



O-1

MODELIZACIÓN DE LA PÉRDIDA DE PRODUCCIÓN DE GARBANZO CAUSADA POR EPIDEMIAS DE LA FUSARIOSIS VASCULAR

Navas Cortés, J.A. y Jiménez Díaz, R.M.

Departamento de Protección de Cultivos. Instituto de Agricultura Sostenible. CSIC. Alameda del Obispo s/n, Apdo. 4084, 14080 Córdoba.

El garbanzo es una leguminosa de grano de interés para los ambientes agrícolas mediterráneos de secano, cuyo cultivo extenso en España y la Cuenca Mediterránea es limitado por los bajos rendimientos originados por los ataques de diversas enfermedades. La Fusariosis Vasculosa causada por *Fusarium oxysporum* f.sp. *ciceris* afecta severamente a los cultivos de garbanzo en España y la Cuenca Mediterránea. Investigaciones realizadas en nuestro laboratorio han demostrado que, en el sur de España el adelanto de la fecha de siembra de principio de primavera al comienzo del invierno retrasa el desarrollo de las epidemias de la Fusariosis Vasculosa y reduce el nivel final de enfermedad.

En este trabajo se han analizado 108 epidemias de la Fusariosis Vasculosa del garbanzo desarrolladas en microparcels en ambiente natural, resultantes de experimentos realizados durante tres ciclos de cultivo consecutivos entre 1986 y 1989. En dichos experimentos se investigó la influencia de la fecha de siembra, el cultivar de garbanzo y la raza del patógeno prevalente en el suelo, en el desarrollo de la Fusariosis Vasculosa y la producción del cultivo. La Fusariosis Vasculosa redujo el rendimiento del garbanzo, disminuyendo significativamente la producción total de la semilla y el peso de 100 semillas. Este efecto estuvo determinado por la fecha de siembra, susceptibilidad del cultivar de garbanzo y la virulencia de la raza de *F.oxysporum* f.sp. *ciceris*. Por otra parte, se han diseñado modelos de regresión que relacionan la producción de garbanzo con el desarrollo de las epidemias de la Fusariosis Vasculosa caracterizado por cinco elementos de la curva de incremento del índice de intensidad de enfermedad (IIE) en el tiempo: el tiempo hasta la aparición de síntomas iniciales (*tsi*); el tiempo hasta el punto de inflexión (*tpi*) de la curva de incremento del IIE; el valor final del IIE; el área bajo la curva de incremento del IIE estandarizada (ABCIIIE); y la tasa de incremento del IIE (*rho*) estimada para el modelo de Richards. Independientemente de la combinación experimental de cultivar de garbanzo y raza del patógeno, la producción absoluta o relativa de garbanzo disminuyó en primer lugar con el retraso de la fecha de siembra. Por otra parte, los modelos de regresión indican que la producción relativa se incrementó con el retraso en el *tsi* y *tpi*, y disminuyó con el incremento del IIE final, el ABCIIIE y *rho*. Asimismo, para cada combinación cultivar de garbanzo y raza de *F.oxysporum* f.sp. *ciceris* se han desarrollado modelos de superficie de respuesta en los que la pérdida de producción de garbanzo disminuye linealmente con el retraso en el *tsi* y aumenta asintótica y negativamente con el incremento en *rho*.

Investigaciones subvencionadas por el proyecto AGF97-1479.

O-2

IDENTIFICACIÓN DE GENES DE *Erwinia chrysanthemi* INDUCIDOS “IN PLANTA”: UNA APROXIMACIÓN GENÓMICA A LA INTERACCIÓN PLANTA-BACTERIA

Aguilar, I., Poza-Carrión, C., López-Solanilla, E., LLama-Palacios, A., Guio, A., García-Olmedo, F. y Rodríguez-Palenzuela, P.

Departamento de Biotecnología, E.T.S.Ingenieros Agrónomos, Universidad Politécnica de Madrid. Ciudad Universitaria s/n, 28040 Madrid.

Erwinia chrysanthemi pertenece al grupo de bacterias pectolíticas causantes de podredumbres blandas y responsables de importantes pérdidas económicas. El éxito o fracaso de esta bacteria como agente fitopatógeno depende de su habilidad para adaptarse al huésped y vencer barreras y mecanismos de resistencia. Con el fin de estudiar la interacción planta-bacteria en este contexto se están realizando distintas aproximaciones: (1) Una de las barreras de que dispone la planta al ataque bacteriano son los péptidos antimicrobianos. La identificación en *Erwinia chrysanthemi* de un sistema de resistencia a péptidos antimicrobianos ha permitido analizar su importancia relativa en virulencia así como el papel de los péptidos en mecanismos de defensa frente a esta bacteria. (2) Durante el proceso de infección por *E. chrysanthemi* tiene lugar la producción de un choque oxidativo. Mediante la construcción del mutante *oxyR* se ha podido estudiar el papel que juega el peróxido de hidrógeno en este proceso y su efecto en virulencia. (3) Además de los descritos en (1) y (2) la bacteria dispone de numerosos factores de patogenicidad que permiten su supervivencia en el huésped y el desarrollo de la enfermedad. Con el fin de aislar y caracterizar genes bacterianos inducidos “in planta” se está empleando un método basado en la mutagénesis al azar del genoma de *E. chrysanthemi* con un mini transposón que a su vez contiene un gen delator GUS sin promotor. De 5000 mutantes analizados se han obtenido 30 “inducidos” en discos de endivia. Estos mutantes están siendo analizados mediante secuenciación parcial y análisis de fenotipo. Con esta aproximación se pretenden identificar nuevos componentes que contribuyan a la virulencia de erwinias pectolíticas y estudiar la regulación en planta de los nuevos factores de patogenicidad.

O-3

PREDICCIONES SOBRE LA EVOLUCIÓN DE LA VIRULENCIA EN POBLACIONES NATURALES DE UN VIRUS DE PLANTAS.

Escriu, F., Fraile, A. y García-Arenal, F.

Dpto. de Biotecnología, E.T.S. de Ingenieros Agrónomos, 28040 Madrid.

La virulencia es una de las características más importantes de los patógenos y su capacidad de evolución tiene importantes consecuencias prácticas en cuanto a la prevención de las enfermedades y al diseño de estrategias eficaces para su control. Entre 1986 y 1992 se produjo la aparición, expansión y posterior desaparición de un síndrome de necrosis sistémica en los cultivos de tomate de la costa mediterránea española causado por el *Virus del mosaico del pepino* (CMV) y su RNA satélite (RNAsat). La desaparición del síndrome de necrosis se debió a la evolución de la población de CMV y su RNAsat hacia una menor virulencia. La evolución de la virulencia en condiciones naturales se ha analizado sólo en algunos patógenos de animales y, que nosotros sepamos, no existen trabajos similares realizados con virus de plantas.

Mediante el análisis de los factores de la eficacia biológica de CMV y su RNAsat se ha encontrado una relación experimental entre su virulencia y su transmisión, que se ha utilizado para aplicar modelos de coevolución huésped-patógeno. Las predicciones de estos modelos indican que la evolución de la virulencia de CMV y su RNAsat depende del número de pulgones presentes en una planta (i) y de la posibilidad de que existan acontecimientos de sobreinfección de aislados de CMV por aislados de CMV con RNAsat. Así, los valores pequeños de i explican la evolución de CMV y su RNAsat hacia una menor virulencia, y los valores mayores de i o las posibilidades de sobreinfección explican la expansión epidémica de los RNAsat sobre la población de CMV. La variación con el tiempo del tamaño de las poblaciones de pulgones en la región afectada por la epidemia de necrosis de tomate, que podría afectar tanto al número de pulgones por planta como la posibilidad de sobreinfección, apoya las predicciones de los modelos y explica la evolución de la virulencia de CMV y su RNAsat en el campo.

La aplicación de los modelos de coevolución huésped-patógeno al caso de CMV y su RNAsat ha permitido tener en cuenta factores de difícil análisis experimental relacionados con la interacción entre un patógeno, su huésped y sus vectores. Este tipo de factores ecológicos pueden tener un papel fundamental en la evolución de la población de un patógeno en la naturaleza.

O-4

PRODUCCIÓN Y FORMULACIÓN DE *Penicillium oxalicum* Y SU APLICACIÓN AL CONTROL DE *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*

Larena, I., De Cal, A. y Melgarejo, P.

Departamento de Protección Vegetal. SGIT-INIA. Carretera de La Coruña km7. 28040. Madrid.

Penicillium oxalicum es un agente de biocontrol que induce resistencia en plantas de tomate infectadas con *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*, reduciendo hasta en un 80% la gravedad de la enfermedad provocada por este hongo patógeno. *P. oxalicum* evita la pérdida del cambium provocada por *Fusarium*, favoreciendo un mayor desarrollo de vasos del xilema en las plantas inducidas, y reduciendo además la colonización de los mismos por el patógeno.

Se ha iniciado el proceso de desarrollo del agente de biocontrol, con el fin de poder aplicarlo en condiciones reales. Para ello se ha comenzado por la optimización del proceso de producción de conidias de *P. oxalicum* ya que, en estudios previos, se demostró que eran éstas y no el micelio las que reducían la enfermedad en plantas de tomate. La producción de conidias se ha realizado en cultivo líquido y sólido. Los ensayos de fermentación sólida se han realizado en bolsas de plástico microporosas para la industria (VALMIC[®]) en las que se introducía turba:vermiculita como soporte, y al que se añadían diferentes nutrientes. Las bolsas se incubaban en la estufa durante 30 días a 20-25°C. Se ensayaron diferentes tipos y cantidades de nutrientes, así como porcentajes de humedad. La producción de conidias en cultivo sumergido se hizo en matraces de 250 ml con 50 ml de medio Morton. Los matraces se incubaban en un agitador orbital a 150 rpm durante 30 días. Para ambos tipos de producción, se estima la cantidad de conidias producidas a los 5, 10, 20, y 30 días de incubación. Se estudió la viabilidad de las conidias en cada combinación mediante bioensayo.

La cantidad de conidias de *P. oxalicum* obtenida mediante fermentación sólida es 1000 veces mayor que en cultivo sumergido. La incorporación de cereales o leguminosas al soporte sólido de turba y vermiculita multiplica por 100 la producción de conidias de *P. oxalicum*. En estas bolsas se obtienen 10⁸ conidias de *P. oxalicum*/g de sustrato seco a los 5 días de incubación, manteniéndose esta cantidad a lo largo del ensayo. El tipo de nutrientes, la mezcla de éstos o el tamaño de partícula de los mismos, no afecta a la concentración final. El contenido inicial de humedad en las bolsas era del 40%, porcentajes mayores no mejoran la producción de conidias de *P. oxalicum*. En este proceso de fermentación sólida se obtiene una elevada masa microbiana con una viabilidad superior al 80%.

Se ha ensayado la eficacia de estas conidias sobre plantas de tomate en cultivo hidropónico, infectadas con *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici*.

O-5

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE UN AISLADO ESPAÑOL DEL VIRUS DEL MOTEADO DEL CLAVEL (CarMV) Y ANÁLISIS DE LA VARIABILIDAD DE LAS PROTEÍNAS DE CUBIERTA Y MOVIMIENTO EN AISLADOS DE ORÍGENES GEOGRÁFICOS MUY DISTINTOS

Cañizares¹, M.C., Marcos², J.F. y Pallás^{1,3}, V.

(1) Depto. de Mejora y Patología Vegetal, CEBAS-CSIC, Campus Universitario de Espinardo. A. Correos 4195, 30071 Murcia. (2) Depto. De Ciencia de los Alimentos, IATA-CSIC. Apdo. de Correos 73, 46100 Valencia. (3) Nueva dirección: Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas, UPV-CSIC, Av. De los Naranjos s/n, 46022 Valencia.

El virus del moteado del clavel (CarMV) es, desde el punto de vista sanitario, el virus más importante de entre los que afectan a la producción de esquejes de esta planta, debido fundamentalmente a que es el virus más difícil de eliminar mediante cultivo de ápices caulinares. El CarMV es el miembro tipo del género de los *Carmovirus*, dentro de la familia *Tombusviridae*, cuyo genoma consiste en un RNA monopartito de cadena simple de aproximadamente 4 kb de longitud que codificaría para al menos 5 proteínas. La ORF del extremo 5' codifica para una proteína de 27 kDa (p27). Esta p27 acaba en un codón ámbar, cuya lectura a través daría lugar a una proteína de 86 kDa (p86), que contiene el motivo GDD característico de las RNA polimerasas dependientes de RNA. Estas 2 proteínas son necesarias para la replicación viral. La secuencia que codifica para la proteína de cubierta de 38 kDa es la ORF situada más cerca del extremo 3'. En la región central del genoma están localizadas 2 pequeñas ORFs (de 7 y 9 kDa), que codificarían para los polipéptidos p7 y p9, implicados en el movimiento del virus por la planta.

En el presente trabajo presentamos la secuencia nucleotídica completa de un nuevo aislado de origen español del CarMV. Este aislado posee porcentajes de identidad con los genomas de los otros 2 aislados caracterizados del mismo virus superiores al 94%, y porcentajes de identidad en secuencia de aminoácidos entre los 3 aislados superiores al 97%, considerando cualquiera de las 5 posibles ORFs. Estudios filogenéticos llevados a cabo con todos los virus de la familia *Tombusviridae* y virus relacionados, ponen de manifiesto que en los casos de las proteínas p86 y proteína de cubierta el agrupamiento se ajusta bastante bien a la clasificación en géneros dada hasta el momento para esta familia, mientras que las filogenias obtenidas con la proteína p7 no se correlacionan con dicha clasificación. Análisis comparado entre los distintos miembros del género *Carmovirus* ha puesto de manifiesto la existencia de elementos de estructura secundaria muy conservados entre ellos tanto en las regiones 5' y 3' no traducibles como en los promotores subgenómicos, lo que sugiere un papel relevante para estas estructuras en el ciclo vital del virus. Por otra parte, se está llevando a cabo un estudio de la variabilidad molecular de las proteínas de cubierta y de movimiento entre aislados del virus de orígenes geográficos muy distintos, un tipo de estudio que no se ha abordado en los *Carmovirus*.

Trabajo financiado por la DIGICYT, proyecto BIO99-0854.

O-6

ANÁLISIS POR MUTAGÉNESIS DIRIGIDA DEL DETERMINANTE DE PATOGENICIDAD DEL VIROIDE DEL MOTEADO CLORÓTICO DEL CRISANTEMO

De la Peña, M. y Flores, R.

Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas (UPV-CSIC). Universidad Politécnica. Avenida de los Naranjos s/n. 46022 Valencia.

El agente causal del moteado clorótico del crisantemo es un RNA viroidal de unos 400 nucleótidos (chrysanthemum chlorotic mottle viroid, CChMVd) con ribozimas de cabeza de martillo en sus cadenas de ambas polaridades (Navarro y Flores, *PNAS USA* 94, 11262-11267, 1997). Recientemente hemos demostrado que su determinante de patogenicidad reside en un tetrabucle de secuencia $5'UUUC^{3'}$ y $5'GAAA^{3'}$ en las cepas sintomática y asintomática respectivamente, pues la substitución por mutagénesis dirigida del primer tetrabucle por el segundo conduce al cambio de fenotipo permaneciendo estable el tetrabucle en la progenie (De la Peña *et al.*, *PNAS USA* 96, 9960-9965, 1999). El tetrabucle GAAA pertenece a la familia GNRA, cuyos miembros son muy estables y abundantes en RNAs naturales.

Con el fin de diseccionar con más detalle este determinante se estudió el efecto de tetrabucles del tipo UNCG, que poseen una estructura interna similar a los GNRA y son funcionalmente intercambiables con éstos en algunos RNAs (Selinger *et al.*, *PNAS USA* 90, 5409-5413, 1993). CChMVd RNAs con tetrabucles del tipo UNCG fueron infecciosos, pero la progenie presentó una alta heterogeneidad en el tetrabucle apareciendo la secuencia UUUC característica de la cepa sintomática. Además, aunque las plantas fueron inicialmente asintomáticas, al cabo de dos o más meses mostraron los síntomas de la enfermedad. Asimismo, infecciones con un CChMVd RNA con un tetrabucle de secuencia "híbrida" (UUAA) presentaron un considerable retraso en la aparición de los síntomas, observándose en la progenie una reversión a la secuencia UUUC. Estos datos indican que: i) tetrabucles UNCG no suplen al GAAA, y ii) las mutaciones ensayadas en la secuencia UUUC anulan temporalmente el fenotipo sintomático pero las poblaciones resultantes son inestables y con el tiempo se impone la secuencia UUUC y su fenotipo sintomático asociado. Así pues los CChMVd RNAs sintomáticos parecen ser biológicamente más eficaces tener que los asintomáticos. Para confirmar este punto se coinocularon transcritos infecciosos representativos de ambas cepas en distintas proporciones, encontrándose que sólo inoculaciones con mil veces más del RNA asintomático que del sintomático indujeron infecciones asintomáticas. Cuando las proporciones fueron de 100:1, 10:1 o 1:1, las plantas fueron sintomáticas en distinto grado, pudiéndose correlacionar este grado con la proporción de ambos RNAs en la progenie. Las implicaciones de estos resultados en el fenómeno de protección cruzada descrito para el CChMVd serán discutidos.

O-7

VARIABILIDAD GENÉTICA DE CEPAS ESPAÑOLAS DE *Erwinia amylovora* y *Brenneria quercina* MEDIANTE ELECTROFORESIS EN CAMPO PULSANTE (PFGE)

Biosca, E. G., Donat, V., González, R., Peñalver, J. y López, M.M.

Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA), Apartado Oficial, 46113, Moncada, Valencia.

Erwinia amylovora, el agente causal del fuego bacteriano, es una bacteria de cuarentena en Europa que afecta a diversas especies de rosáceas de gran importancia económica y a plantas ornamentales. *E. amylovora* está presente en la mayoría de países del centro y norte de Europa, y en los últimos años se ha extendido por países del mediterráneo. En España, se han detectado distintos focos que han sido erradicados en la mayoría de Comunidades Autónomas (CCAA).

Brenneria quercina, el agente etiológico del chancro bacteriano de las quercíneas, se describió por primera vez en California en 1965. El decaimiento y muerte de bosques de quercíneas se ha descrito en varias zonas de Europa y Norte de Africa, pero el aislamiento de *B. quercina* sólo se ha publicado en España. Esta bacteria se ha aislado de tronco, chancros, yemas y exudados de bellotas de distintas especies del género *Quercus* en ocho CCAA.

Se han analizado los fragmentos de restricción de ADN genómico de *E. amylovora* y *B. quercina* digerido con *Xba* I y *Spe* I mediante electroforesis en campo pulsante (PFGE). Se han examinado treinta y cuatro cepas españolas de *E. amylovora* procedentes de Alava, Guipúzcoa, Navarra, Segovia, Guadalajara, Huesca y Girona y cincuenta y tres cepas españolas de *B. quercina* de *Q. ilex*, *Q. pyrenaica* y *Q. suber* procedentes de Andalucía, Aragón, Baleares, C. La Mancha, C. León, C. Madrid, C. Valenciana y Extremadura, comparándolos con sus respectivas cepas de referencia. La tipificación molecular de *E. amylovora* mediante PFGE ha revelado una elevada homogeneidad genética entre las cepas españolas, observándose sólo dos patrones de restricción: Pt3 y Pt4. La mayoría de cepas presentaron el patrón Pt4, previamente detectado en cepas de Francia e Inglaterra, mientras que sólo las cepas procedentes de viveros de Guadalajara y Segovia presentaron el patrón Pt3, descrito en cepas de otros países europeos. El análisis de los RFLPs de DNA genómico de cincuenta y tres cepas de *B. quercina* ha revelado una elevada variabilidad genética entre los aislados españoles y entre éstos y las cepas californianas. Entre los aislados españoles no se ha podido asociar un patrón determinado ni con el origen ni con el tipo de muestra. Estos resultados muestran la utilidad de la PFGE para mostrar diferencias entre cepas de distintos orígenes, no observables mediante otras técnicas.

O-8

EFFECTOS DE DISTINTOS TRATAMIENTOS DE SUELO EN EL CONTROL DE *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* Y EN LAS EPIDEMIAS DE FUSARIOSIS VASCULAR DEL CLAVEL

López, C.J.¹, Basallote, M.J.², López, M.³, Navas, J.A.³, Zea, T.⁴, Vela, D.³ y Melero, J.M.¹

¹ Instituto de Agricultura Sostenible, C.S.I.C. Apdo. 4084, 14080 Córdoba.

² CIFA - Las Torres y Tomejil Apdo. 41200 Alcalá de Río (Sevilla)

³ CIFA - Camino de Esparragosa, s/n 11550 Chipiona (Cádiz)

⁴ CIFA - Cortijo la Cruz, s/n 29140 Churriana (Málaga)

En un invernadero de clavel de Chipiona (Cádiz), gravemente afectado por la Fusariosis vascular (FVC), se arrancaron las plantas y se preparó el suelo para realizar tratamientos erradicativos del patógeno *F. oxysporum* f. sp. *dianthi* (FOD) antes de iniciar un nuevo ciclo de cultivo con la variedad Erika de clavel, muy susceptible a aquel. Las cuantificaciones de FOD antes de realizar los tratamientos promediaron 230, 6.3 y 9.5 ufc/g de suelo en las capas de 0-15, 15-30 y 30-45 cm de profundidad, respectivamente. Todos los tratamientos de suelo ensayados resultaron en una reducción de la densidad de inóculo (DI) a niveles indetectables en el momento de la plantación (Julio, 1998), mientras que la DI en parcelas no tratadas promedió valores de 382 y 146 ufc/g en las dos capas más superficiales del suelo.

El comienzo de la epidemia de FVC ocurrió a finales del verano de 1998, llegando a incidencias de plantas muertas de 35% en las parcelas testigo a los 70 días después de la plantación. Las parcelas tratadas con vapor de agua alcanzaron el 30% de plantas muertas a finales de marzo de 1999, mientras que los distintos tratamientos químicos estuvieron por debajo del 17% de incidencia de FVC. El progreso epidémico se aceleró en primavera - verano de 1999, llegando a sobrepasarse el 25 y 35% de incidencia en las parcelas tratadas con bromuro de metilo (BM) (100 g/m²) y metham-Na + aldicarb (MA) (80ml/m² + 10g), respectivamente, a primeros de 2000. La incidencia de FVC en parcelas tratadas con DD + cloropicrina (Telone C35 a 40 ml/m²) o con BM (20 g/m²) bajo cubierta del suelo con plástico VIF, fue intermedia entre las de los dos tratamientos anteriores y la de vapor de agua alcanzó el 85% a comienzos de 2000, cuando el testigo sin tratar tenía el 100% de las plantas muertas por la FVC.

Los valores del área bajo la curva de progreso epidémico estandarizada fueron significativamente (P=0.05) superiores en el testigo, mientras que fueron menores los correspondientes a los tratamientos de BM 100g/m² y MA. La producción de flor acumulada durante todo el cultivo (19 meses) fue más alta en estos dos tratamientos, y se relacionaron con las tasas de progreso epidémico y las incidencias finales de FVC.

El uso de plástico VIF en combinación con la reducción de dosis de BM al 20% de la habitual, no constituyó una alternativa válida al tratamiento estándar con BM. Sin embargo, la combinación de metham-Na con aldicarb proporcionó niveles de control de la FVC y de rendimiento de clavel similares a los obtenidos con BM, sugiriendo el tratamiento MA como alternativa al BM en el patosistema estudiado.

O-9

DURABILIDAD DE LA RESISTENCIA A *Tylenchulus semipenetrans* EN HÍBRIDOS DE MANDARINO CLEOPATRA X *Poncirus trifoliata* SOMETIDOS A PRESIÓN INICIAL DE INÓCULO CRECIENTE

Verdejo Lucas, S.¹, Sorribas, F.J.², Ornat C.², Galeano, M.¹, Forner, J.B.³, Alcaide, A.³ y Pastor, J.⁴.

¹ IRTA. Crta. de Cabrils s/n. 08348 Cabrils. Barcelona. ² ESAB. Comte d'Urgell 187. 08036 Barcelona. ³ IVIA. Apartado oficial. 46113 Moncada. Valencia. EEE-IRTA. Apartado de correos 203. 43870 Amposta. Tarragona.

El nematodo fitoparásito más frecuente y abundante en las áreas citrícolas españolas es *Tylenchulus semipenetrans*. Los patrones de cítricos resistentes al nematodo ofrecen una alternativa de control económica, segura y no agresiva con el medio ambiente. Recientemente, se ha identificado resistencia a *T. semipenetrans* en nuevos patrones híbridos de cítricos procedentes del Programa de Mejora Genética de Agrios del IVIA. En este trabajo se determina la durabilidad de la resistencia mostrada por dos selecciones del cruzamiento Mandarino Cleopatra x *Poncirus trifoliata* 03.01.5 y 03.01.42 bajo presión inicial de inóculo creciente del nematodo. El patrón Citrange Carrizo se incluyó en los ensayos como control susceptible a *T. semipenetrans*. El ensayo se llevó a cabo en microparcelas localizadas en la provincia de Tarragona y Valencia. Árboles de un año de edad se inocularon con 0, 1, 5, y 10 x 10⁴ huevos por planta y se determinó el número de nematodos por 250 cm³ de suelo y el de huevos y hembras por gramo de raíz 18 meses después de la inoculación. Los parámetros de crecimiento del árbol que se determinaron fueron el diámetro del tronco a los 0, 12, y 18 meses, y el peso fresco de la parte aérea y sistema radical a los 18 meses.

La expresión de la resistencia a *T. semipenetrans* no se vio afectada por la presión inicial de inóculo creciente en las condiciones experimentales ensayadas. El patrón experimental 03.01.42 se comportó como altamente resistente y el 03.01.5 como resistente para todos los niveles de inóculo ensayados y en ambas localidades, lo cual confirma la resistencia mostrada por estos patrones en condiciones de invernadero. El nematodo se reprodujo en el patrón susceptible Citrange Carrizo en todas las condiciones experimentales ensayadas. Sin embargo, la localización del ensayo (ubicación geográfica) afectó significativamente al desarrollo del árbol y del nematodo. Así, el incremento de población de *T. semipenetrans* fue superior y el desarrollo de los árboles menor en las microparcelas ubicadas en Tarragona que en aquellas en Valencia. Los resultados de este estudio ponen de manifiesto la importancia de las condiciones medioambientales y del manejo del cultivo en la interacción nematodo - planta.

O-10

HIPÓTESIS SOBRE LA HERENCIA Y EL MECANISMO DE RESISTENCIA AL VIRUS DE LA SHARKA EN ALBARICOQUERO

Moustafa, T.A., Badenes, M.L., Martínez-Calvo, J. y Llácer, G.

Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA), Apartado Oficial, 46113 Moncada (Valencia).

Durante el transcurso de nuestro programa de mejora genética del albaricoquero, cuyo objetivo principal es la obtención de variedades resistentes al virus de la sharka (PPV) y bien adaptadas a las condiciones de cultivo de la Comunidad Valenciana, se ha estudiado el comportamiento de 167 híbridos procedentes de cruzamientos, realizados entre 1993 y 1996, de variedades norteamericanas resistentes (Goldrich, Harcot y Stark Early Orange) con variedades autóctonas valencianas (Currot, Ginesta, Palau y Mitger). La proporción de híbridos resistentes/híbridos susceptibles (41/126) se ajusta con una alta significación a una segregación 1:3, lo que permite establecer la hipótesis de dos genes independientes y dominantes para explicar este tipo de herencia, de modo que sólo los híbridos heterocigotos para ambos genes serían resistentes. Estos resultados confirman los obtenidos por Dosba et al. (1991).

Varios ensayos y observaciones realizadas durante el estudio de los híbridos han puesto de manifiesto que la dominancia de los dos genes antes citados es probablemente una dominancia incompleta ("gene dosage dependence"), ligada a una interacción cuantitativa entre un inhibidor constitutivo de la planta y una función viral, y no con una inducción de la resistencia del tipo "todo o nada", ya que esta hipótesis es la que mejor explica la existencia de variedades e híbridos con distinto grado de resistencia a PPV en albaricoquero.

La variedad Goldrich, aunque no es la que presenta el mayor grado de resistencia a PPV de las estudiadas internacionalmente, conserva su valor como genitor resistente a sharka en los programas de mejora genética de albaricoquero en los países mediterráneos, donde los inviernos suaves no permiten la utilización de variedades con altas necesidades de frío invernal.

O-11

ENSAYOS COMERCIALES PARA EL CONTROL DE *Penicillium expansum* EN MANZANAS CON EL ANTAGONISTA *Candida sake*

Usall, J.¹, Teixidó, N.¹, Torres, R.¹, Ochoa de Eribe, X.² y Viñas, I.¹

¹ Unitat de Postcollita. CeRTA. Centro UdL-IRTA. Avenida Rovira Roure, 177, 25198-Lleida.

² SIPCAM INAGRA SA. Prof. Báuena, 5, 46009-Valencia.

El desarrollo de resistencias a los fungicidas por parte de muchos patógenos y el creciente interés social sobre los peligros medioambientales y de salud asociados a los pesticidas, ha generado la búsqueda de sistemas alternativos a los productos químicos de síntesis. La utilización de levaduras y bacterias como agentes de biocontrol es la alternativa más estudiada en la postcosecha de fruta de pepita. En el laboratorio de postcosecha del centro UdL-IRTA llevamos más de 10 años desarrollando una cepa de levadura para su aplicación comercial. El objetivo de este estudio es demostrar la aplicabilidad práctica de la cepa de levadura *Candida sake* (CPA-1) en el control de las podredumbres de postcosecha en manzanas.

Durante tres campañas se realizaron ensayos con *C. sake* en condiciones comerciales, en centrales frutícolas de la zona de Lleida y utilizando las técnicas usuales en éstas. El agente de biocontrol fue aplicado mediante drencher y se comparó su efectividad con los fungicidas de postcosecha más utilizados actualmente; imazalil (375 ppm) y la mezcla tiabendazol(425 ppm) + folpet (1000 ppm). Estos ensayos se guardaron en las cámaras frigoríficas de las centrales a 1°C y 3% O₂-3% CO₂ y se evaluó el porcentaje de podredumbre a la salida de cámara. También se llevaron a cabo estudios de población del antagonista sobre manzanas a temperatura de almacenaje (1°C).

El tratamiento de *C. sake* a una concentración de 10⁷ ufc/ml consiguió el mismo nivel de efectividad que el fungicida imazalil y estadísticamente superior al de la mezcla tiabendazol+folpet.

La población del agente de biocontrol creció en la superficie de manzanas con daños artificiales después de 60 días en condiciones de conservación, hecho que no se produjo en manzanas sin daños.

En conclusión, en este estudio se ha visto que la concentración necesaria de *C. sake* para obtener el control de los principales patógenos de postcosecha en manzana es suficientemente baja para ser utilizada en condiciones comerciales. La efectividad conseguida con el citado agente de biocontrol es satisfactoria y totalmente comparable a la obtenida con los fungicidas actualmente utilizados. Además el microorganismo se ha mostrado totalmente compatible con las prácticas y técnicas utilizadas de forma común en las centrales hortofrutícolas. Todo ello demuestra la aplicabilidad real de *C. sake* como agente de biocontrol con el fin de sustituir los productos químicos de síntesis, haciendo así realidad la posibilidad de comer fruta sana y sin residuos.

O-12

ACTIVIDAD DE ANTIMICROBIANOS QUÍMICOS EN EL CONTROL PREVENTIVO DEL FUEGO BACTERIANO EN PERAL

Moragrega, C., Ruz, L., Montesinos, E.

Institut de Tecnologia Agroalimentària-CeRTA, Universitat de Girona. Avgda. Lluís Santaló s/n, 17071, Girona. Fax: 972-418399. E-mail: intea@intea.udg.es

El fuego bacteriano, causado por *Erwinia amylovora* es la enfermedad bacteriana más grave que afecta a los frutales de pepita y la que tiene mayor incidencia negativa en la producción de manzana y pera en determinadas zonas frutícolas. Es una enfermedad altamente contagiosa, de difícil control una vez introducida en una zona, y que ocasiona la muerte progresiva de los árboles de variedades sensibles. Hasta el momento, los métodos de control han sido ineficaces para evitar la introducción de la enfermedad y erradicarla en los países en que es epidémica. Los productos utilizados en control químico son en general poco eficaces ya que solo se dispone de derivados cúpricos y en algunos países antibióticos, flumequina o fosetil-Al.

El objetivo del trabajo que se presenta ha sido evaluar, en condiciones de ambiente controlado, la eficacia en el control de la enfermedad de productos químicos como fosfonatos (fosetil-Al, etefón) y de estimuladores de mecanismos de defensa en la planta (benzotiadiazol) en comparación con la de derivados cúpricos y antibióticos, utilizando plantas de peral de la variedad Conference.

Para cada uno de los productos ensayados (fosetil-Al, etefón y benzotiadiazol) se determinó la cadencia, momento y número de aplicaciones que permitiese una mayor reducción de los niveles de enfermedad. Adicionalmente, para el benzotiadiazol se determinó el efecto de la dosis de producto en el control de la enfermedad.

Todos los productos ensayados aplicados a la dosis y cadencia estándar redujeron significativamente los niveles de enfermedad con respecto a las plantas no tratadas. El etefón y el benzotiadiazol redujeron la severidad de la enfermedad a los mismos niveles que la estreptomycinina o el sulfato de cobre, mientras que con el fosetil-Al se obtuvieron niveles de severidad superiores. Para el fosetil-Al y el etefón se observó una mayor reducción de la severidad de la enfermedad al aumentar el número de días entre el tratamiento con los productos y la inoculación de las plantas con el patógeno.

Por otro lado, la aplicación de benzotiadiazol mostró un efecto significativo en la reducción de la severidad de la enfermedad. El grado de reducción dependía de la dosis de producto aplicada. Se determinó la dosis óptima de producto entre 100 y 200 mg i.a./l obteniendo una reducción de la enfermedad del 60% respecto al control no tratado. En cuanto a la cadencia, las aplicaciones más efectivas en la reducción de la enfermedad fueron las realizadas entre 6 y 7 días antes de la inoculación del patógeno.

Los resultados obtenidos con los nuevos productos ensayados para el control de *E. amylovora* en peral, especialmente el benzotiadiazol, abren nuevas perspectivas para el control químico de la enfermedad.

O-13

AISLAMIENTO, CARACTERIZACIÓN Y SELECCIÓN DE BACTERIAS BENEFICIOSAS EN PRODUCCIÓN Y POSTCOSECHA DE FRUTA

Bonaterra, A., Badosa, E., Cabrefiga, J., Ruz, L. y Montesinos, E.

Instituto de Tecnología Agroalimentaria, Universidad de Girona. Avda. Lluís Santaló s/n, 17071, Girona. Fax: 972-418399. E-mail: intea@intea.udg.es

Las principales pérdidas en producción y postcosecha de fruta y principalmente en manzana y pera son causadas por enfermedades fúngicas y bacterianas, entre las que cabe destacar el fuego bacteriano (*Erwinia amylovora*), la necrosis de yemas de flor (*Pseudomonas syringae*), el moteado del manzano y peral (*Venturia spp.*) y la mancha marrón del peral (*Stemphylium vesicarium*) en producción; y la podredumbre azul (*Penicillium expansum*) en postcosecha. Además, se producen importantes pérdidas en la producción de portainjertos y plántulas, en vivero a lo largo de todo el proceso de producción y trasplante. Tradicionalmente, el control de las enfermedades en producción y postcosecha de fruta se realiza mediante el uso de tratamientos químicos (bactericidas y fungicidas); y en el caso de producción de plántulas con el uso de fitohormonas o reguladores químicos del crecimiento. Actualmente, debido a las fuertes restricciones en el uso de ciertos productos químicos, se están desarrollando métodos alternativos como el uso de bacterias beneficiosas para las plantas (BBPs) entre los que se encuentran los agentes de biocontrol (BCAs) y las rizobacterias promotoras del crecimiento (PGPRs).

Los BBPs se encuentran de forma natural en las plantas, pero se aíslan con baja frecuencia. A fin de obtener aislados que fueran representativos de una gran diversidad de ambientes, se realizó una prospección de microorganismos de distintos órganos, especies de plantas, origen geográfico, año y condiciones climatológicas. Se constituyó una colección de 1.000 aislados, realizándose pruebas bioquímicas y microbiológicas para la determinación de la especie, así como las pruebas de hipersensibilidad en tabaco (HR) y de actividad nucleadora de hielo (INA), para descartar los aislados fitopatógenos o nucleadores de hielo. Las especies mayoritarias de la colección pertenecen a *Pseudomonas fluorescens* y *Erwinia herbicola*. Estas se caracterizaron fenotípicamente mediante los sistemas API y Biolog, y la producción de metabolitos (ácido indolacético, cianhídrico, sideróforos, quitinasas y/o compuestos antimicrobianos como el floroglucinol, ácido fenil carboxílico y pirrolnitrina). Se determinó también el espectro de antagonismo "in vitro" frente a *E. amylovora*, *S. vesicarium*, *P. syringae* y *P. expansum* en distintos medios de cultivo; así como la eficacia de biocontrol de la infección por *E. amylovora* en frutos inmaduros, por *P. expansum* en frutos maduros y por *S. vesicarium* en hoja. También se ha realizado la determinación de su actividad como PGPRs en invernadero sobre distintos portainjertos (el híbrido de melocotonero x almendro GF677 y el ciruelo MARIANNA2624). Paralelamente, se está realizando una caracterización genotípica de las cepas de *P. fluorescens* y *E. herbicola*, mediante el análisis de los polimorfismos en la longitud de macrofragmentos de restricción genómica (MRFLPs) separados por electroforesis de campo pulsante (PFGE) y el análisis de restricción de amplificadores del 16S rDNA junto con el espacio transcrito interno (ARDRA).

Segarra, J.^{1,2}, Jeger, M.J.² y Van den Bosch, F.³

¹ Dpto de Producción Vegetal y Ciencia Forestal. Universitat de Lleida. Av. Alcalde Rovira Roure, 177. 25198. Lleida. ² Horticulture section. Wye College. University of London. TN25 5AH. Wye, Ashford. Kent. ³ Department of Statistics. IACR Rothamsted. AL5 2YQ. Harpenden, Hertfordshire.

Uno de los objetivos de los modelos epidemiológicos es la comprensión del progreso de la enfermedad. En este sentido son especialmente útiles los modelos relacionados con ecología de poblaciones. Generalmente, para la modelización de enfermedades se utilizan modelos de compartimentos. La población se divide en una serie de compartimentos y los individuos pasan de uno a otro según los supuestos del modelo. Los compartimentos utilizados más frecuentemente son: susceptibles (H), latentes (L), infecciosos (S) y post-infecciosos (R).

El primer modelo introducido en epidemiología vegetal fue de hecho el modelo de Vanderplank (1) que incluía los períodos latente e infeccioso. En este modelo, todos los individuos infectados permanecen un intervalo constante de tiempo como latentes y como infecciosos. Sin embargo, en dinámica de poblaciones se asume generalmente que la duración de ambos períodos está distribuida exponencialmente (2). En el presente trabajo se comparan ambos modelos entre sí y se relacionan con la ecuación logística (3).

Ambos modelos (1) y (2) coinciden en la tasa reproductiva básica R_0 , en el umbral epidémico y en la severidad final (y_∞) y difieren en la tasa de infección inicial (r). Cuando la duración epidémica no interrumpe el progreso de la enfermedad la severidad final (y_∞) está directamente relacionada con el valor de R_0 . Sin embargo, cuando se interrumpe la trayectoria de la enfermedad, la severidad final depende del valor de r . La tasa de infección inicial r del modelo de Vanderplank (1) es mayor que la del modelo (2) para velocidades de desarrollo epidémico bajas, mientras que es menor para velocidades superiores. La forma de la curva epidémica es sigmoideal y asimétrica en ambos modelos. La tasa máxima de incremento de la enfermedad se produce alrededor del 50-60% de la severidad final.

Una buena aproximación a las curvas epidémicas (1) y (2) se obtiene con la ecuación logística (3) cuando se sustituyen los parámetros de ésta por los valores epidémicos y_0 , r y y_∞ obtenidos en (1) y (2).

O-15

SUPERVIVENCIA DE *Botrytis cinerea* EN LOS INVERNADEROS DE ALMERÍA Y SU VALOR ADAPTATIVO ASOCIADO A LA RESISTENCIA A DICARBOXIMIDAS

Raposo, R.¹, Gómez, V.² y Melgarejo, P.¹

¹ Dept. de Protección Vegetal. Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria. Carretera de la Coruña km. 7. Madrid 28040. ² Laboratorio de Sanidad Vegetal, La Mojonera, 04004 Almería.

Se ha estudiado la importancia relativa de los esclerocios y del micelio de *Botrytis cinerea* como estructuras de supervivencia en los invernaderos de Almería y su asociación con la resistencia a Dicarboximidias.

La supervivencia de esclerocios obtenidos en PDA y de micelio en tallos de tomate infectados artificialmente se ha cuantificado como el porcentaje de los que se recuperan cuando se colocan en el exterior e interior de los invernaderos desde Junio a Octubre. Los resultados indican que el micelio situado en el exterior del invernadero sobrevivió después de 110 días un 33% y un 5% en 1995 y 1997, respectivamente, mientras que en el interior del invernadero no hubo supervivencia en 1995 y en 1997 fue de un 7%. La supervivencia del micelio en el exterior y en el interior del invernadero fue significativamente diferente en 1995, pero no en 1997. Sin embargo, la supervivencia de los esclerocios fue siempre significativamente mayor en el exterior del invernadero. Después de 110 días, sobrevivieron en el exterior un 91% y un 39% en 1995 y 1997, mientras que en el interior fue del 1% y del 15%, respectivamente.

El porcentaje de supervivencia de los esclerocios y del micelio, medido a los 47, 83 y 110 días se ha correlacionado con la resistencia a iprodiona (fungicida del grupo de las dicarboximidias) según los coeficientes de correlación de rangos de Spearman y estándar de Pearson. Los resultados indican que los esclerocios de los aislados resistentes a iprodiona sobrevivieron menos que los sensibles en varias de las fechas en que se cuantificó.

Sin embargo, cuando se ha investigado la importancia relativa de los esclerocios y del micelio como estructuras de supervivencia de *B. cinerea* en las condiciones estivales de Almería, los resultados indican que los esclerocios tienen un papel secundario en el desarrollo de las epidemias, ya que no se han encontrado ni en restos vegetales ni en material vegetal vivo.

O-17

INFLUENCIA DEL RIEGO DEL OLIVO EN LA DENSIDAD DE INÓCULO DE *Verticillium dahliae* EN EL SUELO

López-Escudero, F.J. y Blanco-López, M.A.

Dpto. de Agronomía. ETSIAM. Universidad de Córdoba. Apdo. 3048. 14080. Córdoba.

Aunque no existen referencias específicas en la literatura, el desarrollo de la Verticilosis del Olivo (VO), causada por *V. dahliae*, parece estar favorecida por el riego. De tal modo que en plantaciones jóvenes regadas especialmente por goteo, o en plantaciones reconvertidas de secano a regadío hemos apreciado un incremento de la enfermedad. Aunque los factores implicados no son bien conocidos, podrían estar relacionados con modificaciones en la susceptibilidad de la planta o el aumento de las infecciones favorecidas en la zona húmeda del riego por: 1) aumento de la densidad de raíces absorbentes junto a los goteros; 2) acumulación de microesclerocios (MS) liberados más rápidamente a partir de las hojas y tejidos infectados; 3) mayor población de malas hierbas que mantienen y aumentan la densidad de inóculo (DI) en el suelo. Estos factores en conjunto, podrían estar propiciando un desarrollo epidémico de la VO más rápido y severo.

En este trabajo se presentan los primeros resultados obtenidos sobre el efecto de la humedad producida por el riego sobre la DI del patógeno en el suelo.

Para ello se han realizado análisis de suelo en 4 plantaciones de olivar afectadas por Verticilosis y regadas por goteo, en las provincias de Córdoba y Madrid. Las muestras de suelo se recogieron en la misma línea de riego (muestra gotero) a ambos lados de cada árbol a 40 y 100 cm del tronco y en la perpendicular a la línea de unión de los goteros a la misma distancia del tronco (muestra testigo). En algunas parcelas los goteros se marcaron y fijaron al suelo para analizar la evolución de la DI en el tiempo.

Los análisis iniciales señalan incrementos del 63,9% al 87,5% de la DI en la muestra gotero con relación a la testigo. Por otra parte, en otro experimento cuyas parcelas solo difieren en la aplicación o no de riego, las DI fueron superiores en los suelos regados (1,2 vs. 0,4 MS/g de suelo).

Nuestros resultados indican una población del patógeno superior en la zona de influencia del gotero, lo que representa una importante consecuencia epidemiológica. Además, en algunas parcelas no se detectó el hongo en el suelo, a pesar de presentar niveles considerables de enfermedad, lo que indica que bajos potenciales de inóculo pueden causar incidencias elevadas de enfermedad favorecido por el riego entre otros posibles factores.

O-18

BASES EPIDEMIOLÓGICAS PARA LA DETERMINACIÓN DE LOS RIESGOS DE INFECCIÓN POR *Spilocaea oleagina* EN EL OLIVAR

Viruega, J.R. y Trapero, A.

Dpto. de Agronomía, ETSIAM, Universidad de Córdoba. Apdo. 3048, 14080 Córdoba.

Diversas razones han motivado que el repilo del olivo, causado por *S. oleagina*, se caracterice por la falta de estudios fitopatológicos modernos, en contraste, por ejemplo, con otro patosistema similar muy bien conocido como es la roña del manzano, producida por *Venturia inaequalis* (anamorfo *Spilocaea pomi*). Las investigaciones que se vienen realizando desde 1994 en el Departamento de Agronomía de la Universidad de Córdoba han permitido caracterizar la epidemiología del repilo y establecer las bases para el desarrollo de un sistema predictivo de los riesgos de infección por *S. oleagina* en las principales comarcas olivareras andaluzas.

