno de los dos invernaderos en los dos primeros años. Los resultados frente a *Meloidogyne* fueron similares al bromuro de metilo en uno de los invernaderos, pero no en el otro en el que aumentó el índice de nodulación en las raíces con el paso del tiempo, aunque permaneció estable la proporción de plantas afectadas. La severidad del ataque no tuvo repercusión en la producción, (índices menores a 3), siendo similares a las del bromuro de metilo en los dos invernaderos para todos los años de reiteración. En el invernadero sin patógenos no se encontraron diferencias en los niveles productivos entre el bromuro de metilo y el 1,3-D + Pic fueron mas bajas que las del bromuro de metilo algunos años puntuales. En definitiva, se puede considerar que la eficacia desinfectante de la mezcla 1,3-D + Pic es estable cuando se reitera su uso en el mismo suelo.



**N-3****DIMETIL DISULFITO Y CLOROPICRINA PARA LA DESINFECCIÓN DE SUELOS DE INVERNADEROS DE PIMIENTO**

**MARTÍNEZ, M.A.<sup>1</sup>, ROS, C.<sup>2</sup>, GUERRERO, M.M.<sup>1</sup>, TORRES, J.<sup>1</sup>, BELTRÁN, C.<sup>3</sup>, CANO, A.<sup>3</sup>, LACASA, A.<sup>1</sup>,**

<sup>1</sup>*Biotechnología y Protección de Cultivos, IMIDA, c/ Mayor s/n, 30150 La Alberca (Murcia).*

<sup>2</sup>*Programa de colaboración FECOAM-Consejería de Agricultura y Agua, c/ Caballero 13, 30002 Murcia.*

<sup>3</sup>*Servicio de Sanidad Vegetal. Consejería de Agricultura y Agua, c/ Mayor s/n, 30150 La Alberca (Murcia).*

El dimetil disulfito (DMDS) es un nuevo fumigante, en fase de desarrollo, que ha mostrado actividad frente a nematodos noduladores en ensayo de campo, siendo reducida la acción sobre los patógenos fúngicos del suelo en cultivos de pimiento. A la cloropicrina (Pic) se le reconoce un espectro de acción sobre hongos del suelo tan amplio como al bromuro de metilo. Habiéndose retomado su utilización como desinfectante, bien aplicada sola o en mezclas o combinaciones con productos con actividad frente a nematodos o malas hierbas. En dos invernaderos con problemáticas fitosanitarias distintas se ha evaluado la actividad desinfectante de la combinación de dimetil disulfito (30 g/m<sup>2</sup>) y cloropicrina (30 g/m<sup>2</sup>) aplicados en el agua de riego y sellado con plástico de PE 0,05mm, comparándola con bromuro de metilo (60 g/m<sup>2</sup> PE ó 30 g/m<sup>2</sup> VIF), cloropicrina sola (30 ó 40 g/m<sup>2</sup> PE) y la mezcla de 1,3- dicloropropeno (60,8%) + cloropicrina (33,3%) (a 50 g/m<sup>2</sup> PE) y un testigo no desinfectado. El diseño del ensayo fue de bloques al azar con tres repeticiones por tratamiento. La combinación DMDS y cloropicrina proporcionó similares niveles de control de *Phytophthora* (5,3%) que la cloropicrina sola (5,1%) y que el bromuro de metilo (0,0%) y el 1,3-D + Pic (0,5%). No se encontraron diferencias entre tratamientos en el porcentaje de plantas infestadas de *Meloidogyne*, pero si en el índice de nodulación siendo mayores en la cloropicrina (3,0) y el DMDS + Pic (2,3) que en el bromuro de metilo (0,5) y 1,3- D + Pic (0,5). En uno de los invernaderos (solo infestado de *Meloidogyne* y poblaciones bajas) no se encontraron diferencias entre tratamientos en la producción comercial siendo en el otro (con *Phytophthora* y *Meloidogyne*) menores las producciones en la cloropicrina (5,3 Kg/m<sup>2</sup>) que en el bromuro de metilo (7,0 Kg/m<sup>2</sup>) y en el 1,3-D + -Pic (6,6 Kg/m<sup>2</sup>) pero no en la combinación DMDS + Pic (6,0 Kg/m<sup>2</sup>). En todos los casos fue muy superior al testigo (1,8 Kg/m<sup>2</sup>). Será preciso completar los ensayos en situaciones más variadas para poder considerar la combinación ensayada como una alternativa al bromuro de metilo.

**N-4****DOSIS DE CLOROPICRINA PARA LA DESINFECCIÓN DE SUELOS DE PIMIENTO**

**ROS, C.<sup>1</sup>, MARTÍNEZ, M.A.<sup>2</sup>, GUERRERO, M.M.<sup>2</sup>, TORRES, J.<sup>2</sup>, BELTRÁN, C.<sup>3</sup>, LACASA, A.<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Programa de colaboración FECOAM-Consejería de Agricultura y Agua, c/ Caballero 13, 30002 Murcia.

<sup>2</sup>Biotechnología y Protección de Cultivos, IMIDA, c/ Mayor s/n, 30150 La Alberca (Murcia).

<sup>3</sup>Servicio de Sanidad Vegetal. Consejería de Agricultura y Agua, c/ Mayor s/n, 30150 La Alberca (Murcia).

La cloropicrina tiene una importante acción fungicida, por la que fue utilizada en la desinfección de suelos. Recientemente ha pasado de ser un indicador a componer las formulaciones de bromuro de metilo (98:2; 67:33; 50:50; 57:43; 70:30) ya que las mezclas tienen mayor espectro de acción. Pero también se contempla su utilización sola, tanto en inyección como aplicada en el agua de riego (formulaciones emulsionables); como una alternativa al bromuro de metilo. Las primeras experiencias, utilizando dosis de 60 g/m<sup>2</sup>, proporcionaron eficacias desinfectantes en cultivos de pimiento similares a las del bromuro de metilo. Con el objeto de determinar las dosis de aplicación en el agua de riego del formulado emulsionable (94:1%p/p) se planteó un ensayo en dos invernaderos comerciales, uno con patógenos (*Phytophthora*, *Meloidogyne*) y otros sin ellos, donde las dosis de 30, 40 y 50 g/m<sup>2</sup> se comportaron como el bromuro (98:2 a 60 g/m<sup>2</sup> PE ó 40 g/m<sup>2</sup> VIF) y un testigo no desinfectado, con diseños de bloques al azar y 3 repeticiones por tratamiento y midiendo la incidencia de *Phytophthora*, *Meloidogyne*, la altura de las plantas, las producciones comerciales y total y el grado de infestación por malas hierbas. El control de *Phytophthora* mejoró al aumentar la dosis de Pic., siendo similar al del BrMe a dosis de 40 y 50g/m<sup>2</sup>, no encontrándose diferencias ni entre dosis ni entre tratamientos en la incidencia de *Meloidogyne*. En el invernadero sin patógenos las plantas del BrMe fueron más altas que las de Pic a las tres dosis. En el invernadero con patógenos no se encontraron diferencias entre dosis en la altura de las plantas, pero si entre 40 g/m<sup>2</sup> pic y el BrMe. A 30 g/m<sup>2</sup> las producciones comerciales (9,0 y 8,3 Kg/m<sup>2</sup>) fueron menores al BrMe (10,1 y 10,3 Kg/m<sup>2</sup>) en los dos invernaderos y también a 40 g/m<sup>2</sup> en el invernadero con patógenos (8,7 Kg/m<sup>2</sup>), no habiendo diferencias ni entre dosis de Pic ni entre 50 g/m<sup>2</sup> (9,6 y 9,2 Kg/m<sup>2</sup>) de Pic y BrMe en los dos invernaderos ni entre 40 g /m<sup>2</sup> (9,2 Kg/m<sup>2</sup>) y BrMe en el invernadero sin patógenos. El control de malas hierbas a las tres dosis fue similar al del BrMe en los dos invernaderos. Los resultados vienen a indicar que la dosis de aplicación se situaría entre 40 y 50 g/m<sup>2</sup>)

## N-5

**INFLUENCIA DEL LOCUS *Mi* EN EL MANEJO DE LA DURABILIDAD DE LA RESISTENCIA A *Meloidogyne* EN TOMATE****CORTADA, L.<sup>1</sup>, VERDEJO-LUCAS, S.<sup>1</sup>, ORNAT, C.<sup>2</sup>, SORRIBAS, F.J.<sup>2</sup>, VIERA, A.<sup>1</sup>**<sup>1</sup>IRTA, Centre de Cabrils, Carretera Cabrils, s/n, 08348 Cabrils (Barcelona). E-mail: tmp2111@irta.es.<sup>2</sup>Departament d'Enginyeria Agroalimentaria i Biotecnologia, Campus Baix Llobregat, Edif. ESAB, Avda. Canal Olímpic s/n, 08860 Castelldefels (Barcelona).

La resistencia vegetal es un sistema eficaz para controlar las poblaciones de nemátodos fitoparásitos. En tomate, el gen *Mi-1* proporciona resistencia a *Meloidogyne incognita*, *M. arenaria* y *M. javanica*, inhibiendo eficazmente la reproducción del nematodo. Este gen está presente en numerosos cultivares y portainjertos de tomate. El uso de estos últimos está en auge, entre otros motivos, debido a que su vigor resulta una herramienta eficaz en la lucha frente a *Meloidogyne spp* y otras enfermedades del suelo. Sin embargo, el empleo reiterado de la resistencia puede provocar la aparición de poblaciones virulentas capaces de superar el gen *Mi-1*. Por lo tanto, se deben conocer los mecanismos que puedan optimizar la durabilidad y la eficacia de la resistencia en el tiempo. Para determinar la influencia de la situación alélica (homocigosis versus heterocigosis) en el locus *Mi*, se realizaron ensayos con tres portainjertos resistentes homocigotos (PG-56, PG-76 y Brigeor), un cultivar resistente heterocigoto (Monika) y un cultivar susceptible (Durinta) y se determinó el efecto del *Mi-1* a una generación (ensayo en contenedor) y a múltiples generaciones del nematodo (ensayo en campo). Se emplearon dos poblaciones avirulentas de *M. javanica* (*Mj-05* y *Mj-Q21-P0*) y una virulenta (*Mj-27*). Para cada variedad, se calculó el índice de reproducción (IR en%) que indica cual ha sido la población final (Pf) alcanzada en la variedad resistente respecto a la Pf de la variedad susceptible. En ambos ensayos, las variedades portadoras del gen *Mi-1* se comportaron como altamente resistentes frente a las poblaciones avirulentas. En el ensayo a una generación, el IR de *Mj-05* en Monika (4%) fue superior ( $P<0,05$ ) al del portainjerto PG-76 (0,63%) pero no difería del IR en PG-56 y Brigeor (1,4 y 1,6%, respectivamente). El IR de la población *Mj-Q21-P0* en cultivar heterocigoto Monika (4%) fue superior ( $P<0,05$ ) al de los portainjertos homocigotos PG-56, PG-76 y Brigeor (0,14, 0,14 y 0,15%, respectivamente). Sin embargo, la población virulenta se reprodujo por igual en las variedades resistentes y en la susceptible. En el ensayo a múltiples generaciones, el IR de la población *Mj-Q21-P0* en PG-56 y Brigeor no difirió del de Monika. Se ha diseñado un segundo ensayo en contenedor ampliando el número de portainjertos de tomate que se analizará a una y a múltiples generaciones del nematodo.