El carácter biotrofo de *S. oleagina*, la escasa capacidad de competencia saprofítica en las hojas caídas y la carencia del estado sexual, determinan su dependencia casi exclusiva de las hojas infectadas del árbol tanto para la producción de inóculo como para la supervivencia. El ciclo de la enfermedad se inicia en la primavera, cuando las hojas nuevas recién brotadas, que son extremadamente susceptibles, resultan infectadas por las conidias presentes en las lesiones de las hojas viejas. Estas infecciones permanecen latentes durante el verano (temperaturas >27°C determinan una fase de inactividad o quiescencia de *S. oleagina*), sin producir caída de hojas, y constituyen la fuente del inóculo de otoño, condicionando, por tanto, el desarrollo de la epidemia en los meses de otoño-invierno. La cuantificación de ese inóculo primario resulta, pues, esencial para la determinación de los riesgos de infección. Además, el momento de aparición de las lesiones en la época otoñal y, por tanto, de las conidias necesarias para producir nuevas infecciones, está determinado por las condiciones ambientales. Así, se requiere un período lluvioso y temperaturas inferiores a 20°C para la reanudación de la actividad del hongo, tras el período estival. La temperatura óptima para la infección está entre 15 y 20°C, con un mínimo de 12 hr de humectación foliar. Por ello, las infecciones más severas de repilo ocurren, generalmente, entre los meses de octubre y febrero. La duración del período de incubación, con un mínimo de 1 mes y un máximo de 10 meses, hace que se puedan producir, en nuestras condiciones, un máximo de 4-5 ciclos de infección en un año.

Con objeto de establecer una estrategia más racional en la lucha contra la enfermedad, se están elaborando modelos epidémicos que incluyen todos los parámetros descritos. Estos modelos van a ser verificados en olivares comerciales con diversas condiciones agronómicas y ecológicas.

O-19

DISTRIBUCIÓN DE BIOTIPOS DE *Bemisia tabaci* (Hemíptera:Aleyrodidae) EN LA CUENCA MEDITERRÁNEA

¹Simón, B., ¹Hernández, M.D., ²Moriones, E., ³Beitia, F. y ¹Cenis, J.L.

¹CIDA, 30150 La Alberca (Murcia); ²Estación Experimental "La Mayora"-CSIC, 29750 Algarrobo-Costa (Málaga); ³SGIT-INIA, Ctra. La Coruña km. 7.5, 28040 (Madrid).

El insecto *Bemisia tabaci* (Genn.) está presente en todas las zonas tropicales y subtropicales del mundo, actuando como vector de importantes virus vegetales. En España se le conoce como vector del complejo TYLCV de geminivirus en tomate y judía y de los crinivirus ToCV y CYSDV en tomate y cucurbitáceas, respectivamente, con un impacto muy grave en la producción hortícola del Sur y Sudeste del país.

Un aspecto relevante de la biología del insecto es el de su variabilidad genética. Se han identificado al menos 20 biotipos del insecto. Estos biotipos difieren en numerosos caracteres biológicos y son fácilmente distinguibles mediante análisis de esterasas y marcadores moleculares (RAPDs, AFLPs y mtDNA). Desde la década de los ochenta se reconoce la gran importancia que tienen los diferentes biotipos en la epidemiología de los virus que transmiten. La expansión mundial del biotipo B, muy polífago, se considera la causa de la movilización de numerosos virus desde especies silvestres a especies de gran cultivo.

A mediados de la década de los noventa se identificó en España la presencia de dos biotipos del insecto: El biotipo B, presente en todo el mundo, y un segundo biotipo, nuevo por entonces, denominado Q. En una reciente prospección de los biotipos de *B. tabaci* en la cuenca mediterránea e islas atlánticas mediante la técnica RAPD-PCR, se ha detectado la presencia del biotipo Q en Italia, Grecia, Israel, Túnez y Marruecos, así como en las islas Canarias, y Cabo Verde. El biotipo B se ha encontrado en Francia, Italia, Israel y Egipto. Además, se ha detectado en una zona montañosa de Sicilia la presencia de un biotipo todavía no descrito, colonizando plantas de *Euphorbia carachas*, pero sin incidencia en los cultivos de la isla. En la Península Ibérica se ha detectado un predominio prácticamente total de biotipo Q.

La amplia distribución del biotipo Q es relativamente inesperada, pues se pensaba que únicamente el biotipo B estaba repartido a gran escala. Este hecho invita a determinar si el biotipo Q ha sido seleccionado por las prácticas agrícolas intensivas y se encuentra en un proceso de expansión, o constituye un biotipo autóctono de la cuenca mediterránea, previo a la expansión del biotipo B. Dado que el biotipo Q es más eficiente que el B en la transmisión del complejo TYLCV, es previsible que una mayor presencia del primero tendrá repercusión en la epidemiología del virus.

O-20

COMPLEMENTACIÓN DEL MOVIMIENTO INTERCELULAR DE PVX POR POTYVIRUS

Bernal, J.J.¹, Santa Cruz, S.² Y Rodríguez-Cerezo, E.¹

Centro Nacional de Biotecnología-CSIC, Madrid, España.

Scottish Crop Research Institute, Invergowrie, Dundee, Escocia.

Potyvirus y potexvirus son virus filamentosos de RNA que necesitan la proteína de la cápsida (CP) para el transporte intercelular y a larga distancia en sus huéspedes. En el movimiento intercelular de los potexvirus intervienen además proteínas codificadas por 3 genes no estructurales (TGB 1, TGB 2, TGB 3), y en el caso de los potyvirus la proteína no estructural CI. Se ha estudiado la equivalencia funcional entre genes de potexvirus y potyvirus implicados en el transporte mediante estudios de complementación del movimiento de mutantes de PVX (*Potato virus X*) defectivos para el transporte intercelular a través de los plasmodesmos.

Se han utilizado dos sistemas experimentales distintos. El primero se basa en el análisis del movimiento de mutantes de PVX (que contienen en su genoma el gen de la proteína fluorescente GFP, green fluorescent protein) en plantas que expresan diferentes proteínas del potyvirus TVMV (*Tobacco vein mottling virus*). Los mutantes de PVX en la CP recuperaron su capacidad para invadir células adyacentes desde una célula inicialmente infectada en plantas previamente infectadas con TVMV, pero no en plantas transgénicas que expresan diferentes proteínas de TVMV. Estos mutantes, en cambio, no recuperan su capacidad de moverse a otras células cuando se bombardean en plantas junto con plásmidos que contienen y expresan distintos genes de TVMV. Los mutantes de PVX con deleciones en los genes TGB1, TGB2 y TGB3 no fueron complementados en ningún caso.

Otro sistema se basa en la utilización de un vector derivado de PVX para la expresión de genes heterólogos. En este vector viral se ha introducido el gen de la CP de TVMV para originar un virus recombinante entre PVX y TVMV, virus que es infectivo y expresa la proteína de TVMV en plantas infectadas. Cuando además se elimina el gen de la CP de PVX, necesaria para el transporte intercelular, el virus híbrido PVX/TVMV resultante es capaz de moverse de una célula a otra y a hojas superiores. Se ha estudiado la progenie de este virus y la formación de pseudocápsidas, y se discuten los resultados en función de los procesos de movimiento que complementa la CP de TVMV. Los datos sugieren que la complementación de la función de transporte que realiza esta proteína no está asociada a la encapsidación del genoma viral. Otras construcciones en este vector basado en PVX que contienen la CP de otro potyvirus (PPV, *Plum pox virus*) u otras proteínas de TVMV no fueron viables si se eliminaban genes implicados en el movimiento intercelular del propio PVX.

O-21

ACUMULACIÓN DEL RNA DE CYSDV EN TEJIDOS DE CUCURBITÁCEAS

Marco, C.F., Aguilar, J.M., Gómez-Guillamon, M.L. y Aranda, M.A.

Estación Experimental "La Mayora"-CSIC. 29750-Algarrobo-Costa (Málaga).

La enfermedad del amarilleo afecta a los cultivos protegidos de melón y pepino del sudeste español y causa importantes pérdidas económicas. En esta región, el crinivirus del amarilleo y enanismo de las cucurbitáceas (CYSDV), que es transmitido por *Bemisia tabaci* Genn., es el agente inductor de la enfermedad. Ciertas prácticas culturales y el control del vector son las medidas de protección frente a la enfermedad disponibles por el momento, pero están resultando insuficientes. En la Estación Experimental "La Mayora" trabajamos para la obtención de variedades genéticamente resistentes al virus, cuyo uso sería la mejor forma de control de la enfermedad.

El conocimiento de la distribución de CYSDV en plantas infectadas era imprescindible para optimizar nuestros métodos de trabajo. Así, se ha llevado a cabo un ensayo para medir la acumulación de RNA viral en plantas de melón, pepino, calabaza y calabacín, inoculadas en condiciones controladas con CYSDV. Las plantas se mantuvieron en invernadero durante cinco semanas a partir de la fecha de inoculación, realizándose muestreos semanales a distintos niveles en cada planta inoculada. La medida de la acumulación del RNA viral se llevó a cabo mediante cuantificación densitométrica de la señal de hibridación molecular en "dot-blot". Estos análisis revelaron que la acumulación de CYSDV en pepino es un orden de magnitud mayor con respecto a las otras especies, y la dinámica de acumulación también parece ser distinta. Utilizando estas referencias, se analizó la acumulación del RNA de CYSDV en diversas entradas de germoplasma de melón que en ensayos anteriores no habían mostrado síntomas tras inoculación con CYSDV. De las entradas analizadas solamente una de ellas resultó ser resistente al virus. Puesto que la inoculación se hizo utilizando el vector, cabía la posibilidad de que esta entrada fuera resistente a la transmisión pero no a la multiplicación del virus. Para analizar este aspecto se inocularon plantas de dicha entrada mediante injerto sobre patrones susceptibles previamente infectados. Así se ha podido observar que ambos factores (transmisión y multiplicación tras transmisión) pueden jugar un papel en la resistencia de esta entrada, ya que en ensayos en los que hubo un 100% de infección en controles susceptibles, en una parte de las plantas supuestamente resistentes se detectó RNA de CYSDV y en otra parte no. En este momento se está estudiando la heredabilidad del carácter mediante ensayos como el descrito utilizando líneas clonales de plantas.

O-22

MECANISMOS DE ADAPTACIÓN A HUÉSPED DEL VIRUS DEL RIZADO AMARILLO DEL TOMATE.

Sánchez-Campos, S., Navas-Castillo, J. y Moriones, E.

Estación Experimental “La Mayora”, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, 29750 Algarrobo-Costa, Málaga.

El virus del rizado amarillo del tomate (*Tomato yellow leaf curl virus*, TYLCV) es un geminivirus del género *Begomovirus* que se transmite de forma natural por la mosca blanca *Bemisia tabaci* Gen. En España se hallan presentes dos especies de este virus: TYLCV-Sar y TYLCV-Is, siendo la causa de graves epidemias en los cultivos de tomate y judía en el sur y sudeste peninsular. Hemos demostrado que ambas especies coexisten en las epidemias e incluso, frecuentemente, en un mismo huésped (tomate, *Datura stramonium*) en forma de infecciones mixtas. Estas dos especies presentan además una gama de huéspedes diferenciales; así, *Solanum nigrum* y *S. luteum* son huéspedes solamente de TYLCV-Sar, judía y *Mercurialis ambigua*, de TYLCV-Is, mientras que tomate y *D. stramonium* lo son de las dos especies.

El genoma de TYLCV está formado por una molécula circular de DNA monocatenario de aproximadamente 2,8 kb y contiene 2 genes en sentido viral solapados (V1 y V2) y 4 en sentido complementario (C1 a C4), también solapados entre sí, y una región intergénica (IR) no codificante de unos 300 nt que contiene elementos clave para la replicación y transcripción del genoma viral. V1 codifica para la proteína de la cápsida, C1 para la replicasa, C2 para una proteína transactivadora de V1 y V2, C3 para un potenciador de la replicación y las proteínas codificadas por C4 y V2 están relacionadas con funciones de movimiento y expresión de síntomas.

Se han estudiado cuales son los mecanismos que permiten a TYLCV-Sar o TYLCV-Is la adaptación diferencial en *S. nigrum* y judía. Se han realizado ensayos que muestran que TYLCV-Sar no infecta plantas de judía porque no se replica en este huésped, mientras que TYLCV-Is sí se replica en plantas de *S. nigrum* pero no es capaz de infectar sistémicamente. Se han construido quimeras entre TYLCV-Sar y TYLCV-Is para determinar donde se localizan los determinantes moleculares asociados con las diferentes capacidades de TYLCV-Sar y TYLCV-Is de replicarse y/o moverse en *S. nigrum* y judía: *quimera 1*, donde la región V1+V2 de TYLCV-Sar se ha sustituido por la de TYLCV-Is; *quimera 5*, donde la región C1+IR de TYLCV-Sar se ha sustituido por la de TYLCV-Is. Se discutirán los resultados obtenidos.

O-23

HISTOPATOLOGÍA Y CAMBIOS ENZIMÁTICOS PRODUCIDOS POR LA INFECCIÓN DE NEMATODOS DEL COMPLEJO *Heterodera avenae* EN UNA LÍNEA DE INTROGRESIÓN TRIGO/ *Aegilops ventricosa*

Andrés, M.F.¹, Melillo, M.T.², Delibes, A.³, Romero, M.D.¹ y Bleve-Zacheo, T.²

¹ Centro de Ciencias Medioambientales. CSIC, Serrano 115 dpdo., 28006 Madrid.

² Istituto di Nematologia Agraria, CNR, Via Amendola 165/A, 70126 Bari, Italia.

³ Departamento de Biotecnología, ETSIngenieros Agrónomos, UPM, 28040 Madrid.

En estudios previos se ha demostrado el alto grado de resistencia de la línea de introgresión trigo/ *Aegilops ventricosa*, H-93-8 (portadora del gen Cre2) frente a dos especies de nematodos *Heterodera avenae* y *H. filipjevi* parásitos de cereales.

El presente estudio analiza la respuesta de dicha línea a la infección por ambas especies de nematodos mediante un análisis secuencial de los cambios citológicos y de las enzimas implicadas en la reacción resistente. En ambos casos las células del parénquima estelar de las que se alimenta el nematodo se transforman en sincitios que se degradan en pocos días. La infección por *Heterodera avenae* produce una respuesta semejante a una reacción hipersensible con depósitos de callosa, deterioro de la membrana y síntesis de productos fenólicos en las células sincitiales. Con *H. filipjevi* la respuesta se produce a los siete días de la entrada del nematodo después de la inducción de algunas células sincitiales en que la condensación nuclear refleja una inactivación de los mecanismos de transcripción.

El análisis de los patrones enzimáticos obtenidos por isoelectroenfoque revela un aumento en las actividades de peroxidasas, esterasas y superóxido dismutasas cuatro días después de la infección por ambas especies, así como la aparición de peroxidasas.

La localización citoquímica de peroxidasas a nivel estructural revela una reacción altamente positiva de las células sincitiales al DAB y ácido homovanílico cuya oxidación por las peroxidasas se manifiesta por la formación de depósitos electrondensos asociados con la membrana plasmática, nuclear y vacuolas. Se demuestra que existe una fuerte correlación entre la expresión citológica de la resistencia y la actividad peroxidasa.

A nivel histoquímico destaca la presencia relativamente abundante de lignina en sincitios de cuatro días. La afinidad de peroxidasas y esterasas para la biosíntesis de los sustratos de lignina y su capacidad para formar agua oxigenada sugiere que estas enzimas pueden ayudar a sintetizar sustancias que formen una barrera para bloquear al patógeno. Nuestros resultados demuestran que en las fases de interacción incompatible entre la línea H-93-8 y las poblaciones de *H. avenae* y *H. filipjevi* se inducen genes cuyos productos (peroxidasas, esterasas y superóxido dismutasas) pueden considerarse como integrantes de un sistema de defensa, cuya acción combinada minimiza los efectos de la exposición de las células a los agentes oxidativos.

O-24

DISECCIÓN GENÉTICA DE LAS MÚLTIPLES FUNCIONES DE LA PROTEÍNA DE LA CÁPSIDA DEL VIRUS DEL MOSAICO DE LA ALFALFA (AMV) EN LA REPLICACIÓN DEL RNA VIRAL, SU ENCAPSIDACIÓN Y MOVIMIENTO.

Tenllado, F.¹ y Bol, J.F.²

¹Centro de Investigaciones Biológicas. Velázquez 144, 28006. Madrid. ²Institute of Molecular Plant Sciences, Leiden University. 2300 RA Leiden, The Netherlands.

La proteína de la cápsida (CP) de virus pertenecientes a los géneros *Alfamovirus* e *Ilarvirus* (*Bromoviridae*) presenta características únicas entre los virus de plantas, al ser necesaria su presencia en el inóculo para que se inicie la infección viral (activación genómica) y, una vez expresada en la célula vegetal, estimular la acumulación asimétrica de cadenas positivas del RNA viral. Además, la CP de estos virus comparte con la de otros grupos de virus una función estructural en la formación del virión, así como un papel en el movimiento célula a célula y a lo largo del sistema vascular de la planta de la partícula infecciosa viral.

Un aspecto interesante en el estudio del ciclo de infección de AMV es determinar si las múltiples funciones de la CP se llevan a cabo por un único dominio funcional de la proteína o bien si distintos dominios de la CP son los responsables. Con tal fin, se realizó un análisis mutacional de la CP estudiando en el sistema de los dos híbridos en levadura el efecto de distintas mutaciones, puntuales o de delección, en la capacidad de la CP de dimerizar, paso previo a la formación del virión. Además, estas mismas mutaciones fueron introducidas en un clon infeccioso del RNA 3 (o RNA 4) de AMV para determinar su efecto sobre la activación genómica, síntesis de cadenas positivas, formación del virión y movimiento del virus. Mutaciones que interfirieron con la formación del dímero CP tuvieron poco efecto en la iniciación de la infección o en la acumulación de cadenas positivas del RNA viral. Sin embargo, estas mutaciones afectaron el proceso de formación de la partícula viral y redujeron o eliminaron la capacidad de movimiento célula a célula del virus. Seis de los siete aminoácidos básicos de la región N-terminal de la CP (posiciones 5, 6, 10, 13, 16 y 25) pudieron ser deleccionados o mutados a alanina sin afectar ningún paso del ciclo de infección viral excepto el movimiento sistémico en plantas. El cambio de la Arginina en posición 17 interfirió con el proceso de iniciación de la infección y el movimiento célula a célula del virus pero no con la acumulación de cadenas positivas o la formación del virión. Los resultados indican que existen distintos dominios de la CP de AMV implicados en las funciones de iniciación de la infección, acumulación de cadenas positivas, formación del virión, movimiento célula a célula y translocación sistémica del virus.

O-25

ANÁLISIS PRELIMINAR DE LA FUNCIÓN SUPRESORA DE SILENCIAMIENTO GÉNICO DEL GEN HC-PRO DEL POTYVIRUS DE LA SHARKA

González-Jara, P., Canto, T. ¹, Martínez-García, B., Atencio, F.A., Tenllado, F., Barajas, D., López-Abella, D. y Díaz-Ruíz, J.R.

Departamento de Biología de Plantas. Centro de Investigaciones Biológicas. CSIC. Velázquez 144. 28006 Madrid. ¹Virology Department. Scottish Crop Research Institute. Invergowrie. Dundee DD2 5DA. Scotland. U.K.

Recientemente se ha demostrado que las interacciones sinérgicas que los potyvirus tienen en infecciones mixtas con virus de otros grupos son el resultado de la supresión de un mecanismo de defensa de la planta por una proteína multifuncional denominada HC-Pro codificada por el genoma de potyvirus.

Con el fin de profundizar en el conocimiento de este mecanismo hemos construido clones de cDNA con la secuencia completa del HC-Pro de un aislado español del potyvirus de la sharka (plum pox virus, PPV), añadiéndole a un clon dos tripletes extras, un AUG y un TAA, al inicio y al final de la secuencia, respectivamente, para permitir la correcta traducción del producto proteico correspondiente, y a otro clon, un codón de terminación al inicio de la secuencia, de manera que no se permita su traducción a proteína. Los citados clones del HC-Pro, traducible y no traducible, se han introducido en un clon completo infeccioso del potexvirus X de la patata (potato virus X, PVX), originando los virus quiméricos denominados PVX-HC-T y PVX-HC-NT, respectivamente. Los transcritos de RNA obtenidos a partir de estos clones han sido infecciosos en plantas de *Nicotiana benthamiana*. Las plantas inoculadas con PVX-HC-NT desarrollaron los mismos síntomas que las inoculadas con transcritos del clon de PVX sin inserto, utilizado como control, aunque estos síntomas aparecieron con un retraso aproximado de un día. Sin embargo, en las plantas inoculadas con PVX-HC-T el síntoma inicial fue seguido de una reacción sinérgica consistente en una necrosis sistémica que provoca la muerte de la planta, como se ha publicado con otros HC-Pro de potyvirus. Como era previsible, la proteína HC-Pro de PPV fue detectada sólo en las plantas inoculadas con PVX-HC-T, mediante ensayos Western blot utilizando un antisuero preparado en el laboratorio. La estabilidad de los insertos fue comprobada mediante ensayos Northern blot, utilizando sondas específicas para PVX. El efecto sinérgico ocasionado por PVX-HC-T no fue reproducido cuando se co-inocularon PPV y PVX en la misma planta, aunque sí cuando se inoculó PPV con una antelación de entre 24 y 48 horas con respecto a la inoculación de PVX.

Todos estos resultados, por un lado, corroboran las conclusiones obtenidas por otros autores acerca del papel que desempeña el producto proteico del gen HC-Pro, y no su RNA, en la inhibición del mecanismo de defensa antiviral en plantas y, por otro, nos va a permitir manipular los clones de PPV obtenidos para analizar su efecto sobre la supresión del mecanismo de silenciamiento génico postranscripcional en plantas.

O-26

RELACIONES VIRUS-PLANTA EN LA FORMACIÓN Y ACUMULACIÓN DE LAS PARTÍCULAS DEFECTIVAS INTERFERENTES DEL BROMOVIRUS DEL MOTEADO DEL HABA (BBMV)

Llamas, S., Sandoval, C., Babin, M. y Romero, J.

Departamento de Protección Vegetal, INIA Autopista A-6, Km 7,0 28040-Madrid.

RNAs defectivos (D) y defectivos interferentes (DI-RNAs) han sido descritos en diversos grupos de virus de plantas y animales y se diferencian porque los RNAs defectivos a diferencia de los DI-RNAs no tienen un efecto aparente en los síntomas que ocasiona el virus auxiliar. DI-RNAs han sido encontrados en diversas razas del Bromovirus moteado del haba (Broad bean mottle virus, BBMV), y sus propiedades estudiadas. La eficiente propagación de estas partículas depende de la presencia de las señales de replicación y de otros factores intrínsecos y externos. Para conocer como estas partículas influyen en el ciclo de vida de un virus, parece necesario conocer en detalle los factores implicados en la formación replicación y acumulación de los DI-RNAs en sus huéspedes. Ensayos biológicos en diversas plantas demostraron un efecto diferencial de los huéspedes en la formación, acumulación y encapsidación de los DI-RNAs y un condicionamiento en el tamaño de estas partículas cuando son formadas *de novo* a través de pases sucesivos sobre un determinado huésped en diversas condiciones ambientales. De esta manera habas crecidas en invernadero producen DI-RNAs denominadas grandes (2,3 Kb) y en fitrotón a 20 °C DI-RNAs pequeñas (1,9 Kb). En plántulas de guisante el efecto es diferente produciendo DI-RNAs pequeños en invernadero y grandes en fitrotón. Un factor importante de esta relación es la temperatura, ya que temperaturas bajas 12 – 16 °C favorecen la formación de los DI-RNAs uno dos pases antes y manifiestan síntomas 2 – 3 días antes de los respectivos controles. Diversas construcciones de DI-RNAs artificiales que mantenían o no el marco de lectura de la proteína trunca 2a que producen las DI-RNAs han servido para determinar las necesidades de tamaño, secuencias y capacidad codificadora necesarios para la eficiente replicación, acumulación y encapsidación de los DI-RNAs. Finalmente hemos estudiado la capacidad interferente de estas partículas en protoplastos y planta y los efectos que producen en la infección viral. La formación de partículas defectivas interferentes en una infección del BBMV, podría ser un mecanismo usado por el virus para superar procesos de selección en la infección viral y un componente esencial en el proceso evolutivo del virus.

O-27

***Bemisia tabaci* (Gen.): ANATOMÍA INTERNA Y RELACIÓN CON EL VIRUS DEL RIZADO AMARILLO DEL TOMATE**

Medina, V.¹, Bedford, I.², Marta, F.¹, Pinner, M.S.², Markham, P.G.²

¹ Dept. Producció Vegetal i Ciència Forestal. Universitat de Lleida (UdL). Avda. A. Rovira Roure 177, 25198 Lleida.

² John Innes Centre. Dept. of Virus Research. Colney, Norwich UK NR4 7UH.

Se han analizado mediante inmunoelectromicroscopía con oro coloidal algunos geminivirus: 'Tomato yellow leaf curl geminivirus' cepa de Cerdeña (TYLCV-Sr), dos cepas de 'African cassava mosaic geminivirus' (ACMV), transmisible (VT) y no transmisible por su vector (VNT), 'Tobacco leaf curl geminivirus' (TobLCV) y 'Asystasia golden mosaic geminivirus' (AGMV), en *Bemisia tabaci* Gennadius, mosca blanca del tabaco. El antisuero utilizado fue uno específico contra la cepa de AMV transmisible por *B. tabaci*. Se ha estudiado la anatomía interna del insecto a nivel celular con el fin de conocer los lugares de acumulación y el modelo de circulación y/o transporte de los geminivirus a través del insecto.

El antisuero reaccionó fuertemente con TYLCV-Sar y ACMV, pero débilmente frente a otros virus. El marcaje se localizó principalmente en las células de la cámara filtrante y las glándulas salivares. En la cámara filtrante se observó marcaje en el interior de estructuras semejantes a lisosomas y en el lumen del intestino. En las glándulas salivares accesorias se marcaron un gran número de vesículas que contenían estructuras fibrilares. No se pudieron observar partículas semejantes a geminivirus en ningún caso. En el caso del aislado ACMV-VNT, no se produjo marcaje de tejidos u órganos y únicamente se marcaron estructuras en el lumen del intestino del insecto.

O-28

DETECCIÓN ESPECÍFICA DE LOS PATOTIPOS DEFOLIANTE Y NO DEFOLIANTE DE *Verticillium dahliae* EN PLANTAS DE OLIVO INFECTADAS MEDIANTE “NESTED”-PCR

Mercado Blanco, J., Rodríguez Jurado, D., Parrilla Araujo, S., Pérez Artés, E. y Jiménez Díaz, R.M.

Departamento de Protección de Cultivos. Instituto de Agricultura Sostenible. CSIC. Apartado 4084. 14080 Córdoba.

La Verticilosis del olivo (VO), causada por los patotipos defoliante (*D*) y no defoliante (*ND*) de *Verticillium dahliae* Kleb., es considerada en la actualidad una de las enfermedades de etiología fúngica más amenazadora para el olivar. Su creciente expansión en Andalucía y otras zonas olivareras españolas se debe, muy posiblemente, al establecimiento de nuevas plantaciones en suelos infestados por el patógeno y/o la utilización de material de plantación infectado. Por ello, para una estrategia de manejo integrado de la VO son claves la utilización de material de plantación certificado libre del patógeno y la elección de suelos no infestados o conteniendo mínima densidad de inóculo de éste. En ambos casos, la diferente virulencia de los patotipos *D* y *ND* sobre cultivares de olivo hace que la correcta identificación de los patotipos sea determinante para la eficacia de la medida de control. La caracterización patogénica de dichos patotipos es laboriosa y costosa en material, espacio y tiempo. En nuestro laboratorio, la aplicación de métodos de diagnóstico molecular basados en la reacción de PCR ha dado lugar recientemente al desarrollo de iniciadores (“primers”) específicos de los patotipo *D* y *ND* de *V. dahliae* (1), que permiten su identificación rápida, factible y reproducible utilizando micelio puro del hongo. Basado en estos resultados, se ha desarrollado un procedimiento que permite diagnosticar específicamente la infección por los patotipos *D* y *ND* en plántones de cultivares de olivo de diferente edad. Muestras de tallos y raíces de plantas de olivo de 3 a 14 meses de edad, inoculados artificialmente con suspensiones de conidias de los aislados V4 (*ND*) y V138 (*D*), se sometieron a un proceso de liofilización y triturado que proporciona una mezcla adecuada para su posterior uso en protocolos de extracción de ADN total con “calidad PCR”. Utilizando dicho material, se ha desarrollado un protocolo de diagnóstico molecular mediante PCR y PCR secuencial (“nested”-PCR) e iniciadores específicos, que permite la identificación diferencial de ambos patotipos desde los momentos iniciales tras la inoculación, en plantas sintomáticas o asintomáticas, así como en plantas en las que ocurrió remisión de síntomas meses después de aquélla. Los resultados de este estudio aportan una herramienta diagnóstica susceptible de ser usada en programas de certificación de material vegetal. Además, se presentan resultados que indican su utilidad como herramienta molecular para investigaciones sobre el desarrollo epidemiológico de la VO utilizando muestras de tejidos de plantas adultas obtenidas de olivares afectados de Verticilosis.

(1) Pérez-Artés *et al.*, (2000). Eur. J. Plant. Pathol. *In press*.

Subvencionado por el proyecto CYCIT OLI96-2131.

O-29

IDENTIFICACIÓN, CLASIFICACIÓN Y POLIMORFISMO, DE *Spilocaea oleagina*, AGENTE CAUSANTE DEL REPILO EN EL OLIVO.

González-Lamothe, R., Baldoni, L.⁽¹⁾, Trapero, A.⁽²⁾, Valpuesta, V. y Botella, M.A.

Departamento de Biología Molecular y Bioquímica. Facultad de Ciencias. Universidad de Málaga.

(1) Instituto di Recerche sulla Olivocultura-C.N.R. Perugia. Italia.

(2) Departamento de Agronomía. Universidad de Córdoba.

La enfermedad del repilo, causada por el hongo *Spilocaea oleagina*, es uno de los problemas más importantes en el cultivo del olivo de toda la región mediterránea. Aunque algunos aspectos del ciclo vital de *Spilocaea* son conocidos, no se tiene certeza de la existencia de reproducción sexual, ni de la variación y especialización del patógeno.

En primer lugar, se identificó el hongo crecido "in vitro" como agente causante del repilo por medio de AFLP.

En segundo lugar y con el objeto de estudiar la clasificación de *Spilocaea oleagina* se clonaron y secuenciaron el DNA ribosómico 16S, y un fragmento del DNA ribosómico 25S que contiene los tres dominios hipervariables D1, D2 y D3. El análisis de estas secuencias, y la construcción de árboles filogenéticos a partir de ellas nos permitió identificar a *Spilocaea oleagina* como organismo perteneciente a la clase Loculomycetes, y con alta probabilidad al género *Venturia*.

Finalmente se estudió del grado de polimorfismo de la población del hongo mediante AFLP, y análisis de secuencias ITR y dominios D1, D2 y D3 del DNA ribosómico 25S.

Font, I., Martínez, P. y Jordá, C.

Area de Patología Vegetal (Virología). Dpto. de Producción Vegetal, Universidad Politécnica de Valencia. E.T.S.I.Agrónomos. Camino de Vera nº 14. 46022. Valencia.

El *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV) comúnmente llamado virus del rizado amarillo del tomate es un virus de la familia *Gemviridae* perteneciente al género *Begomovirus*. Tradicionalmente, los diferentes aislados de TYLCV han sido incluidos dentro de dos tipos : *Tomato yellow leaf curl-Sardinia* (TYLCV-Sar) y *Tomato yellow leaf curl-Israel* (TYLCV-Isr). Estudios basados en la secuencia de la proteína de la cápsida de los distintos aislados de TYLCV mostraban dos agrupaciones claramente diferentes de los mismos, por lo que recientemente (mayo de 1999) han sido denominadas, por el Comité Internacional de Taxonomía de Virus (ICTV), como dos especies distintas.

Con el objeto de estudiar la variabilidad y poder caracterizar los distintos aislados de TYLCV en tipos diferentes se llevó a cabo un análisis RFLPs de 245 muestras infectadas por TYLCV, procedentes todas ellas de zonas productoras de tomate del territorio nacional. Para ello se amplificó por PCR el ADN mediante una pareja de oligonucleótidos universales para el género *Begomovirus*, diseñados por nosotros. Posteriormente el fragmento amplificado se digirió con un total de nueve endonucleasas de restricción: *AluI*, *HaeIII*, *HpaII*, *RsaI*, *Sau3A*, *TaqI*, *DdeI*, *HinfI* y *SbfI*. La digestión con cada una de estas endonucleasas dio como resultado diferentes patrones de bandas dependiendo del enzima utilizado. La combinación de cada uno de los patrones individuales (obtenido con un enzima de restricción) dio como resultado un total de diecisiete patrones compuestos o tipos diferentes. La mayoría de los patrones identificados han sido correlacionados con la especie TYLCV-Sar (5) y TYLCV-Isr (12); entre ellos cabe citar TYLCV tipo: Murcia-Almería, Sardinia, Israel, Spain y Portugal.

Aunque los datos de secuencia ofrecen más información que el análisis de restricción, ésta técnica puede ser usada para la identificación de los diferentes aislados de TYLCV. De esta manera hemos comprobado que mediante el uso de tan sólo cinco de la nueve endonucleasas de restricción: *HaeIII*, *RsaI*, *HinfI*, *TaqI* y *HpaII* se pueden llegar a diferenciar de manera rápida y sencilla los diferentes aislados de TYLCV.

O-31

HONGOS ENDOFÍTICOS Y MICOVIRUS EN POBLACIONES NATURALES DE *Festuca rubra*

Zabalgogeoazcoa, I.¹, Vázquez de Aldana, B.R.¹, García Ciudad, A.¹, Benito, E.P.²
Eslava, A.P.² y García Criado, B.¹

¹ Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología – CSIC, Salamanca

² Departamento de Microbiología y Genética, Universidad de Salamanca.

La península Ibérica es un centro de diversidad de *Festuca rubra*, una gramínea muy apreciada para la formación de céspedes. Se ha estudiado la incidencia de plantas infectadas por el ascomiceto endofítico *Epichloë festucae* (Fam. Clavicipitaceae) en poblaciones naturales de *F. rubra* en dos ecosistemas distintos: pastos semiáridos de dehesas y acantilados marinos. En estas poblaciones, cerca del 70% de las plantas están infectadas por *Epichloë*. Este hongo coloniza permanentemente la vaina foliar y los tallos de las plantas y se transmite verticalmente por semilla. Las plantas infectadas no muestran ningún síntoma, pero en ellas se ha detectado la presencia del alcaloide tóxico ergovalina.

En vista de que este hongo es transmitido como un carácter materno y su asociación con la planta es duradera, la existencia de altas frecuencias de infección en ambientes inhóspitos parece indicar que la infección no es perjudicial para las plantas, sino que incluso podría ser beneficiosa.

Por otro lado, se ha detectado la presencia de dos elementos de RNA bicatenario (RNA_{bc}) en cultivos de *E. festucae* obtenidos de plantas de *F. rubra*. Uno de ellos (EfV) tiene un tamaño de 5 kbp y está encapsidado en partículas isométricas de 50 nm. Estas características son típicas de micovirus de la familia *Totiviridae*. El otro RNA_{bc} (M), tiene un tamaño de 2.5 kbp, no está encapsidado y su secuencia nucleotídica no es homóloga a la de EfV. EfV y M son persistentes en el hongo hospedador y se transmiten eficientemente de hifas a conidios.

Se ha realizado un estudio de la incidencia de estos virus en aislados de *Epichloë* obtenidos de una población natural de *F. rubra* en la cual el 78% de las plantas (n=33) estaban infectadas por *E. festucae*. La mayoría de los aislados de *Epichloë* (82%) resultaron estar infectados por RNA_{bc}, pero algunos estaban infectados por EfV y M, mientras que otros solo por el elemento M. Esto implica que el elemento M no depende de EfV para su replicación.

Los micovirus conocidos se transmiten por fusión celular. La elevada incidencia de virus en esta población de *E. festucae* podría indicar que todas las plantas asociadas a este hongo han sido infectadas por el mismo genotipo, o que existe un contacto entre hongos de distintos genotipos.

O-32

ESTUDIOS PRELIMINARES SOBRE LAS NECROSIS FOLIARES Y DE FRUTOS EN CÍTRICOS CAUSADA POR *Alternaria*.

Vicent, A.¹, Asensi, M.J.¹, Badal, J.¹, Alfaro-Lassala, F.², Cuenca, F.², Armengol, J.¹, Sales, R.¹ y García-Jiménez, J.¹

1. Patología Vegetal. Dpto. Producción Vegetal. Universidad Politécnica de Valencia. Camino de Vera s/n 46022 Valencia.
2. Servicio de Sanidad Vegetal. Ctra. Alicante-Valencia Km 276,5. Apdo. 125, 46460 Silla (Valencia).

En parcelas de mandarinos Fortune de diferentes zonas de la Comunidad Valenciana se viene detectando desde el año 1999 una nueva afección hasta ahora desconocida en España. Los síntomas observados consisten en necrosis de hojas y tallos en las brotaciones primaverales: sobre el limbo foliar se aprecian áreas necrosadas de tamaño variable que se extienden siguiendo las nerviaciones de la hoja y que acaban provocando su caída prematura. Los frutos pueden verse afectados desde el cuajado, presentando pequeñas lesiones necróticas superficiales. Estos frutos pueden caer al suelo o, a medida que maduran, las lesiones se van agudizando en forma de zonas deprimidas de color marrón oscuro con un halo amarillento a su alrededor. Posteriormente esta afección se ha detectado también en tangelo Minneola, donde causa también daños severos y, con menor gravedad, en mandarina Nova.

De las zonas afectadas se obtuvieron consistentemente aislados pertenecientes al género *Alternaria* que, en ensayos de patogenicidad sobre hojas de mandarina Fortune, desarrollaron los mismos síntomas foliares observados en campo. Este hongo es capaz de sintetizar toxinas hospedante-específicas causando la enfermedad conocida en terminología inglesa como "brown spot" sobre algunos cultivares de cítricos. Aunque este patógeno ha sido identificado como *Alternaria alternata* pv. *citri*, actualmente su encuadramiento taxonómico es poco claro, clasificándose incluso como nuevas especies de *Alternaria*.

Actualmente los trabajos en curso se están enfocando principalmente al control, mediante ensayos de tratamientos con diferentes fungicidas y con diferentes estrategias de aplicación, al conocimiento epidemiológico de la enfermedad y a determinar el rango potencial de cultivares cítricos susceptibles.

O-33

TRANSMISIÓN, DIAGNÓSTICO Y VARIABILIDAD MOLECULAR DEL VIRUS DE LAS MANCHAS NECRÓTICAS DE LOS PRUNUS (PNRSV).

Aparicio, F.^{1,2}, Sánchez-Pina, M.A.¹, Saade, M.¹ y Pállas, V.^{1,2}

¹Departamento de Mejora y Patología Vegetal. CEBAS-CSIC. Murcia.

²Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas. CSIC-UPV. València.

El PNRSV es el agente causal de varias enfermedades que afectan a la mayoría de frutales de hueso causando en estos cultivos importantes pérdidas que pueden llegar a ser de hasta un 30% en crecimiento y un 60% en productividad de los árboles infectados. Este virus se transmite mediante semillas vía polen infectado, si bien el mecanismo de transmisión es prácticamente desconocido. Con el fin de profundizar en el estudio de la transmisión del virus, se abordó, mediante hibridación molecular no radioactiva, RT-PCR e hibridación *in situ* la localización del virus en el grano de polen. Así se pudo determinar que la célula generativa que dará lugar a los gametos (células espermáticas), se halla libre de PNRSV, siendo el citoplasma de la célula vegetativa, encargada de desarrollar el tubo polínico, donde se acumula el virus. Este resultado parece sugerir que los gametos masculinos no estarían implicados en la transmisión del virus a la semilla.

Por otro lado el PNRSV, el virus del mosaico del manzano (ApMV) y el virus del enanismo del ciruelo (PDV) son los tres ilarvirus más ampliamente distribuidos y económicamente dañinos que infectan a los cultivos de frutales de hueso. Con el fin de contribuir al desarrollo de técnicas más sensibles y económicas destinadas a la detección de material infectado se desarrolló la detección simultánea de los tres virus mediante hibridación no radioactiva con una mezcla de sondas específicas para cada virus y una múltiplex RT-PCR. Para esta última técnica se aprovechó la elevada homología que presentan estos ilarvirus en el extremo 3' de sus RNA 3 para diseñar un único cebador degenerado antisentido, el cual, junto a un cebador sentido específico para cada uno de los virus permitió, en muestras de campo naturalmente infectadas, la detección simultánea y la identificación de cualquiera de los tres virus presentes en la muestra en una única reacción de RT-PCR.

Diversos estudios han puesto de manifiesto la existencia de diferentes aislados del PNRSV caracterizados por determinadas propiedades tanto serológicas como biológicas. Con el fin de estudiar la variabilidad molecular y buscar una correlación con la variabilidad biológica se clonó y secuenció el RNA 3 de quince aislados del PNRSV procedentes de cinco huéspedes y con diferente sintomatología. La comparación de las secuencias mostró una gran homología entre los aislados tanto en las zonas codificantes como en las no codificantes. El análisis filogenético originó el agrupamiento de los quince aislados en tres grupos claramente diferenciados que podría estar reflejando relaciones evolutivas del PNRSV. Sin embargo no pudo establecerse una correlación entre variabilidad molecular y sintomatología y/o especificidad de huésped.

Trabajo financiado por la DIGICYT, proyecto BIO99-0854.

O-34

VARIABILIDAD DEL VIROIDE DE LA EXOCORTIS DE LOS CÍTRICOS (CEVd) EN AISLADOS DE PLANTAS DE HABA (*Vicia faba*).

Gandía, M., y Duran-Vila, N.

Área de Viroides. Dpto de Protección Vegetal y Biotecnología. I.V.I.A. Ctra Moncada-Náquera Km 3.5. 46113. Moncada. Valencia.

El viroide de la exocortis de los cítricos (CEVd) (Semancik *et al*, 1972) es una molécula de RNA de simple cadena covalentemente cerrada, cuyo tamaño oscila entre 370 y 375 nucleótidos y que adopta una estructura secundaria en forma de varilla (Visvader *et al*, 1982; Gross *et al*, 1982). El CEVd se replica en ausencia de mecanismos de prueba de lectura, lo cual da lugar a una elevada tasa de variabilidad. Se postula que este viroide infecta un huésped susceptible en forma de un número diferente de variantes de secuencia.

Se analizaron plantas de haba (*Vicia faba*) que presentaban el viroide a bajas concentraciones y en las que no aparecía sintomatología. Se obtuvieron extractos de CEVd de dichas plantas, los cuales constituyeron una población inicial a partir de la fuente de viroide. Dichos extractos se inocularon en plantas de tomate y tras la aparición de síntomas en ellos, se realizaron nuevas extracciones con las cuales se infectaron nuevas plantas de haba que tras un determinado periodo de tiempo registraron presencia de CEVd en altas concentraciones y sintomatología (Fagoaga *et al*, 1995). Se obtuvieron extractos de estas plantas de haba sintomáticas, los cuales constituyeron una nueva población a partir de la fuente de viroide inicial.

La población inicial de viroide a partir de habas asintomáticas y la segunda población obtenida a partir de habas sintomáticas fueron analizadas usando la técnica de SSCP. Los resultados mostraron más variabilidad de secuencia en la población inicial del viroide que en la población sintomática. La secuenciación de los distintos clones confirmó la existencia de una variante de secuencia mayoritaria en la población de habas sintomáticas, mientras que la población inicial de viroide registró una mayor variabilidad de secuencia. Dicha variante mayoritaria presentó más homología con la secuencia consenso perteneciente a la clase A (Visvader y Symons, 1985) que produce sintomatología severa en tomate, lo cual podría explicar la aparición de síntomas en habas. Algunas de las variantes de secuencia de la población de viroide asintomática presentaron homología con la secuencia consenso de la clase B (Visvader y Symons, 1985) que produce síntomas suaves en tomate, con lo que se explicaría la ausencia de síntomas en habas.

Con el fin de estudiar qué cambios se han producido en la fuente de viroide tras su paso por un hospedador intermedio, que ha generado una nueva población sintomática y para estudiar la capacidad infectiva de las distintas variantes, se generaron dímeros a partir de variantes de las dos poblaciones de viroide, con los cuales se infectarán nuevas plantas de haba.

O-35

DETECCIÓN SIMULTÁNEA DE 4 VIRUS Y LA BACTERIA *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* EN OLIVO MEDIANTE MULTIPLEX-NESTED PCR EN UN SOLO TUBO CERRADO

Bertolini, E., Olmos, A., Gorris, M.T., Martínez, M.C., López, M.M. y Cambra, M.

Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA). Dpto. de Protección Vegetal y Biotecnología. Laboratorio de Virología e Inmunología. Apdo. oficial. 46113 Moncada, Valencia.

España es el país que más superficie dedica al cultivo del olivo en el mundo, unos 2,5 millones de hectáreas, lo que supone más del 25 % de la superficie mundial. Existe un interés creciente por este cultivo más allá de las zonas clásicas del Mediterráneo, principalmente en países de América del Sur (Argentina, Chile, Colombia y Uruguay) y en Australia. Por ello, se hace necesario disponer de material vegetal de calidad que responda a la creciente demanda de un mercado en expansión pero cada vez más exigente. El Real Decreto 1678/1999 de 29 de octubre establece requisitos de control y certificación de la calidad de las plantas de vivero de olivo, por los cuales se especifica que éstas deben estar libres del virus del mosaico del arabis (ArMV), del enrollado del cerezo (CLRV), del mosaico del pepino (CMV), del virus latente de las manchas anulares de la fresa (SLRV) y de la bacteria *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*, causante de la tuberculosis del olivo.

En España se detecta esporádicamente CLRV, CMV y SLRV y con frecuencia *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*. El diagnóstico y detección de la bacteria no plantea problemas, pero sí el de los virus. Se han ensayado diferentes sistemas de detección, pero aquellos considerados clásicos como ELISA, RT-PCR o IC-PCR resultan ineficaces debido a la baja carga viral, reacciones cruzadas (ELISA) que inducen falsos positivos y problemas de inhibidores (PCR). Por todo ello, se ha desarrollado un nuevo sistema que permite la amplificación simultánea de dianas de los cuatro virus y de la bacteria incluidos en el programa de certificación español mediante multiplex nested PCR según el sistema diseñado por Olmos et al. (1999) y patentado (P9801642). Para ello, se han diseñado iniciadores específicos (externos e internos) para cada uno de los agentes patógenos.

Este método se ha acoplado a una hibridación con sondas específicas marcadas en 3' con digoxigenina de cada virus y de la bacteria para realizar un posterior revelado colorimétrico. Este revelado permite la simultánea detección y caracterización de estos patógenos en olivo de forma sencilla y muy sensible, haciendo posible su uso en programas de certificación. Su aplicación muestra que el estado sanitario general del olivo multiplicado en viveros o cultivado en colecciones o en campo, es muy aceptable, en nuestro país.

ESTRATEGIAS ALTERNATIVAS PARA EL CONTROL DEL VIRUS DEL RIZADO AMARILLO DEL TOMATE (TYLCV)

Monci, F.¹, Soria, C.¹, Sánchez, F.¹, Díaz, J.A.¹, Sánchez-Campos, S.¹, Acebes, A.², López, A.³, Espí, E.⁴ y Moriones, E.¹

¹Estación Experimental "La Mayora", CSIC, 29750 Algarrobo-Costa, Málaga; ²Novartis Agro S.A., La Marina 206, 08013 Barcelona; ³Novartis Crop Protection AG, P.O. Box, 4002 Basel, Switzerland; ⁴Repsol-YPF, Embajadores 183, 28045 Madrid.

La enfermedad del rizado amarillo del tomate es el principal factor limitante para la producción de tomate en el sur y sudeste peninsular español. El agente causal de esta enfermedad recibe el nombre de virus del rizado amarillo del tomate, TYLCV, un complejo de virus de la familia *Geminiviridae* que en condiciones naturales se transmiten a través de la mosca blanca *Bemisia tabaci* Gen. La ausencia en el mercado de cultivares resistentes a este patógeno, así como la baja eficacia de los insecticidas utilizados para controlar el insecto vector, hace imprescindible la búsqueda de estrategias alternativas para el control del virus. El empleo de cubiertas plásticas foselectivas filtrantes de luz ultravioleta (UV) se ha descrito como un buen método de control de TYLCV, alcanzándose reducciones en la incidencia de este virus en tomate superiores al 50%. La protección se ha relacionado con la capacidad de interferir con la visión de *B. tabaci*. Otra posible alternativa para el control de TYLCV es la inducción de resistencia sistémica en las plantas mediante la aplicación de compuestos químicos que activan ese mecanismo de autodefensa. Uno de estos compuestos, el acibenzolar-S-metil (ASM) se ha mostrado efectivo frente a enfermedades causadas por hongos, bacterias y virus en diferentes cultivos.

Para determinar el efecto del plástico foselectivo sobre las poblaciones de *B. tabaci*, así como su eficacia en el control de las infecciones de TYLCV en tomate en las condiciones climáticas, de presión del vector y tipo de invernadero predominante en el sur de España, se realizaron dos ensayos durante la campaña 1999/2000. En un invernadero tipo parral, se recubrió una mitad con plástico de polietileno (PE) comercial, y la otra con plástico foselectivo desarrollado por Repsol YPF. El efecto de ASM, solo y en combinación con los insecticidas habitualmente empleados en la zona para el control de *B. tabaci*, se evaluó en tres ensayos en cultivos al aire libre, uno realizado en la campaña 1998/1999 y dos en 1999/2000 en dos zonas geográficas con características climáticas distintas.

Nuestros resultados muestran una clara reducción de los niveles de *B. tabaci* así como de las infecciones por TYLCV bajo cubierta plástica filtrante de luz UV. Esto se tradujo en mayor producción bajo estas cubiertas. La inducción de resistencia sistémica con ASM en condiciones de presión infectiva media-alta resultó en una menor gravedad de las infecciones de TYLCV, dando como resultado un incremento de la producción total.

El empleo de los plásticos foselectivos así como la inducción de resistencia sistémica con ASM se plantean como medidas adicionales a incorporar en los programas de control integrado del TYLCV. En el caso de cultivos protegidos sería muy interesante el estudio del efecto combinado de ambas alternativas.

O-37

ANÁLISIS GENÉTICO DE LA INTERACCIÓN ENTRE EL VIRUS DE LA TRISTEZA DE LOS CÍTRICOS Y LAS CITRADIAS (*C. aurantium* L. x *P. trifoliata* (L.) Raf).

Ruiz, C., Bretó, M.P., Carbonell, E.A., Cambra, M. y Asins, M.J.

Dpto. Protección Vegetal y Biotecnología. IVIA. Apdo. Oficial. 46113 Moncada (Valencia).

La tristeza es la principal virosis que afecta al cultivo de los cítricos en el mundo. El agente causante de esta enfermedad, conocido como CTV (virus de la tristeza de los cítricos) es un virus de ARN perteneciente a la familia de los closterovirus. Actualmente no se conoce ningún cítrico resistente a todos sus aislados. El naranjo amargo está muy bien adaptado a las condiciones edafo-climáticas mediterráneas, sin embargo, es sensible a tristeza. El conocimiento de los genes responsables de la enfermedad sería de gran interés en la obtención de nuevos patrones de cítricos resistentes a CTV y adaptados a nuestras áreas de cultivo.

Con el fin de localizar regiones genómicas en *Poncirus* y en *Citrus* implicadas en la multiplicación/distribución del virus por la planta, se injertaron sobre naranjo dulce 66 híbridos *C. aurantium* L. x *P. trifoliata* (L.) Raf. Una vez desarrollados estos injertos se inoculó, por injerto en el patrón dulce, un aislado común de CTV de la colección del IVIA. La presencia del virus fue evaluada en dos años sucesivos mediante el método de inmunoimpresión y, al final del segundo año, se cuantificó mediante la técnica ELISA-DAS. Según los resultados de este análisis, los híbridos se pudieron clasificar claramente en tres grupos: resistentes, y susceptibles de poca y gran multiplicación/distribución del virus.

El análisis de más de 150 marcadores de ADN (microsatélites, SCARs e IRAPs) ha permitido la obtención de un mapa genético para cada especie parental. La utilización de estos mapas en el análisis de QTL ("Quantitative Trait Loci") de multiplicación/distribución del virus pone de manifiesto la implicación de más de una región genómica. La de mayor contribución corresponde al locus *Ctr* de *P. trifoliata*, que al igual que la implicada en *C. aurantium*, contiene un análogo de gen de resistencia.

El 50% de los híbridos desarrolló "acorchamiento de las nerviaduras" como consecuencia de la presencia del virus en el patrón dulce. Esta característica, que se comporta como monogénica, se localiza en una única región genómica de *C. aurantium*, entre dos nuevos loci microsatélites.

Estos resultados son directamente aplicables a la elección de parentales y a la selección precoz dentro de programas de mejora de patrones de cítricos.

O-38

INTRODUCCIÓN DE MICROORGANISMOS BENEFICIOSOS EN EL CULTIVO DEL FRESÓN SOMETIDO A TRATAMIENTOS DE SOLARIZACIÓN Y DESINFECCIÓN QUÍMICA.

Camprubí, A., Calvet, C., Estaún, V., Sabadell, S., Ferrer, I. y Aguado, A.

Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentàries (IRTA), Dept. de Protecció Vegetal, Ctra. de Cabrils s/n, 08348 Cabrils, Barcelona.

Los conocimientos actuales sobre los efectos nocivos de los pesticidas en el medio ambiente, la acumulación de residuos en los frutos y la toxicidad en el hombre, han llevado a plantear la utilización de métodos alternativos a la desinfección química de los suelos. En el presente trabajo se ha estudiado el efecto de la solarización, de la desinfección química con Metam-sodio y de la utilización simultánea de microorganismos beneficiosos: micorrizas arbusculares (MA), antagonistas microbianos como *Trichoderma aureoviride* y bacterias promotoras del crecimiento de las plantas (PGPR), en el cultivo del fresón. Al iniciarse el proceso de producción todas las plantas inoculadas o no con el hongo formador de micorrizas arbusculares *Glomus intraradices* presentaban la simbiosis. No se observaron diferencias significativas entre la solarización y la aplicación de Metam-sodio en el control de malas hierbas y en el rendimiento del cultivo. Los tratamientos con microorganismos no influyeron en el rendimiento final del cultivo posiblemente debido a la ausencia de patógenos de suelo y a la micorrización generalizada de todas las plantas.

Para valorar los efectos de la desinfección del suelo sobre las poblaciones nativas de hongos formadores de micorrizas arbusculares se determinó el número más probable de propágulos infectivos antes y después de la aplicación de la solarización, la desinfección con Metam-sodio y con Bromuro de Metilo. La solarización y la aplicación de Metam-sodio redujeron las poblaciones de micorrizas sin llegar a eliminarlas; por el contrario, la fumigación con Bromuro de Metilo eliminó las poblaciones naturales.

O-39

ANÁLISIS DE LA SUSCEPTIBILIDAD DE PATRONES DE FRUTALES A *Agrobacterium tumefaciens* MEDIANTE REGRESIÓN LOGÍSTICA

Lastra, B. ⁽¹⁾, Cubero, J. ⁽¹⁾, Carbonell, E. ⁽¹⁾, Pinochet, J. ⁽²⁾ y López, M. M. ⁽¹⁾

⁽¹⁾ Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA), Apartado Oficial, 46113 Moncada, Valencia. ⁽²⁾ Agromillora Catalana, El Rebato s/n. 08739 Subirats, Barcelona.

La susceptibilidad de patrones de frutales a *Agrobacterium tumefaciens* no ha sido abordada en ensayos comparativos, a pesar de ser su conocimiento especialmente necesario en el caso de replantaciones en suelos en los que se sospecha la presencia de la bacteria. Asimismo, las fuentes de resistencia podrían ser muy útiles para programas de obtención de nuevos patrones.

En los años 1998 y 1999 se realizaron dos ensayos de susceptibilidad a tres cepas de *Agrobacterium tumefaciens* (B6, C58 y 251-21) comparando, respectivamente 12 y 16 patrones de frutales de hueso. Se inocularon 50 plantas por patrón y cepa de *Agrobacterium* evaluándose en ellas tanto la sensibilidad en cuello y raíz como en la parte aérea. Las plantas fueron heridas en raíz y cuello y el substrato inoculado a una dosis de 10^7 ufc/ml. También se hicieron heridas en el tallo de las plantas que fueron inoculadas con una suspensión de 10^9 ufc/ml de cada cepa patógena de *Agrobacterium*.

Se analizó como variable dependiente el número de tumores presentes en los puntos de inoculación y en las raíces. También se observó la presencia de tumores en puntos no inoculados debidos a la migración sistémica de *Agrobacterium* en estos huéspedes. Los datos fueron analizados mediante regresión logística asumiendo una distribución binomial de los mismos.

El análisis reveló la existencia de una fuerte interacción entre patrón y cepa inoculada. La cepa B6 de *Agrobacterium tumefaciens* utilizada en el ensayo resultó ser menos agresiva que las otras dos en cualquiera de los patrones. Ninguno de los patrones fue inmune a la inoculación sin embargo, Torinel fue el menos susceptible a todas las cepas seguido por Deep Purple. El resto de los patrones comparados (Adesoto 101, Barrier, Cadaman, GF-8.1, G x N 22, GF677, Laroda, Marianna 2624, Marianna 4001, Mirobolan 29C, Monegro, Myrocal, AC-952, AC-959, AC-9501 y AC-9502) presentaban niveles de susceptibilidad similares a todas las cepas de *Agrobacterium* inoculadas y se pueden considerar como muy sensibles.

El modelo de regresión logística resulta muy adecuado para el análisis de este tipo de ensayos porque no es necesario transformar los datos para ser ajustados a una distribución normal, lo que hace más fácil su interpretación biológica. Además, el cálculo de las Odds Ratio permite cuantificar la susceptibilidad con un nivel de confianza del 99.5%.

O-40

PROTECCIÓN FRENTE A *Phytophthora citrophthora* EN PLANTAS TRANSGÉNICAS DE NARANJO QUE EXPRESAN EL GEN DE LA PROTEÍNA RELACIONADA CON PATOGÉNESIS P23 DE TOMATE

Fagoaga, C.¹, Rodrigo, I.², Conejero, V.², Hinarejos, C.¹, Tuset, J.J.¹, Arnau, J.¹, Pina, J.A.¹, Navarro, L.¹ y Peña, L.¹

¹Dpto. Protección Vegetal y Biotecnología. Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA). Apartado Oficial. 46113- Moncada. Valencia.

² Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas, Universidad Politécnica de Valencia - Consejo Superior de Investigaciones Científicas. Camino de Vera s/n. 46022- Valencia.

Phytophthora citrophthora es el hongo patógeno más dañino y más ampliamente extendido por todas las áreas citrícolas del mundo. Produce principalmente las enfermedades conocidas como gomosis, podredumbre del cuello de la raíz y parte basal del tronco y aguado o podredumbre marrón de los frutos. La gomosis es una podredumbre de la corteza que, en casos extremos, llega a producir la estrangulación y consiguiente muerte del árbol. Tradicionalmente, *Phytophthora* se ha controlado mediante el uso de portainjertos tolerantes, medidas culturales y tratamientos con agroquímicos muy caros. Sin embargo, hay pocos portainjertos de calidad tolerantes a *Phytophthora*, lo cual limita el desarrollo de la citricultura en ciertas áreas.

La expresión constitutiva de proteínas implicadas en los mecanismos de defensa de las plantas frente a la enfermedad es una de las estrategias propuestas para incrementar su tolerancia frente a hongos. La proteína P23 es una PR de 23 KDa similar a osmotinas y es inducida en plantas de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill. cv. Rutgers) cuando se infectan con CEVd (Citrus Exocortis Viroid). Se ha demostrado la actividad antifúngica de esta proteína en ensayos *in vitro*. Para investigar su papel *in vivo*, se produjeron plantas de naranjo dulce transgénicas (*Citrus sinensis* L. Osb. cv. Pineapple) que portaban un gen quimérico conteniendo la secuencia codificante de la proteína PR de tomate P23 bajo el promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor. Nueve líneas transgénicas regeneradas expresaron constitutivamente la proteína PR. Se inocularon trozos de corteza de estas plantas con *Phytophthora citrophthora* y se observó una reducción significativa en el desarrollo de las lesiones producidas por el hongo en una de las líneas transgénicas en comparación con las plantas control. Cuando plantas propagadas de esta misma línea se inocularon con cultivos del hongo, se consiguieron porcentajes de supervivencia mayores que en las plantas control. Estos resultados demuestran la actividad antifúngica *in vivo* de la proteína de tomate P23 frente a *Phytophthora citrophthora*, y sugieren que esta estrategia podría ser empleada con éxito para controlar a *Phytophthora* en cítricos.

O-41

PROTECCIÓN FRENTE AL VIRUS DE LA TRISTEZA DE LOS CÍTRICOS EN PLANTAS TRANSGÉNICAS DE LIMA MEXICANA CON EL GEN DE LA PROTEÍNA DE LA CÁPSIDA

Domínguez, A. , Guerri, J. , Pina, J.A., Cambra, M., Hermoso, A., Moreno, P., Navarro, L. y Peña, L. .

Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias. Apdo. Oficial 46113. Moncada. Valencia.

El virus de la tristeza de los cítricos (CTV) causa una de las enfermedades más importantes de este cultivo. Este virus provoca el decaimiento de naranjos, mandarinos y pomelos injertados sobre naranjo amargo, lo que ha obligado en la mayor parte de los países citrícolas a abandonar el patrón naranjo amargo y sustituirlo por otros tolerantes al virus. Hasta el momento, no se han desarrollado formas estables de protección. En los últimos 10 años, una de las estrategias más prometedoras de protección frente a virosis ha sido la transformación genética de plantas con secuencias virales. El gen más utilizado ha sido el que codifica la proteína de la cápsida (CP) viral, que ha conferido protección eficaz en numerosos sistemas planta-virus. En el presente trabajo se ha transformado lima Mexicana (*Citrus aurantifolia*. Swing.) con los genes que codifican las CP de los aislados españoles T317 y T305 de CTV, el primero es asintomático, mientras que el segundo es muy virulento en varias especies de cítricos. La lima Mexicana es una especie muy sensible a este virus y se utiliza rutinariamente para el diagnóstico de la enfermedad mediante pruebas de infectividad, lo que la convierte en una planta modelo para la evaluación de la protección frente a CTV.

Para evaluar la protección desarrollada en las plantas transgénicas, éstas se han inoculado mediante injerto de corteza con el aislado T305 de CTV, y mediante pulgones (*Aphis gossypii* Glover), vector natural de CTV, con el aislado T300, muy transmisible. En las brotaciones posteriores a la inoculación se ha seguido el desarrollo de la sintomatología de la enfermedad y la acumulación de virus mediante ELISA. Se han evaluado más de 50 líneas transgénicas, y el comportamiento que han mostrado ha sido básicamente de dos tipos:

(1) líneas que no han desarrollado ningún grado de protección frente a CTV, comportándose de forma similar a las de lima Mexicana no transgénica. En general, estas líneas muestran una acumulación de CTV-CP baja o indetectable.

(2) líneas que han mostrado retraso en la aparición de síntomas, atenuación de los mismos, y/o ausencia de estos en algunas de las plantas inoculadas. Cuando se inoculan propagaciones de estas plantas asintomáticas, un porcentaje similar de las propagaciones se muestra resistente. Estas líneas presentan en su mayoría niveles de acumulación de CTV-CP altos o muy altos. A este grupo pertenecen también líneas con el transgén CP procedente del aislado T317, por lo que la protección observada no parece ser muy dependiente de la homología de secuencia.

En base a las características moleculares de las plantas transgénicas y al tipo de protección observada, el efecto del transgén parece ajustarse a un modelo de protección mediada por proteína de cápsida.

O-42

SILENCIAMIENTO GÉNICO: HACIA UN NUEVO VECTOR PARA IDENTIFICAR FUNCIÓN DE GENES EN PLANTAS

Martin-Hernandez, A.M., Ratcliff, F. y Baulcombe, D.C.
The Sainsbury Laboratory, John Innes Centre, Norwich NR4 7UH, UK.

El silenciamiento génico es un fenómeno que en ocasiones ocurre en plantas tras la inserción de múltiples transgenes o tras la infección con un virus que lleva algún gen presente en el genoma celular. Se manifiesta como la ausencia de expresión tanto del gen introducido como del previamente existente en la célula. Este fenómeno se lleva estudiando muchos años en nuestro laboratorio usando como vector viral el virus X de la patata (PVX) para silenciar específicamente genes en *N. benthamiana*. PVX presenta algunas limitaciones, como su incapacidad para infectar *A. thaliana* o para invadir meristemos. Para superar estos y otros problemas hemos desarrollado un nuevo vector basado en tobacco rattle virus (TRV), virus que cumple ambas características. El genoma de TRV consta de dos RNAs de cadena positiva. El RNA 1 puede replicarse y moverse autónomamente. El RNA 2 codifica para la proteína de la cápsida y para genes requeridos para la transmisión por nemátodos. El clonaje del RNA 1 ha sido el factor limitante para el desarrollo de este nuevo vector, pero recientemente hemos conseguido en nuestro laboratorio un clon de este RNA que es infeccioso cuando se inocula solo y que es capaz de replicar al RNA 2. Para comprobar la eficacia del nuevo sistema hemos silenciado con éxito algunos genes en *A. thaliana* y en *N. benthamiana*, incluyendo NFL, un gen implicado en desarrollo floral y hemos comprobado que el nuevo clon aumenta la eficacia y reproducibilidad de silenciamiento respecto al RNA 1 natural.

O-43

EL DOMINIO PROTEASA DE LA PROTEÍNA N1a DEL VIRUS Y DE LA PATATA (PVY) INDUCE LA RESPUESTA MEDIADA POR *Ry*

Mestre, P., Brigneti, G. y Baulcombe, D.C.

The Sainsbury Laboratory, John Innes Centre, Norwich, NR4 7UH, UK.

Ry es un gen dominante procedente de *Solanum stoloniferum* que en patata confiere resistencia extrema frente a todos los aislados conocidos del virus Y de la patata (PVY). La resistencia mediada por *Ry* presenta varios aspectos en común con la resistencia frente al virus X de la patata (PVX) mediada por el gen *Rx*: las plantas resistentes no muestran síntomas macroscópicos tras ser inoculadas, no se puede detectar acumulación viral mediante ELISA o hibridación de RNA y la resistencia es activa en protoplastos. Ambos genes son distintos de otros genes de resistencia conocidos, en los que la resistencia da lugar a una respuesta hipersensible con muerte celular. *Rx* pertenece a la clase de genes de resistencia conocidos como NBS-LRR. *Rx* reconoce específicamente la proteína de la cápsida de aislados avirulentos del PVX activando la respuesta de resistencia extrema; sin embargo, se ha visto que la expresión constitutiva de la proteína de la cápsida del PVX da lugar a una respuesta hipersensible mediada por *Rx*.

Ry ha sido mapeado en el cromosoma XI del genoma de la patata en un "cluster" de genes de resistencia, pero no se sabe nada sobre los factores virales implicados en la interacción entre PVY y *Ry*. Basándonos en las similitudes que presentan las resistencias mediadas por *Ry* y *Rx*, predijimos que alguna de las proteínas codificadas por PVY sería el elicitador de la resistencia mediada por *Ry* y que se podría observar una respuesta hipersensible cuando el elicitador fuera expresado constitutivamente en lugar de ser expresado por el virus. En base a esta predicción, cada una de las putativas proteínas virales se expresó de manera constitutiva en hojas de plantas de patata resistentes (*Ry*) y susceptibles (*ry*) al PVY. Nuestros resultados indican que el dominio proteasa de la proteasa N1a del PVY es el elicitador de la resistencia mediada por *Ry*. Mutaciones en el centro activo de la proteasa eliminan su capacidad para activar la respuesta mediada por *Ry*, indicando una posible implicación del centro activo en la activación de la resistencia.

O-44

DOS MECANISMOS EN LA RESISTENCIA TRANSGÉNICA CONFERIDA POR EL ARN 1 DE CMV: UNO DE SUPRESIÓN DEL ARN HOMÓLOGO VIRAL PERO NO DEL TRANSGÉNICO, Y OTRO DE BLOQUEO A NIVEL DEL FLOEMA

Canto, T. y Palukaitis, P.

Scottish Crop Research Institute. Virology Department. Invergowrie, Dundee DD2 5DA. Escocia, UK.

La resistencia sistémica al virus del mosaico del pepino (cucumber mosaic virus, CMV) en plantas de tabaco transgénicas para el ARN 1 de CMV conlleva: A, la supresión específica del ARN 1 en hoja inoculada, y B, la inhibición del movimiento de larga distancia del virus, aunque no del movimiento célula a célula (Canto y Palukaitis, 1998). Análisis posteriores en protoplastos mostraron que esta supresión del ARN 1 opera constitutivamente a nivel celular y no está influenciada por el movimiento viral. En células resistentes la acumulación de vectores virales se redujo o suprimió cuando éstos contenían secuencias de la región 3' del ARN 1, identificándola como blanco del mecanismo de supresión. Sin embargo, se encontraron niveles superiores de ARN mensajero del transgen en las plantas resistentes a CMV que en las susceptibles, lo que indica que el ARN transgénico no es blanco del mecanismo de supresión asociado a la resistencia. Por otro lado, el uso de injertos utilizando material de líneas transgénicas resistentes o susceptibles a CMV, así como no transformado, demostró que la ausencia de movimiento a larga distancia de CMV en plantas resistentes está asociada con la incapacidad del virus para entrar en el floema. En los mismos experimentos con injertos, CMV transportado por el floema infectó sistémicamente tejidos de plantas resistentes. En este caso, la supresión del ARN 1 no se observó en los tejidos infectados. En base a estos datos presentamos un modelo que explica la resistencia a CMV en estas plantas.

O-45

PAPEL DEL METABOLISMO DEL NITRÓGENO EN LA REGULACIÓN DEL GEN DE AVIRULENCIA *Avr9* DEL HONGO BIOTROFO PATÓGENO DE TOMATE *Cladosporium fulvum*

Pérez-García A.¹, de Vicente, A.¹ y De Wit, P.J.G.M.²

¹Depto. Microbiología, Fac. de Ciencias, Univ. de Málaga.

²Laboratory of Phytopathology, Wageningen University, The Netherlands

Se ha demostrado la existencia en bacterias y hongos fitopatógenos de una serie de genes que se activan durante la penetración y colonización del hospedador. Uno de estos es el gen de avirulencia *Avr9* de *Cladosporium fulvum*, responsable de la inducción de HR en plantas de tomate portadoras del gen de resistencia *Cf9*. La función del péptido AVR9 es desconocida, pero el conocimiento de su regulación aportar información para establecer su función biológica. En los hongos filamentosos *Aspergillus nidulans* y *Neurospora crassa* la asimilación de compuestos nitrogenados está bajo el control de dos genes principales, un activador y un represor, denominados *areA* y *nmrA* en *A. nidulans* y *nit-2* y *nmr-1* en *N. crassa*. Un mecanismo de regulación similar posiblemente controle la expresión del gen de avirulencia *Avr9*. Primero, *Avr9*, aunque es un gen inducido en planta, puede ser inducido *in vitro* en condiciones limitantes de nitrógeno. Segundo, en el promotor de *Avr9* existen varias copias de la secuencia (TA)GATA, que han sido identificadas como sitios de unión de las proteínas reguladoras del metabolismo del nitrógeno AREA y NIT2.

Para demostrar la implicación del metabolismo del nitrógeno de *C. fulvum* en la regulación del gen de avirulencia *Avr9*, hemos aislado los genes reguladores homólogos de *C. fulvum* para generar transformantes de *C. fulvum* donde dichas actividades génicas estén suprimidas y estudiar en ellos la expresión de *Avr9*. El gen homólogo a *areA/nit-2*, denominado *Nrf1*, fue clonado parcialmente mediante PCR y posteriormente aislado en su totalidad a partir de una genoteca. Su función como regulador del metabolismo del nitrógeno fue comprobada mediante la complementación de un mutante de *A. nidulans* deficiente en *areA*. Los transformantes de *A. nidulans* mostraron asimilación de compuestos nitrogenados idéntica al fenotipo salvaje, lo que sugiere que *Nrf1* y *areA* tienen una función similar. Además, el análisis de la secuencia de aminoácidos deducida para la proteína NRF1 reveló una alta homología con AREA y otras proteínas similares. Mediante técnicas de interrupción génica se obtuvieron transformantes de *C. fulvum* deficientes en *Nrf1*. En éstos la asimilación de compuestos nitrogenados estaba alterada y la inducción *in vitro* de *Avr9* suprimida, sin embargo, en plantas infectadas con tales transformantes se detectaron niveles residuales del péptido, lo que sugiere mecanismos de regulación adicionales. Para establecer el papel del gen homólogo a *nmrA/nmr-1*, denominado *Cf-Nmr1*, estamos siguiendo una aproximación experimental similar.

O-46

LOS GENES DE AVIRULENCIA SON TAMBIÉN LOS PRINCIPALES DETERMINANTES DE PATOGENICIDAD Y VIRULENCIA EN *Pseudomonas syringae*

Sesma, A.¹, Jackson, R.W.², Tsiamis, G.³, Athanassopoulos, E.³, Vivian, A.², Mansfield, J.W., Arnold, D.L.², Stevens, C.³, Taylor, J.⁴ y Murillo, J.¹

¹Depto. Producción Agraria, Univ. Pública de Navarra, Pamplona. ²Dept. Biological Sciences, Univ. West of England, Bristol, GB. ³ Dept. Biological Sciences, Wye College, Wye, Kent TN25 5AH, G.B. ⁴HRI, Wellesbourne, Warwick CV35 9EF, G.B.

El espectro de huésped en patógenos de plantas está definido por la acción coordinada de factores “positivos” (patogenicidad y virulencia) y “negativos” (avirulencia). La acción de los genes de avirulencia (*avr*) impide la infección de determinadas especies o cultivares de plantas, reduciendo el espectro de huésped del patógeno. Aunque se han realizado avances en el estudio de los genes *avr* y los mecanismos de resistencia, los factores que permiten al patógeno infectar a un huésped son poco conocidos. Nosotros hemos abordado la identificación de estos factores, utilizando la bacteria *Pseudomonas syringae* pv. phaseolicola (Pph), que puede infectar a judía y a soja, y cuya estructura en razas está bien caracterizada. Hemos diseñado estrategias de mutagénesis con transposones, complementación de cepas con baja virulencia, y eliminación de plásmidos nativos. Siguiendo esta última metodología hemos obtenido la cepa RW60, que carece del plásmido de mayor tamaño (pAV511), a partir de la cepa 1449B de la raza 7 de Pph. Al contrario que la cepa silvestre, RW60 no produce enfermedad en judía ni en soja, ni induce la HR en determinados cvs. de soja, como Osumi. Hemos aislado diversos cósmidos que complementan este fenotipo, y que definen una región de aprox. 30 kb en la que se han localizado, mediante hibridación y secuenciación, tres genes de avirulencia previamente descritos (*avrD*, *avrPphC* y *avrPphF*), tres ORFs precedidos por secuencias de regulación por HrpL, y diversas secuencias homólogas a IS100 de *Yersinia* y Tn501 de *P. aeruginosa*. Una de las ORFs, denominada *virPphA*, condujo en RW60 a la complementación parcial de la patogenicidad en todos los cvs. de judía analizados, actuando asimismo como un gen de avirulencia en diversos cvs. de soja. El gen *avrPphF* condujo asimismo a una complementación parcial en RW60 de la patogenicidad en judía, aunque exclusivamente en el cv. Tendergreen, y a un aumento significativo de la virulencia en todos los cultivares de soja analizados. Además, *avrPphF* se comportó como un gen de avirulencia en los cvs. de judía Red Mexican y Canadian Wonder, aunque en este último el fenotipo de avirulencia está bloqueado en la cepa silvestre por la acción de otro gen de avirulencia, *avrPphC*. En conjunto, estos resultados muestran que el fenotipo conferido por diversos genes de avirulencia (patogenicidad, virulencia o avirulencia) depende de factores complejos, siendo los más importantes la especie y la variedad de la planta huésped y las interacciones con otros genes de avirulencia de la misma célula. Por último, la agrupación de genes de virulencia y avirulencia junto con elementos transponibles y el hecho de tener un contenido bajo en G+C, indican que la región de 30 kb de pAV511 podría ser una “isla de patogenicidad” similar a las que existen en patógenos de animales.

O-47

MECANISMO DE EXPRESIÓN DEL VIRUS DEL MANCHADO FOLIAR DE LOS CÍTRICOS

Vives, M.C., Galipienso, L., Moreno, P. y Guerri, J.

Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias. Apdo. oficial 46113 Moncada, Valencia.

El virus del manchado foliar de los cítricos (citrus leaf blotch virus, CLBV) se purificó a partir de un kumquat Nagami que inducía, entre otros síntomas, la incompatibilidad de algunas variedades comerciales de cítricos sobre citrange, que es el patrón tolerante a tristeza más utilizado en España. Los viriones de CLBV son partículas filamentosas de 960 x 14 nm formadas por una molécula de RNA monocatenario de cadena positiva y subunidades de una proteína capsídica de 42 kD. El genoma del virus contiene 8.747 nt y está organizado en tres marcos de lectura abierta (ORFs). El ORF 1 codifica una poliproteína de 227 kD que contiene los dominios metil-transferasa, proteasa, helicasa y polimerasa; el ORF 2 codifica una proteína de 40 kD que presenta similitud con las proteínas de movimiento célula-célula de la familia 30 K y el ORF 3 codifica la proteína capsídica.

Ensayos de hibridación molecular en "Northern blot" con extractos de RNA bicatenario (dsRNA) y sondas de distintas regiones del genoma viral, permitieron la detección de 5 dsRNAs de aproximadamente 8, 6.5, 5.5, 3 y 2 kpb. El dsRNA de 8 kpb corresponde a la forma replicativa del genoma del virus, mientras que los dsRNAs de 2 y 3 kpb son formas replicativas de los RNAs subgenómicos 3'coterminales y permiten la expresión de los ORFs que codifican las proteínas de 40 y 42 kD respectivamente. Sorprendentemente los dsRNAs más abundantes son los de 6.5 y 5.5 kpb y corresponden a RNAs subgenómicos 5'coterminales con el genoma del virus. Ensayos de hibridación en "Northern blot" con RNAs purificados de viriones pusieron de manifiesto que tanto el RNA genómico del virus como los RNAs subgenómicos de 2 y 3 kb se encuentran encapsidados.

Para determinar el inicio de la transcripción de los RNAs subgenómicos 3' coterminales se clonó y secuenció la región 5' terminal de los mismos. El inicio de los RNAs subgenómicos de la proteína de movimiento y de la cápsida se encuentran 123 y 284 nt, respectivamente, antes del codón de iniciación de cada ORF. En ambos casos la secuencia es colineal con el RNA genómico y el inicio de la transcripción de los RNAs subgenómicos (GAAAAG) es idéntico al inicio del genoma del virus, lo que sugiere que puede ser una secuencia determinante para el inicio de la replicación.

Para determinar el final de la transcripción de los RNAs subgenómicos 5' coterminales se clonó y secuenció la región 3' terminal de los mismos. El dsRNA de 6.5 kpb termina 255 nt antes del codón de terminación de la proteína de movimiento y el de 5.5 kpb 164 nt antes del codón de terminación de la poliproteína, lo que sugiere que al menos el segundo no debe tener función codificante.

O-48

CARACTERIZACIÓN DE LA RESPUESTA DE DEFENSA EN *Capsicum chinense* (L³L³) FRENTE AL VIRUS DEL MOTEADO SUAVE DEL PIMIENTO (PMMoV).

Gilardi, P., Castillo-Lluva, S., Elvira, M.I., García-Luque, I., y Serra, M.T.

Dpto . Biología de Plantas, C.I.B., C.S.I.C., Velázquez 144, Madrid 28006.

Las virosis constituyen un grave problema en los cultivos de pimiento en todo el mundo, siendo las cepas pimiento de los tobamovirus uno de los principales agentes causales de enfermedades en este cultivo. La resistencia frente a estos virus en el género *Capsicum* está conferida por cuatro genes diferentes L¹, L², L³ y L⁴, posiblemente alelos del locus L (Boukema, 1980. *Euphytica* 29:433; Boukema, 1982. *Capsicum Newslet.* 3:47). La resistencia mediada por el gen L³ es activa frente a todos los tobamovirus excepto a algunas cepas del virus del moteado suave del pimiento (PMMoV), tales como la cepa I.

Hemos utilizado las cepas S e I del virus PMMoV para caracterizar la respuesta de defensa en plantas de *C. chinense* (L³L³). PMMoV-S activa la resistencia conferida por el gen L³ mientras que PMMoV-I escapa a su acción. Hemos determinado que la reacción de defensa resulta en la restricción de la cepa avirulenta a la hoja inoculada así como en un bloqueo de la acumulación de los productos virales (RNAs y proteínas) de PMMoV-S. Por el contrario, la acumulación de los RNAs y proteínas virales de ambas cepas es similar en los protoplastos de este huésped, indicando que esta resistencia no se expresa a nivel celular.

En plantas, hemos observado que asociada a la reacción de defensa frente a PMMoV-S se induce

la acumulación temprana de especies reactivas de oxígeno, cuyo máximo entre las 8 y 10 horas

post inoculación (h.p.i.) precede inmediatamente a la detección de la muerte celular (12 h.p.i.),

mientras que la acumulación de dos marcadores de la fortificación de la pared celular, como son

la callosa y los compuestos fenólicos autofluorescentes, es más tardía.

El sistema PMMoV-*C. chinense* (L³L³) nos ha permitido determinar que la respuesta de defensa de estas plantas frente a PMMoV-S reúne las características de una típica respuesta hipersensible.

O-49

ANÁLISIS DEL MOVIMIENTO SISTÉMICO DEL VIRUS DEL MOTEADO MOSAICO VERDE DEL PEPINO.

Moreno, I.M., Thompson, J.T., Simón Buela, L. y García Arenal, F.
Dpto. de Biotecnología, E.T.S.I.Agrónomos, Universidad Politécnica de Madrid.

Uno de los procesos esenciales para la infección viral en plantas, es el movimiento sistémico que tiene lugar a través del sistema vascular del huésped. La mayoría de los virus de plantas se transportan a través del floema en un movimiento paralelo al flujo del fotoasimilado aunque también se ha descrito el movimiento xilemático de algunos virus cuya infección no está confinada al sistema vascular (1). Las distintas rutas de transporte dan lugar a patrones diferentes de distribución de la infección viral. El *Virus del mosaico del tabaco* (TMV, Género *Tobamovirus*) es un ejemplo de virus que se transporta a través del floema, sin bien se han descrito mutantes de TMV que dan lugar a infecciones sistémicas con una distribución compatible con el transporte xilemático. En trabajos anteriores realizados en el laboratorio, se han obtenido evidencias que muestran que el *Virus del moteado mosaico verde del pepino* (CGMMV, Género *Tobamovirus*) se transporta a través del floema de pepinos en forma de partícula viral (2). También se ha observado que las partículas virales presentes en el floema son más estables que las partículas purificadas frente a la digestión del RNA viral con ribonucleasas. La estabilización de la partícula viral en el floema es el resultado de interacciones con proteínas presentes en el exudado floemático de pepinos y sugiere que el transporte floemático no es un proceso meramente pasivo.

Por otra parte se ha estudiado mediante técnicas de inmunolocalización el progreso de la infección en pepinos inoculados con CGMMV observándose la distribución del virus en el sistema vascular. Estos estudios permiten analizar las rutas de carga, transporte y descarga del virus en órganos inoculados y sistémicamente infectados. Estos análisis han permitido observar la acumulación de CGMMV en células inmaduras del xilema de órganos sistémicamente infectados. En este trabajo se analiza la presencia de CGMMV en el xilema de plantas infectadas y su significado biológico.

1. Jones, R.A.C. (1975). *Phytopathol. Z.* 82, 352-355
2. Simón-Buela L. & García-Arenal F. (1999). *MPMI* 12, 112-118.

O-50

LA EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA p23 DEL VIRUS DE LA TRISTEZA DE LOS CÍTRICOS (CTV) INDUCE SÍNTOMAS DE TIPO VIRAL EN PLANTAS TRANSGÉNICAS DE LIMA

Ghorbel, R.¹, López, C.², Moreno, P.¹, Navarro, L.¹, Flores, R.² y Peña, L.¹

¹Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA), Apdo. Oficial, Moncada 46113, Valencia. ²Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas (UPV-CSIC), Universidad Politécnica de Valencia, Avenida de los Naranjos, Valencia 46022.

Los dos primeros autores contribuyeron igualmente a la realización del presente trabajo.

El virus de la tristeza de los cítricos (CTV) es el agente causal de una de las enfermedades de mayor importancia económica de este cultivo. Su genoma es una molécula de RNA de simple cadena y sentido positivo, con 12 marcos de lectura (ORFs) que potencialmente codifican al menos 17 proteínas. En el extremo 5', la ORF 1a codifica una poliproteína de 349 kDa con dominios de tipo papaína, metiltransferasa y helicasa. La ORF 1b codifica una posible RNA-polimerasa RNA-dependiente. Las 10 ORFs próximas al extremo 3' del genoma se expresan a través de RNA mensajeros subgenómicos 3'-coterminales e incluyen dos proteínas de cápsida de 27 y 25 kDa, una proteína hidrofóbica de 6 kDa, una proteína de 65 kDa con similitudes con las proteínas de choque térmico de tipo HSP70, y otras de 33, 61, 18, 13, 20 y 23 kDa de función desconocida.

La proteína de 23 kDa (p23) es una proteína de unión a RNA y contiene motivos ricos en cisteína e histidina. Por ello, se ha sugerido que podría jugar un papel regulador en la replicación o en la expresión génica del virus. Para explorar si la sobreexpresión de p23 en plantas podría afectar al proceso normal de infección por CTV, se produjeron plantas transgénicas de lima Mexicana (*Citrus aurantifolia* Swing.) que portan el gen p23 o una versión truncada del mismo, bajo el promotor 35S del virus CaMV. Sorprendentemente, la expresión constitutiva de la proteína p23 produjo fenotipos aberrantes en las plantas transgénicas, semejantes a los síntomas que produce CTV en plantas de lima no transgénicas. Las plantas transformadas con la versión truncada del transgén p23 mostraron un aspecto normal. Se observó además una correlación directa entre la severidad de los síntomas y los niveles de acumulación de dicha proteína en las plantas transgénicas. Estos resultados revelan que la proteína p23 está implicada en el desarrollo de los síntomas y que probablemente tiene un papel esencial en la patogénesis viral. Este es el primer caso en que se demuestra la implicación de una proteína de un virus de leñosas en el desarrollo de los síntomas en su huésped natural. Además, este resultado delimita la búsqueda de los determinantes específicos de patogenicidad a una región muy pequeña del genoma de CTV.

O-51

CARACTERIZACIÓN DE ESPECIES DE *Pratylenchus* MEDIANTE RAPD-PCR

Carrasco Ballesteros, S., Castillo, P. y Pérez- Artés, E.

Departamento de Protección de Cultivos. Instituto de Agricultura Sostenible. CSIC.Apdo. 4084. 14080 Córdoba.

Los nematodos lesionadores de raíz (*Pratylenchus* spp.) constituyen por sí mismos, o en conjunción con hongos fitopatógenos de suelo, un factor importante en el desarrollo de enfermedades en cultivos de interés agronómico. Investigaciones en nuestro grupo sobre la incidencia y distribución de nematodos fitopatógenos en viveros de olivo en Andalucía, demuestran una moderada incidencia de infecciones por *P. penetrans* y *P. vulnus*. Asimismo, se han detectado poblaciones de *P. thornei* en suelo y raíces de cultivos de garbanzo en las principales zonas productoras del valle del Guadalquivir. El diagnóstico de ataques por nematodos fitopatógenos, especialmente los lesionadores de raíz, resulta particularmente complejo debido a la sintomatología inespecífica en la parte aérea, e incluso en el sistema radical, de la planta infectada. Ello hace que las infecciones puedan pasar desapercibidas para técnicos y agricultores, con el consiguiente riesgo de propagación involuntaria de inóculo por distribución de material vegetal infectado. La utilización de métodos de diagnóstico molecular basados en la PCR para la identificación de nematodos constituye una alternativa interesante a la caracterización morfológica. El objetivo del presente trabajo ha sido identificar polimorfismos de ADN asociados a diferentes *Pratylenchus* spp. mediante RAPD-PCR, con especial énfasis en *P. thornei*.

Se han utilizado un total de 19 poblaciones de nematodos, incluyendo *P. thornei*, *P. penetrans*, *P. vulnus* y *P. fallax*, así como especies de *Meloidogyne*, *Heterodera*, *Radopholus*, *Ditylenchus* y *Zygotylenchus*. Dichas poblaciones se incrementaron en cultivos monoxénicos de una única hembra en discos de zanahoria. Los nematodos se extrajeron asépticamente del cultivo mediante centrifugación, y el pellet constituido por los huevos, juveniles y adultos se utilizó para la extracción del ADN. Las mezclas de reacción y los ciclos de temperatura, se optimizaron y se realizaron análisis RAPD con 12 cebadores arbitrarios del "kit" E de Operon. Cuatro de los cebadores (OPE-02, OPE-08, OPE-11 y OPE-13) dieron lugar a la amplificación de fragmentos de ADN potencialmente asociados con *P. thornei*. La especificidad de dicha asociación está siendo confirmada mediante pruebas de hibridación.

Los perfiles de amplificación obtenidos con todos los cebadores y poblaciones ensayados se han utilizado para determinar la relación entre éstas por el método UPGMA.

*Investigaciones subvencionadas por el proyecto AGF98-0878

O-52

INTERACCIÓN ENTRE *Meloidogyne artiellia* Y *Fusarium oxysporum* f.sp. *ciceris* EN CULTIVARES DE GARBANZO

Castillo, P., Gomar Tinoco, D., Navas Cortés, J.A., Di Vito, M. y Jiménez Díaz, R.M.

Departamento de Protección de Cultivos. Instituto de Agricultura Sostenible. CSIC. Alameda del Obispo s/n, Apdo. 4084, 14080 Córdoba.

La Fusariosis Vascular del garbanzo (FVG), causada por *Fusarium oxysporum* f.sp. *ciceris*, y las infecciones por *Meloidogyne artiellia*, son factores limitantes de la producción del cultivo. La medida de control de la FVG más efectiva, económica y sostenible es la utilización de cultivares resistentes. Sin embargo, la durabilidad de ésta resistencia puede ser comprometida por la coinfección de la planta por ambos agentes fitopatógenos. Investigaciones recientes en nuestro laboratorio, han demostrado que la coinfección de cultivares de garbanzo resistentes o susceptibles a *F.o. ciceris* raza 5 (Foc-5) por *Pratylenchus thornei* no modifica la respuesta del garbanzo a la FVG. La estrategia de parasitismo por *M. artiellia* difiere substancialmente de la de *P. thornei*, sin embargo, no existe información respecto de la influencia que la coinfección por *M.artiellia* y *F.o.ciceris* pueda ejercer sobre el desarrollo de la FVG. El objetivo de este trabajo ha sido determinar la reacción de cultivares de garbanzo de diferente reacción a Foc-5 frente a la coinfección por Foc-5 y *M.artiellia*. Se han realizado tres experimentos en condiciones controladas favorables para el desarrollo de la FVG, utilizando cultivares de garbanzo con resistencia parcial ('CPS1', 'PV 61', 'CA-252-10-1-OM', 'CA-255-2-5-0'), o completa ('UC 27', 'Surutato', 'CA-334-20-4', 'CA336.14.3.0', e 'ICC 14') a Foc-5, y susceptibles a *M.artiellia*. Las plantas se inocularon simultáneamente con cada una de dos poblaciones de *M.artiellia* (20 huevos y juveniles/cm³ de suelo) y dos densidades de inóculo (3.000 y 30.000 clamidosporas/g de suelo) de Foc-5.