**N-6****EFFECTO DE LA APLICACIÓN DE ENMIENDAS ORGÁNICAS EN LA ESTRUCTURA TRÓFICA DE NEMATODOS EN UN CULTIVO DE SECANO****OLALLA, C.<sup>1</sup>, LÓPEZ, D.J.<sup>1</sup>, GONZÁLEZ, S.<sup>1</sup>, REGUERA, J.I.<sup>2</sup>, SACRISTÁN, G.<sup>2</sup>**<sup>1</sup>Área de Edafología y Química Agrícola. E-mail: djlopez@ubu.es<sup>2</sup>Área de Microbiología. E-mail: jiru@ubu.es

Facultad de Ciencias, Universidad de Burgos, Plaza Misael Bañuelos s/n, 09001 Burgos.

La aplicación de enmiendas orgánicas puede ser usada como vía para restaurar la biodiversidad en el medio edáfico y reducir o incluso eliminar los efectos negativos del uso de productos químicos.

El objetivo de este trabajo es evaluar los efectos del uso de enmiendas orgánicas en la estructura trófica de la nematofauna edáfica de un suelo de secano.

Se efectuaron cinco tratamientos según un diseño de bloques al azar con parcelas experimentales (48 x 12 m) y cinco réplicas: tres dosis de compost de lodo de depuradora: 3,5 (L1), 7,5 (L2) y 17,5 (L3) t/ha; fertilización mineral (I); usándose como control (C) parcelas sin tratar. Se realizaron dos muestreos, uno anterior a la siembra de cebada y aplicación de los tratamientos y otro tras la recogida del cultivo, determinándose la variabilidad de los diferentes grupos tróficos de nematodos, así como el número total de nematodos en ambos muestreos.

Los principales grupos tróficos encontrados en el suelo analizado que son más relevantes para este estudio son los bacteriófagos, omnívoros, fitoparásitos, fungívoros y predadores. De estos los fungívoros son el grupo trófico que aparece siempre en mayor proporción, en el extremo opuesto se encuentran los depredadores. El mayor incremento de los nematodos fungívoros correspondió a las dosis de compost de lodo (1) y (3), con una ratio población inicial/población final (Pf/Pi) de 2,89 y 3,03, respectivamente. Para los nematodos bacteriófagos, se observó un descenso de las poblaciones para todos los tratamientos a excepción de la dosis (1). Para las dosis (2) y (3) la ratio Pf/Pi fue de 0,80 y 0,82. En el caso de los nematodos omnívoros el descenso más acusado se observó para la dosis de compost de lodo (1) con una Pf/Pi de 0,42. En relación a los nematodos fitoparásitos, la dosis (2) resultó la más efectiva en la reducción con una Pf/Pi de 0,42, lo que supone una reducción del 58% frente al 13% del testigo.

A la vista de los resultados obtenidos puede considerarse la aplicación de enmiendas orgánicas como una buena estrategia de manejo del suelo para reducir enfermedades y mejorar la calidad del mismo.

**N-7****CONTROL BIOLÓGICO DEL NEMATODO AGALLADOR *Meloidogyne javanica* EN PORTAINJERTOS GF677 DE *Prunus* sp. MEDIANTE CEPAS DE *Pseudomonas fluorescens* Y *Pantoea agglomerans*****AGUSTÍ, L.<sup>1</sup>, BONATERRA, A.<sup>1</sup>, MORAGREGA, C.<sup>1</sup>, PINOCHET, J.<sup>2</sup>, MONTESINOS, E.<sup>1</sup>**<sup>1</sup>*Instituto de Tecnología Agroalimentaria, CeRTA-CIDSAV, Universidad de Girona, Campus Montilivi, 17071 Girona. E-mail: lagusti@intea.udg.es*<sup>2</sup>*Agromillora Catalana S.A., El Rebato s/n, 08739 T.M. Subirats (Barcelona).*

El nematodo agallador *Meloidogyne javanica* se distribuye mundialmente y ataca una gran variedad de cultivos de importancia económica, entre ellos *Prunus* sp. El control de este patógeno se basa principalmente en métodos culturales, físicos y químicos de tipo preventivo, aunque en los últimos años se ha introducido el control biológico como parte del control integrado. Se han descrito rizobacterias que colonizan las raíces de las plantas huésped y controlan el nematodo fitopatógeno reduciendo el agallamiento. Algunas rizobacterias pueden producir metabolitos que provocan la lisis de los huevos, reducen la eclosión de los huevos, afectan la viabilidad de los estadios juveniles y degradan exudados específicos de la raíz dando lugar a una reducción de la atracción y penetración de los nematodos hacia la raíz.

Actualmente, el control biológico se realiza en combinación con otros métodos de control, dada la especificidad de la interacción del agente de biocontrol con la planta y el nematodo, y la variabilidad en la eficacia de control. El objetivo de este estudio fue la selección de cepas bacterianas con capacidad de controlar *M. javanica* para poder ser utilizadas en el control integrado del nematodo.

A partir de una colección de 58 cepas de *Pseudomonas fluorescens* y *Pantoea agglomerans* se seleccionaron cepas con capacidad para reducir la infección causada por el nematodo agallador *Meloidogyne javanica* en portainjertos GF677 de *Prunus* sp. Las cepas se caracterizaron para la producción de metabolitos secundarios y enzimas y se evaluaron mediante tratamientos de aplicación por riego en portainjertos inoculados con *M. javanica*. Dos cepas de *P. fluorescens* y una de *P. agglomerans* redujeron significativamente el agallamiento hasta un 50% y la producción de huevos hasta un 21% respecto a las plantas testigo no tratadas. Estas cepas fueron utilizadas en estudios posteriores para la determinación de sus mecanismos de acción.

**N-8****USO COMBINADO DE LOS AGENTES MICROBIANOS *Pasteuria penetrans*, *Glomus* sp. Y *Pseudomonas* sp. PARA EL MANEJO DE LA ENFERMEDAD CAUSADA POR *Meloidogyne javanica* EN TOMATE****TALAVERA, M., SALMERÓN, T.***CIFA, Camino de Purchil, IFAPA, Apdo. 2027, 18080 Granada.*

Los nematodos agalladores de raíz (*Meloidogyne* spp.) constituyen el principal problema nematológico en cultivos hortícolas en España. Aunque un gran número de interacciones entre microorganismos antagonistas y *Meloidogyne* spp. han sido investigadas como medidas alternativas de control nematológico, aun no se ha llegado al grado de que un microorganismo antagonista por si mismo pueda ser utilizado a gran escala como agente de control biológico del nematodo agallador. Por otra parte existen evidencias de que el uso conjunto de varios microorganismos antagonistas puede incrementar la protección frente a las enfermedades causadas por nemátodos.

En este trabajo presentamos los resultados de experimentos en los que intentamos combinar dos estrategias frente a la enfermedad causada por *Meloidogyne javanica* en tomate. Por una parte, el uso de agentes de biocontrol del nematodo que permiten reducir el inóculo infectivo en suelo, como la bacteria parásita *Pasteuria penetrans* y por otra parte el uso de agentes bioprotectores que permiten minimizar el daño producido en la planta por la infección del nematodo, como la colonización previa por hongos formadores de micorrizas, o bacterias promotoras del crecimiento capaces de inducir resistencia a patógenos.

En concreto se examinaron las combinaciones: Inundación del suelo infestado por *Meloidogyne javanica* con esporas de *Pasteuria penetrans* con una inoculación previa de los plantones de tomate con hongos formadores de micorrizas del género *Glomus* o con bacterias PGPR del género *Pseudomonas*. En todos los casos la combinación de un agente de biocontrol y de un agente bioprotector o inductor de resistencia en la planta incrementó los parámetros de producción vegetal y redujo el índice reproductor del nematodo y sus poblaciones finales tras 8-10 semanas de cultivo de tomate cv. Durinta.

**N-9****NEMATODOS FITOPARÁSITOS (Y OTROS) EN LAS BANDAS DE UN INVERNADERO COMERCIAL HORTÍCOLA DE ALMERIA (SURESTE DE ESPAÑA)****GALLEGO, E., SÁNCHEZ, J.**

Área de Botánica, Departamento de Biología Vegetal y Ecología, Universidad de Almería, Ctra. Sacramento, s/n, 04120 La Cañada (Almería). E-mail: [egallego@ual.es](mailto:egallego@ual.es)

En los invernaderos de Almería (31.392 ha en 2004), la fumigación química de los suelos en la época estival es una práctica habitual para eliminar hongos y nematodos fitoparásitos, en especial, *Meloidogyne*. Sin embargo, esta desinfección no suele aplicarse en las bandas del invernadero, donde se instalan con frecuencia cultivos secundarios (para autoconsumo) y plantas arvenses. Estas bandas pueden constituir un refugio para los organismos fitoparásitos y una fuente de inóculo para el cultivo principal, por lo que resulta de interés conocer esta comunidad. Se analizaron el suelo y las raíces de las plantas de las bandas de un invernadero comercial cultivado de tomate (*Lycopersicum esculentum*) var. *Pitenza*. Se efectuaron tres muestreos en el transcurso de la primavera de 2004. Durante los dos primeros muestreos se mantuvo por el agricultor un cultivo secundario de perejil (*Petroselinum crispum*), en el siguiente no hubo ninguna planta. Se realizaron los análisis de suelo mediante el método de la bandeja de Baermann y los de raíces mediante el método de la batidora y del tamizado. Los fitonematodos cecidógenos del género *Meloidogyne* predominaron en el primer muestreo (1.480 individuos/100 cc; 86%), aunque desaparecieron en los dos siguientes. El análisis de las raíces del cultivo secundario, que permaneció durante las dos primeras fechas, mostró la presencia de numerosas agallas, con abundancia de *Meloidogyne*. Los nematodos no fitoparásitos fueron siempre frecuentes y sus poblaciones se incrementaron a lo largo del tiempo (desde 240 hasta 11.840 individuos/100 ml). Entre estos nematodos predominaron los bacterívoros del orden *Rhabditida* (> 85%) (*Acrobeles*, *Rhabditis* y similares). También fueron frecuentes (< 15%) los grandes nematodos de la familia *Dorylaimidae*, que aparecieron en el segundo muestreo, y que podrían ejercer un efecto controlador sobre *Meloidogyne*. Los del orden *Aphelenchina* fueron hallados de manera ocasional (< 1%) en el tercer muestreo.