Nuestros resultados demuestran que la severidad de la FVG en los genotipos de garbanzo parcialmente resistentes a Foc-5, es incrementada significativamente por la coinfección del sistema radical de la planta por los dos patógenos, independientemente de la densidad de inóculo del hongo y la población del nematodo. Similarmente, mientras que los cultivares de garbanzo con resistencia completa a Foc-5 permanecieron asintomáticos cuando fueron inoculados únicamente con el hongo; la enfermedad se desarrolló extensamente en todos ellos, excepto ICC14, cuando las plantas fueron coinfectadas por los dos agentes. Todo ello indica que la coinfección por la inoculación simultánea del sistema radical de garbanzo con Foc-5 y *M.artiellia* puede modificar la capacidad de cultivares de garbanzo para impedir total o parcialmente la infección y colonización sistémica de la planta por *F.o.ciceris* y con ello reducir la eficacia de los cultivares resistentes en el control de la FVG. Además, nuestros resultados sugieren que dicho efecto puede ser cultivar-dependiente. Información de esta naturaleza deberá ser necesariamente considerada en los programas de mejora genética a fin de contribuir a la identificación y el desarrollo de cultivares de garbanzo con resistencia durable a *F.o.ciceris*.

*Investigación subvencionada por el Proyecto AGF97-1479

O-53

CARACTERIZACIÓN Y DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE LAS CEPAS DE *Colletotrichum* PATÓGENAS DE PLANTAS DE FRESA

Martínez, P.V.¹, Suárez, B.², García, M^a D.¹ y Querol, A.¹

¹Colección Española de Cultivos Tipo, Universidad de Valencia, Campus de Burjasot, 46100, Valencia.

²Departamento de Microbiología y Genética, Universidad de Salamanca, Avda Campo Charro s/n, 37007, Salamanca.

La antracnosis es una micosis que afecta al cultivo de la fresa y que produce importantes pérdidas económicas en el sector. Los agentes causales son hongos del género *Colletotrichum* pertenecientes a las especies *C. fragariae*, *C. gloeosporioides* y *C. acutatum*. La posible introducción de estos patógenos desde regiones endémicas hacia otras que no lo son, obliga a disponer de unas medidas adecuadas de control. Por este motivo es necesario desarrollar métodos rápidos que nos permitan detectar y diagnosticar las cepas *Colletotrichum* en las plantas de fresa.

Para ello, previamente, se llevo a cabo una caracterización molecular de una colección de cepas de *Colletotrichum* pertenecientes a las especies anteriores. Dicha caracterización se realizó mediante un análisis de restricción del DNA ribosomal que incluye las dos regiones intergénicas ITS1 e ITS 2 y el gen que codifica para el RNA 5.8 S, y mediante el empleo de la técnica de RAPDs. Los resultados permitieron la identificación de las especies y su división en una serie de grupos moleculares. La caracterización se completó con un análisis filogenético utilizando las secuencias del DNA ribosomal de todas aquellas cepas que presentaron variabilidad. El análisis indicó una división principal de las cepas en dos grandes grupos, centrados en las especies *C. acutatum* y *C. gloeosporioides*.

La información obtenida con la caracterización molecular, junto con los datos de secuencia, permitieron desarrollar métodos de diagnóstico por PCR para los patógenos *C. acutatum* y *C. fragariae*, que resultan más eficaces en la detección de estos patógenos que los métodos empleados hasta el momento. Los oligonucleótidos utilizados son específicos para estos patógenos y se pueden utilizar para el diagnóstico en material vegetal. La técnica también es válida para el diagnóstico de infecciones latentes, y podría ser aplicada en la selección de material vegetal libre de patógenos. La utilización de esta tecnología permite obtener resultados en un día de trabajo, frente al tiempo de una o dos semanas requerido por las técnicas convencionales, lo que facilita el transporte de material vegetal a lo largo de la UE bajo las normas de cuarentena.

O-54

DETECCIÓN Y CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* EN FLORIDA

Cubero, J.¹, Graham, J.H.¹, Gottwald, T².

¹University of Florida, Citrus Research and Education Center (CREC). Lake Alfred, Florida, USA and ²USDA-AR-HRL, Ft. Pierce, Florida, USA.

Xanthomonas axonopodis pv. *citri* (*Xac*) es la bacteria responsable de la cancrrosis de los cítricos, una importante enfermedad que afecta a una gran variedad de especies de cítricos y que está caracterizada por la aparición de chancros en hojas, tallos y frutos. Esta patología está extendida a nivel mundial, es endémica en el Sudoeste Asiático y Sudamérica y se ha detectado en algunas zonas de Florida. Aunque el Estado de Florida y el gobierno Federal de los Estados Unidos han llevado a cabo en diferentes épocas programas de erradicación de esta bacteria, año tras año han aparecido y siguen apareciendo nuevos focos de la enfermedad. La diseminación de *Xac* está provocada por factores naturales como tornados, tormentas tropicales o huracanes o consecuencia de la actuación del hombre, fundamentalmente por el trasiego de material vegetal infectado desde unas zonas a otras.

En cualquier programa de erradicación es importante disponer de métodos efectivos de detección y caracterización del agente causal de la enfermedad. En este sentido se ha desarrollado un método de detección por PCR de *Xac* que incluye un control interno de las reacciones. Este control por un lado aumenta la fiabilidad de la detección, al eliminar los posibles falsos negativos provocados por la frecuente presencia de inhibidores de la Taq polimerasa en el material vegetal, y por otro lado hace posible determinar la concentración inicial de la bacteria presente en el material infectado. El control interno diseñado está basado en la construcción de un plásmido que contiene un inserto, generado a partir de un DNA diferente al de *Xac*, pero que posee las secuencias necesarias para ser amplificado con cebadores específicos de esta bacteria.

Además se ha desarrollado un método de caracterización basado en la amplificación por PCR de secuencias repetidas dentro del genoma de las bacterias, que permite identificar de forma precisa la cepa de *Xac* responsable de la infección en una determinada localización y establecer su posible origen. Esta metodología ha sido aplicada en estudios epidemiológicos dentro la península de Florida y también para el establecimiento de relaciones entre *Xac* de otras zonas del mundo. Tanto el método de PCR cuantitativa como la caracterización mediante amplificación de secuencias repetidas son útiles herramientas para los estudios epidemiológicos de esta enfermedad y pueden ser fácilmente exportados a otros modelos bacterianos.

O-55

CARACTERIZACIÓN DE AISLADOS DE PVY ENCONTRADOS EN INFECCIONES NATURALES DE TABACO EN EXTREMADURA

Romero Lorca, A., Fresno, J., Montes, M. y Ponz, F.

INIA, Dpto. Mejora Genética y Biotecnología, Autovía A-6, Km. 7,5. 28040 Madrid.

El virus Y de la patata (PVY) es la especie tipo del género *Potyvirus* de virus de plantas. Además de ser un importante patógeno de patata, infecta de forma natural otros cultivos de solanáceas tales como pimiento, tomate, petunia y tabaco, causando importantes pérdidas en las cosechas. La taxonomía de PVY resultaba confusa debido a los diferentes criterios biológicos y/o serológicos que se aplicaban según el huésped del que proviniese el aislado. Los aislados mejor estudiados son aquellos derivados de patata y pimiento. Los aislados de patata se han clasificado tradicionalmente en Y^O, Y^N e Y^C. La clasificación de los aislados de pimiento se ha basado en la capacidad de vencer una serie de alelos de un gen de resistencia. Los aislados procedentes de tabaco han recibido menor atención y se habían clasificado con respecto a los síntomas producidos en determinados cultivares de tabaco, pero no se había elaborado nunca una clasificación de razas. El uso de diferentes criterios no había permitido la elaboración de una clasificación de los aislados de PVY en verdaderas razas genéticas, independientemente del huésped.

En nuestro laboratorio se ha diseñado un método de tipificación molecular basado en IC-RT-PCR seguida de digestión con enzimas de restricción del fragmento amplificado, para calcular distancias genéticas entre aislados de PVY (que denominamos "restrictotipos" para definirlos taxonómicamente), comparable a las distancias genéticas calculadas directamente por comparación de las secuencias de nucleótidos. Esta rápida tipificación molecular distribuyó los aislados de PVY en tres razas principales: PVY^N y PVY^O, procedentes de patata, y la raza NP (no-patata), incluyendo aislados de pimiento, dos de tabaco y uno de *Datura* spp.

Debido a la falta de clasificación genética de aislados de tabaco, presentamos la caracterización molecular de aislados de PVY muestreados en diferentes localidades de Cáceres durante 1.998 y 1.999. Se recolectaron plantas con síntomas de PVY, se confirmaron por ELISA y la plantas positivas se sometieron a inmunocaptura.RT-PCR seguida de RFLP para su tipificación genética.

En los resultados del año 1.998 se encontró una situación intermedia entre la de pimiento y la de patata, puesto que los restrictotipos se agrupaban en las cepas N, O y NP, aunque la mayoría pertenecían a esta última y con pocos restrictotipos diferentes. Mención especial merece el hecho de que se encontró un gran número de infecciones mixtas (17% de las muestras), especialmente entre aislados de PVY pertenecientes a diferentes razas genéticas. Las infecciones mixtas producían síntomas más fuertes. En 1.999 se realizaron dos muestreos, uno al principio y otro al final de la cosecha, para analizar la evolución de la distintas cepas, en especial de las infecciones mixtas.

Los autores agradecen a CETARSA su colaboración para la realización de este trabajo. Financiado por el proyecto INIA SC 98-087.

O-56

TIPIFICACIÓN MOLECULAR DE CEPAS DE *Brenneria quercina* y *Serratia* sp. AISLADAS EN BOSQUES DE ESPECIES DEL GÉNERO *Quercus* DE LA PENÍNSULA IBÉRICA.

Poza-Carrión, C.¹, Aguilar, I.¹, López, M.M.², González, R.², Biosca, E.G.¹, García-Olmedo, F.¹ y Rodríguez-Palenzuela, P.¹

¹ Departamento de Biotecnología-UPM, ETS Ingenieros Agrónomos, E-28040 Madrid.

² Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias IVIA, 46113 Valencia.

A partir de los años 80, se viene observando en España y otros países Mediterráneos el decaimiento y muerte de árboles del género *Quercus* que se caracteriza por la aparición de “chancros sangrantes” en primavera y otoño. Este síndrome es también conocido en los encinares de otras regiones de Europa y Norte de Africa, siendo denominado genéricamente como la “seca” de la encina. A partir de muestras de tejidos infectados, recogidas en diversas masas forestales de *Quercus* en Aragón, Castilla-La Mancha, Castilla-León, Extremadura, Madrid y C. Valenciana, se obtuvo una colección de aislados bacterianos procedentes tanto de chancros como de exudados de bellotas y yemas de *Quercus ilex* y *Quercus pyrenaica*. La mayoría de los aislados, que fueron previamente identificados mediante técnicas convencionales y serología han sido caracterizados positivamente como *Brenneria quercina* utilizando el sistema BIOLOG, para la identificación de bacterias. Se está procediendo a la tipificación molecular de estos aislados, empleando la técnica rep-PCR. Dicha técnica se basa en la amplificación de ADN a partir de secuencias repetidas en el genoma bacteriano del tipo ERIC, REP y BOX; del análisis electroforético de los fragmentos amplificados se ha construido un dendrograma que refleja los índices de similitud entre dichos aislados. Esta técnica permitirá desarrollar métodos moleculares de diagnóstico de esta especie en material vegetal, para utilizarlos en estudios epidemiológicos de la enfermedad que produce esta bacteria. Para completar la caracterización molecular de estos aislados se procedió a amplificar y secuenciar el gen 16S ADNr, del resultado de la secuencia se ha observado que un grupo de aislados presentan una alta homología con bacterias del género *Serratia*.

O-57

HONGOS FITOPATÓGENOS ASOCIADOS A LA SECA DE LOS *Quercus* EN ANDALUCÍA.

Sánchez, M.E., Navarro, R., Fernández, P. y Trapero, A.

Dpto. de Agronomía. ETSIAM. Universidad de Córdoba. Apdo. 3048. 14080. Córdoba.

En 1999 se inició un Proyecto de Investigación multidisciplinar de ámbito nacional, que estudia las causas de la seca de los *Quercus* mediterráneos y cuyo objetivo último es la propuesta de actuaciones para paliar su incidencia y/o severidad en los montes y dehesas afectados.

Dentro del subproyecto Andalucía, de un total de más de 500 focos de seca localizados en esta Comunidad, se han seleccionado 8 para establecer parcelas de ensayo. Estos 8 focos se encuentran en las 4 provincias más afectadas por la seca (Cádiz, Córdoba, Huelva y Sevilla), y fueron elegidos por ser representativos de la multiplicidad de situaciones climáticas, edáficas, culturales y de aprovechamiento que se dan en Andalucía.

Desde el punto de vista fitopatológico, el primer paso ha consistido en el diagnóstico de las enfermedades presentes en cada una de las 8 parcelas. Para ello, se realizaron una serie de prospecciones y muestreos, tanto de la parte aérea como de las raíces sintomáticas, de 8 árboles afectados en cada parcela. También se tomaron muestras para el aislamiento de patógenos del suelo. Los resultados obtenidos en esta primera prospección muestran que el principal agente fúngico asociado a la seca en Andalucía es *Phytophthora cinnamomi*, hongo causante de podredumbre radical en *Quercus*. No obstante, en las parcelas situadas en la provincia de Córdoba, destaca por su abundancia el hongo productor del chancro carbonoso, *Hypoxylon mediterraneum*.

Los aislados de *P. cinnamomi* obtenidos, tanto de muestras de raicillas necróticas como de suelo, se caracterizaron morfológicamente. También se ha caracterizado su crecimiento micelial en función de la temperatura de incubación. En base a los resultados obtenidos, se ha podido dividir a los aislados en dos grupos morfológicos, que además muestran diferencias en sus relaciones de crecimiento.

Con una baja incidencia y esporádicamente, también se ha detectado *Fusicoccum* sp., agente del chancro de la jara pringosa, y *Diplodia* sp., ambos asociados a la aparición de chancros y desecación de ramillas de encina; *Spilocaea quercus-ilicis*, agente del Repilo de la encina, y escobas de bruja, enfermedad causada por *Taphrina kruchii*.

NUEVAS PATOLOGÍAS EN EL CULTIVO DEL TOMATE: EL PEPMV

Jordá, C.¹, Martínez-Culebras, P.¹, Lázaro, A.¹ y Lacasa, A.²

¹Dpto. Producción Vegetal. Patología. Universidad Politécnica. Cno. de Vera, 14. 46022 Valencia.

²Centro Regional de Investigación y Desarrollo Agrario. La Alberca (Murcia).

El Pepino mosaic virus es un Potexvirus que recientemente ha sido implicado como agente causal de una nueva enfermedad del tomate en cultivo protegido. Desde 1999 que fué descrito por vez primera en Holanda se han ido sucediendo nuevas citas en Inglaterra, Alemania y recientemente en Francia.

En España se han detectado sintomatologías anómalas en plantas de tomate que se manifiestan con un mosaico de manchas color amarillo brillante, de distribución irregular en los foliolos de una misma hoja y dentro del mismo foliolo. La enfermedad evoluciona produciendo una pérdida de color en la hoja, adquiriendo esta un tono amarillo con manchas circulares de contorno irregular. Los frutos producidos por estas plantas se ven igualmente afectados presentando irregularidades de coloración por anormal distribución del licopeno. Este síntoma tan típico no es sin embargo el más corriente, pudiendose presentar otras características como la reducción del limbo foliar hacia hoja filiforme, parada del crecimiento y presencia de abullonado en la hoja. La presencia o no de estas sintomatologías parece estar muy influenciado por las condiciones ambientales.

El presente trabajo aporta la determinación del agente causal de la nueva enfermedad, características de la enfermedad y la búsqueda de métodos de diagnóstico, que incluyen métodos serológicos, con comparación de diferentes sueros, y la utilización del método PCR y RFLPs para el estudio de la posible variabilidad del virus.

O-59

PRESENCIA DEL BIOTIPO PONCIRUS DE *Tylenchulus semipenetrans* “EL NEMATODO DE LOS CÍTRICOS” EN VALENCIA-ESPAÑA.

Murguía, C. A¹., Abad, P¹., Jordá¹, C. y Bello, A².

¹Unidad docente de Patología, Dpto. de Producción Vegetal. Universidad Politécnica de Valencia. Camino de Vera 14, 46020, Valencia.

²C.S.I.C. Centro de Ciencias Medioambientales, Dpto. de Agroecología. C/ Serrano 115 Apdo. 28006-Madrid.

Muchas investigaciones han demostrado la existencia de los biotipos “Poncirus”, “Mediterráneo” y “Citrus” de *T. semipenetrans*, caracterizados por su capacidad de reproducirse sobre ciertos hospedantes diferenciales. También se conoce que la distribución de estos biotipos está condicionada, principalmente, por la planta hospedante más que, por los factores medioambientales, edáficos o climáticos. En España, este nematodo es el más frecuente y abundante en todas las áreas cítricas del país y, hasta ahora, el único biotipo identificado en el país es el “Mediterráneo”. Tampoco se ha descartado la posible presencia de otros biotipos, bajo las condiciones españolas. En tal sentido, nos planteamos el objetivo de detectar e identificar la probable presencia de otros biotipos en áreas cítricas con ciertas condiciones edáficas y agronómicas que favorezcan la presencia de éstos. Mediante prospecciones nematológicas preliminares se logró aislar la población Raf-Valencia de *T. semipenetrans*, procedente de raíces de *P. trifoliata*. Sobre la cual realizamos el presente estudio. Se realizó un test de patogenicidad, bajo condiciones de invernadero, sobre los siguientes hospedantes diferenciales: dos selecciones de *P. trifoliata* Bennecke y Rubidoux, Olivo (*O. europaea* var. Manzanilla), vid “141-R” (*V. berlandieri* x *V. rupestris*) y *Citrus jambhiri*. Plantas de 8 meses de edad repetidas cinco veces/hospedante fueron inoculadas con una suspensión 10.000 huevos + juveniles por planta. Siete meses después se evaluó la infectividad y el potencial reproductivo del nematodo. Los resultados nos indicaron que las selecciones Bennecke y Rubidoux respondieron a la infección con un alto nivel de susceptibilidad. Niveles de infección inferiores se evaluaron sobre *C. jambhiri* y vid. Asimismo, la población no se reprodujo sobre olivo. La capacidad de la población para reproducirse significativamente sobre las dos selecciones de *P. trifoliata* y *C. jambhiri*, así como sobre vid y, su no-parasitismo sobre olivo; nos permite afirmar que mediante este test se ha demostrado que la población Raf-Valencia de *T. semipenetrans* pertenece al biotipo “Poncirus”.

Mediante un ensayo posterior y bajo las mismas condiciones expuestas anteriormente, evaluamos la respuesta de los patrones híbridos 03018, 030118, 030140 y 030142 (*M. cleopatra* x *P. trifoliata*), Swingle citrumelo 4475 (*C. paradisi* x *P. trifoliata*) y *P. trifoliata* Flying Dragon (proporcionados por el Dr. Forner del Dpto. de Citricultura del IVIA-España), caracterizados en anteriores estudios como altamente resistentes al biotipo “Mediterráneo”. Nuestros resultados demostraron que todos los patrones fueron susceptibles a la infección por el biotipo “Poncirus”. La importancia de conocer que el biotipo “Poncirus” habita en algunos suelos cítricos de la Comunidad valenciana radica en que se abrirá una línea de investigación no sesgada al biotipo Mediterráneo, como el único en España, por lo que, en el futuro se deberá reorientar los programas de mejoramiento destinados a la creación de nuevos patrones resistentes a *T. semipenetrans*, tomando en consideración a ambos biotipos.

P-1

EFFECTO DE LA MICORRIZACIÓN ARBUSCULAR Y DEL FUNGICIDA BENOMILO EN EL CONTROL DE *ROSELLINIA NECATRIX* EN PLANTAS DE *CAMELLIA*

Aguín, O.¹, Mansilla, J.P.^{1,3}, Salinero, C.¹, Vilariño, A.² y Sáinz, M.J.³

¹Estación Fitopatológica do Areeiro, Excma. Diputación Provincial de Pontevedra. Subida a la Robleda s/n, 36153 Pontevedra. ²Instituto de Investigaciones Agrobiológicas de Galicia (CSIC), Apdo. 122, 15780 Santiago de Compostela. ³Dept. Producción Vegetal, Universidad de Santiago de Compostela, 27002 Lugo.

Las raíces de la mayor parte de las plantas forman una simbiosis mutualista con hongos del orden *Glomales* (Zigomicetos) que se denomina micorriza arbuscular (MA). Esta simbiosis tiene efectos beneficiosos sobre el crecimiento y la nutrición mineral de la planta y puede jugar un papel importante en el control de enfermedades causadas por hongos del suelo. *Rosellinia necatrix* Prill. (anamorfo: *Dematophora necatrix* Hartig) es un hongo patógeno que causa una podredumbre blanca lanosa radicular. El aislamiento de este hongo a partir de plantas de *Camellia* sp. nos llevó a plantear un estudio para comprobar el poder patógeno de *R. necatrix* así como el papel de la micorrización arbuscular en su control. En ensayos preliminares *in vitro*, el benomilo había demostrado una gran efectividad en la inhibición del crecimiento del micelio de *R. necatrix*. Se obtuvieron estaquillas de un año de edad enraizadas, micorrizadas y no micorrizadas, del híbrido *Camellia japonica x williamsii* cv. Mary Phoebe Taylor. La micorrización se llevó a cabo mediante la inoculación del hongo MA *Glomus aggregatum* en el sustrato de enraizamiento. Con ambos tipos de estaquillas, se establecieron 6 macetas de 1,5 L de capacidad, con una planta por maceta, para cada uno de los siguientes tratamientos: control, inoculación con *R. necatrix*, dos estrategias distintas de aplicación de benomilo (fungicida 1 y fungicida 2) y sus interacciones. El tratamiento fungicida 1, consistió en la inmersión de las estaquillas enraizadas en una solución de 100 µg/mL del producto comercial Zetamilo (benomilo 50% p/p, Zeneca Agro) antes de su trasplante a maceta. Para el tratamiento fungicida 2, la solución de benomilo se aplicó al suelo cuando las plantas mostraron los primeros síntomas de la enfermedad.

A los quince días de la inoculación se observaron los primeros síntomas de amarilleo y posterior caída de hojas. Después de dos meses, las plantas no micorrizadas inoculadas con *R. necatrix* habían muerto o perdido más del 60% de las hojas. Las plantas micorrizadas mostraron mayor tolerancia al ataque del patógeno, ya que un 50% conservó todas las hojas iniciales de la estaquilla, si bien el resto perdió hojas o murió. Los efectos de la micorrización fueron similares a los observados en los dos tratamientos con benomilo: ninguno de ellos consiguió controlar la enfermedad, pero, tras dos meses de contacto con el inóculo de *Rosellinia*, las plantas todavía sobrevivían si bien con una fuerte disminución del número de hojas verdes respecto al material vegetal inicial.

P-2

INDUCCIÓN DE RESISTENCIA EN *Capsicum annuum* FRENTE A *Phytophthora capsici* MEDIANTE TRATAMIENTOS CON *Bacillus* spp.

Sid Ahmed, A., Pérez Sánchez, C. y Candela, M.E.

Unidad de Fisiología Vegetal. Departamento de Biología Vegetal. Facultad de Biología. Universidad de Murcia. Campus de Espinardo. 30100 Espinardo (Murcia).

Phytophthora capsici es un hongo telúrico que infecta plantas de pimiento provocando la muerte de la planta afectada. La manera óptima de controlar la enfermedad es utilizar variedades resistentes, pero cuando no se dispone de ellas, se puede tratar de inducir resistencia mediante el uso de microorganismos antagónicos. La evaluación del efecto del tratamiento de semillas de pimiento con cepas de *Bacillus subtilis* HS93 y *Bacillus licheniformis* LS234, LS523 y LS674 sobre la inducción de resistencia a *P. capsici* en plantas de pimiento, constituye el objeto de este trabajo.

Los estudios se realizaron *in vivo* inoculando con micelio fúngico, tallos de plantas de pimiento crecidas a partir de semillas tratadas con las bacterias mencionadas. La evaluación de la resistencia se llevó a cabo midiendo la longitud de la reacción necrótica de defensa y la acumulación en la zona de inoculación del tallo, de la fitoalexina del pimiento, Capsidiol.

El efecto de los tratamientos de las semillas sobre la respuesta de las plantas a la infección por *P. capsici* se empezó a notar a partir del tercer día después de la inoculación. Generalmente, el desarrollo de la necrosis en las plantas tratadas e inoculadas (T&I) fue significativamente lento en comparación con las plantas no tratadas e inoculadas (NT&I). La diferencia en el desarrollo de la necrosis siguió ampliándose entre las plantas T&I y las plantas NT&I alcanzando al final noveno día 48.5 mm en las plantas NT&I, mientras que en las plantas tratadas con las cepas de *Bacillus* spp. HS93, LS234, LS523 y LS674, la necrosis alcanzó una media de 30.4, 39.3, 35.4 y 37.3 mm, respectivamente. El análisis de la acumulación de capsidiol en las zonas de inoculación reveló que la acumulación de capsidiol es mayor en las plantas T&I al cabo del tercer y sexto día (7.3, 4, 4.5 y 4.4 veces la concentración detectada en las plantas NT&I) después de la inoculación e inferior al cabo del noveno día. Los aislamientos hechos a partir de las zonas cercanas a la necrosis revelaron que ninguno de los tallos contenía las bacterias usadas.

El tratamiento de las semillas de pimiento con los aislados bacterianos parece inducir una reacción sistémica en la parte aérea de la planta ya que no se han detectado bacterias en la zona de inoculación. Entre las cepas bacterianas analizadas, la que mayor inducción de resistencia provoca es *Bacillus subtilis* HS93. Este aislado, además de inhibir el crecimiento vegetativo de *P. capsici* mediante la secreción al medio de metabolitos antifúngicos, es capaz de estimular *in vivo* la respuesta defensiva de las plantas de pimiento.

P-3

ANÁLISIS DE LA INFLUENCIA DE APLICACIÓN DE PESTICIDAS SOBRE LA SEMILLA EN EL MOMENTO DE LA SIEMBRA SOBRE LA EMERGENCIA DE PLANTAS DE ALUBIA (*Phaseolus vulgaris* L.)

Valenciano Montenegro J.B.

Departamento de Ingeniería Agraria. Universidad de León. Avda. Portugal, nº 41. 24.071 León.

El establecimiento del cultivo de la alubia está condicionado, entre otros, por los ataques de mosca (*Phorbia platura*) y por la incidencia de hongos parásitos del suelo (*Rhizoctonia solani*, *Pythium spp.*, *Fusarium spp.*, etc), que representan un grave problema en la provincia de León.

Tradicionalmente se suele realizar una desinfección y protección de la semilla, antes de la siembra, con insecticidas y fungicidas, generalmente por vía húmeda. Este método resulta excesivamente laborioso y plantea el problema de humedecer la semilla.

Se pretende, para evitar estos inconvenientes, la utilización de sembradoras con pulverizadores incorporados, que realicen el tratamiento en el momento de la siembra.

El objetivo del presente trabajo consiste en evaluar distintas mezclas de insecticidas y fungicidas utilizados contra los agentes a controlar y que pudieran ser aplicados en forma líquida en el momento de la siembra. Estudiando su influencia sobre la germinación y emergencia de la alubia, con el fin de poderlos utilizar para aplicarlos en pulverización en el momento de la siembra.

Los ensayos se realizaron en laboratorio, utilizando la variedad Riñón y realizando la siembra en macetas. Los insecticidas utilizados fueron: Carbofurano, Diazinón y Oxamilo; y los fungicidas ensayados fueron: Quinosol, Himexazol y Etridiazol; para todos ellos se utilizaron altas dosis.

La siembra se realizó abriendo una pequeña línea en cada maceta y colocando tres semillas por cada maceta, tras un ligero enterrado se procedía a la pulverización con la mezcla, y posteriormente el enterrado definitivo. Se realizaron 6 repeticiones por tratamiento.

Las mezclas en las que el fungicida utilizado fue el Himexazol fueron las que mejores resultados presentaron, siendo, por lo tanto, las semillas que menor tiempo necesitaron para germinar y emerger. No se apreciaron diferencias significativas entre los distintos insecticidas cuando son mezclados con Himexazol. Las mezclas con Quinosol presentaron muchos problemas de emergencia, incluso en algún tratamiento (Quinosol + Oxamilo) las plantas no llegaron a emerger.

P-4

CUANTIFICACIÓN EN CAMPO DE LA CALIDAD DE DISTRIBUCIÓN DE FUNGICIDAS CÚPRICOS EN OLIVAR MEDIANTE VISIÓN ARTIFICIAL

Porras-Soriano, A., Sánchez, A., Marcilla, I.², Soriano, M.L.¹ y Porras, A.²

¹ Departamento de Producción Vegetal y T.A.; ² Departamento de Mecánica Aplicada. Universidad de Castilla-La Mancha. Ronda de Calatrava 7. Ciudad Real.

El principal método de lucha contra las enfermedades del olivo es, actualmente, la pulverización de productos fitosanitarios sobre la superficie vegetal. Las características que definen un tratamiento por pulverización son: la **calidad de aplicación**, siendo preciso para determinarla cuantificar la superficie del cultivo recubierta de producto, tanto por el exterior como en el interior de la masa foliar, y la **persistencia** o capacidad que tiene un producto fitosanitario depositado sobre la superficie vegetal para resistir las inclemencias ambientales. Para conocer la distribución de productos fitosanitarios sobre la planta se han utilizado diferentes métodos, que se pueden agrupar en: Métodos analíticos, Métodos fluorimétricos, Métodos colorimétricos, Métodos de las improntas y Métodos de visión artificial. El Método de visión artificial desarrollado en este trabajo contribuye a la mejora tecnológica de la utilización de los pulverizadores, permitiendo realizar en campo un análisis de alta precisión del porcentaje de superficie vegetal cubierta por producto fitosanitario, reduciendo las limitaciones de los anteriores métodos. Para ello, tras realizar la aplicación fitosanitaria, se fotografían con una cámara digital muestras de hojas. Las fotografías, que son archivos digitales, pueden ser observadas en un ordenador portátil y se seleccionan las que más calidad fotográfica ofrezcan. Se estudian los valores RGB (Rojo, Verde, Azul) de los *pixeles* que constituyen las imágenes digitalizadas, buscando las diferencias entre las zonas de las hojas cubiertas de producto fitosanitario y las no cubiertas. Con un programa específico, desarrollado por los autores en *Turbobasic*, se determina el porcentaje de superficie foliar cubierta de producto fitosanitario. Este método de evaluación de la distribución ha sido puesto a punto y ensayado en la determinación del porcentaje de superficie foliar cubierta por oxiclورو de cobre, en olivos 'Cornicabra', aplicado mediante pulverización. Los valores RGB que permiten distinguir las zonas de hoja cubiertas del fungicida cúprico fueron: $R > 67$, $G > 65$ y $B > 68$.

En ensayos realizados en campo, se han obtenido porcentajes de cobertura que superan, en algunos casos, el 60% de la superficie foliar. Para comprobación, el programa desarrollado permite dibujar en el monitor los *pixeles* correspondientes a la hoja de olivo y al cobre fitosanitario.

El Método de visión artificial desarrollado permite también determinar en campo la persistencia del fungicida cúprico, así como, puede ser utilizado para cuantificar la cantidad de enfermedad en aquellos casos en que los síntomas cursen con diferencias de color con respecto al propio cultivo. Así como, constituye un económico y práctico medidor del área foliar.

P-5

PROGRAMA DE EVALUACIÓN Y MULTIPLICACIÓN DE PATRONES DE AGUACATE EN CUANTO A SU TOLERANCIA A LA PODREDUMBRE BLANCA

Pérez Jiménez, R. M.¹, Zea Bonilla, T.¹, Barceló Muñoz, A.¹, López Herrera, C. J.²

¹CIFA - Cortijo de la Cruz s/n. 29140. Churriana. Málaga.

²Instituto de Agricultura Sostenible C.S.I.C. Apdo. 4084. 14080. Córdoba.

Actualmente, en el Sur de Andalucía, la podredumbre blanca (PB) causada por *Rosellinia necatrix* Prill. Berl. (anamorfo: *Dematophora necatrix* Hartig), y la podredumbre radicular (PR) causada por *Phytophthora cinnamomi* Rands son las enfermedades que se presentan con mayor incidencia en las plantaciones aguacateras de esta región. Los muestreos que se vienen realizando desde 1986 detectan continuamente nuevas fincas con árboles infectados por estos patógenos. Así a final de 1999 se tenían registradas 123 fincas de aguacate afectadas por PB y 85 fincas por PR.

Para controlar estas enfermedades, dentro de un marco de control integrado, se inició en el año 1995 un programa de mejora del aguacate encaminado a la selección de portainjertos tolerantes a estos hongos de suelo cuyos resultados previos se han presentado en anteriores congresos. En esta comunicación se presenta un esquema del protocolo que se está desarrollando actualmente y que se continuará en el futuro, para este programa de selección de material de aguacate tolerante a *R. necatrix*; dado que la selección de material tolerante a *P. cinnamomi* se está desarrollando desde hace muchos años en otros países cultivadores de aguacate en los que este patógeno es el más importante.

Se están utilizando dos fuentes de material distintas, una es material juvenil: plantas obtenidas por germinación de semillas locales, procedentes de árboles aclimatados a la zona o de árboles que manifiestan en campo tolerancia a la PB (árboles escape); y otra es material adulto: portainjertos clonales locales, procedentes de árboles con alta producción o de árboles escape, y portainjertos clonales importados (selecciones de Australia, California, Canarias, Israel y Sudáfrica) tolerantes a *P. cinnamomi*.

Las evaluaciones de tolerancia se realizan mediante inoculaciones artificiales de los distintos tipos de plantas de aguacate citados, incorporando al sustrato donde vegetan, trigo colonizado por el patógeno. El criterio de selección es para el material juvenil, la supervivencia a la inoculación y para el material adulto el grado de tolerancia que presente en referencia a los controles susceptibles (Topa-Topa) utilizados. Ambos tipos de material vegetal se multiplican posteriormente para definitivos estudios de tolerancia.

La multiplicación del material se está realizando mediante injertos en invernadero y mediante cultivo *in vitro* de secciones nodales del material seleccionado. Actualmente, se encuentra en fase de multiplicación un total de 25 clones de selecciones de material juvenil y 6 clones de material adulto. El material local o el importado de otros países que exprese mayor grado de tolerancia a *R. necatrix* en las inoculaciones en curso se seleccionaran para estudios agronómicos que confirmen su buen comportamiento en campo y permitan recomendarlos para su comercialización.

P-6

LA LECHUGA: CULTIVO TRAMPA DE *MELOIDOGYNE JAVANICA* EN PLANTACIONES DE OTOÑO-INVIERNO.

Sorribas, F. J.¹, Omat, C.¹ y Verdejo Lucas, S.²

¹Dpto. Agronomía. ESAB. Comte d'Urgell 187. 08036-Barcelona. ²Dpto. de Protección Vegetal. IRTA. Ctra. de Cabrils s/n. 08348-Cabrils. Barcelona.

Los cultivos trampa son una herramienta de control de nematodos fitoparásitos ya que permiten disminuir la densidad de inóculo del patógeno mediante la utilización de plantas que el nematodo invade pero en las que no alcanza a reproducirse. Diversos estudios realizados en el litoral barcelonés evidenciaron que cuando la lechuga se cultivaba en verano las densidades de población de *Meloidogyne* aumentaban, mientras que disminuían cuando se cultivaba en otoño-invierno. En esta época del año, el nematodo no llegaba a producir huevos en la lechuga. Estos resultados podrían deberse al efecto combinado de la temperatura del suelo y el tiempo de permanencia del cultivo en campo puesto que la lechuga es huésped del nematodo. Para determinar el papel de cultivo trampa de la lechuga se realizaron una serie de estudios en parcelas de aire libre y de invernadero infectadas por *M. javanica* durante el periodo otoño-invierno de 1998-99 y 1999-2000. Las lechugas se trasplantaron en noviembre en la campaña 1998-99 y a mediados de octubre en la campaña 1999-00. Se determinó la evolución de las densidades de población del nematodo al principio (Pi) y final (Pf) del cultivo de lechuga y se comparó con la evolución del nematodo en parcelas no cultivadas durante el mismo período de tiempo. Paralelamente, se realizó un seguimiento de la penetración y desarrollo del nematodo en lechugas cultivadas en parcelas adyacentes a las del estudio descrito anteriormente. Para ello se arrancaron 8 lechugas cada 15 días hasta el final del cultivo, y se procedió a teñir los nematodos en raíz y a extraerlos por maceración de las raíces y tamizado diferencial. Se registró la temperatura del suelo a 15 cm de profundidad mediante sondas térmicas situadas en cada uno de los campos.

En todos los ensayos, la Pf fue inferior a la Pi y no se detectó producción de huevos en las raíces independientemente de la fecha de plantación. En invernadero, cuando la lechuga se plantó en noviembre, la Pf/Pi fue 0,4 tanto en las parcelas con lechuga como en las dejadas en barbecho ya que el nematodo no invadió la raíz. Sin embargo, en la plantación de octubre, la Pf/Pi en las parcelas con lechuga fue 0,08 y aquellas en barbecho 0,60 debido a la invasión de las raíces por parte del nematodo. El inóculo en suelo tras el cultivo de lechuga fue significativamente inferior al de las parcelas en barbecho. En lechuga cultivada al aire libre no se detectó ningún estadio de desarrollo de *Meloidogyne* en raíz independientemente de la campaña de cultivo y fecha de plantación. Las densidades de población en suelo al final del cultivo fueron similares entre las parcelas plantadas con lechuga y las de barbecho.

Los resultados de estos estudios indican que la lechuga actúa como cultivo trampa de *M. javanica* en plantación otoño-invierno cuando en la fecha de plantación la temperatura del suelo es superior al umbral de penetración del nematodo y posteriormente se produce un descenso de la temperatura que impide que el nematodo pueda completar el ciclo de vida.

P-7

COLONIZACIÓN DE LA RIZOSFERA DE CULTIVOS HORTÍCOLAS POR AISLADOS DE *Verticillium chlamydosporium*

Ornat, C.¹, Sorribas, F.J.¹., Verdejo Lucas, S.², Lorenzo, M.L.³, López-Llorca, L.V.³ y Salinas J.³

¹ Dpto. Agronomía. ESAB. Comte d'Urgell 187. 08036-Barcelona, ² Dpto. de Protección Vegetal. IRTA. Ctra. de Cabrils s/n. 08348-Cabrils. Barcelona y ³ Dpto. de Ciencias Ambientales y Recursos Naturales. CIBIO. Universidad de Alicante. Apartado 99. 03080 Alicante.

Verticillium chlamydosporium, parásito de huevos de nematodos fitoparásitos ha sido investigado por su potencial como agente de control biológico. Este hongo nematófago se ha encontrado parasitando huevos de *Meloidogyne* y *Heterodera* en España. Los aislados de *V. chlamydosporium* difieren en su capacidad para colonizar la rizosfera, temperatura óptima de crecimiento, producción de clamidosporas y capacidad de parasitar huevos de nematodos. En este estudio se examinó la capacidad colonizadora de la rizosfera de *V. chlamydosporium* en ocho cultivares de cinco cultivos hortícolas para determinar la idoneidad de los mismos para el crecimiento del hongo. Se utilizaron dos aislados del hongo seleccionados en estudios previos, BNV81 y Vc-SE, procedentes de *M. javanica* y *H. avenae*, respectivamente. El aislado Vc-10 cedido por el Dr. B. Kerry de IACR-Rothamsted, UK se utilizó de referencia. Plántulas de tomate cv "Nikita" y "Durinta", pimiento "Italiano" y "Lamuyo", judía verde cv "Tauro", lechuga cv "Iceberg" y "Maravilla", y col cv "Salarite" se trasplantaron a macetas de 1 litro de capacidad conteniendo un suelo arenoso previamente inoculado con 5×10^3 clamidosporas por gramo de suelo. Cada combinación planta-aislado se repitió 5 veces y las plantas se mantuvieron en una cámara climática a 25°C durante 42 días. Se determinó las unidades formadoras de colonias (CFU) por gramo de suelo y por superficie de raíz mediante diluciones seriadas. Además, se examinó el crecimiento del hongo en la rizosfera mediante microscopía electrónica de barrido (SEM).

El número de CFU/g suelo no difería entre cultivos independientemente del aislado ensayado. Los aislados BNV-81 y Vc-10 se establecieron bien en el suelo de la mayoría de cultivos ensayados a excepción del pimiento "Italiano". El aislado Vc-SE sobrevivió en el suelo pero el número de CFU recuperadas fue bajo. Sin embargo, el número de CFU/cm² raíz difería entre cultivos. Así el tomate, la judía y la col mostraron un buen nivel de colonización de la raíz, mientras que la lechuga y el pimiento italiano fueron poco colonizados por los diferentes aislados del hongo. Mediante SEM se confirmó que la capacidad de colonización de la raíz variaba según aislado y planta. Las raíces de plantas no inoculadas mostraron poca colonización fúngica. En plantas inoculadas, se observó crecimiento fúngico sobre la raíz, y en ocasiones, éste fue muy abundante observándose hifas de distinto grosor. Además de micelio, aparecieron algunas fiálides y también estructuras semejantes a dictioclamidosporas típicas de *V. chlamydosporium*. Los resultados del estudio sugieren la necesidad de conocer la capacidad de *V. chlamydosporium* para colonizar la rizosfera de las plantas que se cultivan en rotación con objeto de potenciar su capacidad de control de nematodos fitoparásitos.

P-8

RESPUESTA EN CAMPO A *Pratylenchus thornei* DE UNA LÍNEA DE TRIGO CON RESISTENCIA A *Heterodera avenae* DERIVADA DE *Aegilops triuncialis*.

Nombela, G. y Romero, M.D.

Dept. Protección Vegetal, Centro de Ciencias Medioambientales, CSIC, Madrid.

La mayor parte de los daños causados por nematodos en cultivos de cereales se deben al complejo *Heterodera avenae*, específico para dichos cultivos, y a *Pratylenchus* spp. *P. thornei* es una de las especies más comunes en trigo, en ocasiones en mayor medida incluso que *H.avenae*. El empleo de variedades resistentes es uno de los métodos que aúnan seguridad ambiental y eficacia en el control de estos nematodos. Actualmente se han transferido al trigo hexaploide diversos factores de resistencia a *H.avenae* desde las especies silvestres del género *Aegilops* (genes *Cre1* a *Cre5*). En cambio, hasta la fecha no se han identificado genes de resistencia a *Pratylenchus* spp. en cereales comerciales de grano pequeño, si bien se han detectado diferencias de tolerancia entre distintas líneas. En un trabajo previo, caracterizamos el gen *Cre2* (presente en la línea de introgresión trigo/*Ae. ventricosa*, H93-8) frente a *P. thornei*, observando que ni dicha línea ni sus parentales presentaban resistencia en campo a esta especie, aunque sí en condiciones controladas.

En esta ocasión se llevó a cabo la caracterización de un nuevo gen de resistencia a *H.avenae*, *CreAet*, frente al ataque de *P. thornei*. Dicho gen había sido transferido a la línea TR-353 de *Triticum aestivum* desde *Aegilops triuncialis*. La respuesta como hospedador a *P. thornei* de la línea TR-353 se comparó con la de sus progenitores *T. aestivum* H10-15, *T. turgidum* H1-1 (especie puente) y *Ae. triuncialis* A-1, y con la de la línea H93-8 (gen *Cre2*) y *T. aestivum* cv. Loros (gen *Cre1*). Como controles se utilizaron *T. aestivum* cvs. Capa y Rinconada, susceptibles a *H.avenae*. El estudio se realizó en condiciones de campo, en una parcela naturalmente infestada con *P. thornei* y *H. avenae*, distribuyendo las plantas según un esquema de bloques al azar. Se realizaron dos muestreos, uno a los 2,5 meses desde la siembra y otro a madurez (5 meses). Se utilizaron 10 réplicas de cada tratamiento, y los resultados se expresaron como nematodos por planta, por gramo de raíz y por 100 ml de suelo.

A los 2,5 meses, la infestación de la línea TR-353 por *P. thornei* no mostró diferencias significativas respecto a sus parentales y al control Capa, pero fue superior a la de Rinconada. La misma relación se observó en el último muestreo con respecto a la abundancia de estos nematodos por gramo de raíz; sin embargo, TR-353 hospedó un número significativamente mayor de nematodos por planta que sus parentales *Ae. triuncialis* y *T. aestivum* H10-15 (además de Rinconada), y muy cercano al máximo de *T. turgidum*. La infestación por *H. avenae* al final del estudio fue superior a la de *Ae. triuncialis* pero significativamente menor que la del resto de variedades/líneas.

A los 2,5 meses, el gen *CreAet* mostró una capacidad para controlar a *P. thornei* intermedia entre las de *Cre2* (mínima) y *Cre1*, si bien el número de nematodos por planta en Loros fue significativamente más bajo que en TR-353 al final del estudio. Respecto a la infestación por *H. avenae*, las resistencias conferidas por *Cre1* y *Cre2* (por este orden) fueron significativamente mayores que la debida al nuevo gen *CreAet*.

USO DE ACEITES EN CONTROL FITOSANITARIO EN VIÑA

Silvarrey, C., García, J.J., Jacas, J.A. y Cabaleiro, C.

Departamento de Producción Vexetal, Universidade de Santiago de Compostela.
Escola Politécnica Superior, Campus Universitario s/n, 27002 Lugo.

Las principales ventajas de los aceites frente a otros productos fitosanitarios son el control eficaz de algunas plagas y patógenos, una alta eficacia a muy bajas dosis, bajo coste, baja toxicidad para el hombre y los animales, no aparición de resistencias por parte de plagas y patógenos y respeto a los enemigos naturales. Sus principales desventajas, además de la de los productos de contacto, son la fitotoxicidad y la falta de eficacia para muchos patógenos y plagas. Actualmente los aceites apenas se utilizan en viñedo, pero los buenos resultados obtenidos en el control de alguna plaga como el minador de los cítricos y algunos hongos patógenos de varios cultivos indican que puede ser un elemento a incluir en los programas de manejo integrado en viña y también en el cultivo "biológico" de viñedo que se intenta potenciar en Galicia.

Para poder considerar los aceites de rango estrecho de destilación como un arma más en la protección del viñedo es preciso determinar su fitotoxicidad y sus propiedades biocidas. Se han realizado dos ensayos en cámara y uno en campo para determinar si el empleo de estos aceites es fitotóxico en las plantas de vid. Se emplearon 4 aceites, dos de ellos comerciales, uno de origen mineral (SunSpray oil) y otro de origen vegetal (aceite de colza, Codacide) y dos aceites de pescado (AFAMSA 117 y 121). Se emplearon 4 dosis de cada aceite (0.25, 0.5, 1 y 2% v/v) aplicadas semanalmente durante 6 semanas sobre plantas de vid en maceta en fitotrón. Los resultados son prometedores puesto que no se han observado efectos fitotóxicos cuantificables sobre los brotes en crecimiento de plantas tratadas a ninguna de las dosis empleadas. La repetición del ensayo en campo parece indicar que tampoco hay un efecto fitotóxico en condiciones de campo.

Para iniciar el estudio de las propiedades biocidas de los aceites frente a hongos patógenos en vid se ha realizado un ensayo en cámara para ver la eficacia de algunos aceites contra el oidio de la vid (*Uncinula necator*). Se inocularon las plantas mediante pulverización con una suspensión de conidias del hongo y una vez detectadas las primeras manchas, se realizaron los tratamientos con tres tipos de aceite (SunSpray, Codacide y Afamsa 121) a una dosis del 0,5% v/v, y utilizando como controles un antioidio sistémico (m.a. tebuconazol) y agua destilada. Los resultados una semana después de aplicado el tratamiento muestran eficacias del 55,5% para el fungicida sistémico, 64,1% para el Codacide, 49,2% para el SunSpray y 67,7% para el Afamsa 121, sin diferencias significativas entre los distintos productos. Dos semanas después se volvieron a evaluar y se obtuvieron las siguientes eficacias 56,2% para el antioidio, 78,9% para el Codacide, 58,2 para el SunSpray y 60% para el Afamsa 121. El estudio se completará con tratamientos en invernadero y en campo.

P-10

ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DE LAS ENZIMAS DEGRADADORAS DE LA PARED CELULAR DE *Trichoderma* SOBRE *Penicillium digitatum* Y *Penicillium italicum*

Azpilicueta, A.¹, Rey, M.¹, Monte, E.² y Llobell, A.¹

¹ IBVF. CSIC-Universidad de Sevilla. Av. Américo Vespucio S/N. 41092. Sevilla.

² Dpto de Microbiología y Genética. Universidad de Salamanca. Edif. Departamental. Plaza Doctores de la reina S/N. 37007. Salamanca.

El moho verde y el moho azul causados por *Penicillium digitatum* y *Penicillium italicum* respectivamente, son enfermedades de postcosecha de cítricos responsables de graves pérdidas económicas. El control de tales enfermedades se basa principalmente, en el uso de fungicidas químicos. No obstante, la progresiva pérdida de efectividad de los fungicidas debido a la aparición de patógenos resistentes, el riesgo para la salud humana de los residuos en la fruta, y las restricciones legislativas han promovido la búsqueda de nuevas estrategias. El uso de las enzimas degradadoras de la pared celular (EDPC) producidas por *Trichoderma* se presenta como una posible alternativa. Las EDPC son muy efectivas como agentes inhibidores de la germinación de las esporas y del crecimiento de un amplio rango de patógenos, siendo muy selectivas y por lo tanto no perjudiciales para el hombre.

El objetivo de este trabajo es estudiar la actividad antifúngica "in vitro" de las EDPC de distintas estirpes de *Trichoderma* frente a dos aislamientos de *P. digitatum* y *P. italicum* obtenidos de frutos enfermos. Para ello se cultivaron 10 cepas de *Trichoderma* en medio líquido utilizando como inductor quitina en escamas (Sigma). Se compararon los patrones enzimáticos y la producción total de proteínas de cada estirpe. El ensayo de actividad antifúngica se llevó a cabo en microplacas evaluando a distintos tiempos la viabilidad y crecimiento de los conidios de ambos patógenos. En este ensayo se compararon los distintos extractos proteicos concentrados y previamente dializados frente a agua. Se encontraron diferencias importantes en la producción de proteínas entre las cepas, así como en la actividad antifúngica de dichos extractos.

Los resultados obtenidos mostraron variabilidad en función de la estirpe de *Trichoderma* utilizada y del patógeno sobre el que se probaron. Así, T2413 y Nar destruyeron totalmente los conidios de ambos patógenos; B11 inhibió totalmente a *P. digitatum* pero no a *P. italicum*, al igual que con CG81. Por último, otras estirpes de *Trichoderma* como TS50, VFG5 y VFG6 no mostraron un efecto significativo sobre la germinación de *P. italicum* frente al testigo. Para establecer la capacidad antifúngica de cada estirpe de *Trichoderma* se está determinando la dosis efectiva media (DE50) de cada uno de los extractos.

Estos datos son bastante prometedores y apuntan a que el empleo de las EDPC podría ser una alternativa para reducir o eliminar el uso de compuesto químicos en el control de las enfermedades de postcosecha en cítricos.

P-11

PATOGENICIDAD DE NEMATODOS LESIONADORES (*Pratylenchus* spp.) Y NODULADORES (*Meloidogyne* spp.) SOBRE PLANTONES DE OLIVO Y EFECTO PROTECTOR DE LA MICORRIZACIÓN

Nico, A.I., Castillo, P., Gómez Barcina, A. y Jiménez Díaz, R.M.

Departamento de Protección de Cultivos. Instituto de Agricultura Sostenible. CSIC. Alameda del Obispo s/n, Apdo. 4084, 14080 Córdoba.

Las infecciones de olivo por nematodos fitopatógenos, fundamentalmente nematodos lesionadores de raíz (*Pratylenchus* spp.) y noduladores (*Meloidogyne* spp.), se han asociado con reducciones del crecimiento y vigor de la planta en varios países de la cuenca mediterránea. Por ello, la infección de material de plantación por estos nematodos constituye un riesgo para el establecimiento de nuevas plantaciones de olivo y contribuye a la distribución de estos patógenos a nuevas áreas. Investigaciones recientes han demostrado una moderada incidencia y distribución de nematodos fitopatógenos en viveros de olivo del Valle del Guadalquivir. Asimismo, diversos autores han demostrado que la infección por hongos micorrícicos puede incrementar la tolerancia de algunas plantas a diversos estreses bióticos y abióticos. Por tanto, los objetivos de este trabajo han sido determinar la patogenicidad en plantones de olivo 'Picual' y 'Arbequina', de los nematodos lesionadores *P. penetrans* y *P. vulnus*, y noduladores *M. arenaria*, *M. incógnita* y *M. javanica*, así como evaluar el efecto protector de la micorrización frente a dichas infecciones.

Se han realizado experimentos en condiciones controladas, utilizando plantones de 'Arbequina' y 'Picual' de 3-4 meses de edad. En todos los experimentos, las plantas se inocularon con las poblaciones de nematodos lesionadores y noduladores (5 y 15 ejemplares/cm³ de suelo, respectivamente) en el momento del trasplante. Para estudiar el efecto protector de la infección micorrícica frente a infecciones por estos nematodos, se utilizaron plantones micorrizados con *Glomus mossae*, *G. intrarradices* y una mezcla de *G. intrarradices* y *G. fasciculatum*. Las reacciones a las infecciones se evaluaron a los 90-100 días después de la inoculación, mediante el incremento relativo de diversos parámetros de crecimiento del plantón (altura total de la planta, diámetro del tallo y brotes y número de nudos). Asimismo, se evaluaron las densidades de población de los diferentes nematodos estudiados en suelo y raíces de las plantas.

Los resultados demuestran que los plantones de olivo 'Arbequina' y 'Picual' son buenos huéspedes de los nematodos lesionadores y noduladores estudiados; así como que todos ellos reducen significativamente el crecimiento relativo del diámetro del tallo y brotes, así como el número de nudos del plantón, respecto de los controles no inoculados. Sin embargo, ninguna de las especies de nematodos utilizadas redujo significativamente el crecimiento relativo de la altura de la planta. En las plantas micorrizadas, el parasitismo por *P. vulnus* y *M. incógnita* redujo significativamente los parámetros de crecimiento anteriormente mencionados en relación a las plantas no inoculadas. Sin embargo, esta respuesta fue diferencial y estuvo influida tanto por el cultivar de la planta huésped, como por el hongo micorrícico utilizado y el nematodo implicados en la interacción.

P-12

CONTROL BIOLÓGICO DE LA VERTICILOSIS DEL OLIVO MEDIANTE *PSEUDOMONAS* SPP. NATIVAS DE RAÍCES DE OLIVO

Hervás, A., Mercado Blanco J., Rodríguez Jurado, D. y Jiménez Díaz, R.M.

Departamento de Protección de Cultivos. Instituto de Agricultura Sostenible. CSIC. Apartado 4084. 14080 Córdoba.

La Verticilosis del olivo (VO), causada por *Verticillium dahliae* Kleb., es considerada en la actualidad una de las enfermedades de etiología fúngica más amenazadoras para el olivar. Los aislados de *V. dahliae* que infectan olivo se pueden clasificar como defoliante (*D*) y no defoliante (*ND*), de acuerdo con el tipo y severidad de la reacción que causan en este huésped y en algodón. Las infecciones de plántulas de olivo por el patotipo *D* pueden ser letales, por lo que constituyen una grave amenaza para el establecimiento de nuevas plantaciones.

Las Verticilosis están consideradas entre las enfermedades de cultivos más difíciles de combatir, de manera que el manejo eficiente de las mismas requiere la práctica de una estrategia de control integrado. Una opción interesante que podría complementar la acción de control de otras medidas de lucha es la aplicación de microorganismos antagonistas del patógeno eficaces como agentes de biocontrol. Diversos estudios han demostrado el uso eficaz de microorganismos antagonistas para combatir la enfermedad en plantas herbáceas. Sin embargo, la utilización de dichos agentes microbianos para el control de marchiteces vasculares en plantas leñosas sólo se ha investigado en escasas ocasiones y con éxito variable y/o limitado. El objetivo de este estudio ha sido explorar la posibilidad de usar aislados bacterianos endofitos o colonizadores de raíces de olivo como agentes de control biológico de la VO, con vistas a su aplicación durante la propagación viverística del olivo.

Se han obtenido diversos aislados bacterianos de raíces de olivos Picual procedentes de vivero, que han sido identificadas como *Pseudomonas* spp. Se ha investigado la capacidad antagonista de dichas bacterias para inhibir el crecimiento micelial de los aislados V138 (*D*) y V4 (*ND*) de *V. dahliae* en diferentes medios microbiológicos. Asimismo, se ha determinado su capacidad para producir pioverdinas y ácido salicílico *in vitro*, y se han realizado diversos bioensayos con el fin de determinar la efectividad de dichas bacterias para combatir las infecciones por el patotipo *D* (aislado V138) de *V. dahliae* en plantas de olivo Picual. Para ello se han utilizado plantas de 3-5 meses de edad propagadas tanto por el método tradicional de estaquillado como por micropropagación. Los resultados demuestran que algunos de los aislados de *P. fluorescens* son capaces de retrasar significativamente el desarrollo de síntomas y reducir la incidencia y severidad de la enfermedad respecto a los controles no tratados, y por lo tanto, poseen potencial como agentes de biocontrol de la VO. Sin embargo, es de destacar que no se ha encontrado correlación entre la capacidad antagonista *in vitro* y su efectividad *in planta*.

P-13

INFLUENCIA DE LAS FECHAS DE SIEMBRA Y LOS REPELENTES EN LA INFECCION POR PVY

Handizi, A.¹, Legorburu, J.¹ y Sierra, J.A.²

¹ **NEIKER-Instituto Vasco de I+D Agrario.**

² Servicios Agrícolas Alaveses, Sagral.

Se trata de dos ensayos realizados en la Granja modelo de Arkaute: el primero se lleva por tercer año consecutivo, y trata de evaluar y cuantificar el efecto de la fecha de siembra sobre la sanidad de PVY, así como el efecto de la protección del cultivo en diferentes fases de su estado fisiológico. Para ello se ha utilizado un diseño de parcelas subdivididas (fecha en la parcela principal y protección en la subparcela), con dos bloques. La protección consistió en proteger el cultivo durante el primer y el segundo tercio del ciclo mediante manta térmica (manta 1y manta 2, respectivamente). La siega de las matas ha sido la protección para el ultimo tercio del ciclo vegetativo. El segundo se lleva por segundo año consecutivo. Tiene por fin evaluar el efecto de ciertos repelentes de pulgones sobre la sanidad de PVY. Para ello se utilizo un diseño de bloque al azar, con cuatro repeticiones. La parcela unitaria consistía en 100 pies de la variedad Kennebec. Los tratamientos fueron: aceite de neem, azadiractina y Triac-N; más un control sin tratar. La aplicación de los tratamientos ha sido semanalmente, desde la emergencia (11 de junio) hasta que los vuelos de pulgones bajaron de 25 alados por trampa y semana (23 de julio).

Según los resultados, destaca la protección que ofrece la manta térmica en la juventud de la planta, especialmente en la siembra de Mayo. También se observa una tendencia hacia una mayor infección según avanza la fecha de siembra. En planta adulta, la manta térmica protege en las siembras de Mayo y Junio, pero no en las de Abril (pico de vuelos de Junio) ni en las de julio (pico de vuelos de Setiembre). Los altos porcentajes de la incidencia de PVY son consecuencia a la mala calidad del material de partida (certificada B, apta para producir patata de consumo y no siembra)

Se ha observado una protección significativa del aceite de neem sobre el control y el triac. A continuación se sitúa la azadiractina (principio activo extraído del aceite de neem), dando una protección significativa respecto al control.

P-14

RESISTENCIA DE *Botrytis cinerea* A FUNGICIDAS EN LOS CULTIVOS PROTEGIDOS DE ALMERÍA

Moyano, C.¹, Raposo, P.¹, Gómez, V.², Delcan, J.¹ y Melgarejo, P.¹

¹ INIA. Dpto. de Protección Vegetal. Crta. de la Coruña, Km 7,5. 28040. Madrid.

² Laboratorio de Sanidad vegetal. Delegación de Agricultura y Pesca. Almería.

La podredumbre gris, causada por *Botrytis cinerea*, es una de las enfermedades más importantes en los cultivos hortícolas de Almería. Su control se efectúa fundamentalmente por métodos químicos, existiendo en la actualidad problemas de control debido, entre otras causas, al desarrollo de resistencia a fungicidas como son los benzimidazoles, las dicarboximidas y los N-fenil carbamatos. El pirimetanil, que pertenece a la familia de las anilino pirimidinas, es un fungicida introducido recientemente y que ha dado problemas de resistencia en otros países.

El objetivo de este trabajo es ver la evolución de la resistencia a estos fungicidas en Almería partiendo de los datos obtenidos en 3 muestreos realizados al comienzo de las epidemias. Se recogieron 261 aislados de 49 invernaderos en diciembre de 1992, 154 en 31 invernaderos en diciembre de 1995 y 302 en 47 invernaderos en enero de 2000.

La dosis discriminadora entre aislados resistentes y sensibles para los benzimidazoles fue de 1 mg/l de PDA, y de 5 mg/l para las dicarboximidas y los N-fenil carbamatos. Para el pirimetanil, se calculó la DE50 de 45 aislados que se recogieron en el primer muestreo, y que no han estado expuestos a este fungicida, y de 40 aislados del tercer muestreo. Desde 1992, la resistencia a dicarboximidas, benzimidazoles y N-fenil carbamatos ha aumentado significativamente ($p=0.05$). La resistencia a benzimidazoles ha pasado de un 47 a un 90%, a dicarboximidas de un 56 a un 77% y a N-fenil carbamatos de un 1,2 a un 23%. El fenotipo doble resistente a carbendazima y procimidona es el más frecuente, llegando a un 65% en el 2000 y los triples resistentes han pasado de un 1,2 en el año 1992 a un 13,9% en el 2000. En el estudio del pirimetanil, tanto en los aislados del muestreo de 1992, como en los de 2000 han aparecido 3 aislados resistentes. En cada uno de los muestreos hay 2 subpoblaciones diferenciadas que se corresponden con los aislados sensibles (DE50 entre 0.05-0.5 en el 1992 y 0.07-0.5 en el 2000) y los resistentes (DE50 entre 1-10). La media de la DE 50 en los aislados de la población no expuesta y la expuesta al fungicida no difiere y es de 0.53 mg/l de pirimetanil. Los 3 aislados resistentes de 1992 nos indican un alto riesgo de aparición de resistencia pero no se ha producido un aumento porque el pirimetanil se utiliza solo desde 1996, 1 o 2 veces por campaña, y únicamente está permitido en cultivos de tomate y fresa.

El uso de los benzimidazoles y las dicarboximidas debe ser limitado al máximo, dados los niveles de resistencia alcanzados. La resistencia al pirimetanil es mucho menor y si el uso de las anilino pirimidinas se mantiene en los niveles actuales, se podrá ejercer un buen control combinando el uso de estas materias activas con otros fungicidas con distinto modo de acción.

P-15

CONTROL *IN VITRO* DE *Sclerotium cepivorum* Berk. MEDIANTE LA UTILIZACIÓN DE HONGOS ANTAGONISTAS

Bascón Fernández, J., Corpas Hervías, C. y Basallote Ureba, M.J.

Centro de Investigación y Formación Agraria "Las Torres-Tomejil". Consejería de Agricultura y Pesca. Junta de Andalucía. Apdo. Oficial. 41200 Alcalá del Río (Sevilla).

La Podredumbre Blanca, ocasionada por el hongo *Sclerotium cepivorum* Berk., es una de las enfermedades más importantes de los cultivos de ajo y cebolla en las principales zonas productoras españolas. Los esclerocios, que constituyen la estructura de supervivencia de este hongo, persisten en el suelo durante años y pueden ocasionar severas epidemias a muy bajas concentraciones. La introducción de antagonistas al suelo es una alternativa al uso de los químicos en el control de enfermedades causadas por hongos esclerociales, siendo algunas especies de *Trichoderma* de los hongos más utilizados para controlar este grupo de patógenos. Este trabajo se ha llevado a cabo para evaluar *in vitro* la capacidad antagonista, frente a *S. cepivorum*, de una serie de aislados fúngicos de diferente procedencia (ajo, aguacate, compost de orujo).

La selección de los posibles agentes de biocontrol se llevó a cabo mediante cultivos duales en placa Petri sobre PDA. Para ello, se llevaron a cabo dos experimentos en bloques al azar, con cuatro repeticiones de 14 aislados de *Trichoderma* sp. y de un aislado de *Fusarium* sp. Tras un periodo de incubación de siete días a 18 °C y en oscuridad, se determinó el porcentaje de inhibición del crecimiento radial y se anotó la presencia de esclerocios inmaduros y maduros. Seis días más tarde se contabilizaron, en un área de 1 cm², los esclerocios maduros en la zona de contacto de las dos colonias y en la zona distal, situada entre el disco del micelio de *S. cepivorum* y el borde de la placa. Además, para determinar el tipo de interacción existente entre el patógeno y los posibles agentes de biocontrol se realizaron cultivos duales mediante la técnica de montaje en porta.

Tras siete días de incubación las placas control estuvieron homogéneamente cubiertas por micelio y esclerocios maduros de *S. cepivorum*. El crecimiento radial del micelio de *S. cepivorum* sólo fue inhibido significativamente por tres de los aislados fúngicos testados, dos procedentes de bulbos de ajo y otro de raíz de aguacate. Al finalizar el experimento, todos los aislados se habían desarrollado sobre la colonia del patógeno, excepto uno de *Trichoderma* sp. que formó una pequeña barrera de inhibición, y el aislado de *Fusarium* sp. que se desarrolló más lentamente que el patógeno y detuvo su crecimiento al contactar las dos colonias. En la mayoría de las combinaciones no se detectaron esclerocios maduros en la zona de contacto después de 13 días de incubación, mientras que en la zona distal se observaron esclerocios en mayor o menor número en todos los duales salvo en aquellos con los aislados procedentes de ajo. El modo de acción más frecuente de los aislados de *Trichoderma* sp. testados fue micoparasitismo.

P-16

EFFECTO DE DISTINTAS SECUENCIAS DE TRATAMIENTOS DE SUELO Y SEMILLAS EN EL CONTROL DE LA PODREDUMBRE BLANCA DEL AJO

Bascón Fernández, J.¹, Calvet Pinós C.³, Corpas Hervías, C.¹, Lara Ruiz, A.¹, Melero Vara, J.M.⁴, Prados Ligerero A.M.², Basallote Ureba, M.J.¹.

¹CIFA "Las Torres-Tomejil". Junta de Andalucía. Apdo. Oficial. 41200 Alcalá del Río (Sevilla);

²CIFA "Alameda del Obispo". Junta de Andalucía. Apdo. 3092. 14080 Córdoba; ³IRTA, Ctra. Cabriels s/n 08348 Cabriels (Barcelona); ⁴IAS, CSIC, Apdo. 4084. 14080 Córdoba.

La Podredumbre Blanca, ocasionada por el hongo *Sclerotium cepivorum* Berk., es una de las enfermedades más extendidas y destructivas de los cultivos de *Allium* en el mundo. En Andalucía, la solarización del suelo constituye el método de control más efectivo de dicha enfermedad. Se ha referido que la micorrización de plantas de cebolla con *Glomus* sp. proporciona una protección efectiva frente a la Podredumbre Blanca. También se ha demostrado previamente la efectividad de *Trichoderma harzianum*, como agente de biocontrol, y la del fungicida tebuconazol en tratamientos de semilla.

Se desarrollaron tres experimentos en un campo naturalmente infestado por *S. cepivorum*, a lo largo de tres cultivos consecutivos de ajo. Durante los dos primeros años se compararon la solarización, la aplicación de *G. intraradices* en el surco de siembra y la combinación de ambos, con un tratamiento testigo no tratado. En el tercer año experimental, se introdujeron dos nuevos tratamientos, la aplicación de tebuconazol a la semilla y el aporte al surco de un aislado de *T. harzianum* seleccionado *in vitro* por su alta capacidad micoparasítica. Además, en las parcelas en las que se combinaron ambos procedimientos, se volvió a aportar el hongo micorrízico.

La solarización redujo la densidad de inóculo del patógeno a niveles inapreciables, sin embargo su efectividad se redujo de un cultivo de ajo al siguiente, debido a la fácil recolonización del suelo. La epidemia de Podredumbre Blanca se inició 4-5 meses después de la siembra en las parcelas testigo, en las micorrizadas artificialmente y en aquellas donde se aportó *T. harzianum*. La solarización del suelo y el tratamiento de las semillas con tebuconazol resultaron en un notable retraso en el comienzo de la enfermedad. Asimismo, la incidencia final de plantas muertas, y el área bajo la curva de progreso epidémico estandarizada, se redujeron significativamente para estos dos tratamientos, cuando se compararon con los restantes. En consecuencia, los rendimientos fueron más del doble para dichos tratamientos. La solarización también incrementó la frecuencia de bulbos >50 mm de diámetro. No obstante, en el tercer ciclo de cultivo, la proporción de bulbos de mayor calibre fue superior al 80 % para todos los tratamientos considerados. En las condiciones de nuestro experimento, el aporte de *G. intraradices* en el surco de siembra no tuvo efectos sobre la enfermedad, ni sobre el desarrollo del cultivo.

P-17

DESCRIPCIÓN DE LAS CAPACIDADES ANTAGONISTAS DE LA MICROBIOTA BACTERIANA Y ACTINOMICÉTICA DEL COMPOSTADO DEL RESIDUO INDUSTRIAL DEL CORCHO.

Blanco, R.¹, Gómez Baena, A.¹, Núñez Simarro, F.¹, Montoya, J.R.¹, Santos, M.¹, Avilés, M.¹, Tello Marquina, J.C.

¹Dpto. de Producción Vegetal. Universidad de Almería. La Cañada de San Urbano s/n. 04120 Almería.

² Dpto. Ciencias Agroforestales. Universidad de Sevilla. Ctra. Utrera Km1. 41013 Sevilla.

Durante las dos últimas décadas se ha desarrollado un importante cuerpo de conocimientos sobre el control biológico y ambiental de las enfermedades de origen telúrico asociado con el empleo de sustratos elaborados con compost. El control de las enfermedades incluye la muerte de los fitopatógenos preexistentes en los residuos durante y después de producirse las altas temperaturas implicadas en el proceso de compostaje. Así encontramos sustratos a partir de compost con supresividad frente a enfermedades del suelo inducidas por *Pythium* spp., *Phytophthora* spp., *Rhizoctonia solani*, *Sclerotium rolfsii* y algunas *formae specialis* de *Fusarium oxysporum*.

De esta manera los objetivos de este trabajo son: primero, la identificación de las bacterias y actinomicetos, mesófilos y termófilos, presentes en el residuo industrial del corcho de 4 meses y 11 meses de compostaje. Y segundo, valorar "in vitro" las capacidades antagonistas de aquellos frente a *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* (razas 0 y 1), *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-lycopersici*, *Fusarium oxysporum* f.sp. *melonis* (razas 0, 1, 2 y 1-2), *Fusarium moniliforme* y *Alternaria* sp.

La composición de la microbiota mesófila en el compost de 4 y 11 meses es prácticamente la misma. En cambio, la composición de la microbiota termófila en la composta de 4 meses es más diversa que en el compostado de 11 meses. Posible consecuencia del progresivo alejamiento de la fase termófila.

Se encontraron entre los actinomicetos antagonistas frente *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* (razas 0 y 1), *Fusarium oxysporum* f.sp. *melonis* (razas 0, 1, 2 y 1-2), *Fusarium moniliforme* y *Alternaria* sp. los siguientes géneros: *Streptomyces*, *Saccharopolyspora* y *Nocardia*.

Se encontraron entre la microbiota bacteriana frente *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* (razas 0 y 1), *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-lycopersici*, *Fusarium oxysporum* f.sp. *melonis* (razas 0, 1, 2 y 1-2), *Fusarium moniliforme* y *Alternaria* sp. los siguientes géneros: *Bacillus*, *Enhydrobacter*, *Sporosarcina*, *Plesiomonas*, *Listeria*, *Kurthia*, *Neisseria*, *Methylococcus*, *Phenyllobacterium*, *Staphylococcus*, *Pseudomonas*, *Photobacterium* y *Vibrio*.

P-18

INTEGRACIÓN DE LA SOLARIZACIÓN Y LA MICORRIZACIÓN EN EL CONTROL DE LA FUSARIOSIS VASCULAR DEL MELÓN

López Cosme, E. y González Torres, R.

Servicio de Investigación Agroalimentaria. Diputación General de Aragón. Apartado 727, 50080 Zaragoza.

Se evaluó el efecto de la solarización y la micorrización en microparcels de hormigón de 150x100x60 cm, infestadas artificialmente con las razas 0, 1 y 2 de *Fusarium oxysporum f. sp. melonis (Fom)*, situadas en el SIA de Zaragoza. La solarización se realizó durante los meses de Julio y Agosto de 1998, contabilizándose una concentración de inóculo, antes y después de la misma, de 3584 y 2050 ufc/g de suelo en las parcelas no solarizadas; y de 3940 y 155 ufc/g de suelo en las parcelas solarizadas.

En ambos tipos de parcelas se trasplantaron, en Otoño de 1998, 16 plantas de melón cv. Charentais T, micorrizadas con *Glomus intraradices* y no micorrizadas. El diseño fue de bloques al azar con tres repeticiones.

Las plantas que crecieron en parcelas no solarizadas experimentaron un menor crecimiento (siendo éste mayor en las micorrizadas) que el de las que se desarrollaron en las parcelas solarizadas (experimentando también un mayor crecimiento las micorrizadas). En Diciembre de 1998, el promedio de peso seco de cuatro plantas de melón/parcela fue de 34.5 y 52.3g en las parcelas no solarizadas (no micorrizadas y micorrizadas, respectivamente); y de 107 y 130g en las parcelas solarizadas (no micorrizadas y micorrizadas, respectivamente).

No se observaron síntomas de Fusariosis vascular en las parcelas solarizadas, tanto en plantas de melón micorrizadas como no micorrizadas. En las parcelas no solarizadas, los daños causados por la mezcla de *Fom* en las plantas micorrizadas y no micorrizadas no difirieron significativamente entre sí. Un severo ataque de Oidio solapó los síntomas de Fusariosis vascular en la fase final del cultivo.

En la Primavera de 1999 se repitió el ensayo con el cultivar de melón Piel de sapo. No se observaron diferencias significativas en los resultados obtenidos con respecto al experimento anterior.

P-19

COMPARACIÓN DE DOS PROCEDIMIENTOS PARA LA PREDICCIÓN DE LAS TEMPERATURAS EN SUELOS SOLARIZADOS EN ARAGÓN

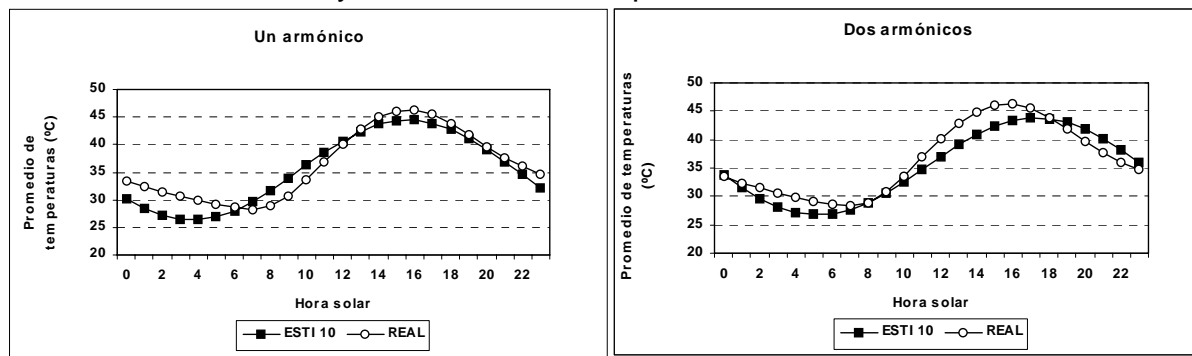
López Cosme, E. y González Torres, R.

Servicio de Investigación Agroalimentaria. Diputación General de Aragón. Apartado 727, 50080 Zaragoza.

La solarización es un método de desinfestación no química del suelo que ha sido testada con éxito en áreas con intensa radiación solar y elevada temperatura durante el verano. La duda surge cuando nos planteamos el uso de esta técnica en áreas que podemos llamar marginales en cuanto a las condiciones climáticas existentes (vg. Norte de España). Es en estas zonas en las que un método de predicción de temperaturas se hace imprescindible, pues puede proporcionar un criterio fiable para recomendar o no la utilización de la solarización.

En trabajos anteriores quedó demostrada la validez del análisis de Fourier para la predicción de las temperaturas en suelos solarizados en Aragón a partir del ajuste de los datos de la primera semana de solarización efectiva a ecuaciones sinusoidales de uno y dos términos. El ajuste de las ecuaciones de dos términos requiere disponer de un registrador continuo de temperaturas para recoger los datos de al menos ocho temperaturas diarias. Sin embargo, para ajustar la ecuación de un término sólo resulta necesario conocer las temperaturas máximas y mínimas diarias de la primera semana de solarización.

En este ensayo, llevado a cabo durante el verano de 1998, se comprobó que, si bien la estimación con la ecuación de dos términos se aproxima más a la temperatura real, esta mejoría no es significativa como para elegirla en detrimento de la estimación con la ecuación de un término. Las figuras muestran la comparación de la temperatura real del suelo a 10 cm con la estimada utilizando las ecuaciones de uno y dos armónicos, respectivamente.



Se demuestra que tan válida puede ser la predicción obtenida mediante el uso de un registrador continuo de temperaturas como la obtenida con el empleo de un simple termómetro de máximas y mínimas.

P-20

IMPORTANCIA DE ESPECIES CULTIVADAS EN LA SUPERVIVENCIA DE PATOTIPOS DE *Verticillium dahliae* QUE INFECTAN ALGODONERO Y OLIVO EN ANDALUCÍA

Rodríguez Morcillo, V.¹, Bejarano Alcázar, J.¹ y Jiménez Díaz, R.M.²

¹ Departamento de Protección Vegetal. CIFA “Alameda del Obispo” de Córdoba. Junta de Andalucía. Apto. 3092. 14080 Córdoba.

² Instituto de Agricultura Sostenible, CSIC. Apdo.4084. 14080 Córdoba.

La Verticilosis, causada por *Verticillium dahliae* Kleb, es la enfermedad más importante del algodón en Andalucía. Los aislados de *V. dahliae* presentes en dicha región se pueden diferenciar en dos patotipos principales por la reacción que inducen en plantas huésped: severo defoliante (D) y moderado no defoliante (ND). La rotación con cultivos no susceptibles podría ser una medida eficaz que contribuya a reducir los niveles de las poblaciones del hongo en el suelo. En este trabajo se presentan resultados preliminares de una investigación enfocada a estudiar la gama de plantas huésped de los patotipos D y ND entre especies cultivadas y malas hierbas frecuentes en el Valle del Guadalquivir.

Los experimentos se realizaron con dos aislados representativos de los patotipos D y ND de *V. dahliae*. Los cultivos investigados fueron: garbanzo (tipos ‘kabuli’: ‘PV-60’, ‘PV-13’; y ‘desi’: ‘WR-315’, ‘JG-62’), trigo (trigo duro: ‘Vitrón’, ‘Don Pedro’; trigo blando: ‘Cajeme’, ‘Yécora’), colza (‘Lucía’, ‘Desirée’) y ajo (ajo morado). Las plantas se inocularon por inmersión del sistema radical en una suspensión de conidias de cada aislado. Tras la inoculación, las plantas se mantuvieron en invernadero con ambiente parcialmente controlado. La severidad de los síntomas inducidos se evaluó periódicamente según una escala 0-4 (0=no síntomas; 4=planta muerta). Una vez finalizados los experimentos, se evaluaron el peso y la altura de la raíz y parte aérea de la planta y se realizaron aislamientos de diferentes zonas de las plantas inoculadas.

Los dos aislados de *V. dahliae* fueron patogénicos sobre todos los cultivares de garbanzo estudiados. La severidad de la reacción inducida fue mayor en ‘PV-60’ y ‘PV-13’ que en ‘JG-62’; y en éste último fue a su vez superior que en ‘WR-315’. El aislado D fue más virulento que el aislado ND, e indujo síntomas afectando a un elevado porcentaje del área foliar y defoliación acentuada en todos los cultivares excepto ‘WR-315’. Un porcentaje variable de las plantas de colza mostró síntomas leves, dependiendo del cultivar y aislado utilizado. Ninguna de las plantas inoculadas de trigo y ajo mostró síntomas externos de la enfermedad. Los resultados de los aislamientos indicaron la ocurrencia de infecciones asintomáticas en la raíz y parte aérea de plantas de trigo y colza. Estos datos indican el potencial de ambos patotipos para infectar especies cultivadas utilizadas frecuentemente en las rotaciones de cultivos de Andalucía, lo que podría reducir su eficacia para el control de la enfermedad. No obstante, para disponer de conclusiones definitivas es necesario continuar la investigación con un número mayor de genotipos vegetales, y en condiciones de campo.

P-21

INFLUENCIA DE LA INOCULACIÓN CON ESCLEROCIOS DE *Verticillium dahliae* EN PUNTOS INDIVIDUALES DE LA RAÍZ SOBRE LA INFECCIÓN DE PLANTAS DE BERENJENA.

Bejarano Alcázar, J.¹, Termorshuizen, A.J.² y Jiménez Díaz, R.M.³

¹ Departamento de Protección Vegetal, CIFA "Alameda del Obispo" de Córdoba, Junta de Andalucía. Apdo. 3092. 14080 Córdoba, España.

² Department of Phytopathology, Wageningen Agricultural University. P.O.B. 8025. 6700 EE Wageningen, The Netherlands.

³ Instituto de Agricultura Sostenible, CSIC. Apdo. 4084. 14080 Córdoba, España.

Verticillium dahliae induce marchiteces vasculares en una amplia gama de plantas huésped. El número de esclerocios del patógeno necesario para causar enfermedad varía con el cultivo y con el patotipo de *V. dahliae*. Una planta puede resultar afectada como consecuencia de múltiples infecciones del sistema radical, aunque el efecto de una infección puede depender de su posición en la raíz y de la edad de la planta. En este trabajo se ha investigado el efecto de inoculaciones en puntos individuales de la raíz con esclerocios de *V. dahliae*, sobre la infección de la raíz y parte aérea de plantas de berenjena (*Solanum melongena* L.).

Se realizaron tres experimentos utilizando macetas especialmente diseñadas para permitir la incorporación del inóculo y su posterior retirada del punto de inoculación sobre las raíces seleccionadas. Las inoculaciones se llevaron a cabo aplicando diferentes cantidades de esclerocios embebidos firmemente en filtros de polipropileno, directamente sobre el ápice de la raíz principal de plántulas de berenjena. El filtro con los esclerocios se retiró de la maceta a los 3-4 días de ser aplicado. Tras la inoculación, se evaluaron periódicamente el número de colonias de *V. dahliae* desarrolladas sobre el sistema radical y la presencia y densidad del patógeno en el tallo.

Las primeras plantas con infecciones en la raíz se observaron a las 2-3 semanas de la inoculación. Las raíces de las plantas inoculadas mostraron elevados niveles de infección en la zona de inoculación, pero también se observaron infecciones en zonas de la raíz situadas por encima y por debajo del punto de inoculación. La exposición de las raíces a cantidades tan bajas como 26 esclerocios fue suficiente para inducir una incidencia del 65% de plantas con raíces infectadas. Sin embargo, sólo una de un total de 205 plantas inoculadas resultó con infección del tallo. El número de plantas con infección radical disminuyó con el tiempo tras la inoculación. Estos resultados permiten concluir que la infección radical de plantas de berenjena puede ser causada por un número muy bajo de esclerocios de *V. dahliae*, y que el nivel de potencial de inóculo utilizado en los experimentos no fue suficientemente elevado para inducir infección en la parte aérea de las plantas. La metodología de inoculación desarrollada podría permitir profundizar en el estudio de la influencia de factores como el tipo y edad de la raíz infectada y la posición y el número de infecciones, sobre la relación entre densidad de inóculo e incidencia de enfermedad.

P-22

DETECCIÓN Y FLUCTUACIÓN POBLACIONAL DE CICADÉLIDOS Y FULGÓRIDOS EN VIÑAS INFECTADAS POR FITOPLASMAS EN LA PROVINCIA DE BARCELONA

Martínez, M. A.¹, Altabella, N. F.², Alari, M. T.², Tudela, R.², Ornat, C.² y Sorribas, F. J.²

¹Dpto. de Protección Vegetal. IRTA. Ctra. de Cabrils s/n. 08348-Cabrils. Barcelona. ² Dpto. Agronomía. ESAB. Comte d'Urgell 187. 08036-Barcelona.

En España han sido citadas hasta el momento dos enfermedades de la viña causadas por fitoplasmas: la Flavecencia dorada y el Bois noir. Estas enfermedades son transmitidas por injerto y por insectos del orden Homóptera, siendo los insectos vectores conocidos *Scaphoideus titanus* Ball. e *Hyalesthes obsoletus* Sign., respectivamente. Mientras que el primero ha sido detectado en diversas regiones vitícolas españolas, el segundo no ha sido citado en viña en España, a pesar de que la enfermedad ha sido detectada en diversas áreas vitícolas y con altas tasas de progresión de la enfermedad. El objetivo de este estudio fue detectar la presencia de Cicadélidos y Fulgóridos y su curva de vuelo en viñas infectadas por fitoplasmas, lo cual puede mejorar el control de la enfermedad a través del control del vector.

El estudio se inició en 1999 en un viñedo de la variedad Chardonnay de la granja escuela Torre Marimon en Caldes de Montbui (Barcelona) en la que se había diagnosticado Bois noir a partir de muestras enviadas al Servei de Laboratoris de Sanitat Agraria. La captura de los cicadélidos y fulgóridos se realizó mediante placas pegajosas amarillas de 20 x 20 cm que se dispusieron a 1 metro del tronco de las viñas enfermas y a unos 5 cm de la superficie del suelo. Los cicadélidos y fulgóridos fueron identificados mediante características morfológicas. Las placas se cambiaban semanalmente desde mayo hasta finales de septiembre. Durante el año 2000 se está realizando el mismo seguimiento para confirmar los resultados obtenidos el año anterior.

Se detectaron los cicadélidos *Agallia* spp., *Circulifer fenestratus*, *Empoasca* spp., *Psammotettix* spp., *Scaphoideus titanus*, y *Ziginidia scutellaris* y el fulgórido *Hyalesthes obsoletus*.

Empoasca spp., *Ziginidia scutellaris* y *Scaphoideus titanus* se detectaron durante todo el período de estudio. El número de capturas de *Empoasca* fue mayor que la del resto de cicadélidos. El fulgórido *Hyalesthes obsoletus* se detectó a partir del 16 de Junio en 1999, y las últimas capturas tuvieron lugar el 8 de septiembre.

P-23

TRANSMISIÓN POR SEMILLA EN CONDICIONES DE CAMPO DE LOS POTYVIRUS QUE INFECTAN LA JUDÍA.

Cifuentes G., Castro S. y Romero J.

Departamento de Protección Vegetal, INIA. Autopista A-6, Km 7,0 28040-Madrid.

El virus del mosaico común de la judía (Bean common mosaic potyvirus, BCMV) y el virus del mosaico común necrótico de la judía (Bean common mosaic necrotic potyvirus, BCMNV), son considerados los patógenos principales de este cultivo, debido a su transmisión por semilla y su dispersión en la naturaleza por pulgones. El porcentaje de transmisión por semilla varía en función de la variedad oscilando en la mayoría de cultivares entre 20 y 50 % y en algunos casos es superior al 80 %. En España en algunas zonas productoras de judía, los agricultores tienen que cambiar cada cierto número de años sus cultivares debido a que la semilla “degenera” lo que está ligado a la transmisión de BCMV y BCMNV por estas semillas. Para realizar una evaluación del porcentaje de semillas de judía infectadas por virus que se podría transmitir de una generación a otra, durante dos campañas agrícolas hemos marcado plantas al azar en cultivos comerciales de dos cultivares de judía: Canela y Palmeña ubicados en Villalis de la Valduerna (León). Las plantas marcadas fueron analizadas cada 15 días por ELISA para determinar el tiempo de su infección por virus. Al final del cultivo las plantas marcadas fueron cosechadas individualmente y las semillas obtenidas fueron germinadas en estufa a 20 °C y sus radículas primarias analizadas por ELISA para determinar la presencia o ausencia de virus. El Porcentaje de semillas infectadas obtenido varía de 9 – 31 % en el cultivar Canela y de 4- 24 % en el cultivar Palmeña. La correlación entre el porcentaje de semillas infectadas y la época de infección de la planta para las dos campañas y cultivares será presentada.

P-24

TRANSMISIÓN POR PULGONES DEL LUTEOVIRUS DEL ENROLLADO DE LA JUDÍA (BLRV)

Ortiz, V., y Romero, J.

Departamento de Protección Vegetal. INIA. Autopista A-6 Km 7,0 28040-Madrid.

Los luteovirus son un grupo importante de patógenos de plantas, principalmente por lo daños que ocasionan, son transmitidos en la naturaleza exclusivamente por pulgones de forma persistente y muchas veces algunas especies de pulgones transmiten un determinado virus de forma específica, por lo que la interacción virus-vector-planta constituye muchas veces un factor limitante en el estudio del ciclo de vida del virus.

El virus del enrollado de la judía (*Bean leaf roll virus*, BLRV) está ampliamente distribuido en las leguminosas de grano que se cultivan e la península Ibérica. En este trabajo hemos realizado ensayos de transmisión mediante pulgones del aislado del BLRV-HA proveniente de campos de haba de Antequera (Málaga). Como vectores se evaluaron dos especies de pulgones: *Myzus persicae* y *Acyrtosiphon pisum* y de esta última especie se evaluaron dos clones. La detección del virus, en la planta como en el insecto vector, se realizó mediante la amplificación por RT-PCR de un fragmento de la proteína de la cápsida del BLRV, usando cebadores específicos para este virus. Las dos especies de pulgones fueron capaces de transmitir el virus, siendo la eficiencia mayor en los dos biotipos de *Acyrtosiphon pisum* . Los resultados fueron similares cuando se utilizaron como inóculo plantas enfermas enteras u hojas desprendidas de estas plantas.

P-25

ESTUDIO SOBRE LA ECOLOGÍA MARINA DE *Fusarium* EN LA COSTA Y FONDOS MEDITERRÁNEOS DE ESPAÑA. RESISTENCIA *IN VITRO* A LA SAL DE *Fusarium oxysporum*

Blanco, R.¹, Núñez, F.J.¹, Montoya, J.R.¹, Gómez, A.¹, Santos, M.¹, Avilés, M.² y Tello Marquina, J.C.¹.

¹Dpto. de Producción Vegetal. Universidad de Almería. La Cañada de S. Urbano. S/n.