**N-10****CARACTERIZACION MORFOLOGICA, MOLECULAR Y PATOGENICA DEL NEMATODO FORMADOR DE QUISTES DE LA PATATA (*Globodera* sp) EN MALLORCA****ANDRÉS, M.F.<sup>1</sup>, MARTÍNEZ-BERINGOLA, M.L.<sup>2</sup>, ALONSO, R.<sup>3</sup>, ALEMANY, A.<sup>3</sup>, SALTO, M.T.<sup>3</sup>**<sup>1</sup>Dpto Protección Vegetal, CCMA, CSIC, Serrano 115, 28006 Madrid.<sup>2</sup>Dpto Protección Vegetal, INIA, Ctra Coruña, Km 7,5, 28040 Madrid.<sup>3</sup>Dpto Biología, Univ. Islas Baleares, Ctra Valldemosa, Km 7,5, 07122 Palma de Mallorca.

Entre los cultivos de valor estratégico en las Islas Baleares, el más importante socio-económicamente es la patata, el cual se concentra principalmente en 1.000 ha de superficie de regadío en la Comarca de Sa Pobla de la Isla de Mallorca. Los nematodos formadores de quistes del género *Globodera* son los patógenos más importantes que afectan al cultivo de la patata donde pueden ocasionar graves pérdidas de la cosecha. En Mallorca, tradicionalmente, el control de estos nematodos se ha basado en la aplicación sistemática de nematicidas químicos altamente tóxicos y con un elevado coste económico y medioambiental, pero en los últimos años se están estudiando métodos alternativos de control que contribuyan a una estrategia de producción integrada. El objetivo de este trabajo es realizar la caracterización precisa de los distintos aislados o poblaciones que producen la infestación en esa zona como paso previo y fundamental para conseguir el manejo efectivo de estos nematodos patógenos. En la zona de estudio se han aislado poblaciones de *Globodera* de las cuales finalmente siete se ha logrado reproducir y multiplicar en variedades de patata susceptibles (Marfona y Desiree) bajo condiciones controladas. El estudio morfológico de estas poblaciones se ha realizado mediante el análisis morfométrico de 30 ejemplares (15 en fase de quiste y 15 en fase juvenil de 2ª edad) de cada población y de tres poblaciones de referencia (Pa1, Pa3 y Ro1) y su caracterización molecular por (RAPD)-PCR con marcadores basados en el polimorfismo para secuencias o fragmentos de ADN. La caracterización patogénica se ha realizado mediante los test biológicos de patotipos. Los ensayos se han llevado a cabo inoculando las poblaciones en cada uno de los clones diferenciales de *Solanum* portadores de diversos genes de resistencia. El análisis diferencial de las tasas de multiplicación obtenidas nos ha permitido la identificación de al menos dos patotipos de *Globodera pallida*. Por último, dentro del estudio patogénico, se ha llevado a cabo un ensayo experimental sobre macetas y en condiciones controladas con las variedades cultivadas y de mayor importancia económica en la zona de estudio (Marfona y Maris Peer) en el que ha evaluado, con al menos dos niveles iniciales de inóculo, el grado de multiplicación de una población de *Globodera pallida* autóctona y el impacto en la planta huésped, con objeto de analizar el grado de susceptibilidad /tolerancia de estas variedades frente al ataque del nematodo.



## N-11

**ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE PEROXIDASAS EN UNA LÍNEA DE INTROGRESIÓN *Aegilops*/TRIGO RESISTENTE A *Heterodera avenae***

**SIMONETTI, E.<sup>1</sup>, GONZÁLEZ-BELINCHÓN, C.M.<sup>1</sup>, ANDRÉS, M.F.<sup>2</sup>, MORENO, S.<sup>1</sup>, LÓPEZ-BRAÑA, I.<sup>1</sup>, ROMERO, M.D.<sup>2</sup>, MARTÍN-SÁNCHEZ, J.A.<sup>3</sup>, DELIBES, A.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>ETS Ingenieros Agrónomos, UPM, Avda. Complutense s/n, 28040 Madrid. E-mail: [angeles.delibes@upm.es](mailto:angeles.delibes@upm.es)

<sup>2</sup>Centro de Ciencias Medioambientales, CSIC, Serrano 115, 28006 Madrid. E-mail: [mafay@ccma.csic.es](mailto:mafay@ccma.csic.es)

<sup>3</sup>Centre R+D de Lleida, UdL-IRTA, Avda. Alcalde Rovira Roure 177, 25198 Lleida. E-mail: [juanantonio.martin@IRTA.es](mailto:juanantonio.martin@IRTA.es).

La interacción incompatible planta-patógeno está, a menudo, determinada por la respuesta hipersensible (HR), caracterizada por un rápido desarrollo, en la planta, de necrosis alrededor del patógeno. La reacción viene precedida por la síntesis de formas activas de oxígeno (AOS) que se inducen por el patógeno. Las plantas poseen sistemas, tanto enzimáticos como no enzimáticos, para contrarrestar estos compuestos en condiciones de estrés. Entre los sistemas enzimáticos se encuentran las peroxidasas (PER, EC 1.11.1.7). Las formas aniónicas de PER parece que están relacionadas con la defensa y lignificación de la pared que se inducen tempranamente durante la infección por nematodos. En trabajos anteriores, de este grupo de investigación, se observó mediante isoelectroenfoque que en raíces de líneas de trigo resistentes, infectadas por el nematodo *Heterodera avenae*, existe una estrecha correlación entre la HR y la actividad peroxidasa, detectándose un máximo de inducción a los siete días de la inoculación con el nematodo. En función de lo anterior se decidió estudiar por Northern, en la línea H-93-8, portadora del gen de resistencia **Cre2**, si esto es un reflejo de los cambios en los niveles de los ARNm que codifican para peroxidasa, observándose, una concentración máxima de estos a los siete días post-inoculación en la zona de la raíz donde se establece el nematodo. Se han clonado y secuenciado los productos de RT-PCR obtenidos a partir del ARNm, utilizando en la reacción de PCR cebadores diseñados a partir de las regiones conservadas de las peroxidasas de trigo. Se ha detectado un gran número de secuencias con homología a peroxidasas y algunas de ellas se expresan preferentemente en la zona de la raíz infectada por el nematodo. Estas se están cuantificando, por qRT-PCR, y analizando si proceden de su parental resistente *Aegilops ventricosa*.

## N-12

**PERFILES PROTEICOS EXPRESADOS DIFERENCIALMENTE EN RAÍCES DE GENOTIPOS DE GARBANZO INFECTADOS POR *Meloidogyne artiellia* Y *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* RAZA 5****PALOMARES-RIUS, J.E.<sup>1</sup>, TENA-ALDAVE, M.<sup>2</sup>, JIMÉNEZ-DÍAZ, R.M.<sup>1,3</sup>, CASTILLO, P.<sup>1</sup>**<sup>1</sup>Instituto de Agricultura Sostenible, CSIC, Apdo. 4084, 14080 Córdoba. E-mail: ag1cascp@uco.es<sup>2</sup>ETSIAM, Universidad de Córdoba, Edificio C6- "Edificio Severo Ochoa", Carretera de Madrid, Km 396, Campus de Rabanales, 14071 Córdoba.<sup>3</sup>ETSIAM, Universidad de Córdoba, Edificio C4- "Celestino Mutis", Carretera de Madrid, Km 396, Campus de Rabanales, 14071 Córdoba.

La coinfección de garbanzo por *Meloidogyne artiellia* y la raza 5 de *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* (Foc 5) incrementa la severidad de la Fusariosis Vascular en cultivares parcialmente resistentes a dicha raza, y anula la resistencia completa a ella en determinados genotipos dependiendo de su naturaleza y la densidad de inóculo de Foc 5. Sin embargo, los mecanismos que pueden estar implicados en los efectos referidos son poco conocidos todavía aunque se postula que sean de naturaleza biológica y/o bioquímica más que mecánica. El objetivo de esta investigación es evaluar si la coinfección de genotipos de garbanzo por Foc 5 y *M. artiellia* determina perfiles de expresión proteica diferenciales que puedan ser asociados con cambios en respuestas defensivas de la planta. Para ello, dos líneas de garbanzo que en investigaciones anteriores mostraron resistencia estable (ICC1416K) o inestable (CA 336.14.3.3) a la coinfección por Foc 5 y *M. artiellia*, se inocularon en este estudio con cada uno de dichos patógenos individual o conjuntamente y la expresión diferencial de los perfiles proteicos se evaluó en el proteoma total de sus raíces a los 4 y 8 días después de la inoculación, y en secciones radicales noduladas e infectadas por el nematodo. Aunque en la interacción garbanzo-Foc 5 se han identificado diversas proteínas, en los análisis del proteoma total se ha observado un efecto de dilución de las respuestas proteicas en plantas infectadas por el nematodo y en aquellas que fueron coinfectadas por ambos patógenos. Sin embargo, cuando el análisis proteómico se circunscribió a los nódulos de la raíz inducidos por el nematodo hemos identificado una expresión diferencial de proteínas relacionadas con mecanismos defensivos de la planta, entre las cuales podemos destacar el descenso de chalcona sintasa y calreticulina (calcium-binding protein), la aparición de novo de una catalasa, y el incremento de una ascorbato peroxidasa en plantas infectadas por *M. artiellia*. Asimismo, el estudio proteómico del fluido apoplástico concentra la respuesta proteica respecto a la interacción garbanzo-Foc 5, e indica la presencia de diversas proteínas relacionadas con los procesos de patogénesis.

Investigación subvencionada por el Proyecto AGL2003-00640.

**N-13****INTERACCIONES EN GENOTIPOS DE GARBANZO ENTRE INFECCIONES POR *Meloidogyne artiellia* Y RAZAS DE *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris***

RODRÍGUEZ-LÓPEZ, J.<sup>1</sup>, LANDA, B.B.<sup>1,2</sup>, NAVAS-CORTÉS, J.A.<sup>1</sup>, JIMÉNEZ-DÍAZ, R.M.<sup>1,2</sup>, CASTILLO, P.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Instituto de Agricultura Sostenible, CSIC, Apdo. 4084, 14080 Córdoba. E-mail: ag1cascp@uco.es

<sup>2</sup>ETSIAM, Universidad de Córdoba, Edificio C4- "Celestino Mutis", Carretera de Madrid, Km 396, Campus de Rabanales, 14071 Córdoba.