04120 Almería.

²Dpto. Ciencias Agroforestales. Universidad de Sevilla. Crtra. Utrera Km 1. 41013 Sevilla.

Este trabajo se justifica por el uso que se ha dado a las arenas de las playas en los cultivos intensivos del Sudeste Peninsular para conformar los denominados enarenados. La arena ha sido considerada como un sustrato inerte, por lo que se ha utilizado como soporte de los denominados "cultivos sin suelo" en Murcia desde hace años. El presente trabajo, completa los realizados sobre este mismo tema.

Para ello se ha procedido a la caracterización de las poblaciones de *Fusarium* presentes en las arenas y fondos de la costa Mediterránea española para ver la importancia relativa de este género con respecto a otros presentes en el medio, así como determinar la microbiota fúngica más común en las arenas mediterráneas.

Se analizaron un total de 29 muestras entre arenas de playa y fondos marinos, estos últimos fueron tomadas a profundidades que iban de 9 a 27 metros de profundidad, en distintos puntos de las costas de Almería, Alicante, Gerona, Menorca, Ibiza y Espalmador.

De este trabajo se pudo concluir que el género *Fusarium* se encuentra con cierta frecuencia distribuido en las playas y fondos marinos del litoral Mediterráneo español (hasta 27 m por debajo del nivel del mar). Tres fueron las especies aisladas: *F. oxysporum*, *F. solani* y *F. roseum*, siendo la especie *F. oxysporum* la más representativa, por contra, *F. solani* se aisló con poca frecuencia. Del estudio taxonómico de los aislados de *F. roseum* según el sistema propuesto por Nelson et al., 1983 indicó la presencia de dos especies de la sección Gibbosum, *F. equiseti* y *F. acuminatum*.

Con respecto a la microbiota fúngica no fusarica identificada es de destacar el amplio número de géneros fúngicos identificados, resaltando el género *Penicillium* presente en todas las muestras analizadas.

También se procedió a estudiar el comportamiento *in vitro* de los aislados de *Fusarium oxysporum* determinados en las arenas y fondos marinos a diferentes concentraciones salinas y a distintas temperaturas de incubación, donde no se observó una resistencia especial a la salinidad de estos *Fusaria* con los determinados en suelos cultivados. Se comprobó que los *F. oxysporum* ensayados podían crecer en medio de cultivo en condiciones de salinidad superiores a los 114.54 bares obteniéndose con la adicción de 212.5 g de ClNa por litro de PDA o con 156.6 g de ClK por litro de PDA.

P-26

EVOLUCIÓN DURANTE CINCO AÑOS DE LAS POBLACIONES DE *Tylenchulus semipenetrans* EN UN CULTIVO DE CLEMENTINOS INJERTADOS SOBRE CITRANGE CARRIZO

Tuset, J.J., Zaragoza, S., Villalba, D. y Bueno, J.M.

Micología. Dpto. de Protección vegetal y Biotecnología. Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias. Carretera Moncada-Naquera, Km 4,5. 46113 Moncada (Valencia).

El nematodo de los cítricos, *Tylenchulus semipenetrans*, está presente en la mayoría de las zonas citrícolas del mundo. Este nematodo parasita las raicillas de los árboles debilitándolos, disminuyendo su crecimiento y su producción. Debido a esto, se piensa que puede ser una de las causas del cansancio del suelo, serio problema que afecta a las replantaciones de cítricos y que dificulta el normal desarrollo de los plantones.

Un estudio para conocer la evolución de las poblaciones de *Tylenchulus semipenetrans* en un cultivo de clementinos cv. "Orogrande" injertados sobre citrange Carrizo se ha realizado en una parcela de 9.000 m² situada en el término de Ribarroja (Valencia), que anteriormente estuvo plantada de naranjos dulces cv. "Washington Navel" en patrón naranjo amargo (*Citrus aurantium*) cuyos árboles se arrancaron en la primavera de 1993. La parcela se dividió en subparcelas, efectuando en cada una de ellas diferentes tratamientos. La plantación se realizó en la primavera de 1994.

En la subparcela testigo ha sido donde más nematodos se han encontrado, con un máximo en la primavera de 1998, con una población de 181 nematodos/gr. de raíz. La subparcela en que se aplicó un lavado antes de la plantación y la subparcela en la que se injertaron los patrones al año siguiente de la plantación tuvieron una población de nematodos inferior al testigo, también con un máximo en el año 1998, con 68 y 56 nematodos/gr de raíz, respectivamente. La subparcela cuyos árboles fueron tratados con bromuro de metilo tuvo un máximo de 50 nematodos/gr. de raíz (años 1998 y 99), población que bajó mucho al año siguiente. Las subparcelas que menor cantidad de nematodos tuvieron fueron las tratadas con metam-sodio, con dicloropropeno y la subparcela cuya plantación se realizó sobre los restos de la plantación anterior (no se arrancaron las raíces). La disminución del número de nematodos en todas las subparcelas a partir del cuarto año (1999), se debe al mayor volumen del sistema radical de los árboles, lo que reduce la concentración de éstos en las raíces. En la experiencia, la eficacia de los tratamientos no queda clarificada.

P-27

VALORACIÓN DEL NÚMERO DE ZOOSPORAS DE *Phytophthora citrophthora* NECESARIO PARA CAUSAR INFECCIÓN RADICAL EN TRES ESPECIES DE CÍTRICOS

Lapeña, I., Tuset, J.J., Hinarejos, C. y Mira, J.L.

Micología. Dpto. Protección Vegetal y Biotecnología. Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias. Carretera Moncada-Náquera, Km 4,5. 46113. Moncada. Valencia.

Phytophthora citrophthora es un hongo habitante del suelo muy extendido en toda el área mediterránea y que es muy patógeno de los cítricos, al afectar el tejido cortical vivo causando podredumbres de las raíces y chancros basales. En la experiencia se utilizaron tres especies de cítricos, una empleada para producción de fruta comercial como es *Citrus sinensis* cv. "Pineapple" y otras dos empleadas como portainjertos (citrange Troyer y *Citrus reshni*). Como la infección de este hongo se produce por medio de las zoosporas, hemos estudiado diferentes concentraciones de las mismas a una idéntica conductividad eléctrica (C.E.) de 1000 S/cm. En *C. sinensis* cv. "Pineapple" las concentraciones ensayadas fueron 10^2 , 10^3 , 10^4 y 10^5 zoosporas/ml. En *C. reshni* éstas fueron de 10^3 , 10^4 y 10^5 zoosporas/ml y en c. Troyer de 10^4 y 10^5 zoosporas/ml. Todas las plántulas de estas tres especies estuvieron 24 h sumergidas en las diferentes concentraciones indicadas y después se transplantaron a las macetas y se situaron en el invernadero.

La concentración de 10^3 zoosporas/ml afectó a *C. sinensis* cv. "Pineapple" produciendo un 70% de plántulas dañadas y un 30% de muertas. Las dos especies empleadas como portainjertos necesitaron una concentración de 10^5 zoosporas/ml para ser afectadas, si bien en *C. reshni* se produjo un 90% de mortalidad y en c. Troyer ésta no tuvo lugar. Después del ensayo, *C. sinensis* cv. "Pineapple" se ha mostrado muy sensible seguida por *C. reshni*, mientras que c. Troyer se ha comportado como resistente.

P-28

DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE CYSDV EN MOSCA BLANCA (*Bemisia tabaci* GENN.) MEDIANTE HIBRIDACIÓN MOLECULAR CON SONDAS NO RADIOACTIVAS.

Ruiz, L., Janssen, D., Velasco, L. y Cuadrado, I.M.

Unidad de Virología, Centro de Investigación y Formación Agraria. Apdo. de correos 91, 04700 El Ejido. Almería.

El virus del amarilleamiento de cucurbitáceas (cucurbit yellow stunting disorder virus, CYSDV) transmitido por mosca blanca es un factor limitante en la producción de hortalizas en el sudeste español. En nuestro laboratorio estamos desarrollando modelos de predicción de esta enfermedad vírica mediante el análisis de la carga viral por mosca mediante el diagnóstico con sondas moleculares.

Para ello se han diseñado dos sondas de DNA a partir de secuencias de nucleótidos descritas del CYSDV que codifican para las proteínas HSP70 y CP, respectivamente.

La cuantificación se ha realizado midiendo la densidad óptica (DO) de la señal resultante en la hibridación de una curva patrón realizado a partir de concentraciones conocidas de cDNA viral, obtenido previamente mediante RT-PCR. Dicha curva patrón relaciona la DO con el logaritmo de la concentración de DNA/RNA por muestra y permite extrapolar concentraciones problema de RNA viral.

Se ha podido establecer así que las sondas obtenidas a partir de HSP70 y CP son comparables, mostrando resultados correlacionados. No obstante, la sonda de HSP70 es 100 veces más sensible que la derivada de CP, recomendándose, pues, la primera para estos estudios.

El método de la hibridación molecular para el desarrollo de modelos de predicción es una alternativa al empleo de RT-PCR por su reproducibilidad, sencillez y economía de medios y material.

P-29

DIAGNÓSTICO DE VIRUS DE RNA POR HIBRIDACIÓN NO RADIATIVA EN IMPRONTAS DE TEJIDO VEGETAL

Aguilar, J.M., Marco, C.F., Díaz, J.A. y Aranda, M.A.

Laboratorio de Virología. Estación Experimental “La Mayora”-CSIC. 29750 Algarrobo-Costa (Málaga)

La disponibilidad de métodos para el diagnóstico de virus que sean rápidos, fiables, sensibles y económicos es fundamental para el desarrollo de estrategias para la protección de cultivos. Los métodos basados en técnicas tipo ELISA tienen estas características, pero no siempre existen anticuerpos específicos para cada virus o es barato obtenerlos. Además, las técnicas tipo ELISA suelen requerir una cierta preparación de las muestras que hay que analizar, lo que complica el trabajo cuando el número de muestras es elevado. La facilidad actual para sintetizar sondas no radiactivas ha puesto al alcance de la mayoría de laboratorios el uso de técnicas de diagnóstico alternativas al ELISA basadas en la hibridación molecular.

Para el trabajo que llevamos a cabo en la Estación Experimental “La Mayora” con objeto de obtener variedades de melón resistentes a virosis, hemos desarrollado la técnica de diagnóstico por hibridación en improntas de tejido vegetal para tres de los virus de mayor importancia en cultivos de melón: el cucumovirus del mosaico del pepino (CMV), el potyvirus del mosaico de la sandía 2 (WMV-2) y el crinivirus del amarilleo y enanismo de las cucurbitáceas (CYSDV). Estos virus pertenecen a grupos taxonómicos distintos, alcanzan diferentes concentraciones en sus huéspedes e incluso difieren en su distribución en los tejidos de la planta infectada, aunque tienen en común poseer genomas de RNA monocatenario de polaridad positiva. En el caso de WMV-2 ha sido necesario primero la clonación de un cDNA al RNA genómico de un aislado español del virus. La región para la que se ha obtenido este cDNA comprende las 1,6 Kb más próximas al extremo 3' del RNA viral y la homología de su secuencia con otras secuencias de WMV-2 disponibles en las bases de datos ha resultado ser alta (>95%). A partir de este clon de cDNA y de otros disponibles para CMV y CYSDV se han sintetizado sondas no radiactivas de cRNA para los tres virus. Estas sondas se han utilizado en experimentos de hibridación en improntas de tejidos y también en experimentos de hibridación tipo “dot-blot” utilizados como referencia. Las muestras provenían de un panel amplio de huéspedes inoculados artificialmente (o no, para los controles negativos). Cuando ha sido posible (CMV y WMV-2) se ha realizado también diagnóstico mediante ELISA en las mismas muestras. Del análisis de los resultados se deduce: i) grados de especificidad y sensibilidad comparables para los tres métodos de diagnóstico y ii) una facilidad de ejecución y economía substancialmente superiores para el método de hibridación en improntas de tejido vegetal. Por lo tanto, recomendamos el método de hibridación no radiactiva en improntas de tejido vegetal para el diagnóstico rutinario de virus de RNA de plantas.

DETECCIÓN DE UN VIRUS NO PERSISTENTE EN SU INSECTO VECTOR POR AMPLIFICACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS VIRALES

Martín, R.¹, Palacios, I.², Fereres, A.² y de Blas, C.¹

¹ Depto. Protección Vegetal. INIA. Carretera Coruña Km 7'5. 28040 Madrid.

² Centro de Ciencias Medioambientales (CSIC), Serrano 115 dpdo, 28006 Madrid

Las técnicas de ELISA convencionales no son suficientemente sensibles para la detección de virus en sus áfidos vectores y por tanto es necesario utilizar técnicas moleculares más sensibles como la amplificación de ácidos nucleicos virales. Especialmente, los virus no persistentes son muy difíciles de detectar, debido a su extremada baja concentración y su presencia restringida al estilete, junto a su elevada inestabilidad en el vector. El virus del mosaico del pepino (CMV), un virus no persistente con una amplia gama de huéspedes y distribuido por todo el mundo, tiene un genoma RNA tripartito, y los numerosos aislados detectados se han agrupado en dos subgrupos (denominados I y II) según sus características biológicas, serológicas y de secuencia nucleotídica. En España, aunque presentes los dos, se encuentra más frecuentemente el I.

Se realizaron ensayos de transmisión de CMV utilizando individuos de *Aphis gossypii* mantenidos en melón cv Regal. Tras una hora de ayuno, los pulgones realizaron pruebas durante cinco minutos sobre plantas infectadas con CMV-M6 y se guardaron de dos formas: congelados y escachados sobre membranas de Whatman 3 MM (Olmos et al, 1997). Con los pulgones congelados se ensayaron dos métodos de extracción de RNA, resultando mejor el de Singh et al (1998). Los virus retenidos en las membranas fueron capturados en tubos tapizados bien con albúmina de suero de bovino o bien con anticuerpos específicos de CMV, según Olmos et al (1997). Se realizaron ensayos de NASBA (nucleic acid sequence based amplification) y de transcripción inversa (RT) seguida de nested PCR, utilizando oligonucleotidos cebadores previamente diseñados en zonas conservadas. Se presentan los resultados de la detección del virus en un solo pulgón.

Referencias:

Olmos et al, 1997. J. Virol. Methods 68: 127-137.

Singh. et al, 1998. J. Virol. Methods 74: 125-138.

P-31

DETECCIÓN DEL VIRUS DE LA PSORIASIS DE LOS CÍTRICOS MEDIANTE INMUNOIMPRESIÓN-ELISA.

Martín, S¹. , Milne, R.G²., Alioto, D³., Moreno, P¹., Guerri, J¹.

¹Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA), Apartado Oficial, 46113, Valencia; ²Istituto di Fitovirolgia Applicata CNR, Strada delle Cacce 73, I-10135 Torino, Italia; ³Istituto di Patologia Vegetale, Università di Napoli, 8005 Portici (Na), Italia.

La psoriasis de los cítricos es una de las virosis que más daños causa en las plantaciones comerciales de España, particularmente en las de naranjo dulce. La etiología de la psoriasis no está demostrada pero aparece asociada al virus de la psoriasis de los cítricos (CPsV), miembro tipo del género *Ophiovirus*. Actualmente el diagnóstico de la enfermedad se realiza mediante ensayos de infectividad en plantas indicadoras, que comienzan a expresar síntomas a partir de un mes después de la inoculación. Otras enfermedades transmisibles por injerto producen síntomas foliares parecidos a los de psoriasis y es preciso un ensayo de protección cruzada frente a psoriasis B (una variante más virulenta) para hacer un diagnóstico más específico. Ello hace que el actual método de diagnóstico sea caro, lento e inadecuado para una aplicación masiva.

La disponibilidad de anticuerpos monoclonales y policlonales frente a la capsida de CPsV (obtenidos en el IFA, Torino, Italia) ha permitido poner a punto un protocolo de detección por ELISA indirecto utilizando improntas de tejido sobre membranas de nitrocelulosa como antígeno.

Para la puesta a punto se inocularon plantas de invernadero con tres aislados distintos de psoriasis y se ensayó la detección utilizando distintos tipos de material. La detección más sensible de CPsV tuvo lugar en brotes jóvenes, que son además un material idóneo para la preparación de las improntas. Esta técnica se ha ensayado con éxito en nueve variedades comerciales de cítricos.

Para validar el método con aislados desconocidos de CPsV se comparó el diagnóstico serológico y mediante ensayos de infectividad de 45 aislados de distintas zonas citrícolas españolas. La coincidencia de ambos diagnósticos fue total.

Se está optimizando el diagnóstico serológico muestreando diez árboles infectados, en invierno, primavera y verano y comparando los resultados obtenidos al analizar mediante inmunopresión o ELISA en placa seis muestras de cada árbol. Se discute la fiabilidad de las distintas técnicas de diagnóstico.

P-32

DETECCIÓN DEL VIRUS DEL MANCHADO FOLIAR DE LOS CÍTRICOS (CLBV) MEDIANTE HIBRIDACIÓN MOLECULAR

Galipienso, L., Vives, M.C., Moreno, P., Navarro, L., Boil, M. y Guerri, J.

Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias, Apdo. oficial, Moncada, Valencia

El virus del manchado foliar de los cítricos (CLBV) se purificó a partir de un kumquat Nagami (SRA153) que inducía, entre otros síntomas, mala unión de algunas variedades de cítricos con el patrón citrange, que es el patrón tolerante a tristeza más utilizado en España. En experimentos previos, el virus se detectó mediante RT-PCR en algunos árboles de plantaciones comerciales con síntomas de mala unión con citrange, pero no en otros con síntomas similares. La no detección en estos últimos podría ser debida a una mala distribución del virus dentro de la planta, a que los síntomas estuviesen inducidos por variantes de secuencia de CLBV no reconocidos por los cebadores, o a que un patógeno diferente fuese el causante de los mismos. Para conocer la incidencia de CLBV en nuestro país sin las limitaciones de las técnicas basadas en RT-PCR, se ha desarrollado un procedimiento de detección del virus mediante hibridación molecular con sondas de cDNA marcadas con digoxigenina.

Para la puesta a punto del método se inocularon plantas de distintas especies y variedades de cítricos con el aislado SRA153. Para la detección se ensayó como diana extractos purificados de RNA bicatenario (dsRNA), RNA total e improntas de brotes u hojas en membranas de Nylon. La detección más consistente de CBLV se obtuvo con extractos de dsRNA y RNA total procedente de hoja joven, mientras que la utilización de improntas sólo permitió la detección en brotes jóvenes de algunas variedades.

La hibridación utilizando RNAs totales puso de manifiesto que el título y la distribución del virus en la planta infectada eran diferentes según las variedades. Así, en algunas variedades como el naranjo dulce Pineapple, el título era muy bajo y la distribución errática, por lo que era necesario utilizar un mínimo de seis muestras por planta para una detección fiable.

En condiciones de campo se observó que la distribución del virus es aún más errática, ya que se encontraron diferencias incluso entre árboles vecinos de una misma parcela. Estos resultados podrían explicar en parte la falta de asociación encontrada hasta ahora entre la presencia del virus y los síntomas de mala unión.

P-33

TOMATO YELLOW LEAF CURL BEGOMOVIRUS (TYLCV-Sar): LOCALIZACIÓN DEL ADN VIRAL Y DE LA PROTEÍNA DE CUBIERTA EN *Solanum nigrum* L. Y *Lycopersicon sculentum* Mill.

Pinner, M.S.¹, Medina, V.², Sabini, L.I.³, Achón, M.A², Markham, P.G.¹.

¹ Dept. Producció Vegetal i Ciència Forestal. Universitat de Lleida (UdL). Avda. A. Rovira Roure 177, 25198 Lleida.

² John Innes Centre. Dept. of Virus Research. Colney, Norwich UK NR4 7UH.

³ Dept. de Ciencias Exactas, Físico-Químicas y Naturales. Universidad Nacional de Río Cuarto. Río Cuarto. Córdoba. Argentina.

Mediante hibridación *in situ* e inmunomarcage con oro coloidal se ha estudiado la distribución del ADN viral y la proteína de cubierta de TYLCV-Sar en dos de sus plantas huéspedes *Solanum nigrum* L. y *Lycopersicum sculentum* L.. Las muestras de *S. nigrum* L. se colectaron durante el verano (periodo vegetativo) y el invierno (periodo de reposo).

La hibridación *in situ* demostró que la infección del virus se produce principalmente en el tejido vascular de todas las partes de la planta, incluyendo tallos, raíces y hojas. En algunas hojas la infección alcanza el parénquima empalizada. La distribución de ADN viral en hoja invernal es un 90% menor que en hoja de verano. Las raíces también son infectadas pero en menor proporción que las hojas.

El marcaje con oro coloidal confirmó la presencia de viriones localizando la proteína de cubierta en los tubos cribosos, los núcleos de las células acompañantes y el citoplasma de las células del parénquima del floema.

Ambos huéspedes mostraron un modelo similar de infección.

P-34

DESARROLLO DE UN MÉTODO DE DETECCIÓN DE ALTA SENSIBILIDAD PARA EL VIRUS DEL JASPEADO DE LA VID (GFKV)

Mansilla, C., Ponz, F., Torres, V. y Fresno, J.

INIA. Autopista a-6, km 7. 28040 Madrid.

La infección por GFKV es latente en la mayoría de las variedades de vid (*Vitis vinifera*) y de los portainjertos utilizados, resultando generalmente asintomática. Las hojas de vides con fuerte infección de jaspeado pueden presentarse arrugadas, retorcidas e incluso enrollarse hacia arriba, y determinados aislados severos pueden inducir diferentes grados de retraso en el crecimiento, disminución en la rizogénesis, en la madera de poda, del rendimiento y del vigor de la planta. Nosotros hemos encontrado fuertes niveles de incidencia en los viñedos de La Mancha.

Agente.- El virus del jaspeado (Grapevine fleck virus, GFKV) fue aislado por primera vez en 1991. Este virus no se transmite mecánicamente y está descrito como limitado a floema. Es un virus RNA isométrico de 30 nm. No está clasificado dentro de ningún grupo de los clásicos de la taxonomía de virus de plantas.

Transmisión.- No se trasmite mecánicamente, ni es conocido su vector. Su distribución es fundamentalmente por material vegetal de propagación contaminado. No presenta transmisión por semilla.

Control.- Uso de plantas de propagación libre de virus obtenidas por termoterapia o cultivo de meristemos.

Detección. -. En los esquemas de certificación y control de material vegetal, se emplea el injerto sobre *Vitis rupestris* como indicador y el análisis serológico por ELISA. Pero en muchos casos los resultados son dudosos o difíciles de interpretar.

Para evitar estas dificultades, hemos ensayado técnicas moleculares, IC-RT-PCR, como herramienta de alta sensibilidad, de uso fácil y fiable, que puede resultar útil en los programas de selección sanitaria y de certificación de material vegetal de vid a multiplicar, determinando su estatus sanitario con fiabilidad. Se presentarán y discutirán los resultados obtenidos.

P-35

DIAGNÓSTICO MOLECULAR DEL VIRUS DEL MOSAICO DEL PEPINO DULCE

Mansilla, C. y Ponz, F.

INIA, Autopista A-6 km 7. 28040 Madrid.

En muchas ocasiones, la emergencia de nuevos virus que causan daños de consideración en cultivos de gran interés económico nos coloca en una situación en la que se hace necesario poner a punto un buen método de detección de forma rápida. Los métodos de detección moleculares, altamente específicos, generalmente requieren unos conocimientos sobre el patógeno incompatibles con una puesta a punto de una técnica de detección rápida.

En nuestro laboratorio hemos puesto a punto un método de detección molecular (inmunocaptura – retrotranscripción – PCR) para un virus emergente en el cultivo de tomate, el virus del mosaico del pepino dulce, a partir del único conocimiento de que se trata de un patógeno perteneciente al grupo de los Potexvirus, lo cual se puede saber por observación de la morfología al microscopio electrónico, con total desconocimiento de la secuencia de dicho virus.

La metodología seguida en este caso pone a disposición una herramienta de trabajo que nos permitiría una primera detección rápida de patógenos, análisis de los resultados obtenidos y desarrollo de técnicas de detección totalmente específicas.

P-36

EVALUACIÓN DEL TEST ELISA (ADGEN) PARA LA DETECCIÓN DE ESPECIES DE *Monilinia* spp.

De Cal, A. y Melgarejo, P.

Departamento de Protección Vegetal. SGIT-INIA. Carretera de La Coruña km7. 28040. Madrid.

Monilinia laxa, *M. fructigena* y *M. fructicola* son los hongos que causan la podredumbre parda y el momificado de los frutos en los frutales de hueso y pepita. De estas tres especies de *Monilinia*, *M. fructicola* es la que causa mayores daños en frutales de hueso. Esta especie está presente en América y Australasia, pero no en Europa, y es uno de los organismos de cuarentena de la Unión Europea. La identificación de estas especies está basada en caracteres morfológicos y culturales. Adgen (UK) ha desarrollado un test ELISA para poder diferenciar a *M. laxa* y *M. fructigena* de *M. fructicola*.

Se ha estudiado la especificidad de este test ELISA en 56 aislados de *Monilinia* recogidos de frutales de hueso en España y que habían sido identificados como *M. laxa* y *M. fructigena* mediante métodos culturales y morfológicos. Se utilizaron como referencia 2 aislados de cada una de las tres especies procedentes de colección. Se estudiaron 3 tipos de antígenos de estos aislados: 1) micelio procedente de placas de agar patata dextrosa, 2) micelio y conidias recogidas de la superficie de cerezas o nectarinas y 3) micelio y conidias procedentes de momias de nectarinas. Los resultados obtenidos mediante ELISA cuando se usaba como antígeno micelio y conidias de *Monilinia* spp. sobre frutos son similares a las identificaciones realizadas por métodos culturales y morfológicos. De los 56 aislados, 5 eran identificados como *M. fructigena* y el resto como *M. laxa*. No se detectó, como era de prever, ningún aislado de *M. fructicola*. Sin embargo, el test ELISA no se correspondía con las especies identificadas (ni con las especies de colección) si se utilizaba como antígeno micelio procedente de placas de agar patata dextrosa o de momias.

El uso del test diagnóstico de *Monilinia* spp para identificar *M. fructicola*, puede ser una herramienta rápida a la hora de detectar este patógeno de cuarentena si se utiliza como antígeno micelio y conidias sobre fruto infectado.

P-37

PUESTA A PUNTO DE UN MÉTODO PARA LA DETECCIÓN DEL VIRUS DEL CRIBADO DEL MELÓN (MNSV) EN AGUAS DE RIEGO Y SOLUCIONES NUTRITIVAS DE CULTIVOS HIDROPÓNICOS

Lorca¹, A., Botella² F. y Pallás¹, V.

(1) Depto. de Mejora y Patología Vegetal, CEBAS-CSIC, Campus Universitario de Espinardo. A. Correos 4195, 30071 Murcia. (2). Depto. Biología Aplicada, División Ecología. U. Miguel Hernández. Campus de Orihuela (Alicante).

El virus del cribado del melón (*Melon Necrotic Spot Virus-MNSV*) afecta a diversos cultivos de cucurbitáceas y de manera especial al melón en cultivo hidropónico. La enfermedad comienza con la aparición de manchas cloróticas en las hojas que con el tiempo evolucionan a necróticas, formándose finalmente un enrejado necrótico a lo largo de las nerviaciones de la hoja. También se producen estrías en la base de los tallos y en los frutos pueden aparecer manchas necróticas con la consiguiente pérdida de calidad comercial. En los casos más severos se produce la muerte de la planta. El MNSV es un virus perteneciente al género de los *Carmovirus* y se transmite a través del hongo quitridiomicete *Olpidium bornovanus*. Este hongo se reproduce por zoosporas, las cuales se transmiten con mucha facilidad a través del agua de riego. Por este motivo, los cultivos de tipo hidropónico y semihidropónico son especialmente favorables para la transmisión del virus. En el presente trabajo se ha realizado, por una parte, una comparación entre la sensibilidad de los métodos serológicos tradicionalmente utilizados (DAS-ELISA) y otros basados en el genoma viral (hibridación molecular no radiactiva y RT-PCR) para la detección del virus en tejido foliar. Por otra parte, se ha desarrollado un método para la detección del MNSV tanto en aguas de riego como en soluciones nutritivas de cultivos hidropónicos. En el primer caso, la hibridación molecular no radiactiva resultó ser 25 veces más sensible que la detección basada en el test ELISA, siendo su umbral de detección de $6.4 \mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$ de tejido frente a los $160 \mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$ de tejido obtenidos como umbral para el test ELISA. En el caso de la RT-PCR, su sensibilidad resultó ser 625 veces superior a la de la hibridación molecular no radiactiva, alcanzando un umbral de detección de 10.2 ng mL^{-1} de tejido. Estos resultados son similares a los obtenidos previamente para otros virus (1, 2). En la detección del virus en aguas de riego y en soluciones nutritivas de cultivos hidropónicos se procedió a concentrar la muestra mediante la centrifugación del agua previo tratamiento con polietilenglicol (PEG) o directamente por ultracentrifugación. Sólo con la técnica de la RT-PCR fue posible detectar el MNSV debido a la baja concentración que el virus alcanza en estas dos situaciones. La puesta a punto de este procedimiento permitirá avanzar en los métodos de control de la infección de dicho virus.

(1) Sánchez-Navarro, J.A.; Cano, E.A. and Pallas, V. (1996). *Plant Pathol.* 45, 375-382

(2) Sánchez-Navarro, J.A.; Aparicio, F.; Rowhani, A. and Pallas, V. (1998). *Plant Pathol.* 47, 780-786.

P-38

DETECCIÓN DE AISLADOS DEL VIRUS DE LA SHARKA POR RT-NESTED-PCR EN UN SOLO TUBO CERRADO Y CARACTERIZACIÓN CON SONDAS ESPECÍFICAS

Olmos, A., Esteban, O., Bertolini, E., Martínez, M.C., Gorris, M.T. y Cambra, M.

Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA). Dpto. de Protección Vegetal y Biotecnología. Laboratorio de Virología e Inmunología. Apdo. oficial. 46113 Moncada, Valencia.

El virus de la sharka (PPV) es el agente causal de una de las enfermedades más importantes de los árboles frutales de hueso por su fácil transmisión por pulgones de forma no persistente y por sus implicaciones agronómicas y económicas. Por ello se requiere una detección sensible y fiable que además permita la clasificación de aislados en uno de los cuatro grupos reconocidos actualmente (D, M, Soc, EA) puesto que presentan un comportamiento epidemiológico y agresividad diferente.

Se ha puesto a punto un sistema basado en el método patentado (P9801642, Julio 1998) que permite la detección por nested PCR en un solo tubo cerrado de cualquier aislado de PPV. Con este fin se han diseñado iniciadores generales (P10 y P20) externos a los universales ya utilizados internacionalmente (P1 y P2). La elección de los iniciadores se realizó usando la herramienta de búsqueda nucleotídica del programa Entrez Browser, el programa informático para el estudio de similaridad Advanced BLAST 2.0 (ambos del Centro Nacional para la Información Biotecnológica, Bethesda, MD, USA) y el programa OLIGO 4.0 (LRS, Long Lake, MN, USA), según Olmos et al. (2000).

Esta técnica se ha acoplado a un revelado colorimétrico mediante sondas universales o específicas de grupo, marcadas en 3' con digoxigenina. El empleo de una sonda general permite el uso a gran escala, siendo muy útil en programas de certificación. El uso de sondas selectivas tiene interés para programas de erradicación selectiva ya que permite la caracterización por grupos de los aislados de PPV. Este tipo de revelado, permite además obviar los geles de agarosa y el tóxico bromuro de etidio.

El método permite la detección con una sensibilidad 100 veces superior a la convencional inmunocaptura RT-PCR. Esta sensibilidad hace posible el uso de dianas impresas o escachadas en papel (material vegetal o pulgones).

SENSIBILIDAD DE LAS TÉCNICAS DE DETECCIÓN DE *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* EN TUBÉRCULOS DE PATATA.

Palomo Gómez, J. L.¹; García Benavides, P.¹; López González, M. M.²

¹ Centro Regional de Diagnóstico. Consejería de Agricultura y Ganadería. Apdo. 61.37080 Salamanca.

² Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias. Apartado Oficial 46113. Moncada (Valencia).

Clavibacter michiganensis subsp. *sepedonicus*, responsable de la podredumbre anular de la patata, es un patógeno de cuarentena incluido en la lista A2 de la Directiva 77/93/CEE. La metodología oficial de análisis de esta bacteria está regulada por la Orden 7591 (BOE 81, 1994). La dificultad del análisis radica en la existencia de infecciones latentes, sin síntomas y con una baja concentración de la bacteria. Las muestras, compuestas por 200 tubérculos, se analizan mediante inmunofluorescencia indirecta. Si el resultado es positivo es imprescindible confirmar el diagnóstico mediante el aislamiento de la bacteria, que presenta dificultades ya que *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus* tiene un crecimiento lento. Suele ser necesario recurrir a inoculaciones en planta de berenjena, que actúa como medio de enriquecimiento selectivo y permite además la comprobación del poder patógeno. Una vez aislada la bacteria, la identificación se realiza mediante una serie de pruebas bioquímicas, fisiológicas y serológicas.

En este trabajo se ha comparado la sensibilidad de las siguientes técnicas:

- Inmunofluorescencia indirecta (IF) con anticuerpos monoclonales específicos.
- Aislamiento en medios de cultivo (NBY y NCP-88).
- Prueba de patogenicidad en berenjena (cv. *Black Beauty*).
- PCR (Protocolos de Schneider *et al*, 1993 y Li & De Boer, 1995), tras extracción del ADN según el protocolo de Llop *et al* (1999).

Se prepararon suspensiones de dos cepas de la bacteria, de distintos orígenes geográficos, en extractos de patata de dos variedades, hasta alcanzar unas concentraciones seriadas desde 10^7 hasta 1 ufc/mL. A cada uno de los extractos de patata con estas concentraciones bacterianas, se les aplicaron las técnicas citadas.

Los resultados obtenidos permiten establecer una escala de sensibilidad de las distintas técnicas. La más sensible resultó ser la inoculación en berenjena que detectó hasta 10^2 ufc/mL, seguida de PCR (Schneider) e IF (10^3 - 10^4 ufc/mL), y por último PCR (Li & De Boer) con 10^5 ufc/mL. El aislamiento no detectó concentraciones inferiores a 10^7 ufc/mL, por lo que no se considera recomendable. Se propone un procedimiento de análisis basado en estos resultados, que permita combinar la máxima sensibilidad con la posibilidad de procesar muestras a gran escala.

P-40

COMPARACIÓN DE MÉTODOS DE DETECCIÓN DE *Ralstonia solanacearum* EN AGUAS SUPERFICIALES.

Palomo, J. L. y García-Benavides, P.

Centro Regional de Diagnóstico. Consejería de Agricultura y Ganadería. Apdo. 61.37080 Salamanca.

Ralstonia (Pseudomonas) solanacearum es una bacteria de cuarentena incluida en la lista A2 de la Unión Europea (Directiva 77/93). Es una bacteria capaz de afectar a más de 200 especies distintas, aunque los daños más importantes se producen en la familia *Solanaceae*. En los últimos años se han detectado algunos focos de esta enfermedad en cultivos de patata en España, así como en otros países europeos. Nuestras condiciones ambientales, favorables para el desarrollo de la enfermedad, hacen que esta sea un riesgo importante para el sector productor de patata.

Las medidas para prevenir su introducción y difusión en la Unión Europea, están reguladas por el Real Decreto 1644/99 (BOE 265). Uno de los principales riesgos de esta enfermedad es su facilidad para transmitirse a través del agua de riego. Ante la aparición de un nuevo foco, se deben tomar medidas para evitar la diseminación de la bacteria por aguas superficiales. Para ello es necesario disponer de métodos de detección lo suficientemente sensibles y sencillos como para poder analizar un elevado número de muestras procedentes de las reiteradas prospecciones que deben realizarse en las aguas superficiales posiblemente contaminadas. No existe ningún método oficial de análisis de la bacteria en agua, sin embargo es conveniente realizar el aislamiento, identificación y comprobación del poder patógeno, al menos en las primeras detecciones dentro de una zona.

Aunque se dispone de un medio de cultivo semiselectivo (SMSA modificado), la concentración de la bacteria en los cauces fluviales suele ser tan baja que es necesario realizar una concentración o enriquecimiento previo al análisis. Se ha comparado la sensibilidad de los siguientes métodos de detección de *Ralstonia solanacearum* en agua:

- Siembra directa en medio SMSA.
- Concentración mediante centrifugado y siembra en SMSA.
- Enriquecimiento en medio semiselectivo SMSA y ELISA-DASI.
- Enriquecimiento en medio semiselectivo PSP modificado y ELISA-DASI.
- Enriquecimiento en medio semiselectivo Wilbrink modificado y ELISA-DASI.

Los resultados obtenidos permiten establecer un método de detección rápido y sencillo con el que se obtiene una sensibilidad superior a 5 ufc/mL de agua. Se discuten las ventajas e inconvenientes de cada uno de los métodos ensayados.

P-42

DETECCIÓN EN ESPAÑA DE *Ciborinia camelliae* KOHN, HONGO CAUSANTE DE LA MARCHITEZ DE LA FLOR DE LA CAMELIA

Mansilla, J.P., Pintos, C., Salinero, M.C., Aguin, O. y Abelleira, A.

Estación Fitopatológica "Do Areeiro". Servicio Agrario. Diputación Provincial de Pontevedra. Subida a la Robleda 36153 Pontevedra.

Ciborinia camelliae es un hongo ascomiceto helotial que afecta exclusivamente a la flor de la camelia pudiendo ser susceptibles todos los cultivares e híbridos de *C. japonica*, *C. sasanqua* y *C. reticulata*.

Este hongo, parásito de cuarentena, aparece encuadrado en la lista A1 de la EPPO no estando declarada su presencia en España hasta el año 1999.

Los síntomas y daños de la enfermedad aparecen limitados a la flor de la camelia, sobre los pétalos aparecen pequeñas manchas de color marrón oxidado que avanzan hacia la base de los mismos, toman consistencia húmeda extendiéndose, finalmente, la pudrición a toda la flor la cual puede permanecer seca sobre el arbusto o lo que es más normal, caer sin disgregarse.

Cuando se invierte la flor y se retiran los sépalos se observa un anillo de micelio blanco - grisáceo rodeando la base de los pétalos.

Las infecciones más avanzadas muestran manchas negras mucosas en el centro de algunos pétalos, producidas al principio en anillos concéntricos los cuales confluyen posteriormente quedando inmersos en un mucilago negro, son los espermodocios que presentan al microscopio fiálidas verticiladas, con un prominente collarite, en forma de racimos donde nacen los microconidios catenulados, globosos de paredes marrones con una gran gútula en su interior y un pequeño apéndice en la base, constituyendo la fase imperfecta del hongo, de la cual se desconoce su papel en el ciclo infectivo del mismo.

Dos o tres semanas después de que la flor ha caído al suelo se desarrollan, en la base de los pétalos, los esclerocios característicos de la enfermedad (reflejando la posición de los sépalos) son duros negros y pueden adherirse en un anillo permaneciendo viables hasta cinco años. A finales del otoño emergen de los esclerocios los apotecios cupulados con un estipe largo y un receptáculo de color beig-canela conteniendo ascas unitunicadas con múltiples parafisos y con ocho ascosporas en su interior las cuales serán liberadas y transportadas por el viento hasta infectar los pétalos durante todo el periodo de floración.

Ante la presencia de síntomas que podían ser debidos al ataque de este patógeno, sobre múltiples plantas de camelia distribuidas por los parques y jardines de las cuatro provincias de la Comunidad Gallega, se decidió realizar un muestreo para determinar el agente causal de los mismos, encontrándose en todos los casos las estructuras características de *Ciborinia camelliae* anteriormente descritas siendo confirmada en laboratorio la identificación positiva del mismo, lo cual permite establecer la presencia de este hongo por primera vez en España

P-43

DETECCIÓN DE ESPECIES DE *Bursaphelenchus* EN GALICIA

Abelleira, A., Mansilla J.P., Aguín, O., Pintos, C. y Salinero, M.C.

Estación Fitopatológica "Do Areeiro". Servicio Agrario. Diputación Provincial de Pontevedra. Subida a la Robleda, s/n 36153 Pontevedra.

Como consecuencia de la detección en 1999 del nematodo de cuarentena *Bursaphelenchus xylophilus* en Portugal, y por primera vez en la Unión Europea, se han realizado muestreos en todos sus países integrantes para determinar la posible presencia de *Bursaphelenchus xylophilus*.

La Comunidad Gallega reúne una serie de condiciones favorables para la posible presencia de *B. xylophilus* como son: su proximidad geográfica a Portugal, el alto porcentaje de madera que este país nos importa, y poseer una amplia distribución de las especies del género *Pinus* hospedante del nematodo.

Por todo ello, se realizaron dos muestreos, el primero en Octubre de 1999 en el que se recogieron muestras sistemáticamente en todas las masas forestales de *Pinus spp* existentes en la Comunidad Gallega, en dicho muestreo no se identificó ninguna especie de *Bursaphelenchus*. El segundo muestreo se realizó en Marzo del 2000 siguiendo las directrices de la Comunidad Europea, recogándose muestras en las zonas consideradas de máximo riesgo como fueron aserraderos, fábricas de tableros, puertos, masas de *Pinus* próximas a estos puntos y principales vías de comunicación.

El resultado de este segundo muestreo tampoco evidencia la presencia de *B. xylophilus*, pero si fueron identificadas otras especies de *Bursaphelenchus*, *B. mucronatus* y *B. sexdentati*.

Bursaphelenchus mucronatus apareció en cuatro muestras de aserraderos y fábricas, dos en madera apeada de *Pinus sylvestris* de procedencia francesa y ucraniana, y las dos restantes en las pilas de serrín por lo cual no se puede precisar su origen ni especie de *Pinus*.

B. sexdentati se detectó en una masa de *Pinus spp* próxima a un aserradero.

La identificación de *B. mucronatus* se determinó siguiendo su morfología, morfometría y por la técnica de PCR como exige el protocolo de la CEE en el caso de que aparezca dicha especie. Y la de *B. sexdentati* inicialmente solo de manera morfológica y morfométrica.

P-44

IDENTIFICACIÓN DE CUATRO ESPECIES DEL GÉNERO *Armillaria* EN GALICIA MEDIANTE LA TÉCNICA PCR

Aguín, O., Mansilla, J.P., Abelleira, A., Pintos, C. y Salinero M.C.

Estación Fitopatológica "Do Areeiro", Servicio Agrario, Excma. Diputación Provincial de Pontevedra. Subida a la Robleda s/n. 36153 Pontevedra.

Durante mucho tiempo se creyó que el género *Armillaria* estaba formado por una sola especie; sin embargo, después de múltiples estudios, se confirmó la existencia de unas cuarenta especies distribuidas por todo el mundo que varían en su comportamiento biológico y fitopatológico. En Galicia se conoce desde hace tiempo la existencia de este género, pero la falta de estudios de identificación de especies ha hecho que los síntomas de enfermedad asociados a *Armillaria* hayan sido atribuidos únicamente a la especie *Armillaria mellea*. Esto se debe a que la determinación de especies de *Armillaria* resulta bastante difícil con los métodos de identificación utilizados habitualmente en laboratorios de diagnóstico, principalmente la observación visual de carpóforos, de micelio en cultivo y de rizomorfos, junto con el método de compatibilidad. La aplicación de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) ha supuesto un enorme avance en el campo de la sistemática de hongos, facilitando la detección y determinación de especies fúngicas en un tiempo muy reducido en comparación con otros métodos ya existentes. Para *Armillaria*, el problema se ha subsanado al aplicar la técnica PCR complementada con el análisis del polimorfismo de la longitud de fragmentos de restricción (RFLP), que permite la identificación en tan sólo un día de las especies del género, dando resultados muy fiables. El objetivo principal de este trabajo fue identificar mediante la técnica PCR-RFLP las especies de *Armillaria* presentes en la Comunidad Gallega, para poder diseñar estrategias de control adecuadas a cada caso. El estudio abarcó diferentes especies vegetales (ornamentales, vid, frutales, frondosas, coníferas) procedentes de distintas localizaciones gallegas. Para el análisis se utilizaron varias fuentes de material fúngico: esporas, rizomorfos sobre las raíces, micelio situado debajo de la corteza o micelio creciendo en placa sobre un medio de cultivo. Para la extracción del ADN, se pesaron entre 10- 40 mg de cada muestra, a los que se aplicó el protocolo estándar de un kit comercial. Los cebadores utilizados, LR2R y 0-1, amplificaron un fragmento de 900 pares de bases del ADN ribosómico. Los productos de la amplificación fueron digeridos por las enzimas de restricción AluI, NdeI y BsmI, que permiten diferenciar seis especies presentes en Europa: *A. borealis*, *A. cepistipes*, *A. ostoyae*, *A. mellea*, *A. gallica* y *A. tabescens*. Se han identificado cuatro patrones de restricción que se corresponden con las especies: *A. mellea*, *A. cepistipes*, *A. ostoyae* y *A. gallica*. La más abundante fue *Armillaria mellea*, que se aisló en muestras de vid, ornamentales, frutales, frondosas y coníferas. *Armillaria gallica* se encontró en vid, frondosas y frutales. *Armillaria ostoyae* apareció únicamente en coníferas, concretamente sobre pinos. Y, por último, *Armillaria cepistipes* se detectó en una sola muestra de rizomorfos situados sobre vid.

P-45

EVALUACIÓN E IDENTIFICACIÓN DE LOS HONGOS DEL SUELO QUE CAUSAN DAÑO AL CULTIVO DE LA ALUBIA EN LA PROVINCIA DE LEÓN

Valenciano Montenegro, J.B.

Departamento de Ingeniería Agraria. Universidad de León. Avda. Portugal, nº 41.
24.071 León.

La judía (*Phaseolus vulgaris* L.), cultivo tradicional en la provincia de León, se ve afectada durante su cultivo por diversos hongos patógenos, que contribuyen a un debilitamiento e incluso a la muerte de las plantas. Los daños más graves son causados por las micosis del suelo, provocando, según el hongo, tres tipos de daños y/o sintomatologías distintas: Pudriciones radiculares, caída de plantas y/o marchitez.