La utilización de cultivares resistentes a razas de *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* (Foc) es la estrategia de control más práctica y económicamente eficiente de la Fusariosis Vascular (FV) del garbanzo. Sin embargo, su eficiencia y aplicabilidad pueden verse comprometidas por la variabilidad patogénica del hongo y por la coinfección simultánea de la planta resistente a éste por nematodos fitopatógenos (especialmente *Meloidogyne artiellia*) junto con razas no patogénicas de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris*. En anteriores investigaciones hemos demostrado que las coinfecciones por *M. artiellia* y Foc raza 5 (Foc-5) incrementan la severidad de la enfermedad en cultivares parcialmente resistentes a dicha raza, y anulan la resistencia en los cultivares que muestran resistencia completa a ella, dependiendo del genotipo vegetal y la densidad de inóculo de Foc 5. El objetivo de la presente investigación fue determinar si la coinfección de genotipos de garbanzo por *M. artiellia* suprime su resistencia a las razas Foc-0, -1A, y -2. Para ello, se han realizado experimentos en condiciones controladas óptimas para el desarrollo de la FV utilizando aislados tipo de Foc-0, -1A, y -2 y un aislado de *M. artiellia*, todos ellos mantenidos en cultivo puro en nuestro laboratorio. Como genotipos de garbanzo se han utilizado los siguientes: BG 212, CA 334.20.4.2.3, CA 336.14.3.0 ICC 14216K, PV 61, UC 27, WR 315 y 12071/10054, que presentan diferentes niveles de resistencia a las citadas razas, y la línea P 2245 que es susceptible a todas las razas del patógeno hasta ahora descritas y sirvió como control de enfermedad. Los resultados indican que la coinfección de los genotipos de garbanzo por Foc-0, -1A, y -2 y *M. artiellia* no modifica la reacción de ellos a la FV, que fue caracterizada por el periodo de incubación, índice de intensidad de enfermedad, y área bajo la curva de progreso de dicho índice en el tiempo. No obstante, es de destacar que la extensión de la colonización del sistema radical de garbanzo por Foc estuvo influida diferencialmente por el genotipo de garbanzo y, en combinaciones específicas, por la coinfección por ambos patógenos. Asimismo, el parasitismo por *M. artiellia* caracterizado por el índice de reproducción del nematodo (Rf) estuvo influido diferencialmente por el genotipo de garbanzo pero no se modificó por la coinfección de ambos patógenos.

Investigación subvencionada por el Proyecto AGL2003-00640.

**N-14****ANÁLISIS DE LA INDUCCIÓN DE VARIOS PROMOTORES DE *Geminivirus* EN EL SITIO DE ALIMENTACIÓN DEL NEMATODO****GARCÍA, A.<sup>1</sup>, FENOLL, C.<sup>1</sup>, MULLINEAUX, P.M.<sup>2</sup>, ESCOBAR, C.<sup>1</sup>**<sup>1</sup>*Facultad de Ciencias del Medio Ambiente, Universidad de Castilla-La Mancha, 45071 Toledo.*<sup>2</sup>*Department of Botany, Stockholm University, SE-106 91 Stockholm, Sweden.*

Los nematodos endoparásitos de plantas inducen en las raíces de las plantas la formación de unas estructuras especializadas, sitios de alimentación del nematodo (Nematode Feeding Site, NFS). Durante el proceso de formación de estas estructuras es necesario que se produzcan importantes cambios metabólicos y de expresión génica. Existen una variedad de genes que se han visto inducidos en los sitios de alimentación: (células gigantes en nematodos formadores de agallas). Entre otros, se han descrito genes inducidos que están relacionados con situaciones de estrés (*HSP17.7* Escobar y col., 1999), con el control del ciclo celular (*CyCA2;1* De Almeida Engler y col., 1999), en la formación del citoesqueleto (*AtFH6* De Almeida Engler y col., 2004) y con posibles cambios hídricos en las células (*LEMMI9* Escobar y col., 2003). Sin embargo, la especificidad de los promotores de estos genes en células gigantes es muy baja. Por ello, comenzamos a analizar la expresión de promotores de genes que no tuviesen su origen en las plantas, cuya expresión pudiera ser más restringida a los NFS, entre ellos algunos promotores de virus de plantas (El promotor AR1 del virus del pimiento huasteco, Aristizabal., 1996).

En este trabajo hemos completado el análisis de la inducción de dos promotores de geminivirus (Virus del estriado del maíz, MSV, en sentido V y el Virus del enanismo del trigo, WDV) tras la infección con *Meloidogyne javanica*, en *Nicotiana tabaccum*.y *Arabidopsis thaliana*.

Con los resultados obtenidos podemos concluir que una versión promotora larga (1176pb) del MSV es activa en células gigantes inducidas por *M. javanica* de forma generalizada. Su activación en el resto de tejidos está restringida a tejido vascular aéreo, localizada principalmente en floema. La baja expresión del promotor en tejido aéreo y la nula expresión en raíces hacen que este sea un buen candidato para un futuro uso en una estrategia biotecnológica anti-nematodo. Sin embargo, los resultados preeliminares de inducción del promotor del WDV en células gigantes no han podido ser confirmados, por lo que este promotor parece no ser activo en los sitios de alimentación del nematodo o su activación es muy baja y no detectable con los métodos empleados.

## J-1

**CARACTERIZACIÓN DE UNA COLECCIÓN DE *Orobanche cumana* (JOPO DE GIRASOL) RECOGIDA EN LA PENÍNSULA IBÉRICA DURANTE 20 AÑOS****MOLINERO-RUIZ, M.L., PINEDA-MARTOS, R., MELERO-VARA, J.M.***Instituto de Agricultura Sostenible (IAS), CSIC, Apdo. 4084, 14080 Córdoba. E-mail: ag2morum@uco.es*

La principal limitación fitopatológica del rendimiento de girasol, el principal cultivo herbáceo oleaginoso en España, la constituye el jopo (*Orobanche cumana*), una planta parásita cuyo método de control más efectivo es la resistencia genética. Hace 25 años se describieron en Rumanía cinco razas distintas de *O. cumana* (A a E), cada una controlada por un gen dominante: *Or<sub>1</sub>* a *Or<sub>5</sub>*. Aunque en otros países cada uno de estos genes aporta resistencia acumulada a las razas de jopo, en España se ha mostrado que el patrón de virulencia de las poblaciones del parásito es diferente, y que la resistencia efectiva frente a la nueva raza F no lo es frente a la E. Por ello, se ha comenzado una caracterización pormenorizada de poblaciones de jopo de distinta antigüedad, que permita una clasificación en grupos o complejos raciales lo más exacta posible. Además, se pretende comprobar si la rápida aparición de formas más virulentas de la planta parásita se debe a: 1) elevada diversidad genética que responde a una fuerte presión de selección, 2) elevada frecuencia de mutación en poblaciones relativamente homogéneas o 3) introducción de nuevas razas por importación y siembra semilla de girasol contaminada por jopo. Se seleccionaron 39 poblaciones de *O. cumana* recogidas en Andalucía (Cádiz, Córdoba, Málaga y Sevilla) y Cuenca entre los años 1983 y 2003. Se llevaron a cabo experimentos en condiciones controladas durante las dos semanas posteriores a la inoculación de las plantas de girasol, y luego en umbráculo hasta su madurez fisiológica, conforme a la metodología descrita previamente por nuestro grupo, a fin de comprobar la viabilidad de la semilla de *O. cumana*, así como para multiplicar dicha semilla. Además, cuando el número de jopos obtenidos fue suficientemente elevado, se tomaron muestras de tejido para extracción de ADN. La semilla de 19 de las 39 poblaciones inoculadas resultó viable, siendo la más antigua una población recogida en 1988 en El Coronil, Sevilla. El menor vigor de la semilla de poblaciones más antiguas se manifestó por un retraso de 15-20 días en la emergencia de las plantas de jopo respecto a la de poblaciones de 2003. Se están llevando a cabo amplificaciones RAPD de las muestras de ADN extraído de 11 poblaciones de jopo, ensayando inicialmente 94 cebadores.

## J-2

**POBLACIONES EUROPEAS DE JOPO (*O. cumana*) VIRULENTAS EN LÍNEAS DE GIRASOL CON DIFERENTES GENES DE RESISTENCIA****RARANCIUC, S.<sup>1</sup>, MELERO-VARA, J.M.<sup>2</sup>, MOLINERO-RUIZ, M.L.<sup>2</sup>**<sup>1</sup>Research Institute for Cereals and Industrial Crops, 91520 Fundulea, Rumanía.<sup>2</sup>Instituto de Agricultura Sostenible (IAS), CSIC, Apdo. 4084, 14080 Córdoba. E-mail: ag2morum@uco.es

Tanto en España como en otros países europeos productores de girasol, el jopo (*Orobanche cumana*) constituye una de las principales limitaciones del rendimiento del cultivo. *O. cumana* es una angiosperma holoparásita cuyo método de control más eficaz es la resistencia genética, que llega a superarse por la evolución del patógeno hacia razas más virulentas. En Rumanía se han descrito cinco razas distintas de *O. cumana* (A a E), cada una controlada por un gen dominante: *Or*<sub>1</sub> a *Or*<sub>5</sub>. Mientras en España se ha observado un patrón de virulencia de las poblaciones del parásito diferente, en Turquía no se ha efectuado una caracterización de las poblaciones autóctonas. Por otro lado, en los tres casos son frecuentes las infecciones por jopo en híbridos de girasol resistentes. Con el fin de caracterizar simultáneamente la virulencia de poblaciones de jopo de los tres países, así como para evaluar la efectividad de la resistencia genética en cada caso, se seleccionaron 15 poblaciones de *O. cumana*: 5 de Turquía, 2 de Rumanía y 8 de España. Cada población se inoculó en nueve plantas de un testigo de girasol susceptible, sin genes de resistencia a jopo, así como de otros tres cultivares, uno de ellos resistente a la raza E y susceptible a la F, y los otros dos con resistencia a la raza F. Se establecieron cuatro experimentos, en cámara de condiciones controladas durante los 15 días posteriores a la inoculación, y luego en invernadero hasta la madurez fisiológica de las plantas de girasol. La inoculación y evaluación de síntomas en las plantas se realizaron según la metodología descrita por nuestro grupo de trabajo. Al final de cada experimento, todo el material utilizado se esterilizó en autoclave. Todas las poblaciones fueron virulentas sobre el testigo susceptible, en el que se observaron hasta 62 jopos/planta. Uno de los cultivares resistentes a la raza F sólo presentó infecciones entre 8 y 16 jopos/planta en tres de las cinco poblaciones de Turquía. Las dos poblaciones rumanas fueron virulentas sobre el otro cultivar resistente a la raza F, pero una de ellas no lo fue sobre el resistente a la raza E (*Or*<sub>5</sub>). Este patrón no acumulativo de resistencia ha sido descrito recientemente por nuestro grupo. De las poblaciones españolas, sólo dos resultaron ser de raza E, ya que no causaron enfermedad en el cultivar de girasol portador del gen *Or*<sub>5</sub>. Las seis poblaciones restantes, caracterizadas como raza F, presentaron virulencias significativamente distintas, con infecciones entre 3 y 42 jopos/planta.