En la mayoría de los casos los tratamientos realizados, bien sobre la planta durante el cultivo o bien sobre la semilla para su desinfección, se basan en el empleo de productos de amplio espectro por desconocimiento del agente causante del daño. Por este motivo se cree necesario realizar un estudio sobre la incidencia de las micosis radiculares que afectan a este cultivo en las comarcas leonesas donde se cultiva.

El objetivo del presente trabajo consiste en la evaluación de los daños causados por los hongos del suelo sobre la judía, así como el aislamiento y la identificación de los mismos.

Para lograr este objetivo se realizaron prospecciones en las distintas zonas de cultivo de la provincia de León durante los meses de Mayo a Agosto del año 1998, recogiendo información sobre sintomatología, incidencia y distribución de las plantas afectadas. El nivel o intensidad de las prospecciones en cada zona, está relacionado con la importancia del cultivo en la misma. Se tomaron muestras de dichas plantas, con el fin de realizar el análisis y posterior diagnóstico en el laboratorio, que se realizó mediante siembras en medio de cultivo (PDA), y posterior montaje con azul de metilo a partir de las colonias crecidas, para su observación al microscopio.

Los resultados obtenidos, hasta el momento, reflejan que los hongos que aparecen principalmente son *Pythium spp*, *Rhizoctonia solani* y *Fusarium solani*, además, en la mayoría de los casos asociado al daño aparecía más de un patógeno, el daño solía estar causado por más de un hongo. El síntoma más comúnmente encontrado durante las prospecciones es el de pudriciones radiculares, presente en muchas plantas, aunque sin manifestar síntomas externamente. Los resultados han mostrado que la incidencia de estos hongos sólo alcanza niveles de cierta importancia en la comarca del Páramo Leonés, aunque es la zona con mayor extensión del cultivo de alubia en la provincia de León, por el contrario existen comarcas donde prácticamente no se detectó ningún hongo.

P-46

AVANCES EN EL CONOCIMIENTO DE LA YESCA: ALGUNOS HONGOS PRESENTES EN MADERA DE VID.

Redondo, C.², Tello Mariscal, M.L.², Ávila, A.² y Mateo-Sagasta, E.¹

¹ Cátedra de Patología Vegetal, Departamento de Biotecnología, Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos, Universidad Politécnica de Madrid. Ciudad Universitaria s/n, 28040 Madrid.

² Instituto Madrileño de Investigaciones Agrarias (I.M.I.A.), Departamento de Investigaciones Agrarias, Consejería de Medioambiente, Comunidad Autónoma de Madrid, Apdo. 127, Ctra. N II, Km. 38.200, 28800 Alcalá de Henares, Madrid.

Las pudriciones producidas por los hongos de degradación de la madera de la vid (*Vitis vinifera* L.) es una de las enfermedades cuya sintomatología se conoce desde la antigüedad. Sin embargo, el estudio sistematizado de las especies fúngicas asociadas a estos procesos todavía no se ha realizado en España. Ante la inminente prohibición del uso de arsenito sódico como tratamiento fitosanitario para estas patologías, es imprescindible profundizar en el conocimiento de los hongos patógenos involucrados en este proceso, para poder proponer métodos alternativos menos nocivos para el aplicador y para el medioambiente.

Durante los años 1998 y 1999 se detectó en la Comunidad de Madrid la presencia de cepas afectadas por patologías propias de la madera de vid. Se determinó como zona de estudio las parcelas número 21 y 22 del polígono número 15 de la localidad de Valdilecha (Madrid), que debido a su topografía presenta un microclima atemperado y una humedad ambiental elevada, lo que favorece la proliferación de los hongos fitopatógenos presentes en la madera de vid. En estas parcelas se encuentran cepas de la variedad Chasela, de hasta 120 años de edad.

Tras realizar muestreos sistematizados durante estos dos años y coincidiendo con los momentos más importantes en la fenología de la planta y de los ciclos biológicos de los posibles patógenos, se aislaron y determinaron los hongos más frecuentes en cada una de las necrosis. Para ello, se tomaron muestras en las secciones longitudinales y transversales a varias alturas de las cepas afectadas.

Aunque existen especies comunes a todas ellas, los hongos aislados son diferentes en cada una de las necrosis que presentan las cepas afectadas por este síndrome. Por tanto, se puede definir la relación parásito – huésped que se establece en las necrosis presentes, estudiando la evolución de las pudriciones y la sucesión de hongos que las producen. En el estudio realizado en cepas de diferente edad afectadas por el síndrome se puede apreciar que es mayor el número e intensidad de las necrosis en aquellas de mayor edad, evidentemente favorecido por el proceso natural de envejecimiento de la cepa. No se producen diferencias notables en las especies ni en la frecuencia de aparición de las mismas en los cortes realizados en las muestras, pudiéndose observar el avance de la pudrición desde el punto de entrada, coincidiendo habitualmente con heridas de poda en los brazos, hacia la cabeza y pie de la cepa.

P-47

INCIDENCIA DEL VIRUS DEL BRONCEADO (TSWV) EN CULTIVOS DE LECHUGA Y PIMIENTO EN DIFERENTES COMARCAS DE CATALUÑA

Aramburu, J. y Aós, L.

Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentaries (IRTA). Departamento de Protección Vegetal. Ctra. de Cabrils s/n. 08348 Cabrils. Barcelona.

El virus del bronceado (TSWV) fue descrito por primera vez en nuestro país en 1985 coincidiendo con la entrada de uno de los insectos que lo transmite con mayor eficacia; el trips de las flores (*Frankliniella occidentalis*). Desde entonces se ha difundido fundamentalmente a través del litoral Mediterraneo y actualmente causa graves pérdidas económicas en cultivos hortícolas y ornamentales.

El tomate, la lechuga y el pimiento son tres de los cultivos hortícolas más afectados; sin embargo, la introducción reciente en el mercado español de híbridos de tomate con resistencia al TSWV ha hecho que la incidencia en este cultivo haya disminuido considerablemente. La ausencia o la discutible efectividad de las resistencias existentes en lechuga y pimiento y la baja efectividad del control químico o biológico sobre el insecto transmisor hace que el control de la enfermedad únicamente se pueda realizar introduciendo cambios de las prácticas culturales; lo cual obliga a tener un conocimiento sobre las características epidemiológicas de la enfermedad en cada zona particular de cultivo. Con este propósito se ha realizado un estudio para determinar la incidencia de esta enfermedad en las principales comarcas de cultivo hortícola de Cataluña y poder explicar cuales pueden ser las causas de las diferencias encontradas.

Durante dos años consecutivos se ha realizado una prospección visual de los síntomas e la enfermedad y controles serológicos mediante ELISA en un total de 50 parcelas de lechuga y 30 de pimiento, de las cuales, el virus se ha detectado en 38 parcelas de lechuga y en 23 de pimiento.

El grado de coincidencia entre los dos métodos de diagnóstico utilizados fue casi del 98% en el cultivo de la lechuga, pero descendió hasta el 91% en el pimiento. El motivo es que la apreciación de los síntomas de bronceado en pimiento se confunde en ocasiones con otras alteraciones fisiológicas causadas por diferentes motivos.

Las parcelas prospectadas se localizaron en 7 comarcas costeras y en 3 comarcas contiguas del interior. El porcentaje promedio de infección detectado en lechuga fue del 8.56% y en pimiento fue del 1.74%; no obstante, en las comarcas de interior (donde apenas se cultiva pimiento) el porcentaje de infección en lechuga fue inferior al 0.1%. Esta diferencia tan acusada se debe a que la enfermedad del bronceado en las comarcas costeras se ha convertido en endémica debido a la práctica habitual del cultivo rotativo y la abundancia de cultivos susceptibles al virus. Los agricultores, para paliar los efectos de la enfermedad, están desplazando recientemente parte del cultivo de la lechuga desde las comarcas costeras hacia comarcas contiguas del interior, alternando con los cultivos tradicionales de estas comarcas como el avellano o los cereales; cultivos que no son susceptibles al TSWV y dificultan el establecimiento de la enfermedad.

UNA NUEVA ENFERMEDAD FOLIAR EN BOJ (*Buxus*) CAUSADA POR EL HONGO *Cylindrocladium* EN EL REINO UNIDO

Henricot, B., Pérez Sierra, A. y Prior, C.

Plant Pathology Department. Royal Horticultural Society. Wisley. Woking. Surrey GU23 6QB. England.

Buxus es una planta que tradicionalmente se ha utilizado en jardinería para el diseño de parterres, creación de setos y para modelar distintas siluetas o formas de carácter ornamental. En 1998 se detectó, en el Reino Unido, una nueva enfermedad foliar del boj caracterizada por la presencia, en las hojas, de unas manchas de color marrón oscuro, en un principio circulares, que pronto se extendían hasta cubrir toda la hoja. Como resultado final se producía la defoliación de las ramas afectadas. En todos los casos a partir de las hojas sintomáticas se aisló el hongo *Cylindrocladium*.

Cylindrocladium es un hongo fitopatógeno que afecta a una amplia gama de árboles y plantas cultivadas en todo el mundo. Hasta el momento no se había detectado en *Buxus*. Esta enfermedad se ha identificado en diferentes especies cultivadas de boj y en plantas autóctonas. *B. sempervirens* 'Suffructicosa' es la especie donde el hongo se ha aislado con mayor frecuencia, aunque también ha sido confirmado en otras variedades de *B. sempervirens*, *B. microphylla* y *B. sinica*. La enfermedad se ha extendido en el Reino Unido y se ha ratificado su presencia en muestras procedentes de Francia y Bélgica.

Se realizaron los postulados de Koch para confirmar que el hongo *Cylindrocladium* era el patógeno responsable de los síntomas observados. Plantas de boj fueron inoculadas con una suspensión de conidias ($1-3 \times 10^6$ esporas/ml) de *Cylindrocladium*. Los síntomas producidos fueron los típicos de la nueva enfermedad y el hongo fue reaislado con éxito de las plantas afectadas.

Se ha intentado identificar la especie de *Cylindrocladium*, causante de la enfermedad, mediante el estudio de las características morfológicas, descritas por Crous y Wingfield (1994) y Schoch *et al* (1999), y mediante técnicas moleculares. La secuencia de la región ITS ha sido obtenida utilizando los primers ITS1 y ITS4. Basándonos en las características morfológicas y en la comparación de las secuencias obtenidas de la región ITS con las publicadas en la base de datos GeneBank, podemos concluir que la especie de *Cylindrocladium*, causante de la enfermedad en *Buxus*, no se ajusta a las características de otras especies descritas hasta ahora.

P-49

**PRESENCIA DE HONGOS EN MATERIAL DE PROPAGACIÓN DE KIWI
(*Actinidia deliciosa*)**

Prado Castro, M^a J., Grueiro López, M^a P. y Vázquez-Ruiz de Ocenda, R.A.

Departamento de Biología Vegetal. Universidad de Santiago de Compostela. Escola Politécnica Superior, Campus de Lugo. 27002, Lugo.

La superficie dedicada al cultivo del kiwi (*Actinidia deliciosa* Liang & Ferguson) en la provincia de Pontevedra se ha incrementado de forma considerable en la última década, llegando a equipararse en algunas zonas a la de viña. Este fuerte aumento llevó a pensar, en un principio, que podría conducir a una merma en la calidad fitosanitaria de las plantaciones.

El presente trabajo pretende conocer las condiciones sanitarias de las plantas de kiwi, especialmente las de plantas machos. El material vegetal analizado procede de distintas zonas de la parte aérea recogidos en distintos períodos fenológicos: flores (anteras y receptáculos) estaquillas, yemas, hojas y pecíolos bien procedentes directamente del campo, o bien este mismo material después de su manipulación para ser utilizado como explanto primero en programas de micropropagación y regeneración mediante cultivo *in vitro*. Aparte, se han analizado también los “lloros” que se producen al podar las plantas, puesto que podrían ser utilizados como focos de infección por parte de algunos hongos.

Los resultados preliminares nos indican la presencia de diferentes grupos de hongos (endófitos, saprófitos y patógenos). Afortunadamente, aun siendo relativamente frecuente la presencia de hongos potencialmente patógenos como *Botrytis cinerea* (en flor, estaquillas y hojas), *Phomopsis* spp. (en estaquillas), *Cladosporium* spp. (en hojas, estaquillas, lloros), *Phoma* sp. (en yemas) y *Alternaria* spp (en estaquillas, flores y lloros), su repercusión en el estado fitosanitario de las plantaciones no es significativa. El estudio de antagonismos entre los hongos endófitos aislados frente a los potencialmente patógenos podría dar una primera explicación de la salud manifestada en campo por el material.

Financiado por el Proyecto 1FD97-1208.

P-50

LA MARCHITEZ AMARILLA DE LA REMOLACHA AZUCARERA DE CHILE ES PRODUCIDA POR UN FITOPLASMA DEL GRUPO 16S r III.

Castro, S.¹, Hepp, R.² y Romero J.²

¹ Departamento de Protección Vegetal. INIA. Autopista A-6 Km 7,0 28040-Madrid.

² Facultad de Agronomía, Universidad de Concepción, Chillán, Chile.

La Marchitez Amarilla de la remolacha es una enfermedad endémica en Chile y Argentina. Fue la responsable de la eliminación de la industria azucarera remolachera en Argentina y en Chile es una de las enfermedades importantes de este cultivo. Es transmitida por el cicadélido *Paratanus exitiosus* y los síntomas en el campo son muy complejos e incluyen: hojas amarillas, hojas filiformes lanceoladas, hojas necróticas y enrolladas en forma de “capucha de monje”, necrosis de raíz que lleva a una marchitez generalizada de la planta. El agente causal de esta enfermedad ha sido relacionado con la presencia de fitoplasmas. Para conocer y caracterizar el agente causal de la marchitez amarilla, se recolectaron plantas con síntomas de diferentes campos y localizaciones a lo largo del valle Central de Chile. Las muestras fueron analizadas mediante i) Observaciones al microscopio electrónico de secciones ultrafinas de tejido enfermo, pudiendo apreciar las formas pleomórficas típicas de los fitoplasmas en el interior de los vasos del floema. ii) Amplificaciones por PCR del gen 16S rRNA de los fitoplasmas usando los cebadores universales P1/Tint y fU5/rU3 que amplifican 1.6 y 0.9 Kb. Los productos amplificados fueron secuenciados y comparados con secuencias de otros fitoplasmas del banco de genes mediante el programa Clustal W, lo que nos permitió construir un árbol filogenético en el cual el fitoplasma de la Marchitez Amarilla de la remolacha azucarera pertenece al Grupo 16S r III cuyo miembro tipo es el fitoplasma de la enfermedad X. iii) Con la finalidad de encontrar otro posible fitoplasma asociado con esta enfermedad, muestras de diversas procedencias fueron analizadas mediante PCR con cebadores universales y secuenciación. Como una medida de comprobación se realizaron amplificaciones usando cebadores específicos del grupo 16S r III (P1/Wxint). Todas las muestras analizadas corresponden a un fitoplasma del grupo 16S r III. iv) Para un uso como análisis de rutina los productos de PCR fueron digeridos con enzimas de restricción y los RFLPs analizados en geles de policarilamida.

A pesar de encontrarse actualmente solo en el cono sur del continente americano, esta enfermedad constituye un peligro potencial para los cultivos de remolacha azucarera de otras partes del mundo.

P-51

PRESENCIA DEL CRINIVIRUS *Tomato chlorosis virus* EN EUROPA.

Navas-Castillo, J., Camero, R., Bueno, M. y Moriones, E.

Estación Experimental "La Mayora". Consejo Superior de Investigaciones Científicas. 29750 Algarrobo-Costa, Málaga.

En 1997, se detectó en los cultivos de tomate de la costa del sur peninsular un síndrome desconocido hasta entonces en nuestro país. Los síntomas, observados en parcelas con altas poblaciones de la mosca blanca *Bemisia tabaci*, consistían en áreas cloróticas irregulares en las hojas inferiores, que evolucionaban hacia un amarilleamiento internervial. Este amarilleamiento progresaba hacia la parte superior de la planta, generalizándose a las pocas semanas. También se observaba un menor crecimiento de las plantas afectadas y éstas sufrían serias pérdidas de producción debido al menor tamaño de los frutos y al retraso en la maduración. La distribución al azar de las plantas sintomáticas parecía excluir a factores fisiológicos o nutricionales como causantes del síndrome de amarilleo. Durante los años 1998 y 1999, la enfermedad estaba ampliamente extendida en las provincias de Almería y Málaga, siendo su incidencia muy elevada en muchas parcelas. La enfermedad pudo transmitirse en el laboratorio a partir de plantas sintomáticas a plantas de tomate sanas mediante *B. tabaci*.

El análisis molecular mediante PCR y secuenciación de los productos amplificados de las plantas sintomáticas, tanto de campo como inoculadas en el laboratorio mediante *B. tabaci*, demostró que estaban infectadas por *Tomato chlorosis virus* (ToCV), un miembro del género *Crinivirus* (familia *Closteroviridae*) detectado hasta ahora sólo en Estados Unidos.

Se discutirán estos resultados y la necesidad de desarrollar estrategias de control de este nuevo problema que afecta gravemente al cultivo de tomate de la franja costera del sur peninsular, y que podría extenderse a otras zonas de cultivo, dado que ToCV también es transmitido por *Trialeurodes vaporariorum*, una especie de mosca blanca presente en regiones menos cálidas de Europa.

P-52

BACTERIAS Y FITOPLASMAS DETECTADOS POR LOS LABORATORIOS DE DIAGNÓSTICO DE LAS CC.AA.

Grupo de Trabajo de Laboratorios de Diagnóstico y Prospecciones Fitosanitarias; coordinado por Montón, C.¹; García, F.¹ y Cambra, M.²

¹ Lab. de Sanidad Vegetal. Vía Circ. Nord, 6 C/3. Zona Franca. 08040 - Barcelona.

² Centro de Protección Vegetal. Apdo. 727. 50080 - Zaragoza.

Desde 1985 los diferentes laboratorios de diagnóstico de las diversas CC.AA., reunidos por el M.A.P.A., funcionan de forma coordinada dentro del Grupo de Trabajo de Laboratorios de Diagnóstico y Prospecciones Fitosanitarias. Desde ese momento el número de laboratorios y CC.AA. participantes ha ido en aumento hasta un total de 23 laboratorios pertenecientes a 15 CC.AA.

Dentro de las características específicas de dichos laboratorios destacan el contacto directo y continuo con los agricultores y técnicos, así como por procesar un elevado número de muestras, hecho por el cual se tiene una visión muy aproximada de los problemas fitopatológicos de su entorno. No obstante, en su trabajo rutinario prima la rapidez en el diagnóstico, frente a un exhaustivo estudio taxonómico del patógeno.

Debido a la necesidad de detectar enfermedades bacterianas de cuarentena, junto a las técnicas tradicionales del aislamiento y realización de pruebas bioquímicas (nutricionales y enzimáticas), se han impuesto otras técnicas como: Inmunofluorescencia, pruebas ELISA, estudios de los perfiles de ácidos grasos por cromatografía, y técnicas moleculares (reacción en cadena de la polimerasa y análisis de fragmentos de restricción); estas últimas se han desarrollado de una forma similar para el diagnóstico de fitoplasmas.

Los registros de análisis de los diferentes laboratorios, realizados desde la creación del Grupo, han permitido detectar 46 bacterias y 6 fitoplasmas distintos en más de 110 hospedadores vegetales. Cabe destacar entre ello las primeras detecciones de: *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*, *Ralstonia solanacearum*, el fitoplasma de la flavescencia dorada de la vid y *Erwinia amylovora*.

Además se cuenta con la asistencia de la SubDirección de Sanidad Vegetal (M.A.P.A.) que apoya a los laboratorios de diagnóstico, mediante convenios de colaboración con unidades de investigación, facilitando la resolución del análisis de muestras problemáticas.

P-53

VIRUS Y VIROIDES DETECTADOS POR LOS LABORATORIOS DE DIAGNÓSTICO DE LAS CC.AA.

Grupo de Trabajo de Laboratorios de Diagnóstico y Prospecciones Fitosanitarias; coordinado por Serra, J.¹ y Cano, Ana M^a.²

¹ S^o Sanidad y Certificación Vegetal. Apto. 125. 46460 - Silla (Valencia).

² Sec. Seguimiento de Plagas. Est. Sericícola. Mayor, s/n. 30150 - La Alberca (Murcia).

En 1985, auspiciado por el M.A.P.A., se creó un grupo de trabajo que aglutinaba a los diferentes laboratorios de diagnóstico de las diversas CC.AA. A partir de entonces, y gracias al desarrollo de las competencias autonómicas, se han creado e incorporado otros centros, hasta un total de 23 laboratorios pertenecientes a 15 CC.AA.

Dichos laboratorios se caracterizan por tener un contacto directo y continuo con los agricultores y técnicos, así como por procesar un elevado número de muestras, lo que los hace tener una visión muy aproximada de los problemas fitopatológicos de su entorno. La mayoría de los análisis de los laboratorios de virología están dirigidos a la certificación de material vegetal libre de virus.

Desde la creación del Grupo de Trabajo, se han diagnosticado un total de 60 virus y 3 viroides distintos que afectan a más de 80 especies vegetales. La técnica inmunoenzimática ELISA es la mayoritariamente utilizada, aunque algunos laboratorios complementan sus diagnósticos mediante inoculación en plantas indicadoras y técnicas moleculares (reacción en cadena de la polimerasa, hibridación de ácidos nucleicos, análisis de fragmentos de restricción, etc...). En el listado de organismos detectados se ha seguido la nomenclatura utilizada por Plant Viruses Online. Descriptions and Lists from the VIDE Database (1997).

La SubDirección de Sanidad Vegetal (M.A.P.A.) apoya a los laboratorios de diagnóstico, mediante convenios de colaboración con unidades de investigación, facilitando la resolución de los análisis en el caso de muestras problemáticas.

ESPECIES DEL GÉNERO *Phytophthora* DETECTADAS POR LOS LABORATORIOS DE DIAGNÓSTICO DE LAS CC.AA.

Grupo de Trabajo de Laboratorios de Diagnóstico y Prospecciones Fitosanitarias; coordinado por Páez, J.I.¹ y Collar, J.²

¹ Lab. de Sanidad Vegetal. Apto. 121. 41089 - Montequinto (Sevilla).

² Lab. Agrario y Fitopatológico. Ctra. Betanzos-Santiago, Km. 8. 15318 - Mabegondo (La Coruña).

Desde 1985 los diferentes laboratorios de diagnóstico de las diversas CC.AA., coordinados por el M.A.P.A., funcionan con directrices comunes dentro del Grupo de Trabajo de Laboratorios de Diagnóstico y Prospecciones Fitosanitarias. Desde ese año el número de laboratorios y CC.AA. participantes ha ido en aumento hasta un total de 23 laboratorios pertenecientes a 15 CC.AA.

Dichos laboratorios se caracterizan por tener un contacto directo y continuo con los agricultores y técnicos, así como por procesar un elevado número de muestras, lo que los hace tener una visión muy aproximada de los problemas fitopatológicos de su entorno. No obstante, en su trabajo prima la rapidez en el diagnóstico, frente a un exhaustivo estudio taxonómico del patógeno; por ello, gran parte de los diagnósticos realizados no llegan a precisar la especie.

El género *Phytophthora* es uno de los hongos aislados con mayor frecuencia, detectándose en más de 190 especies vegetales. Las especies aisladas que se han determinado son: *Phytophthora cactorum*, *P. capsici*, *P. cinnamomi*, *P. citricola*, *P. citrophthora*, *P. cryptogea*, *P. erythroseptica*, *P. infestans*, *P. nicotianae*, *P. palmivora*, *P. phaseoli*, *P. porri* y *P. syringae*. En la determinación de las especies se han seguido las claves de Stamps *et al.* (1990) y Ho (1981); en el caso específico de *P. nicotianae*, de acuerdo a Hall (1994) se han fusionado las especies *P. nicotianae* var. *nicotianae* y *P. nicotianae* var. *parasitica*.

Para el aislamiento y taxonomía se han utilizado medios de cultivo generales y semiselectivos, así como la utilización de trampas vegetales, principalmente de pétalos inmaduros de clavel.

P-55

CARACTERIZACIÓN PARCIAL DE UN AISLADO DEL VIRUS DEL MOSAICO DE LA CAÑA DE AZÚCAR (SCMV)

Minguell, R., Sobrepere, M., Rodrigo, G., Medina, V., Pons, X. y Achón, M.A.

Area de Protecció de Conreus, Centre UdL-IRTA. Alcalde Rovira Roure 177, E-25198 Lleida.

Recientemente en Cataluña se ha determinado la presencia del virus del mosaico de la caña de azúcar (Sugarcane mosaic potyvirus, SCMV), con una incidencia inferior al 0.21 % y, se ha iniciado la caracterización de un aislado obtenido de maíz, al que se ha denominado SCMV-Sp. La gama de huéspedes y las reacciones que este aislado induce en varias líneas de *Sorghum bicolor* indican que está relacionado con las cepas SCMV-MB y SCMV-BC, aunque se han observado diferencias a nivel serológico, de transmisibilidad por pulgones y de la proteína de cubierta con estas cepas y con otras presentes en Europa. No se han observado diferencias a nivel citopatológico. Este aislado induce la formación de inclusiones cilíndricas de morfología laminar y en roseta, además de cristales citoplasmáticos. SCMV-Sp es transmitido en orden decreciente de eficiencia por *Schizaphis graminum*, *Sitobion avenae*, *Metopolophium dirhodum*, *Rhopalosiphum padi* y *Rhopalosiphum maidis*. Este estudio indica que las especies de pulgones presentes en la zona y su abundancia no son el factor determinante de la baja incidencia de este virus en la zona.

P-56

PRESENCIA DEL VIRUS DEL ENANISMO RUGOSO DEL MAÍZ (MRDV) EN CATALUÑA

Rodrigo, G., Sobrepere, M. Medina, V. y Achón, M.A.

Area de Protecció de Conreus, Centre UdL-IRTA Alcalde Rovira Roure 177, E-25198 Lleida.

El virus del enanismo rugoso del maíz (Maize rough dwarf Fijivirus, MRDV) es un virus distribuido mundialmente, transmitido por *Laodelphax striatellus*, cuyos huéspedes naturales conocidos son maíz, *Digitaria sanguinalis* y *Echinochloa crus-galli*.

En Cataluña se detectó por primera vez en 1986, con incidencias cercanas al 10% en campos experimentales. Posteriormente su detección se redujo notablemente, resultando muy difícil la observación de plantas con la sintomatología inducida por este virus. Recientemente, prospecciones sistemáticas en maíz indican una mayor presencia de MRDV en la zona durante la última campaña. Se ha detectado MRDV en más del 26% de los campos en los que se realizó la prospección en 1999. Su diagnóstico se ha realizado por síntomas y posterior detección de los 10 fragmentos genómicos de ARNbc. Por el momento no se ha determinado diferencias en la motilidad electroforética de los fragmentos genómicos en 48 muestras de maíz ni detectado la presencia de estos fragmentos en ningún huésped alternativo. En el citoplasma de las células infectadas con MRDV se han observado las partículas virales, viroplasmos y círculos abiertos, estructuras asociadas con la infección de MRDV. Prospecciones futuras indicarán si se está incrementando la presencia de este virus en la zona.

P-57

ETIOLOGÍA DE LA AUSENCIA DE FLORADA EN EL CULTIVO DE *Pleurotus ostreatus*.

Corpas Hervías, C. y Basallote Ureba, M.J.

Centro de Investigación y Formación Agraria "Las Torres-Tomejil". Consejería de Agricultura y Pesca. Junta de Andalucía. Apdo. Oficial. 41200 Alcalá del Río (Sevilla).

Pleurotus spp. es un hongo comestible introducido recientemente en España, del que se producen en torno a 10.000 T anuales de setas. Sin embargo, los productores poseen una escasa información técnico-fitosanitaria del cultivo. Ultimamente, se han referido importantes descensos en los rendimientos de *Pleurotus* spp. en las principales zonas productoras españolas (La Rioja y Castilla-La Mancha). Inspecciones realizadas en Septiembre de 1999 en naves de cultivo de *P.ostreatus* localizadas en el término municipal de Brenes (Sevilla), pusieron de manifiesto una importante disminución en la producción de primeras floradas y la desaparición, casi generalizada, de segundas y terceras floradas. Las bolsas de sustrato con escasa o nula producción presentaban manchas de color verde-parduzco asociadas con un exudado de color castaño, detectándose éstas anomalías desde la fase de incubación. Aunque esta coloración no se desarrollaba en todas las bolsas de la nave de cultivo, sí se pudo constatar la transmisión entre aquellas que se encontraban en contacto.

Para determinar la etiología de la ausencia de producción, se recolectaron muestras de setas y de sustrato de tres cultivos regulares. De la mayoría de las muestras analizadas se aislaron cultivos bacterianos y *Trichoderma* spp.. Asimismo, se realizaron aislamientos del cultivo de *P.ostreatus* sobre granos de trigo y de la paja de trigo utilizada como sustrato. Los microorganismos recuperados fueron testados *in vitro* mediante la realización de cultivos duales en placa Petri sobre PDA, frente a *P.ostreatus*. Se detectaron dos tipos de comportamientos, uno de los cultivos bacterianos procedente de la paja de trigo y dos de los aislados de *Trichoderma* sp. recuperados de bolsas sin coloración verde-parduzca, formaron barrera de color pardo en la zona de contacto de las colonias; sin embargo, la mayoría de los aislados de *Trichoderma* sp., procedentes de setas y de bolsas afectadas, invadieron rápidamente toda la placa. En base a los resultados obtenidos, se seleccionaron dos aislados bacterianos y dos de *Trichoderma* sp. para inocular, junto con *P. ostreatus*, la paja de trigo utilizada como sustrato. Tras la incubación, las bolsas inoculadas se dispusieron en un umbráculo con un sistema de nebulización para crear el ambiente de alta humectación necesario para la fructificación de *P. ostreatus*. Los dos aislados bacterianos testados ni impidieron la floración, ni ocasionaron disminución en la producción de setas. Por el contrario, los aislados de *Trichoderma* sp. evaluados colonizaron rápidamente el sustrato impidiendo la aparición de setas. No obstante, en las bolsas inoculadas con el aislado de *Trichoderma* sp. que formó barrera en el ensayo de cultivos duales, se observaron focos incipientes del micelio de *P. ostreatus*.

P-58

LA PROTEÍNA DE LAS INCLUSIONES CILÍNDRICAS (CI) DEL VIRUS DE LA SHARKA (PPV) REQUIERE OLIGOMERIZACIÓN PARA SU ACTIVIDAD RNA HELICASA

Gómez de Cedrón, M., López, L., Osaba, L., Domínguez, E. y García, J.A.

Centro Nacional de Biotecnología, CSIC, Campus de la Universidad Autónoma, 28049 Madrid.

Una característica exclusiva del grupo de los potyvirus es la formación de inclusiones cilíndricas en el citoplasma de las células a las que infecta. Estas inclusiones, con forma de rueda de molino, son resultado de la agregación de la proteína CI. La proteína CI del virus de la sharka (PPV) pertenece a la superfamilia SF2 de helicasas de RNA. Se sabe que CI interviene en la replicación del RNA viral, así como en el movimiento célula a célula del virus. Sin embargo, no está claro de qué manera la actividad enzimática de la proteína participa en la replicación y movimiento del virus. Tampoco se sabe el significado biológico de la formación de las inclusiones cilíndricas.

Las helicasas son proteínas que acoplan la hidrólisis de ATP al desenrollamiento de ácidos nucleicos. Ciertas helicasas son activas en forma de oligómero, mientras que otras son monoméricas. Dado que CI forma inclusiones cilíndricas debe interactuar consigo misma. Usando la técnica de dos híbridos en levadura se ha localizado la región implicada en la interacción CI-CI en el extremo amino terminal.

Por otro lado, al centrifugar en un gradiente de glicerol (15-30%) un producto de fusión de CI con la proteína de unión a maltosa (MBP), éste se distribuye a lo largo de todo el gradiente. Cuando analizamos las actividades enzimáticas observamos un máximo de actividad ATPasa coincidente con la posición del monómero, mientras que la actividad RNA helicasa se incrementa a medida que aumenta la agregación de la proteína. La relación final RNAhelicasa/ATPasa resulta muy superior en las formas agregadas de la proteína que en la monomérica. Por otro lado, llevamos a cabo experimentos de competición con mutantes negativos. A medida que se incrementa la cantidad de proteína mutante, para cantidades constantes de proteína silvestre, la actividad RNA helicasa disminuye de manera progresiva, mientras que la actividad ATPasa permanece constante. De este resultado se concluye que la interacción entre monómeros de proteína mutante y silvestre da lugar a estructuras oligoméricas sin actividad RNA helicasa.. Sin embargo, la actividad ATPasa es independiente del estado de oligomerización. Parece, por tanto que la oligomerización de CI favorece su actividad RNA helicasa, pero que la actividad ATPasa puede ser independiente del estado de agregación.

Estamos por último interesados en determinar de que manera pueden interferir estos mutantes negativos sobre las funciones de replicación y movimiento del virus.

P-59

ESTUDIO DE LA ESTABILIDAD VIRAL DEL VECTOR DE EXPRESIÓN EN PLANTAS BASADO EN EL VIRUS DE LA SHARKA (PPV)

Lucini, C., Fernández-Fernández, M.R., García, J.A. y López-Moya J.J.

Departamento Genética Molecular de Plantas, Centro Nacional de Biotecnología, CSIC, Campus de Cantoblanco, Universidad Autónoma 28049 Madrid.

La enfermedad de la sharka es responsable de importantes pérdidas económicas en la producción de melocotoneros, ciruelos y albaricoqueros en España. El virus causante de dicha enfermedad (plum pox virus, PPV) pertenece al grupo de los potyvirus. Como la mayoría de los virus de plantas, su genoma consta de una hebra de ARN de cadena sencilla y polaridad positiva.

Actualmente se está utilizando PPV, al igual que otros virus de plantas, como herramienta biotecnológica para la expresión a gran escala de genes de interés. Los vectores de expresión basados en virus de plantas ofrecen ventajas frente a otros abordajes (rapidez en la obtención de resultados, buenos rendimientos, etc). PPV presenta una ventaja frente a otros virus vegetales por la posibilidad de utilizarse en árboles frutales. Un aspecto fundamental para obtener resultados de interés práctico es el conocimiento de la estabilidad de las construcciones que expresen genes extraños al virus.

Siguiendo la estrategia de la inserción de genes, hemos clonado genes marcadores y secuencias que codifican regiones antigénicas de la proteína S del coronavirus de la gastroenteritis transmisible. Se han utilizado construcciones con vectores de PPV, incorporando genes exógenos entre P1-HC, entre N1b-CP. Resultados previos indican que en tiempos tardíos post-infección y tras sucesivos pases de inoculación mecánica, es posible detectar variantes con deleciones de distinto tamaño que afectan fundamentalmente a los genes insertados. Análisis de las secuencias flanqueantes de las deleciones sugieren que el fenómeno se debe a recombinación no homóloga. Sin embargo, el proceso por el que estas variantes son generadas no se conoce suficientemente, por lo que un estudio más detallado puede servir para esclarecer los mecanismos moleculares que operan en estos fenómenos de recombinación. Este análisis servirá para determinar el patrón de expresión de proteínas exógenas en vectores virales, así como las recomendaciones de uso práctico.

P-60

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DEL TYMOVIRUS DEL MOSAICO DEL CHAYOTE Y EXPRESIÓN EN CÉLULAS EUCARIOTAS DE SU POSIBLE PROTEÍNA DE MOVIMIENTO.

Jiménez, I., Bernal, J.J. y Rodríguez-Cerezo, E.

Centro Nacional de Biotecnología (CNB-CSIC), Campus Universidad Autónoma. Cantoblanco. 28049 Madrid.

El mosaico del chayote (*Sechium edule* Jacq. Sw.) es una enfermedad cuyo agente causal es un tymovirus que se ha denominado *Chayote mosaic virus*, ChMV (Hord y col., 1997; *Plant Disease* 81: 374-378). El genoma de ChMV está compuesto por una molécula de RNA de cadena sencilla y polaridad positiva de 6364 nucleótidos que se ha secuenciado en su totalidad (Bernal y col. *Phytopathology* en prensa). Al igual que otros tymovirus, ChMV codifica al menos 3 proteínas: una proteína rica en prolina de unos 73 kDa. denominada *overlapping protein* (OP) cuya ORF solapa con la de una proteína de mayor tamaño implicada en la replicación del genoma viral (RP), y la proteína de la cápsida (CP). La caracterización del genoma de ChMV ha permitido construir un clon de cDNA que cubre la totalidad de su genoma y que constituirá una herramienta muy útil para el estudio de la patogénesis de este virus. En la actualidad se encuentran en curso experimentos para analizar la infectividad de transcritos derivados de este clon de longitud total en diferentes huéspedes de ChMV.

Por otra parte, mutaciones que suprimen la expresión de la OP del tymovirus *Turnip yellow mosaic virus*, TYMV, anulan su movimiento intercelular (Bozart y col., 1992; *Virology* 187: 124-130). Se desconoce si esta proteína posee alguna de las características de las proteínas de movimiento virales: unión a ácidos nucleicos, localización en plasmodesmos y modificación de los mismos. Se han iniciado diversas estrategias experimentales con objeto de caracterizar las posibles propiedades de la OP de ChMV relacionadas con su función en el movimiento intercelular. Se ha clonado la secuencia que codifica la OP en un vector derivado de baculovirus para su expresión en células de insecto. Este sistema ha permitido expresar dicha proteína con una cola adicional de 6 histidinas en el extremo N-terminal, que facilita su purificación mediante columnas de afinidad Ni-NTA. En la actualidad se están optimizando las condiciones de purificación de esta proteína. Se pretende con esto generar cantidades suficientes de proteína que permitan realizar estudios bioquímicos y serológicos como ensayos de unión a ácidos nucleicos y la obtención de un suero específico contra la proteína.

También se ha construido un clon de cDNA que contiene la secuencia codificante de la OP de ChMV fusionada al gen de la proteína verde fluorescente (GFP) por su extremo C-terminal, en vectores que poseen el promotor 35S de CaMV (*Cauliflower mosaic virus*). Con esta construcción se ha bombardeado la epidermis de distintos huéspedes de ChMV. Los resultados preliminares obtenidos sugieren que la proteína de fusión OP-GFP presenta una localización subcelular concreta, aún no identificada, diferente a la observada para la GFP libre.

P-61

IDENTIFICACIÓN DE DETERMINANTES GENÉTICOS RESPONSABLES DE LA INTERACCIÓN ENTRE EL VIRUS DEL ENANISMO RAMIFICADO DEL TOMATE (TBSV) Y RNA SATÉLITES EN *Nicotiana benthamiana* Y *N. Clevelandii*

Herrero, S. y Rodríguez-Cerezo, E.

Centro Nacional de Biotecnología-CSIC. Campus Universidad Autónoma. Cantoblanco 28049 Madrid. España

Los RNA satélites (RNA sat) son moléculas de RNA subvirales asociadas a un virus ayudante del que dependen para su replicación y transmisión. Recientemente, en nuestro laboratorio hemos demostrado la asociación del tombusvirus del enanismo ramificado del tomate (tomato bushy stunt virus, TBSV) con RNA sat en infecciones naturales (1). Los RNA sat B6 (610 nt) y B10 (613 nt) son dos variantes que presentan alta homología de secuencia (97%) y que difieren en sus propiedades biológicas. Mientras que B10 atenúa los síntomas causados por TBSV e interfiere en su replicación disminuyendo de forma clara su acumulación final en todos los huéspedes estudiados (2), B6 no modifica ni los síntomas ni la acumulación del RNA viral. Para identificar los determinantes genéticos responsables de las propiedades biológicas de estas variantes, se procedió a la construcción de RNA sat recombinantes que contienen diferentes regiones de B6 y B10. Su caracterización se realizó mediante la coinoculación de transcritos infectivos de TBSV junto con transcritos de los RNA sat recombinantes en *Nicotiana benthamiana* y *N. Clevelandii*, posteriormente se determinaron los niveles de acumulación de los RNA sat y de TBSV mediante análisis de Northern blot.

La acumulación de los diferentes RNA sat recombinantes estudiados varía tanto en la hoja inoculada como en la hoja sistémica. Los resultados sugieren que los primeros 120 nt no contienen determinantes genéticos implicados en los niveles de acumulación, sino que éstos se encuentran repartidos en el resto de la molécula del RNA sat. Los datos obtenidos indican que existe una preferencia selectiva por parte del virus ayudante que resulta en una replicación y/o movimiento más efectivo de ciertos RNA sat. También se estudiaron los niveles de acumulación del virus ayudante en presencia de los diferentes RNA sat. Dichos niveles varían y se correlacionan con la capacidad de atenuación de síntomas por parte del RNA sat asociado. Nuestras observaciones indican que los determinantes genéticos del RNA sat responsables tanto de su acumulación como la del virus ayudante son de naturaleza compleja. En la actualidad se está analizando de forma más detallada los nucleótidos responsables de las diferencias biológicas entre los RNA sat B6 y B10.

(1) A. Célix, E. Rodríguez-Cerezo, and F. García-Arenal. 1997. *Virology* 239 : 277-284

(2) A. Célix, J. Burguán and E. Rodríguez-Cerezo. 1999. *Virology* 262: 129-138.

P-62

CARACTERIZACIÓN DE UNA CEPA DEL VIRUS DE LAS MANCHAS NECRÓTICAS DEL MELÓN QUE SUPERA LA RESISTENCIA CONFERIDA POR *nsv*

Díaz, J.A¹, Bernal, J.J², Moriones, E.¹ y Aranda, M.A¹

¹Estación Experimental "La Mayora", CSIC. 29750 Algarrobo-Costa. Málaga

²Centro Nacional de Biotecnología, CSIC. Campus UAM. 28049 Cantoblanco. Madrid

El virus de las manchas necróticas del melón (*Melon necrotic spot virus*, MNSV) es un *Carmovirus* (familia *Tombusviridae*) transmitido en la naturaleza por el hongo de suelo *Ospidium bornovanus* y por la semilla. En España, MNSV afecta a los cultivos protegidos de melón del litoral mediterráneo donde se obtiene gran parte de la producción dedicada a la exportación, pudiendo ocasionar por tanto importantes pérdidas económicas. El control de MNSV en melón se ha conseguido mediante el uso de semillas libres de virus, el control del vector y sobre todo gracias a la utilización muy extendida de cultivares comerciales que incorporan en homocigosis el gen *nsv* de resistencia a MNSV. Esta resistencia es la única descrita para MNSV por el momento.

Durante un muestreo en invernaderos de mejora en la provincia de Almería se observaron plantas de genotipo *nsv/nsv* de melón con los síntomas característicos de infección sistémica por MNSV. De estas plantas se muestreó material sobre el que se diagnosticó por hibridación molecular la presencia de MNSV. Se realizaron inoculaciones sobre entradas de melón susceptibles y resistentes utilizando material original muestreado e inóculo clonado. Tanto las plantas susceptibles como las supuestamente resistentes resultaron infectadas, independientemente de que el inóculo fuera el material original o clonado. Por lo tanto, se ha identificado una nueva cepa de MNSV capaz de superar la resistencia conferida por el gen *nsv*. Se ha denominado a esta cepa MNSV-264. Estamos llevando a cabo una caracterización biológica y genética de esta cepa. Los resultados obtenidos hasta el momento indican que difiere de las cepas estándar al menos en la capacidad de inducir síntomas en *Gomphrena globosa*, *Nicotiana benthamiana* y en los melones portadores del gen *nsv* en homocigosis. Hemos secuenciado el RNA genómico de MNSV-264, que ha resultado tener una homología de secuencia de nucleótidos del 92% con la cepa holandesa y del 83% y 88% con las regiones genómicas secuenciadas de las cepas japonesas S y NH, respectivamente. Los datos de secuencia no permiten establecer cuál es el determinante genético en MNSV-264 de virulencia sobre genotipos *nsv/nsv*, y por ello se ha abordado la generación de clones de cDNA al RNA de MNSV-264 a partir de los cuales sintetizar RNA infectivo y poder generar virus mutantes.

La incidencia de MNSV en el invernadero del que se aisló MNSV-264 fue muy alta, tanto en plantas susceptibles como en plantas supuestamente resistentes y los daños en plantas en las que se diagnosticó la presencia de MNSV fueron graves. Por tanto, la aparición de esta nueva cepa supone una grave amenaza para el cultivo del melón. Además de la importancia práctica inmediata del hallazgo de MNSV-264, la aparición de esta nueva cepa nos ha permitido abordar un trabajo que cubre aspectos fundamentales para conocer la biología de la interacción incompatible planta/patógeno en el caso de control monogénico recesivo.

P-63

INDUCCIÓN DE EXTENSINAS EN RAICES DE TOMATE INFESTADAS POR *Meloidogyne javanica*

Nombela, G.¹, Del Campo, F.F.² y Williamson, V.M.³

¹ Departamento de Protección Vegetal, Centro de Ciencias Medioambientales, CSIC, Serrano 115 dpdo., 28006-Madrid; ² Departamento de Biología, Universidad Autónoma de Madrid, 28049-Madrid; ³ Department of Nematology, University of California, Davis, CA 95616, USA.

Los nematodos del género *Meloidogyne* son fitoparásitos sedentarios obligados que causan grandes pérdidas en cultivos hortícolas, al reducir el aporte de nutrientes a las plantas. En las raíces originan unas formaciones características (nódulos), constituídas por células especializadas de las que se nutren (células gigantes) y tejido adyacente hipertrofiado. Las extensinas son glicoproteínas ricas en hidroxiprolina (HPRGs) de la pared celular vegetal, que juegan un papel estructural dinámico durante el desarrollo y son codificadas por genes pertenecientes a una familia multigénica. Las lesiones mecánicas y la infección por patógenos inducen la acumulación de proteínas, entre ellas extensinas, lo que indica una función adicional de éstas en la defensa de la planta.