## OT-1

**INMUNIDAD INNATA DE LAS PLANTAS Y RESISTENCIA A HONGOS NECROTROFOS: NUEVOS CONCEPTOS Y FUTURAS APLICACIONES**

**MOLINA, A., JORDÁ, L., SÁNCHEZ-RODRÍGUEZ, C., SÁNCHEZ-VALLET, A., HERNÁNDEZ-BLANCO, C., LLORENTE, F., GARCÍA-OLMEDO, F.**

*Centro de Biotecnología y Genómica de Plantas (CBGP), Universidad Politécnica de Madrid  
Dep. Biotecnología, E.T.S.Ingenieros Agrónomos, Avda. Complutense, 28040 Madrid.*

Los hongos necrotrofos y vasculares son patógenos extremadamente virulentos que causan pérdidas relevantes en determinados cultivos, siendo especialmente devastadores en post-cosecha. Las estrategias de control utilizadas en agricultura (incluyendo el uso de fungicidas) han mostrado ser muy poco efectivas para el control de este tipo de patógenos. Nuestro conocimiento sobre los mecanismos que regulan el reconocimiento por la planta de estos hongos y la activación de las correspondientes respuestas de defensa es escaso. El estudio de la resistencia de *Arabidopsis thaliana* a este tipo de patógenos ha permitido determinar que ésta es compleja y multigénica. Con el objetivo de caracterizar componentes del sistema de inmunidad innata implicados en la regulación de la resistencia de las plantas a este tipo de patógenos, hemos aislado y caracterizado mutantes de *Arabidopsis thaliana* resistentes (*ern1-ern3: enhanced resistance to necrotrophs*) a hongos necrotrofos, y se ha realizado un análisis de la resistencia natural de *Arabidopsis* a ese grupo de patógenos. La caracterización genética y molecular del gen *ERN1*, que codifica una celulosa sintasa (AtCESA8) necesaria para la síntesis de la pared celular secundaria, ha revelado que las señales derivadas de la pared celular y de la ruta del ácido abscísico (ABA) son relevantes en la resistencia de las plantas a hongos necrotrofos y vasculares. El análisis de la resistencia natural de *Arabidopsis* al hongo necrotrofo *Plectosphaerella cucumerina* ha permitido la identificación de ERECTA, una RLK (*receptor-like kinase*), como el QTL mas importante que confiere resistencia a este hongo. Además, nuestros datos han permitido demostrar que la proteína G heterotrimérica de *Arabidopsis* desempeña un papel en resistencia a necrotrofos. Los avances en la caracterización funcional de estos componentes, así como la potencial utilidad de estos descubrimientos en protección vegetal serán discutidos.

## OT-2

**RESIDUOS DE FUNGICIDAS EN SUELOS DE INVERNADEROS DE TOMATE DE LA REGION DE MURCIA****FENOLL, J., HELLÍN, P., MARÍN, C., RUIZ, M., MIGUEL, M., FLORES, P., LACASA, A.***Instituto Murciano de Investigación y Desarrollo Agrario y Alimentario (IMIDA), 30150 La Alberca (Murcia). E-mail: jose.fenoll@carm.es*

En la Región de Murcia, el tomate se cultiva mayoritariamente a lo largo de la franja costera de los términos de Mazarrón y Aguilas, tanto al aire libre protegido por mallas o en invernaderos. Son numerosas las enfermedades fúngicas que afectan a la parte aérea, requiriendo de intervenciones químicas para paliar los efectos. El uso reiterado y frecuente de fungicidas, propicia la acumulación de restos en los suelos, lo que puede llegar a tener repercusiones cuando se pretende cambiar el uso del mismo. Este aspecto tiene singular trascendencia al convertir suelos con cultivos convencionales a cultivos ecológicos. En las últimas campañas se han iniciado trabajos orientados a conocer los niveles de contaminación por plaguicidas de los suelos cultivados con tomate, con el objeto de arbitrar medidas y estrategias descontaminantes. En este trabajo se presentan los resultados de la prospección de las zonas tomateras y el efecto de la práctica de desinfección del suelo mediante biofumigación con solarización sobre los niveles de fungicidas. Las muestras de suelos fueron analizadas mediante extracción líquido-líquido, seguida de cromatografía de gases (CG) con detectores específicos de captura de electrones ( $\mu$ ECD), nitrógeno-fósforo (NPD) y espectrofotómetro de masas (MSD). En la mayoría de los suelos se han detectado remanentes de varios fungicidas (por ejemplo, triadimenol, tetraconazol), a niveles elevados, quizás debido a su uso reiterado. La biofumigación con solarización permite reducir el contenido de algunas de estas materias activas, acelerando los procesos de degradación de estos compuestos.



# ÍNDICE ALFABÉTICO DE AUTORES

## A

ABAD, J. ....	306
ABAD-CAMPOS, P. ....	91, 184, 210
ABARCA-GRAU, A.M. ....	339
ABDALI, A. ....	164
ABDULLAHI, I. ....	29
ACHÓN, M.A. ....	279, 280
AGUIZ, O. ....	159, 160, 163, 164
AGUILAR, L. ....	269
AGUILAR, M.I. ....	340, 341
AGUÍN, O. ....	205, 206, 207, 208
AGUSTÍ, L. ....	150, 377
AIDOUN, A. ....	164
AITKIEN, J. ....	130
AITOUNA, H. ....	160
ALANIZ, S. ....	91
ALBARÁÑEZ, E.H. ....	140
ALBI, T. ....	364
ALCOVERRO, T. ....	187
ALEMANY, A. ....	380
ALFARO-FERNÁNDEZ, A. ....	276, 290, 291, 292
ALFARO-LASSALA, F. ....	183
ALFÉREZ, M.D. ....	269
ALIAGA, P. ....	224, 225, 226
ALONSO, R. ....	380
ALONSO-BLANCO, C. ....	23
ALONSO-DUEÑAS, N. ....	279, 280
ALSALIMIYA, M. ....	114
ALTABELLA, J. ....	64
ÁLVAREZ, B. ....	62, 360
ÁLVAREZ, J.M. ....	168
ÁLVAREZ, L.A. ....	209, 210, 212, 213, 214
ALVES-SANTOS, F.M. ....	65, 132, 147, 189
AMBRÓS, S. ....	84, 86, 328
ANADÓN, A. ....	120
ANCILLO, G. ....	314
ANDRÉS M.F. ....	380, 381
ANTÚNEZ-LAMAS, M. ....	98
AÑAÑOS, M.A. ....	169, 232
APARICIO, F. ....	39
ARAMBURU, J. ....	85, 283, 300, 301, 310, 324,
ARANDA, M.A. ....	43, 303
ARESTOY, F. ....	116
ARGUDÍN, M.A. ....	345
ARMAS-PÉREZ, I.E. ....	167
ARMENGOL, J. ....	27, 91, 93, 140, 183, 209, 210,
	211, 212, 213
AROCA, A. ....	89, 200, 234
ARQUERO, O. ....	66, 196
ARREBOLA, E. ....	333, 336
ASCASIBAR, J. ....	199

ASENCIO, A.D. ....	120
ASENSIO, C. ....	299
ATKINSON, M.A. ....	15
ÁVILA, A.C. ....	41
AVILÉS, M. ....	47, 116, 117, 118, 180

## B

BADAL, J. ....	183, 184
BADOSA, E. ....	63, 77, 95, 137
BALLESTER, A.R. ....	50
BANI HASHEMIAN, M. ....	320
BAÑÓN, S. ....	170
BAÑOS-ATANCE, A. ....	238
BARAJAS, D. ....	317
BARDAJÍ, E. ....	63
BARRAU, C. ....	78, 125, 165
BARRIOS, G. ....	64, 220
BASALLOTE, M.J. ....	37
BASCÓN, J. ....	210
BATLLE, A. ....	337, 338, 348, 349
BATLLE, I. ....	251
BATLLORI, J.LL. ....	133
BEDNAREK, P. ....	13
BEJARANO, E.R. ....	329, 363
BEJARANO-ALCÁZAR, J. ....	177, 182
BELDA, J.E. ....	79, 152, 153
BELLO, A. ....	104, 371
BELMONTE, A. ....	266, 269
BELTRÁN, C. ....	373, 374
BENDAHMANE, A. ....	43, 303
BENÍTEZ, M.J. ....	66, 196
BENÍTEZ, T. ....	52
BENITO, E.P. ....	240, 241
BENITO-PESCADOR, D. ....	240, 241
BENNOUNA, M. ....	190
BERBEGAL, M. ....	27, 93, 212
BERGUA, M. ....	270
BERNAD, L. ....	321
BERNAL, A. ....	143
BERNAL, M.A. ....	239
BERTACCINI, A. ....	64
BERTOLINI, E. ....	59, 268, 286, 351
BESALÚ, E. ....	63
BETANCOURT, M. ....	71
BEUZÓN, C.R. ....	356, 357, 361, 363
BEZOS-CAMPS, R. ....	347
BIELZA, P. ....	372
BILLS, G.F. ....	25
BIOSCA, E.G. ....	62, 96
BLANCH, M. ....	366
BLANCO, C. ....	126, 175, 176

# ÍNDICE ALFABÉTICO DE AUTORES

BLANCO, R. ....	169, 232
BLANCO-LÓPEZ, M.A. ....	30
BLANCO-MARTÍN, I. ....	151
BLOEMBERG, G. ....	127
BOITEUX, L.S. ....	305
BONATERRA, A. ....	137, 150, 335, 377
BONILLA, N. ....	105
BONILLA-MARTÍNEZ, A. ....	311
BOONHAM, N. ....	29, 299
BORJA, M. ....	46
BORRERO, C. ....	47, 116, 117
BOTÍA, J.M. ....	120
BOTTI, S. ....	64
BRAÑA, M. ....	149
BROWN, J.K.M. ....	15, 70

## C

CABALEIRO, C. ....	61, 198, 302
CABALEIRO, C. ....	61
CABEZA, A. ....	147
CABEZA-FERNÁNDEZ, E. ....	182
CABREFIGA, J. ....	99, 137
CABRERA, J. ....	136
CABRERA-ORDOÑEZ, E. ....	98
CAETANO, P. ....	33
CAHANA, A. ....	83
CALVET, C. ....	121
CALVET, C. ....	121, 122
CAMBRA, M. ....	57, 59, 267, 268, 286, 287, 351
CAMBRA-ÁLVAREZ, M.A. ....	287, 347, 355
CAMINERO, C. ....	55, 358
CAMPELO, M.P. ....	139, 221, 261
CAMPRUBÍ, A. ....	121, 122
CAMPRUBÍ, A. ....	122
CAMPS, J. ....	335
CANDELA, M.E. ....	155, 156, 157, 158, 190
CANO, A. ....	373
CANO, M. ....	266
CANTO, T. ....	326
CANTORAL, J.M. ....	244
CAÑAMÁS, T. ....	49
CAÑIZARES, M.C. ....	327
CAPOTE, N. ....	59, 268, 286
CARBONELL, A. ....	44
CARBÚ, M. ....	244
CARMONA, M.P. ....	269, 298, 307, 308
CARRETERO, F. ....	191, 222, 223, 225, 227, 228
CASALS, C. ....	49
CASANOVA, E. ....	47
CASQUERO, P.A. ....	139
CASTAGNONE, P. ....	29
CASTAÑO, A. ....	284
CASTILLO, A.G. ....	329
CASTILLO, P. ....	6, 307, 382, 383
CASTILLO, S. ....	116, 117, 180
CAYUELA, J.A. ....	364
CAZORLA, F.M. ....	105, 107, 108, 127, 154, 333, 334, 336
CEBRIÁN, M.C. ....	26, 276, 277, 290, 291, 292
CELADA, B. ....	64

CENIS, J.L. ....	273
------------------	-----

## Ch

CHERIFI, F. ....	197
CHIKH-ROUHO, H. ....	168
CHMITI, A. ....	94

## C

CID, M. ....	61
CIFUENTES, D. ....	232
CLAVÉ, J. ....	251
COBOS, R. ....	171
CODINA, J.C. ....	106
CODÓN, A.C. ....	52
COLLAR, J. ....	199
COLOMER, J.I. ....	79
CONEJERO, A. ....	56
CONESA, A. ....	314
CONSONNI, C. ....	13
CONTRERAS, J. ....	372
CÓRDOBA, I. ....	222, 225, 228
CÓRDOBA, M.C. ....	290, 291, 292, 223, 224, 276
CORDÓN-TORRES, M.M. ....	34
CORPAS, C. ....	37
CORPAS, J.L. ....	248
CORTADA, L. ....	54, 375
CRESPO, A. ....	140
CRETAZZO, E. ....	297
CREVILLÉN, M. ....	153
CUADRADO, I.M. ....	266, 269, 308
CUARTAS, R. ....	19
CUBERO, J. ....	48, 135, 202
CUENCA, F. ....	183

## D

DABAUZA, M. ....	262, 278
DALMAIS, M. ....	303
DE ARMAS, R. ....	367
DE CAL, A. ....	48, 68, 80, 111, 112, 113, 202
DE CARA, M. ....	26, 191, 222, 223, 224, 225, 226, 227, 228
DE LA IGLESIA, E. ....	171
DE LA ROCA, E. ....	210
DE LEÓN, L. ....	97, 353
DE LOS SANTOS, B. ....	126, 175, 176, 248
DE MENTHEM, N. ....	275
DE VEGA, J.J. ....	21, 69, 258
DE VICENTE, A. ....	20, 105, 106, 107, 108, 131, 154, 333, 334, 336
DE VITA, P. ....	28
DE WEERT, S. ....	127
DEL CUETO-GINZO, A. ....	310
DEL MONTE, J.P. ....	275
DEL RÍO, J.A. ....	138, 245
DELIBES, A. ....	381
DESCALS, E. ....	35, 192
DIÁNEZ, F. ....	191, 222, 223, 224, 225, 226, 227, 228

# ÍNDICE ALFABÉTICO DE AUTORES

DÍAZ, G. ....	120
DÍAZ, J. ....	246, 247
DÍAZ-HERNÁNDEZ, S. ....	110
DÍAZ-MÍNGUEZ, J. M. ....	21, 65, 69, 258
DÍAZ-RUIZ J. R. ....	83, 319
DÍAZ-VIVANCOS, P. ....	87
DICENTA, F. ....	322
DICK, M. ....	242
DÍEZ, J.J. ....	65, 132, 147, 148, 188, 216, 217, 218, 219, 249, 250
DONAIRE, L. ....	22, 317
DUNABEITIA, M. ....	179
DURÁN-VILA, N. ....	58, 281, 289, 314, 320, 321

## E

EGEA-GILABERT, C. ....	155, 156, 157, 158
EL BAKALI, M.A. ....	200
EL MODAFAR, C. ....	159
ELORRIETA, M.A. ....	340, 341
ELVIRA-RECUENCO, M. ....	316
ENRIQUEZ, M. ....	302
ESCOBAR, C. ....	384
ESCOFET, M. ....	201
ESCOFET, P. ....	205
ESCRUI, F. ....	270, 287, 309
ESLAVA, A.P. ....	21, 65, 69, 240, 241, 258
ESPÁRRAGO, G. ....	151, 189
ESPINO, A. ....	291
ESSAAIDI, M. ....	190
ESTAÚN, V. ....	121, 122
ESTEBAN, O. ....	57
EVIDENTE, A. ....	36
EZZIYANI, M. ....	155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 190

## F

FAGOAGA, C. ....	88
FAJARDO, T.V.M. ....	313
FALK, B. ....	40
FELIU, L. ....	63
FENOLL, C. ....	384
FENOLL, J. ....	390
FERERES, A., ....	60, 282
FERNÁNDEZ, J.A. ....	170
FERNÁNDEZ, J.I. ....	263
FERNÁNDEZ, N. ....	293
FERNÁNDEZ, P. ....	104, 153
FERNÁNDEZ-ACERO, F.J. ....	244
FERNÁNDEZ-CABANÁS, V.M. ....	116
FERNÁNDEZ-CALVINO, L. ....	24, 323
FERNÁNDEZ-MUÑOZ, R. ....	304, 305, 306
FERNÁNDEZ-ORTUÑO, D. ....	20
FERRE, R. ....	63
FERRER, R.M. ....	288
FIGUEROA, M. ....	36
FLORES, P. ....	390
FLORES, R. ....	44, 88, 314
FONT, M.I. ....	26, 290, 292, 294
FORMENT, J. ....	50

FORTES, I.M. ....	73, 264
FRAILE, A. ....	71, 275
FRANCÉS, J. ....	137

## G

GADEA, J. ....	50
GAFORIO, L. ....	90, 235, 257
GAGO, S. ....	44
GALEANO, M. ....	79, 152, 153
GALIPIENSO, L. ....	85, 283, 300, 301, 310, 324
GALLEGO, E. ....	129, 379
GALLEGO, P.P. ....	256
GALLO-LLOBET, L. ....	110, 238
GANDÍA, M. ....	314
GANLEY, R. ....	242
GARCÍA C.A. ....	55
GARCIA DE ROSA, B. ....	262, 263, 297
GARCÍA, A. ....	26, 79, 294, 384
GARCÍA, B. ....	181, 271
GARCÍA, C.A. ....	358
GARCIA, F. ....	64, 200, 201
GARCÍA, G. ....	152
GARCÍA, J. A. ....	57, 87, 192
GARCÍA, P. ....	93, 149
GARCÍA-ALCÁZAR, M. ....	232
GARCÍA-ANDRÉS, S. ....	72
GARCÍA-ARENAL, F. ....	23, 71, 275
GARCÍA-BARRADO, J.A. ....	65, 151, 189
GARCÍA-BENAVIDES, P. ....	230, 352
GARCÍA-BERRIOS, J. ....	302
GARCÍA-CABELLO, S. ....	30
GARCÍA-CANO, E. ....	304, 305, 327
GARCÍA-FIGUERES, F. ....	122, 167, 220, 234
GARCÍA-GUTIÉRREZ, L. ....	106
GARCÍA-JIMÉNEZ, J. ....	7, 27, 91, 93, 140, 183, 184, 209, 210, 211, 212, 213, 214
GARCÍA-LIDÓN, A. ....	138
GARCÍA-LUQUE, I. ....	42, 311, 318, 319
GARCÍA-MAS, J. ....	303
GARCÍA-MUÑOZ, J.A. ....	35
GARCÍA-OLMEDO, F. ....	389
GARCÍA-RANDEZ, A. ....	290
GARCÍA-RUIZ, A. ....	118
GARCÍA-SÁNCHEZ, M.A. ....	21, 69, 258
GARRIDO, C. ....	244
GAYOSO, C. ....	243
GEIDER, K.E. ....	96
GELL, I. ....	68, 202
GENOVÉS, A. ....	315
GIL, F. ....	266
GIL, M. ....	57
GILARDI-NAVARRO, P. ....	319
GIMÉNEZ-JAIME, A. ....	140
GIMÉNEZ-PECCI, M.P. ....	295
GIORDANO, L.B. ....	305
GOLDARAZENA, A. ....	51
GOLMOHAMMADI, M. ....	354
GÓMEZ, A. ....	90
GÓMEZ, G. ....	314
GÓMEZ, J. ....	144, 145, 228

# ÍNDICE ALFABÉTICO DE AUTORES

GÓMEZ, P. ....	138, 245
GÓMEZ, R. ....	340, 341
GÓMEZ, V.M. ....	340, 341
GÓMEZ-GUILLAMÓN, M.L. ....	303
GONZÁLEZ, A. ....	138, 245
GONZÁLEZ, A.J. ....	26, 109, 149, 193, 194, 221, 261, 345, 346
GONZALEZ, B. ....	208
GONZÁLEZ, J.M. ....	340, 341
GONZÁLEZ, N. ....	173, 195
GONZÁLEZ, S. ....	376
GONZÁLEZ, V. ....	172, 231, 236, 237
GONZÁLEZ-ABOLAFIO, R. ....	355
GONZÁLEZ-BELINCHÓN, C.M. ....	381
GONZÁLEZ-CANDELAS, L. ....	50
GONZÁLEZ-DÍAZ, E. ....	167
GONZÁLEZ-SÁNCHEZ, M.A. ....	154, 233
GONZÁLEZ-TORRES, R. ....	168
GONZÁLEZ-VARELA, G. ....	109, 193, 194, 346
GORRIS, M.T. ....	268
GOYTIA, E. ....	24, 323
GRAHAM, I. ....	29
GRAMAJE, D. ....	140
GRANDE-PÉREZ, A. ....	73
GUERRA, M. ....	139
GUERRERO, M.M. ....	104, 371, 372, 373, 374
GUERRI, J. ....	84, 86, 288, 289, 314, 328
GUEVARA, C.M. ....	356, 363
GUIJARRO, B. ....	113
GUINDA, A. ....	364
GUIRADO, M <sup>a</sup> .L. ....	144, 145
GUIRAO-MOYA, P. ....	229, 253
GUTIÉRREZ, J.A. ....	336
GUTIERREZ-MAÑERO, F.J. ....	46
GUZMÁN, M.M. ....	299

## H

HAMBERG, M. ....	46
HAMDACHE, A. ....	160, 161, 163, 164
HELLÍN, P. ....	390
HENRICOT, B. ....	213
HEPPE, E. ....	130, 179, 242
HERMOSO DE MENDOZA, A. ....	88
HERNÁNDEZ, C. ....	284, 314, 325
HERNÁNDEZ, J.A. ....	87
HERNÁNDEZ, J.M. ....	146, 187, 215
HERNÁNDEZ-BLANCO, C. ....	389
HERNÁNDEZ-ROMERO, D. ....	359
HERRERA, J.A. ....	223, 224, 277
HERRERO DE HARO, R.I. ....	307
HERRERO, N. ....	181
HINAREJOS, C. ....	231, 237
HINAREJOS, R. ....	38, 231, 237
HITA, I. ....	262, 263, 297
HUMPHRY, M. ....	13

## I

IGLESIAS-DÍAZ, I. ....	255
INOUE-NAGATA, A.K. ....	41

IPPOLITO, A. ....	124
ITURRITXA, E. ....	130, 179, 242

## J

JACTEL, H. ....	216
JAIZME-VEGA, M.C. ....	167
JANSSEN, D. ....	26, 266, 269, 273, 308
JEGER, M.J. ....	75
JIMÉNEZ, J.J. ....	28, 115
JIMÉNEZ-DÍAZ, R.M. ....	5, 67, 178, 185, 186, 342, 343, 382, 383
JORDÁ, C. ....	26, 223, 224, 272, 276, 277, 290, 291, 292, 294, 346
JORDÁ, L. ....	389
JORDÁN-RAMÍREZ, R. ....	67
JUÁREZ, M. ....	274

## K

KHADDOR, M. ....	164
------------------	-----

## L

LACASA, A. ....	104, 371, 372, 373, 374, 390
LAFUENTE, M.T. ....	50
LAÍN-DUQUE, R. ....	103
LAKHSSASSI, N. ....	333
LAMARTI, A. ....	159, 160, 161, 162, 163, 164
LAMERS, G.E.M. ....	127
LANDA, B.B. ....	185, 186, 342, 343, 383
LANDERAS, E. ....	93, 149
LARENA, I. ....	80
LASTRA, B. ....	256, 355
LAVIÑA, A. ....	337, 338, 348, 349
LE-COURTOIS, V. ....	360
LEGAZ, M.E. ....	366, 367
LEGUA, P. ....	274
LEÓN, M. ....	91, 93, 184, 209, 211, 212, 214
LEÓN, P. ....	152
LEÓN-EGIDO, M. ....	103
LERMA, M.L. ....	203, 204, 272
LEUCHTMANN, A. ....	271
LIPKA, V. ....	13

## LI

LLÁCER, G. ....	56
LLAMA-PALACIOS, A. ....	19
LLAVE, C. ....	22, 317, 323
LLOP, P. ....	29, 354
LLORENTE, F. ....	389
LLORENTE, I. ....	133, 134

## L

LOPES, J.R.S. ....	342
LÓPEZ, C. ....	85, 88, 117, 300, 301, 324
LÓPEZ, D.J. ....	128, 376
LÓPEZ, M.C. ....	266

# ÍNDICE ALFABÉTICO DE AUTORES

LÓPEZ, M.M.	29, 62, 76, 96, 339, 344, 353, 354, 355, 359, 360
LÓPEZ, O.	340, 341
LÓPEZ, R.	299
LÓPEZ, V.	191, 222, 223, 224
LÓPEZ-ABELLA D.	24, 323
LÓPEZ-ARANDA, J.M.	126, 298
LÓPEZ-BELLIDO, F.J.	136
LÓPEZ-BRAÑA, I.	381
LÓPEZ-CORTÉS, I.	140
LÓPEZ-ESCUADERO, F.J.	30
LÓPEZ-GARCÍA, B.	119
LÓPEZ-HERRERA, C. J.	82, 123, 124
LÓPEZ-MONDEJAR, R.	143
LÓPEZ-MOYA J.J.	24, 323
LÓPEZ-PÉREZ A.J.	262
LÓPEZ-RUIZ, F.	131
LÓPEZ-SOLANILLA, E.	19, 77, 98
LORENZANA, A.	139
LORENZO, D.	166
LORENZO, M.P.	166
LOUREIRO, M.D.	293
LOURO, D.	73
LOVATO, F.A.	41
LOVERA, M.	66, 196
LOZANO, G.	73, 285, 327
LOZANO-DURÁN, R.	329
LUIS-ARTEAGA, M.	270, 287, 288, 309
LUNELLO, P.	295, 296
LUQUE, J.	36, 53, 121, 200, 220, 234, 251, 252

## M

MACFARLANE, S.	326
MACHO, A.P.	356, 357
MACHÓN, P.	132
MANSILLA, J.P.	205, 206, 207, 208
MAOUNI, A.	162
MARCHAL, F.	94
MARCILLA-GOLDARACENA, I.	103
MARCO, C.F.	303
MARCO-NOALES, E.	96, 339, 355, 359
MARCOS, J.F.	45, 119
MARCOS, M.F.	139
MARÍN, C.	390
MARÍN, F.	222, 227
MARÍN-GONZÁLEZ, J.C.	203
MARTIAÑEZ, J.	83
MARTÍN, A.	55, 358
MARTÍN, G.	266
MARTÍN, M.P.	64
MARTÍN, M.T.	171
MARTÍN, S.	84
MARTÍN-DOMÍNGUEZ, R.	69, 241
MARTÍNEZ DE ILÁRDUYA, O.	199, 243
MARTÍNEZ, A.	263
MARTÍNEZ, D.	138, 267
MARTÍNEZ, F.	180
MARTÍNEZ, I.	130
MARTÍNEZ, J.A.	170, 274
MARTÍNEZ, M.A.	104, 268, 371, 372, 373, 374

MARTÍNEZ, M.P.	166
MARTÍNEZ, P.	227
MARTÍNEZ, S.	325
MARTÍNEZ-BERINGOLA, M.L.	380
MARTÍNEZ-BERMEJO, D.	65
MARTÍNEZ-CALVO, J.	56
MARTÍNEZ-GARCÍA, B.	24, 317
MARTÍNEZ-GÓMEZ, P.	87, 322
MARTÍNEZ-MEDINA, A.	143
MARTÍNEZ-PRIEGO, LL.	22, 317
MARTÍN-GARCÍA, J.	216
MARTÍN-PÉREZ, R.	107
MARTÍN-RODRIGUES, N.	21, 69, 258
MARTÍN-SÁNCHEZ, J.A.	381
MARTÍN-SÁNCHEZ, P.M.	233
MARTOS, S.	36, 200, 220, 251, 252
MATAS, I.M.	362
MATAS, M.	283
MEDINA, C.	152
MEDINA, J.J.	126
MEDINA, V.	40, 292
MELERO-VARA, J.M.	34, 37, 141, 142, 387, 388
MELGAREJO, P.	48, 68, 80, 111, 112, 113, 135, 202
MENÉNDEZ, E.	46
MERCADO-BLANCO, J.	178
MERINO F.	239, 243, 246, 247
MESANZA, N.	242
MIGUEL, M.	390
MIRA, J.L.	231, 237
MIRANDA, L.	126
MOLINA, A.	389
MOLINA, M. J.	215
MOLINA-GALDEANO, M.	42, 318
MOLINERO-RUIZ, M.L.	34, 387, 388
MONROC, S.	63
MONTAÑO-MATA, N.	211
MONTENEGRO, D.	205, 206, 207, 208
MONTES, M.	185, 186
MONTESINOS, E.	63, 77, 95, 99, 133, 134, 137, 150, 335, 350, 368, 377
MONTÓN, C.	64, 201
MORAGA-QUINTANILLA, A.	311
MORAGREGA, C.	150, 350, 368, 377
MORAL, J.	66, 174, 196, 197
MORALEJO, E.	35, 192
MORENO, A.	60, 267, 268
MORENO, M.C.	77, 137
MORENO, P.	84, 86, 88, 288, 289, 314, 328
MORENO, S.	381
MORENO-MATEOS, M.A.	52
MORENTE, M.C.	354
MORERA, B.	351
MORET, A.	92
MORILLA, G.	329
MORIONES, E.	72, 264, 285, 303, 304, 305, 306, 327
MOYA, P.	328
MOYANO, C.	316
MUGNAI, L.	36

# ÍNDICE ALFABÉTICO DE AUTORES

MULLINEAUX, P.M.	384
MUÑOZ LEDESMA, F.J.	185, 186
MUÑOZ, A.	45
MUÑOZ, M.I.	204
MUÑOZ, R.M.	203, 204, 272, 291
MUÑOZ, Z.	92
MURCIA, N.	281
MURILLO, J.	100, 333, 336

## N

NAGATA, T.	41
NASSEUR, F.	163
NAVARRO, A.	170
NAVARRO, E.	74
NAVARRO, J.A.	315
NAVARRO, L.	84, 88, 289
NAVARRO, N.	143
NAVAS-CASTILLO, J.	72, 73, 264, 265, 285, 327
NAVAS-CORTÉS, J.A.	67, 383
NIETO, C.	43, 303
NOGALES, A.	121, 122
NOGUERA, B.	184
NOVO, E.	239
NUEZ, F.	301, 324

## O

OLAIZOLA, J.	148, 249
OLALLA, C.	128, 376
OLIVEIRA, R.	174, 197
OLMOS, A.	59, 286
OLMOS, E.	87
ORDAX, M.	96
ORDOVÁS, J.	118
ORIA DE RUEDA, J.A.	148
ORNAT, C.	54, 375
ORTEGA, A.	253
ORTEGA, J.	248
ORTEGA-GEA, A.	229
ORTIZ-MARTÍN, I.	357, 361
ORTUÑO, A.	138, 245
OTERO, L.	207

## P

PADILLA, C.	262, 263, 297
PADILLA, V.	262, 263, 297
PAGÁN, I.	23, 319
PAJARES, J.A.	147, 218, 249, 250
PALACIO-BIELSA, A.	347, 355
PALDI, N.	83
PALLÁS, V.	39, 313, 314, 315
PALOMARES-RIUS, J.E.	382
PALOMO, J.L.	55, 230, 352
PALO-NÚÑEZ, E.	151, 189
PALO-OSORIO, C.	151, 189
PANSTRUGA, R.	13
PARLADÉ, X.	53
PASCUAL, J.A.	143
PEDUTO, F.	36

PEÑA, L.	57, 88
PEÑALVER, J.	354
PEÑALVER, R.	76, 77, 339, 344, 355
PERA, J.	53
PEREGRINA, I.	226, 228
PEREIRA, L.A.R.	41
PEREIRA, S.	61, 302
PERERA, S.	146
PEREZ, C.	158
PÉREZ, R.	208
PÉREZ, S.	117, 253
PÉREZ-GARCÍA, A.	20, 105, 106, 107, 108, 131, 333, 334, 336
PÉREZ-GONZÁLEZ, S.	229
PÉREZ-JIMÉNEZ, R.M.	154, 233, 298
PÉREZ-MARTÍNEZ, I.	100, 344
PÉREZ-SIERRA, A.	93, 209, 211, 212, 213
PICO, P.	350
PINA, J.A.	289, 320
PINEDA-MARTOS, R.	387
PINOCHET, J.	377
PINTOS, C.	205, 206, 207, 208
PIQUER, J.	76
PIRON, F.	303
PLANAS, M.	63
PLIEGO, C.	127
POMAR, F.	199, 243
PONZ, F.	282, 295, 296
PORRAS, I.	138
PORRAS, M.	78, 165
PORRAS-PIEDRA A.	103
PORRAS-SORIANO R.	103
PORRAS-SORIANO, A.	103
PORTAL, M.A.	172
PRADOS-LIGERO, A.M.	37, 141, 142
PRIETO, M.J.	166
PUJOL, M.	95
PULIDO, L.	275

## Q

QUERO, P.	244
QUESADA, J.M.	76, 344, 354

## R

RADA, M.	364
RAHOLA, J.	64
RAMOS, B.	21, 69, 258
RAMOS, C.	100, 127, 154, 344, 362, 365
RAMOS, N.	165
RAMOS-SOLANO, B.	46
RAPOSO, R.	89, 200, 234
RARANCIUC, S.	388
RAVELO, M.	296
RAVENSBERG, W.	79
RECIO, D.	136
REDONDO, C.	112, 135
REGUERA, J.I.	128, 376
REIGADA, S.	201
REINOSO, B.	221, 261

# ÍNDICE ALFABÉTICO DE AUTORES

RENOBALES, G. ....	242
RENOVELL, A. ....	84
REQUENA, A. ....	156, 157, 190
REQUENA, M.E. ....	155, 156, 157, 158
RESENDE, R.O. ....	41, 305, 327
REYES, J.A. ....	222, 225, 228
REYES, J. ....	64, 220
RIDOUT, C.J. ....	15, 70
RINCÓN, A.M. ....	52
RÍOS, J.J. ....	364
RIVERA, A. ....	199
ROCA, L.F. ....	94, 114
RODICIO, M.R. ....	345, 346
RODRÍGUEZ, A. ....	97, 353
RODRÍGUEZ, B. ....	296
RODRÍGUEZ, C.W. ....	366
RODRÍGUEZ, J.M. ....	144, 145
RODRÍGUEZ, L. ....	171
RODRÍGUEZ-JURADO, D. ....	177, 178
RODRÍGUEZ-LÓPEZ, J. ....	383
RODRÍGUEZ-MOLINA, M.C. ....	65, 151, 189
RODRÍGUEZ-MORENO, L. ....	365
RODRÍGUEZ-PALENZUELA, P. ....	19, 77, 98
RODRÍGUEZ-PÉREZ, A. ....	110, 238
RODRÍGUEZ-RODRÍGUEZ, M.D. ....	307
RODRÍGUEZ-ROMERO, A.S. ....	167
ROJAS, C. ....	19
ROMERO, C. ....	56
ROMERO, D. ....	106, 108, 334
ROMERO, E. ....	125
ROMERO, F. ....	78, 125, 126, 165, 175, 176, 248
ROMERO, J. ....	74, 312
ROMERO, M. ....	251
ROMERO, M.A. ....	115
ROMERO, M.D. ....	381
ROMO, M. ....	271
ROMÓN, P. ....	51
ROS, C. ....	104, 371, 372, 373, 374
ROSELLÓ, M. ....	352
RUANO-ROSA, D. ....	82, 123, 124
RUBIO, F. ....	166
RUBIO, L. ....	288
RUBIO, M. ....	87, 322
RUBIO, M.E. ....	37
RUBIO-SÁNCHEZ, C. ....	229
RUÍZ, F.J. ....	191, 223, 224, 226
RUIZ, L. ....	312
RUIZ, M. ....	390
RUIZ-ALBERT, J. ....	356, 363
RUIZ-RUIZ, S. ....	86
RUZ, L. ....	368

## S

SABADELL, S. ....	187
SABATÉ, J. ....	337, 338, 348, 349
SABUQUILLO, P. ....	48, 80, 111, 112
SACRISTÁN, G. ....	128, 376
SACRISTÁN, S. ....	15, 70
SÁEZ, E. ....	144, 145, 269
SAGRARIO, J. ....	309

SAIDI, R. ....	164
SALAS, D. ....	165
SALAZAR, D.M. ....	140
SALCEDO, C.I. ....	76, 355
SALLERES, B. ....	239
SALMERÓN, E. ....	297
SALMERÓN, T. ....	378
SALTO, M.T. ....	380
SALVADOR, D. ....	204
SÁNCHEZ, A. ....	201
SÁNCHEZ, F. ....	282, 296
SÁNCHEZ, J. ....	129, 379
SÁNCHEZ, M.E. ....	28, 33, 115
SANCHEZ-AMAT, A. ....	359
SÁNCHEZ-CAMPOS, S. ....	72
SÁNCHEZ-DURÁN, M.A. ....	329, 363
SÁNCHEZ-FERNÁNDEZ, A. ....	319
SÁNCHEZ-MÁRQUEZ, S. ....	25
SÁNCHEZ-NAVARRO, J.A. ....	39, 313
SÁNCHEZ-RODRÍGUEZ, C. ....	389
SÁNCHEZ-SEVILLA, J.F. ....	298
SÁNCHEZ-TORRES, P. ....	38, 231, 237, 254
SANCHEZ-VALLET, A. ....	389
SÁNCHEZ-ZABALA, J. ....	179
SANT, M.D. ....	47
SANTAMARÍA, G. ....	350
SANTAMARÍA, O. ....	147, 217, 250
SANTIAGO R. ....	338, 367
SANTOS, M. ....	191, 222, 223, 224, 225, 226, 227, 228
SANTOS, S. ....	316
SANZ-ROS, A.V. ....	218
SCHENA, L. ....	124
SCHULZE-LEFERT, P. ....	13
SEBIHI, W. ....	190
SEGARRA, G. ....	47
SEGARRA, J. ....	75
SEGUNDO, E. ....	266, 269, 298, 307, 308
SEGURA, A. ....	61, 302
SEGURA, J.M. ....	191, 225, 226, 228
SERRA, P. ....	58, 281, 320
SERRANO, L. ....	280
SERRANO, Y. ....	144, 145
SERRAR, D. ....	164
SERRA-YOLDI, M.T. ....	42, 311, 318, 319
SIERRA, J.M. ....	188, 219
SIKORA, R.A. ....	14
SILVAR, C. ....	246, 247
SIMÓN, B. ....	273
SIMONETTI, E. ....	381
SIVERIO, F. ....	97, 353
SOARES, C. ....	165
SOLANO, F. ....	359
SOLER-ALEXANDRE, S. ....	85, 301, 324
SOLIVERI, J. ....	248
SOLSONA, C. ....	49
SOMERVILLE, S. ....	13
SORIA, C. ....	298
SORIANO-MARTÍN, M.L. ....	103
SORRIBAS, F.J. ....	54, 81, 375

# ÍNDICE ALFABÉTICO DE AUTORES

STCHIGEL, A.M. ....	81
STEFANSKA, A. ....	69
STEIN, M. ....	13
STEWART, L. ....	40
SUÁREZ, B. ....	293
SUBIRAS, J. ....	280
SUNDIN, G.W. ....	100
SURICO, G. ....	36
SWANSON, M. ....	326
SZTEJNBERG, A. ....	48, 111, 112

## T

TALAVERA, M. ....	54, 378
TEIXIDÓ, N. ....	49
TEJERINA, L. ....	217
TELLIER, A. ....	15
TELLO, J.C. ...	26, 118, 169, 174, 180, 191, 222, 223, 224, 225, 226, 227, 228, 346
TELLO, M.L. ....	90, 235, 257
TENA-ALDAVE, M. ....	382
TENLLADO, F. ....	83
TOMÁS-GARCÍA, D. ....	72, 306
TOMLINSON, J. ....	29
TORÉS, J.A. ....	20, 105, 108, 131
TORNOS, T. ....	283
TORRES, E. ....	64, 200, 201, 349
TORRES, J. ....	54, 371, 372, 373, 374
TORRES, M.P. ....	120
TORRES, R. ....	68
TORRES-VILA, L.M. ....	189
TOURIÑO, A. ....	282
TRAPERO, A. ....	28, 33, 66, 94, 114, 115, 173, 174, 195, 196, 197
TRENADO, H.P. ....	265
TRIGALET, A. ....	360
TRIGALET-DEMERY, D. ....	360
TRILLAS, M.I. ....	47, 116
TROYA, M.T. ....	166
TRUNIGER, V. ....	43
TRUOL, G. ....	295
TUGENTMAN, M. ....	83
TUSET, J.J. ....	38, 231, 237, 254

## U

UHRIG, J.F. ....	326
URRUTIA, M.T. ....	340, 341
USALL, J. ....	49, 68

## V

VACA, E. ....	253
VALDÉS, F. ....	296
VALENCIANO, J.B. ....	139
VALERO, J. ....	54
VALKONEN, J.P. ....	323

VALLEJO, I. ....	244
VALLEJO, R. ....	64, 349
VALVERDE-CORREDOR, A. ....	178
VAN DEN BOSCH, F. ....	75
VARGAS, F. ....	251
VARGAS, M. ....	83
VARGAS-MAINAR, M.E. ....	270
VARGAS-OSUNA, E. ....	173
VASSE, J. ....	360
VÁZQUEZ-RUIZ DE OCENDA, R.A. ....	255, 256
VELASCO, L. ....	266, 273, 278, 297
VELOSO, J. ....	247
VERDEJO-ALONSO, E. ....	151, 189
VERDEJO-LUCAS, S. ....	54, 81, 375
VICENT, A. ....	91, 184, 210, 211, 214
VICENTE, C. ....	366, 367
VIDAL, E. ....	268
VIERA, A. ....	81, 375
VILA-CAMBRA G. ....	319
VILAJELIU M. ....	133
VILARDELL, A. ....	133, 134
VILARDELL, P. ....	133, 134
VILAS, M. ....	198
VILLAMAR-FERNÁNDEZ, L. ....	141, 142
VIÑAS, I. ....	49
VIÑUELA, E. ....	275
VIVES, J.M. ....	64
VIVES, M.C. ....	84, 289

## W

WELLER, D.M. ....	343
WINTER, S. ....	29
WRIGHT, K.M. ....	326
WYAND, R.A. ....	15

## Y

YARDEN, G. ....	83
-----------------	----

## Z

ZABALGOGEAZCOA, I. ....	25, 181, 271
ZAMBOLIM, L. ....	342
ZAMORA, P. ....	188, 219
ZAMRI, A. ....	114
ZANÓN, M. ....	26
ZEABONILLLA, T. ....	233, 298
ZERIOUH, H. ....	108, 334
ZHAO, Y. ....	100
ZORNOZA, C. ....	183
ZUMAQUERO, A. ....	357
ZURERA, C. ....	125