En un reciente estudio de nuestro laboratorio sobre la respuesta temprana del tomate a la infestación por nematodos formadores de nódulos, se identificó un clon (D7) correspondiente al gen de extensina *Lemmi8*, cuya expresión se incrementaba en los ápices radiculares a las 12h de su inoculación con *Meloidogyne javanica*. En este trabajo presentamos nuevos datos sobre la expresión temprana de *Lemmi8* en cultivares de tomate resistentes y susceptibles a *M. javanica*, como respuesta a la infestación con dos poblaciones quasi-isogénicas de esta especie, VW4 (no virulenta) y VW5 (virulenta, capaz de romper la resistencia en Motelle). Hemos estudiado la inducción mediante análisis de la acumulación de transcritos por "Northern" y visualización histoquímica en plantas transgénicas (gen testigo GUS). Para emitir conclusiones fiables, hemos usado cultivares de tomate con precursores genéticos casi idénticos, Moneymaker (susceptible) y Motelle (resistente) y líneas transgénicas derivadas de esos cultivares.

En resumen, nuestros resultados muestran que tanto VW4 como VW5 producen un incremento temprano (10 h post-inoculación) y transitorio de la acumulación del producto de *Lemmi8*, en Moneymaker y en Motelle. Dicho incremento es mayor y más rápido con VW5 y en Motelle. El análisis de las plantas transgénicas realizado hasta el momento (con líneas derivadas de Moneymaker) está de acuerdo con los datos obtenidos con "Northern". En conjunto, nuestros datos sugieren que las extensinas juegan un papel en la defensa temprana y posiblemente en la respuesta de resistencia del tomate a los nematodos formadores de nódulos.

P-65

FORMACIÓN DE RNAs DEFECTIVOS INTERFERENTES DEL BROMOVIRUS DEL MOTEADO DEL HABA EN PLANTA SIN PRESIÓN DE INÓCULO.

Sandoval C., Llamas S. y Romero J.

Departamento de Protección Vegetal, INIA, Autopista A-6, Km 7,0 28040-Madrid

El bromovirus moteado del haba (*Broad bean mottle virus*, BBMV), es capaz de replicar y acumular RNAs defectivos interferentes (DI-RNAs) formados a partir de deleciones internas del RNA2. Estas partículas son formadas *de novo* a partir de pases sucesivos del virus en alta multiplicidad de inóculo a través de un apropiado huésped. Con la finalidad de evaluar el efecto del huésped y la temperatura en la formación y acumulación de estas moléculas, diferentes experimentos fueron realizados: i) Evaluación de la temperatura sobre la formación de los DI-RNAs. Plantas de haba y guisantes crecidas en fitotrón y mantenidas a diferentes temperaturas, fueron inoculadas con BBMV en pases sucesivos, encontrando que temperaturas bajas (12 °C) favorecen la formación y acumulación de los DI-RNAs, tanto en haba como en guisante. ii) Formación de DI-RNAs en plantas de habas sin necesidad de pases del virus. En estos experimentos plantas de haba fueron inoculadas con transcritos RNAs de los tres RNAs genómicos del BBMV a diversos estadios de crecimiento y mantenidos en invernadero o en condiciones de campo en un cultivo bajo malla antipulgón. La presencia o ausencia de los DI-RNAs fueron evaluados mediante hibridación tipo Northern y RT-PCR. En ambos experimentos estas partículas son formadas *de novo* sin necesidad de pases a los 35 días después de su inoculación, demostrando que estas partículas pueden ser producidas por habas *in vivo* sin presión de inoculación.

P-66

LA ESTRUCTURA DE LA PROTEÍNA DE MOVIMIENTO DE UN NUEVO TYMOVIRUS DEMUESTRA LA IMPORTANCIA DEL MOVIMIENTO EN LA GAMA DE HUÉSPEDES DE LOS VIRUS VEGETALES

Ohnesorge, S. y Pfitzner, A.

General Virology, University of Hohenheim, 70599 Stuttgart, Germany

Un tymovirus recientemente aislado de *Alliaria petiolata* presenta una homología de secuencia elevada con el tymovirus Turnip Yellow Mosaic Virus. Sin embargo, la caracterización del rango de huéspedes mostró que ambos virus difieren en su habilidad para infectar plantas de la familia de las crucíferas. El nuevo virus no es capaz de infectar de forma sistémica el huésped susceptible y representativo de TYMV, *Brassica campestris* ssp *pekinensis*. Además, este virus muestra un rango de huéspedes muy restringido. Hasta el momento solo se han conseguido infectar sistémicamente *Arabidopsis thaliana* y *Alliaria petiola*. El análisis de secuencias mostró que las pautas de lectura solapadas que codifican para la proteína de movimiento y la proteína replicasa presentan grados muy distintos de variación de secuencia en comparación con el TYMV. Mientras que la secuencia de aminoácidos de la proteína replicasa tiene una alta homología de secuencia con la ORF del TYMV, la secuencia de la proteína de movimiento es mucho más divergente. Estos resultados indican que existe una presión evolutiva para mantener la estructura y función de la proteína conservada replicasa, mientras que la proteína de movimiento es mucho más variable y por tanto susceptible de adaptarse a un nuevo rango de huéspedes.

The structure of the movement protein of a new tymovirus demonstrates the importance of the movement in the host range of plant viruses (recibido en inglés)

A recently isolated tymovirus from *Alliaria petiolata* shows a high sequence homology the tymovirus Turnip Yellow Mosaic Virus. Characterisation of the host range, however, revealed that both viruses differ in their ability to infect plants of the family cruciferae. The newly isolated virus is not able to infect systemically the representative susceptible host of TYMV, *Brassica campestris* ssp *pekinensis*. Furthermore this virus shows a very restricted host range. The only plants that could be infected systemically so far are *Arabidopsis thaliana* and *Alliaria petiola*. Sequence analysis revealed that the overlapping reading frame coding for the movement protein and the replicase protein show a very different degree of sequence variation in comparison to the TYMV. While the aminoacid sequence of the replicase protein of the new virus shows a high homology to the TYMV ORF, the protein sequence of the movement protein is much more divergent. These results indicate that there is an evolutionary pressure to keep the structure and function of the replicase protein conserved, while the movement protein is much more variable and therefore able to adapt to a new host range.

P-67

ALTERNATIVAS NO QUÍMICAS AL USO DEL BROMURO DE METILO EN CULTIVOS DE PIMIENTO EN INVERNADERO: BIOFUMIGACIÓN E INJERTO

Lacasa, A.¹, Guerrero, M.M.¹, Guirao, P.², Ros, C.², Martínez, M.C.¹, Oncina, M.¹, González, A.¹, Beltrán, C.¹, Bello, A.³ y Contreras, J.⁴

¹Consejería de Agricultura, Agua y Medio Ambiente, C.I.D.A. y Laboratorio de Sanidad Vegetal, c/ Mayor s/n 30.150 La Alberca, Murcia.

²Programa de Colaboración FECOAM y Consejería de Agricultura, Agua y Medio Ambiente, c/ Caballero, 13, 30.002 Murcia.

³Centro de Ciencias Medioambientales, C.S.I.C., c/ Serrano,115 Dpdo. 28.006 Madrid.

⁴Dept. de Producción Agraria, ETSIA; Universidad Politécnica de Cartagena, Paseo Alfonso XIII, 52, 30.203 Cartagena, Murcia.

Los acuerdos internacionales establecen la restricción del uso del bromuro de metilo como desinfectante del suelo en 2005. Esto afecta directamente a la producción de pimiento en los invernaderos de la provincia de Murcia y Sur de la de Alicante, cuyos suelos se vienen desinfectando todos los años con bromuro de metilo 98%+2% de cloropicrina (BM 98:2) a razón de 60g/m² desde hace más de 15 años.

En invernaderos comerciales con problemas fitopatológicos de suelo (*Phytophthora capsici* y *Meloidogyne incognita*) y sin ellos, se han ensayado la biofumigación (incorporando estiércol fresco de oveja, humedeciendo y cubriendo el suelo con plástico durante 4 semanas) en distintas épocas, y el injerto sobre patrones vigorosos y tolerantes a *Phytophthora*, comparando los resultados con los obtenidos en parcelas desinfectadas con BM 98:2 aplicado a 60g/m² bajo plástico de polietileno.

La biofumigación iniciada antes de la segunda semana de septiembre proporcionó aceptables niveles de control de *Phytophthora* y de producción comercial, siendo algo inferior la eficacia en el control de *Meloidogyne* y de las malas hierbas, que fueron similares a los obtenidos con metam sodio o dazomet. Cuando la biofumigación se inició a partir de mediados de septiembre, la eficacia de la desinfección fue baja, incluso en suelos sin problemas fitopatológicos. La aplicación de este método en suelos previamente desinfectados con BM requiere de su ejecución en 2 ó 3 años sucesivos para alcanzar niveles de eficacia aceptables, siendo de gran utilidad para los cultivos ecológicos.

La mayor parte de los más de 40 portainjertos ensayados han mostrado un buen nivel de resistencia a *Phytophthora* y tan sólo unos pocos no se han infestado de *Meloidogyne*. La producción con algunos patrones fue ligeramente inferior (7.1 Kg/m²) a la media de la obtenida en las parcelas desinfectadas con BM 98:2 a 60g/m² (8.2Kg/m²).

P-68

ALTERNATIVAS QUÍMICAS AL USO DEL BROMURO DE METILO EN CULTIVOS DE PIMIENTO EN INVERNADERO.

Lacasa, A.¹, Guirao, P.², Guerrero, M.M.¹, Ros, C.², Martínez, M.C.¹, Oncina, M.¹, Torres, J.¹, González, A.¹, Beltrán, C.¹ y Bielza, P.³

¹Consejería de Agricultura, Agua y Medio Ambiente, C.I.D.A. y Laboratorio de Sanidad Vegetal, c/ Mayor s/n, 30.150 La Alberca, Murcia.

²Programa de Colaboración FECOAM y Consejería de Agricultura, Aguas y Medio Ambiente, c/ Caballero, 13, 30002 Murcia.

³Depto. Producción Agraria, ETSIA, Universidad Politécnica de Cartagena, Paseo Alfonso XIII, 52, 30203 Cartagena, Murcia.

El tratamiento anual del suelo con bromuro de metilo 98% + 2% de cloropicrina (BM 98:2), aplicado a 60g/m² bajo un film de plástico de polietileno de 200 galgas, ha sido una práctica habitual en los últimos 15 años, en las cerca de 1.800ha de invernaderos destinados al cultivo de pimiento en la provincia de Murcia y en el Sur de la de Alicante. Tan drástica desinfección se realiza para limitar la incidencia de *Phytophthora capsici* y de *Meloidogyne incognita*, que se revelan como los principales problemas fitopatológicos del suelo, y, para aumentar la producción en los suelos no contaminados de patógenos.

En varios invernaderos comerciales con diferentes situaciones fitopatológicas y distinta antigüedad en la reiteración del cultivo de pimiento, se han ensayado las siguientes alternativas: 1) Dosis reducidas de BM (30 y 15g/m²) con plástico VIF. 2) La mezcla de 1,3.- dicloropropeno + cloropicrina (58-61% + 32-33.5%), aplicada a 50 g/m² en el agua por los goteadores, bajo plástico de PE de 200 galgas. 3) Metam sodio (50%) a 1.500l/ha, aplicado en el agua por los goteadores bajo PE de 200galgas. 4) Dazomet aplicado a 60g/m² sobre el suelo humedecido, incorporado con fresadora y cubierto, inmediatamente, con PE de 200 galgas. La eficacia de los tratamientos se ha comparado con la desinfección con BM 98:2 a 60g/m² bajo PE de 200 galgas.

Con la aplicación del BM a 15g/m² se produce una reducción de la producción al segundo año de reiteración del tratamiento en el mismo suelo, lo que no ha sucedido cuando se ha aplicado a 30g/m². La mezcla de 1,3.- dicloropropeno + cloropicrina ha proporcionado niveles de eficacia similares a las de la desinfección con BM 98.2 a 60g/m² en el control de malas hierbas, de *Phytophthora* y ligeramente inferiores de *Meloidogyne*; siendo también similares las producciones, incluso cuando se reitera el tratamiento dos años seguidos al mismo suelo. Los resultados obtenidos tras la aplicación de Metam sodio y de Dazomet han sido significativamente inferiores a las de BM 98:2 a 60g/m² para todos los parámetros medidos: incidencia de *Phytophthora* y de *Meloidogyne*, colonización por malas hierbas, desarrollo vegetativo de las plantas y producción.

P-69

REDUCCIÓN DE PÉRDIDAS CAUSADAS POR *Rhizoctonia solani* EN LA REMOLACHA AZUCARERA MEDIANTE CULTIVARES TOLERANTES

Ayala, J. y Ramirez , C.

AIMCRA. Apartado 855 47080 Valladolid

Rhizoctonia solani es un hongo de suelo que produce podredumbre de la raíz de la remolacha azucarera, ocasionando importantes pérdidas que afectan al rendimiento agronómico y a la calidad industrial.

Durante varios años se realizaron ensayos de control químico, pero ninguno de los fungicidas utilizados resultó eficaz.

Además, en estos años de estudio se comprobó el comportamiento errático e imprevisible del nivel de ataque y lugar de aparición de *R. solani*.

En la zona de cultivo donde se presenta *R. solani* está muy diseminada la Rizomanía. Esta virosis es, hoy día, solamente atenuada con cultivares tolerantes. Por lo tanto, el interés tanto experimental como práctico es conocer el comportamiento de cultivares tolerantes a ambas enfermedades.

Para asegurar la aparición de podredumbres producidas por *R. solani* y conseguir ataques uniformes, se puso a punto un método de inoculación basado en el desarrollado por Ruppel en Fort Collins (1979, 1998)

El inóculo se multiplica en cebada a partir de un aislado del hongo procedente de la parcela a inocular.

La preparación del inóculo y la inoculación resultaron eficaces, consiguiéndose ataques uniformes con niveles de enfermedad entre mediados y graves en cultivos convencionales.

Entre los cultivares experimentales utilizados, KWS 7180 demostró un control eficaz de la podredumbre producida por *R. solani*.

Además demuestra buena tolerancia a Rizomanía y buen potencial productivo en condiciones sanas.

En el presente año (año 2000) se están realizando ensayos con cultivares experimentales nuevos y con diferentes métodos de inoculación.

P-70

MICROBIOTA NO PATÓGENA, ENDOFÍTICA Y EPIFÍTICA, ASOCIADA A *Pseudomonas savastanoi*

Rojas, A.M., García de los Ríos, J.E., Jiménez, P., Reche, P., Mathieu-Daude, F. y McClelland, M.

Sidney Kimmel Cancer Center, San Diego, CA, USA.

Facultad de Ciencias Experimentales y Técnicas, Universidad San Pablo CEU, Madrid.

Pseudomonas savastanoi es una bacteria fitopatógena que infecta al olivo (*Olea europaea* L.), adelfa (*Nerium oleander* L.), fresno (*Fraxinus excelsior* L.) y retama (*Retama sphaerocarpa* Bss.). En estas plantas induce la formación de tubérculos, principalmente en las ramas.

Una vez desarrollada la enfermedad, los tubérculos inducidos por *P. savastanoi*, son invadidos por microorganismos pertenecientes a la microbiota epifítica, entre los que se encuentran especies de *Erwinia* y *Xanthomonas*.

Las cepas de *Erwinia* aisladas han sido estudiadas en sus características fenotípicas, comparándolas con las cepas tipo *Erwinia herbicola* NCPPB 2971 y *Pantoea agglomerans* ATCC 27155, encontrándose una gran uniformidad fenotípica.

A nivel genético, se han estudiado los patrones de PCR-ribotipia y secuencias de los genes RNA 16S, RNA 23S y *mdh*.

Estos estudios confirman que, entre las cepas aisladas, predominan las pertenecientes a *Erwinia herbicola-Pantoea agglomerans*. No obstante, se detectan grupos de cepas que se separan del citado complejo, constituyendo potenciales nuevas especies.

Las cepas tipo de las posibles nuevas especies han sido depositadas en la CECT, Valencia, y en la ATCC, Rockville, Maryland, USA. Las secuencias están disponibles en el Gen Bank de la NCBI.

P-71

EFFECTO DE LA SOLARIZACIÓN EN EL CONTROL DE LA PODREDUMBRE RADICULAR DEL AGUACATE. SENSIBILIDAD TÉRMICA DE SU AGENTE CAUSAL *Phytophthora cinnamomi* Rands

Gallo Llobet, L.¹, Rodríguez Pérez, A.¹ y Siverio de la Rosa, F.²

¹Dpto. Protección Vegetal del Instituto Canario de Investigaciones Agrarias (I.C.I.A.), Apartado 60, 38200 La Laguna-Tenerife, Islas Canarias.

²Dirección Gral. de Desarrollo Agrícola de la Consejería de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentación del Gobierno de Canarias.

Se iniciaron ensayos de campo en agosto de 1996 para estudiar el efecto de la solarización en el control de *Phytophthora cinnamomi* en un cultivo establecido desde hacía 14 años. Se partió de árboles con distintos índices de intensidad de enfermedad (IIE), que fue evaluado anualmente antes de la colocación del plástico empleando una escala visual de 0 a 10, en la que 0 corresponde a una planta sana y 10 a una muerta.

Se utilizó polietileno transparente de 350 galgas que se mantuvo en la parcela entre 6-8 semanas durante los meses de agosto-septiembre en los años 1996-1999. Antes de extender el plástico se regó a capacidad de campo y se instalaron sensores a 5, 15 y 30 cm de profundidad. Las máximas temperaturas fueron alcanzadas en el año 97: 56°C, 44°C y 38°C a 5, 15 y 30 cm respectivamente, oscilando entre 48°C y 46°C a 5 cm en los años 96, 98 y 99.

El número total de árboles en el control fue de 23 y en el suelo solarizado de 25. El IIE del control pasó de 1,7 en el primer año a 4 en el último, y en el suelo solarizado de 2,4 a 3,2. El porcentaje de árboles asintomáticos al comienzo del ensayo era del 48% en el control y del 56% en el suelo solarizado, siendo del 13% y 32% después de 4 años.

El efecto de la solarización sobre la supervivencia del patógeno se valoró enterrando granos de trigo inoculados con *Phytophthora cinnamomi* a 5, 15 y 30 cm de profundidad en la parcela. El patógeno se recuperó después del periodo de solarización en todos los puntos inoculados, si bien el porcentaje de supervivencia del mismo a 5 cm en el suelo solarizado fue inferior al control.

Se estudió la sensibilidad térmica del patógeno en ensayos de laboratorio realizados con 22 cepas del hongo que pusieron de manifiesto que tratamientos térmicos de 38-39°C durante 1 h son letales para el micelio. Sin embargo, cuando se indujo la formación de clamidosporas mediante cultivo en V8-agar, la presencia de estas estructuras permitió sobrevivir al 25% de las cepas a tratamientos de 41°C durante 1 h. Cabe señalar que, excepto en el año 97, las temperaturas alcanzadas en suelo a partir de los 15 cm durante la solarización no alcanzaron los 40°C. Estos datos deben ser tenidos en cuenta, ya que las clamidosporas constituyen la principal forma de resistencia de *Phytophthora cinnamomi* en el suelo.

P-72

ACTIVIDAD ANTAGONISTA DE BINAB[®] (*Trichoderma harzianum* Y *Trichoderma polysporum*) FRENTE A *Phytophthora cinnamomi* Rands

Domínguez Correa, P.¹, Siverio de la Rosa, F.² y Gallo Llobet, L.¹

¹Dpto. Protección Vegetal del Instituto Canario de Investigaciones Agrarias (I.C.I.A.), Apartado 60, 38200 La Laguna-Tenerife, Islas Canarias.

²Dirección Gral. de Desarrollo Agrícola de la Consejería de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentación del Gobierno de Canarias.

Phytophthora cinnamomi Rands es un hongo patógeno con más de 1000 hospedadores que ocasiona pérdidas económicas en cultivos de interés como aguacate, castaño, prótea y viña. La capacidad de algunas *Trichoderma* sp. para competir por los nutrientes, el espacio físico y degradar las paredes celulares fúngicas es bien conocida.

El presente trabajo evalúa el control ejercido por el producto Binab[®] (*Trichoderma harzianum* y *Trichoderma polysporum*) sobre el crecimiento *in vitro* de 29 cepas de *P. cinnamomi*, procedentes de distintos hospedadores: *Persea americana* (aguacate) y *Persea indica* (viñátigo), *Castanea sativa* (castaño), *Vitis vinifera* (vid) y *Protea* sp.

Se realizaron enfrentamientos duales en placa entre las cepas de *P. cinnamomi* y Binab, y se midió el crecimiento medio de las cepas a los 10 días, con y sin Binab, para establecer el porcentaje de inhibición. Se extrajeron sustancias excretadas por Binab en medio líquido con el fin de determinar si ejercían alguna actividad fungistática y se realizaron observaciones de los enfrentamientos al microscopio óptico.

Binab produjo una inhibición media del crecimiento del 75%. Asimismo, se detectó la existencia de sustancias antibióticas de bajo peso molecular con actividad fungistática y solubles en disolventes orgánicos. También se observó que Binab vacuoliza y lisa el micelio de *P. cinnamomi*, ocasionando su muerte a los 10 días del enfrentamiento en el 98% de los casos. Las observaciones microscópicas revelaron el enrollamiento de los componentes del Binab sobre las hifas del patógeno.

P-73

ESTRATEGIAS DE CONTROL DE LA PODREDUMBRE PARDA DE LA PAPA CAUSADA POR *Ralstonia solanacearum* (Smith) y Abuuchi et al.

Rodríguez Pérez, A.¹, Gallo Llobet, L.¹ y Siverio de la Rosa, F.²

¹Dpto. Protección Vegetal del Instituto Canario de Investigaciones Agrarias (I.C.I.A), Apartado 60, 38200 La Laguna-Tenerife, Islas Canarias.

²Dirección Gral. de Desarrollo Agrícola de la Consejería de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentación del Gobierno de Canarias.

***Ralstonia solanacearum*, agente causal de la podredumbre parda de la papa, fue detectada en la isla de La Palma en 1981 donde ocasiona actualmente importantes daños en este cultivo. La bacteria produce en condiciones favorables una rápida e irreversible marchitez de la planta al atacar a su sistema vascular. Los tubérculos infectados presentan una podredumbre parda en el anillo vascular con exudado bacteriano. En caso de infección severa el exudado también se observa en el exterior del tubérculo, que al final queda totalmente podrido.**

El control de *Ralstonia solanacearum* se ha revelado hasta el momento como un problema de difícil solución. Desde 1998 se llevan a cabo una serie de ensayos en parcelas infestadas de forma natural de la isla de La Palma con el fin de evaluar diferentes métodos de control. Entre los tratamientos aplicados se incluyeron enmiendas de CaCO₃, biofumigación, barbecho (removiendo periódicamente la tierra mediante arado durante el verano) y rotación con avena. Cada tratamiento fue aplicado en dos parcelas severamente afectadas, excepto la rotación con avena que se ensayó en una única parcela. El ensayo de las enmiendas se mantuvo dos años, durante los cuales se trató cada parcela con dos dosis de CaCO₃ a razón de 0,5 Kg/m². La biofumigación se ensayó por primera vez en el presente año, utilizando estiércol de cabra mezclado con restos vegetales de laurisilva. La parte tratada se cubrió durante las 5 semanas previas a la siembra con polietileno transparente de 350 galgas, dando un riego a capacidad de campo previamente. El barbecho y la rotación con avena fueron suprimidos después del primer año debido a los resultados negativos que se obtuvieron.

La eficacia de los tratamientos aplicados se evaluó valorando la incidencia de plantas afectadas, la producción total en cada parcela y el rendimiento de tubérculos con y sin síntomas externos. Además, se determinó el porcentaje de tubérculos asintomáticos, tubérculos con síntomas internos (podredumbre parda del anillo vascular) y tubérculos con síntomas externos (podridos o con exudado en los ojos) en muestras de 100-200 tubérculos recogidos al azar de cada parcela. Los resultados obtenidos señalan a las enmiendas de CaCO₃ como el tratamiento más eficaz. En este sentido, existen referencias que relacionan al calcio con cambios en la resistencia de la planta frente a diversos patógenos. En nuestro caso, se observaron incrementos del 47% y 113% en el rendimiento de tubérculos sin síntomas externos después del primer año de ensayo. También se observó una disminución significativa en el número de plantas enfermas y en el porcentaje de tubérculos con síntomas (internos y externos) de las muestras de tubérculos recogidos al azar.

P-74

ESTUDIO DE LA PRODUCCIÓN DE 2,4-DIACETILFLOROGLUCINOL POR DIFERENTES CEPAS DE *Pseudomonas fluorescens* ACTIVAS EN EL BIOCONTROL DE DIFERENTES HONGOS FITOPATÓGENOS

Alemany J., Montojo O., Camps J. y Montesinos E.

Institut de Tecnologia Agroalimentària-CeRTA, Universitat de Girona. Avda. Lluís Santaló s/n 17071, Girona. Fax: 972-418399.

En el control de las enfermedades fúngicas los tratamientos con fungicidas són los más eficaces y los más utilizados aunque presentan algunos inconvenientes como son la presencia de residuos en las cosechas y su dispersión en el medio ambiente. La necesidad de un desarrollo sostenible ha incentivado el estudio de nuevas estrategias para el control de enfermedades tanto bacterianas como fúngicas. Una de las estrategias consiste en el uso de microorganismos agentes de biocontrol, no patógenos de las plantas o animales, pero que impiden la infección o desarrollo del patógeno. Uno de los mecanismos utilizados por ciertos agentes de biocontrol es la antibiosis. Un problema en la selección de los agentes de biocontrol productores de antibióticos es que existe una gran variabilidad en la producción del antibiótico según el medio de crecimiento. En este campo es donde se enmarca el trabajo que se presenta a continuación.

El objetivo principal de este estudio fué caracterizar la producción *in vitro* del antibiótico 2,4-diacetilfloroglucinol (DAFG) en diferentes cepas de *Pseudomonas fluorescens* caracterizadas como agentes de biocontrol, y comparar los parámetros de crecimiento y de producción del antibiótico en diferentes medios nutritivos. Se utilizaron diferentes medios de crecimiento y además del medio de crecimiento se evaluó el efecto de azúcares y de la adición de hierro como aditivos en el medio.

Mediante pruebas de inhibición del crecimiento *in vitro* de patógenos indicadores como *Penicillium expansum* y *Stemphylium vesicarium*, se vió que el DAFG inhibía su crecimiento pero que no existía correlación entre producción de antibiótico por las cepas y la formación de halos de inhibición. Se determinó cuales eran las mejores productoras y las características del medio, aditivos (azúcares o hierro) que conducían a una mayor producción de DAFG.

Los resultados mostraron que la producción de DAFG depende de la cepa y del medio de crecimiento y que la glucosa tiene un efecto positivo en su producción, mientras que el hierro tiene un efecto que depende de la cepa y del medio. Las cepas caracterizadas como buenos agentes de biocontrol como *P. fluorescens* Q2-87 y JBR 1-70 (cepas de referencia) eran las que en casi todos los medios ensayados aparecían como las más productoras. Una de las cepas de nuestra colección, la EPS808, productora de DAFG, también presentó un patrón de producción similar a las anteriores por lo que parece ser una buena candidata a agente de biocontrol si el mecanismo implicado es la producción de este antibiótico. El estudio de la producción de antibiótico en múltiples medios puede ser de ayuda en la selección de futuros agentes de biocontrol.

P-75

INDUCCIÓN DE TOLERANCIA A *Meloidogyne javanica* EN EL HÍBRIDO DE ALMENDRO X MELOCOTONERO MAYOR (*Prunus dulcis* x *Prunus persica*) POR EL HONGO MICORRÍFICO *Glomus intraradices*

Hernández-Dorrego, A.², Calvet, C.¹, Pinochet, J.³, Estaún, V.¹ y Camprubí, A.¹.

¹ Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentàries (IRTA), Dept. de Protecció Vegetal, Ctra. de Cabrils s/n, 08348 Cabrils, Barcelona.

² Sustancias y Tecnologías Naturales, S.L. (SYTEN). Calle Provença 288 Pral., 08008 Barcelona.

³ Agromillora Catalana, S.A., El Rebato s/n, 08739 T.M. Subirats, Barcelona.

El híbrido interespecífico Mayor (*Prunus dulcis* Mill. x *Prunus persica* (L.) Batsch.) se comenzó a difundir hace muy pocos años y su producción comercial se encuentra actualmente en aumento en España. La mayoría de sus características agronómicas son favorables. No obstante, es un patrón altamente susceptible al ataque de nematodos agalladores. Estudios previos de investigación han demostrado la elevada aptitud para la micorrización de este portainjerto; sin embargo, los criterios clásicos actuales en la obtención de material vegetal no consideran los beneficios aportados por la inoculación artificial temprana de los portainjertos con hongos formadores de micorrizas arbusculares (HMA), a pesar de tratarse de una alternativa biotecnológica factible para aumentar la tolerancia a patógenos del suelo. Se realizó un ensayo en condiciones de invernadero con la finalidad de estudiar a corto plazo la respuesta del portainjerto micorrizado artificialmente a una población del nematodo agallador (*Meloidogyne javanica* (Treub.) Chitwood). Las plantas se inocularon con un aislado del HMA *Glomus intraradices* Schenk y Smith en el momento del trasplante a contenedores, y cinco meses después (período que simulaba la fase de vivero) se inocularon con el nematodo. Tras nueve meses de crecimiento, la colonización micorrícica de las raíces superó el 75% y se produjo a su vez una estimulación significativa del desarrollo de los portainjertos micorrizados con respecto a los no inoculados. Los resultados del estudio indicaron que ambos microorganismos (el simbiote beneficioso y el patógeno) son capaces de colonizar simultáneamente los mismos espacios en el sistema radical de la planta. Sin embargo, el índice de agallamiento producido por el nematodo, así como la población final del mismo en suelo y raíces, fueron significativamente superiores en las plantas no micorrizadas.

P-76

EFFECTO DE LA INOCULACIÓN TEMPRANA DE OLIVOS CON MICORRIZAS ARBUSCULARES EN EL CRECIMIENTO Y PRODUCCION EN PLANTACION

Estaún, V.¹, Camprubí, A.¹, Calvet, C.¹ y Pinochet, J.²

¹Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentaria (IRTA.) Dept. de Protecció Vegetal, Ctra. de Cabrils s/n., 08348 Cabrils, Barcelona.

²Agromillora Catalana S.A., El Rebató s/n., 08739 T.M. Subirats, Barcelona.

El olivo (*Olea europaea* L.) es una planta que forma micorrizas arbusculares en condiciones naturales. Sin embargo, se desconoce el efecto a largo plazo de la inoculación de cultivares comerciales con hongos formadores de micorrizas.

En este estudio se inocularon estaquillas enraizadas del cultivar arbequina con dos especies de hongos formadores de micorrizas seleccionados por su eficacia en la promoción del crecimiento: *Glomus mosseae* (BEG 116) y *Glomus intraradices* (BEG 72).

En el momento del trasplante a campo las plantas inoculadas con los hongos formadores de micorrizas presentaban un mayor crecimiento que las plantas no inoculadas. A los 6 meses del trasplante las plantas no inoculadas habían formado la simbiosis con hongos nativos. La evolución del crecimiento se controló periódicamente a lo largo de 3 años y las plantas micorrizadas artificialmente mantuvieron su ventaja en el crecimiento respecto de las plantas no inoculadas. El hongo más efectivo fue *Glomus intraradices* (BEG 72) aislado de una zona con características edafoclimáticas similares a las de la zona estudiada.

Los resultados de la primera cosecha demuestran que la micorrización temprana influye positivamente en el rendimiento del cultivo.

P-77

RESPUESTA A LA MICORRIZACIÓN CON *Glomus intraradices* EN EL PORTAINJERTO DE CEREZO CAB-6P (*Prunus cerasus* L.)

Bonet, A.¹, Calvet, C.¹, Pinochet, J.², Camprubí, A.¹ y Estaún, V.¹

¹Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentàries (IRTA), Dpt. de Protecció Vegetal, Ctra. de Cabrils s/n., 08348 Cabrils, Barcelona.

²Agromillora Catalana, S.A., El Rebato s/n 08739 T.M. Subirats, Barcelona.

En la producción frutícola actual, la utilización de portainjertos es una necesidad debido a la baja adaptabilidad a determinadas condiciones desfavorables que tienen los cultivares comerciales en general. En diversos estudios se ha demostrado un incremento significativo del desarrollo de la planta como respuesta a la micorrización artificial en portainjertos de frutales. Por otra parte, las plantas micorrizadas toleran mejor las condiciones de estrés fisiológico, como deficiencia de nutrientes, sequía, salinidad y el ataque de patógenos del suelo.

Con el fin de determinar la aptitud para la micorrización de los principales portainjertos comerciales en España, se ha realizado un estudio con el cerezo CAB-6P, utilizando como inóculo micorrícico un aislado del hongo formador de micorrizas arbusculares *Glomus intraradices*, que se ha manifestado como el hongo más efectivo para colonizar raíces.

Los portainjertos se inocularon durante el trasplante a macetas de 2,7 l de capacidad y se mantuvieron en condiciones de invernadero.

El inóculo estaba compuesto por 10 g de suelo rizosférico que incluían hifas, esporas y fragmentos de raicillas micorrizadas de plantas fuertemente colonizadas. Se empleó como sustrato una mezcla de suelo arenoso, arena de sílice y turba en proporción 3:2:1. y se utilizaron como parámetros para determinar el desarrollo vegetativo de la planta: el peso fresco, el peso seco y la longitud de la parte aérea, que se midieron después de un año de crecimiento en condiciones de invernadero.

En las plantas micorrizadas, se observó un incremento en crecimiento respecto a las no inoculadas de hasta un 100%. Los resultados analizados demuestran que las diferencias entre plantas micorrizadas y plantas no inoculadas son atribuibles a la micorrización con *Glomus intraradices*.

P-78

EL CONTROL DE LAS ENFERMEDADES DE POSCOSECHA DE FRUTOS CÍTRICOS. SOLUCIONES DE TECNIDEX

Salvador, E. y Domingo M.

Departamento de Tecnología de Tecnidex, Técnicas de Desinfección S.A. C./ Ciudad de Sevilla nº 45 A, Polígono Industrial Fuente del Jarro, 46988 Paterna (Valencia).

Las podredumbres poscosecha de frutos cítricos ocasionan importantes pérdidas económicas, por lo que su control es necesario para reducirlas y evitar el desarrollo de micotoxinas nocivas para la salud humana. La mayoría de los fungicidas utilizados desde hace más de 30 años van dirigidos al control de *Penicillium digitatum* y *P. italicum*, causantes de un 75-80 % de las pérdidas por podredumbres poscosecha.

Posteriormente la presión sobre *Penicillium* spp. incrementó la incidencia de otros hongos como *Geotrichum candidum*, causante de la podredumbre amarga, *Phytophthora citrophthora*, causante del aguado, *Botrytis cinerea*, causante de la podredumbre gris, *Alternaria citri*, causante de la podredumbre negra, y *Rhizopus nigricans*, causante de la podredumbre por *Rhizopus* ("el pelut").

Tecnidex ha desarrollado en los últimos años una amplia gama de fungicidas de poscosecha, que permite además del control de *Penicillium*, con los imidazoles, imazalil (Textar I,) y procloraz (Ascurit), y los benzimidazoles, tiabendazol (Textar 60 T) y metil-tiofanato (Fubotec IM), y combinaciones de imidazoles y bencimidazoles (Fubotec Extra, Fubotec IM), un buen control sobre otras enfermedades como, *G. candidum*, mediante el uso del fungicida guazatina (Guazatec Plus, Textar 20 G), *P. citrophthora*, mediante el uso del fosetil-aluminio (Fubotec-Al), *B. cinerea*, mediante el uso de tiabendazol y dicloran (Fubotec Plus), y un control aceptable sobre *A. citri*, mediante el uso de Procloraz (Ascurit), y sobre *R. nigricans*, mediante el uso de dicloran (Textar 20 D, Fubotec Plus). La adecuada combinación de esta gama de productos en cada momento de la campaña, permite un control adecuado de estas podredumbres.

Tecnidex es sensible a las exigencias actuales de reducción de los productos químicos utilizados sobre las frutas y hortalizas y ha realizado una serie de trabajos encaminados en este sentido. Entre ellos ha estudiado la influencia de la temperatura en el incremento de la eficacia de los fungicidas de poscosecha, para alcanzar un mejor control y para evaluar la posibilidad de reducir la dosis de aplicación. Se ha observado que la influencia de la temperatura depende de la familia a que pertenece el fungicida, del propio fungicida e incluso del tipo de formulación. Por tanto, si en general se puede afirmar que el incremento de temperatura desde 15-25°C hasta 40°C produce un incremento de la eficacia del tratamiento, en muchos casos hay que matizar dicha generalización debido a la variabilidad de los resultados. También tiene una influencia importante el sistema de aplicación utilizado, que permita con mayor o menor facilidad la aplicación de dicha temperatura y el mantenimiento uniforme de la misma (factor clave en su eficacia).

P-79

EFICACIA DE LA TERMOTERAPIA EN EL CONTROL DE *Erwinia amylovora* EN MATERIAL VEGETAL DE PROPAGACIÓN INOCULADO ARTIFICIALMENTE

Ruz, L., Moragrega, C. y Montesinos, E.

Institut de Tecnologia Agroalimentària-CeRTA, Universitat de Girona. Avgda. Lluís Santaló s/n, 17071, Girona. Fax: 972-418399.

Erwinia amylovora es el agente causante del fuego bacteriano, enfermedad que afecta a un gran número de especies de la familia de las rosáceas, tanto frutales (peral, manzano) como ornamentales (*Cotoneaster*, *Pyracantha*, *Crataegus*, *Sorbus*). El mayor riesgo de difusión de la enfermedad a largas distancias y a zonas protegidas reside en la introducción de material asintomático portador de *E. amylovora*, ya que el pasaporte fitosanitario se otorga en base exclusivamente a la ausencia de síntomas en las plantas del Sector Protegido y en casos dudosos los síntomas se confirman mediante aislamiento del patógeno con una técnica de baja sensibilidad como el aislamiento en cultivo. De esta manera podría distribuirse planta asintomática portadora de poblaciones endófitas del patógeno.

El objetivo del trabajo que se presenta ha sido la puesta a punto de un método de tratamiento de material vegetal basado en la aplicación de calor (termoterapia), que permita eliminar o disminuir el riesgo de presencia de *E. amylovora* en material vegetal antes de su uso en viveros o plantación en campo.

Se evaluó el efecto del tipo de tratamiento con calor y de las combinaciones tiempo-temperatura sobre la viabilidad del material vegetal de propagación en reposo constituido por las especies *Pyrus communis*, *Malus domestica*, *Cotoneaster sp.* y *Crataegus sp.* También se evaluó la sensibilidad de cepas de *E. amylovora* de distinta procedencia al calor. Finalmente, las condiciones de tratamiento que permitieron la muerte del patógeno y el mantenimiento de la viabilidad del material vegetal se utilizaron para evaluar el efecto de la termoterapia en la disminución del inóculo de *E. amylovora* sobre material vegetal inoculado artificialmente.

Se observó que las especies vegetales ensayadas respondían de forma distinta a las condiciones de tratamiento con calor y al tipo de calor. En general, tratamientos con calor seco a 50 °C disminuían considerablemente la capacidad de brotación del material vegetal, mientras que la aplicación de calor húmedo tenía un efecto variable en función de la temperatura y duración del tratamiento. Las distintas cepas de *E. amylovora* mostraron diferente sensibilidad al calor, aunque en todos los casos se observó un efecto significativo del tratamiento en la reducción de la población bacteriana. Tratamientos a 50 °C permitían una reducción significativa de la población bacteriana en 5 minutos de exposición, mientras que a 45 °C eran necesarios 30 minutos para disminuir la población bacteriana en más de 8 unidades logarítmicas. En cuanto a la disminución de la población de *E. amylovora* inoculada artificialmente sobre plantones de peral se obtuvieron dos tratamientos efectivos consistentes en calor seco-45 °C- 60 minutos y calor seco-50 °C-30 minutos.

P-80

EXPERIENCIAS PILOTO DE CONTROL QUÍMICO Y BIOLÓGICO DE LA PODREDUMBRE AZUL DE LA PERA EN CENTRALES FRUTÍCOLAS

Francés, J., Bonaterra A. y Montesinos, E.

Instituto de Tecnología Agroalimentaria-CeRTA, Universidad de Girona. Avda. Lluís Santaló S/n, 17071, Girona. Fax: 972-418399.

La contaminación fúngica ambiental y superficial de las centrales de frigoconservación de fruta, y la acumulación de residuos fitosanitarios en los productos que se consumen en fresco, son dos de las mayores preocupaciones en la comercialización de fruta y de las autoridades sanitarias en relación con la salud del consumidor. La determinación de los puntos críticos de contaminación fúngica y el estudio de la sensibilidad de peras a la podredumbre azul en relación con variables fisico-químicas, y la eficacia de tratamientos para su control, constituyen los objetivos fundamentales de nuestro trabajo, orientados a sentar las bases de la Producción Integrada de manzana y pera. Para determinar las zonas con mayor carga fúngica y establecer cuales son los Puntos Críticos de Control, se realizó un estudio en tres centrales frutícolas situadas en Bordils (Girona), Tudela (Navarra) y Alagón (Zaragoza), y se tomaron muestras de la superficie de paredes y suelos de varias dependencias de las centrales, así como de palots, cintas calibradoras y de las peras. Además se recogieron muestras del ambiente de varias dependencias mediante un biocolector de impacto. El material vegetal utilizado para determinar la sensibilidad a la podredumbre azul, fueron peras de las variedades Passe Crassane y Conference producidas durante las campañas de 1995 a 1998 en diversas fincas comerciales de las regiones de Girona, Zaragoza y Navarra. La fruta se caracterizó adecuadamente y se determinaron parámetros de calidad físicos (penetración Magness-Taylor, deformaciones máximas debidas a impactos y pinchazo) y químicos (análisis de minerales, Ca, N, K, azúcares y acidez total). Se realizaron 5 tratamientos diferentes de control de *P. expansum* en posrecolección, consistentes en testigo no tratado, desinfección con lejía al 2% y lavado con agua, químico convencional (Folpet[®], Imazalil[®], Etoxiquina[®] y CaCl₂), biológico con *P. fluorescens* EPS-288 Rif⁺, y combinado con 1/4 de la dosis del tratamiento químico y el agente de biocontrol.

Se observó una mayor contaminación en la zona de selección y calibrado, y pasillos de acceso a las cámaras. Las tres centrales estudiadas mostraron una contaminación muy baja en las cámaras de conservación, pero no en las de maduración o almacenaje preventiva. Las cintas de calibrado también fueron un punto crítico de contaminación. La susceptibilidad de las peras de las 15 fincas a la podredumbre azul fue diferente de unas a otras, y se observó una relación positiva entre la incidencia de la podredumbre azul y la deformación máxima de las peras, y también con el contenido en azúcares del fruto. En las 24 experiencias piloto realizadas a lo largo de las campañas de 1995 a 1997 se observó que en un 95% de los casos, el control combinado (biológico + 1/4 del químico) consiguió una eficacia de control de la podredumbre azul superior al 80%.

P-82

LAS APLICACIONES DE SPINOSAD, UN NUEVO PRODUCTO NATURAL PARA EL CONTROL DE INSECTOS, EN INVERNADEROS DE PIMIENTOS, CONTRA *Frankliniella occidentalis*, REDUCEN SIGNIFICATIVAMENTE LA INCIDENCIA DEL VIRUS DEL BRONCEADO DEL TOMATE TSWV.

Buendia, J. y Molina, R.

DowAgrosciences Ibérica, cerro del Castañar 72 B-4ª, 28034. Madrid.

El virus del bronceado del tomate (TSWV) constituye uno de los problemas más graves en los invernaderos de pimientos, llegando en ocasiones, si no se utilizan medidas sanitarias adecuadas, a infectar altos porcentajes de plantas que pueden reducir la producción hasta un 50% y en casos muy graves, en porcentajes superiores.

El virus TSWV ataca a gran número de cultivos y es un problema grave en los cultivos hortícolas en todo el mundo.

Se ha demostrado que el tisanóptero *Frankliniella occidentalis* es uno de los vectores más potentes y eficaces en la transmisión del virus.

Los estudios realizados a pleno campo por otros investigadores, indican que el uso de insecticidas con una buena actividad contra *Frankliniella occidentalis* no ha reducido significativamente la incidencia del virus en plantas de tomate, debido a la movilidad del insecto, que puede reinfestar con facilidad la zona tratada.

El objeto del presente trabajo fué el estudio de la incidencia del virus en invernaderos de pimientos tratados con Spinosad para el control de *Frankliniella occidentalis* comparando con otros invernaderos tratados con productos standard.

El Spinosad es un nuevo producto natural para el control de insectos, en trámite de registro en diversos países de la Unión Europea, que ha mostrado gran actividad en el control de *Frankliniella occidentalis* a dosis muy bajas de uso, en numerosos cultivos y especialmente en pimientos en invernadero.

El producto se obtiene de la fermentación de *Sacharopolispora spinosa* una bacteria del orden actinomicetales, y tiene un muy favorable perfil toxicológico y medioambiental, lo que unido a las bajas dosis de uso, al respeto de la fauna útil y al elevado control de tisanópteros y de larvas de lepidópteros lo convierten en el producto de elección para programas de producción integrada en diversos cultivos hortícolas.

En experiencias realizadas en 1999 y 2000 en invernaderos de pimientos en Murcia y Almería, se ha demostrado que el uso de Spinosad en un programa de tratamientos contra *Frankliniella occidentalis* ha reducido significativamente la incidencia del virus TSWV en comparación con los programas actuales de control del insecto.

P-83

EVALUACIÓN RÁPIDA DE RESISTENCIA DE CULTIVARES DE OLIVO A *Verticillium dahliae* DE ESTAQUILLAS SIN ENRAIZAR

Martos Moreno, C. y Blanco-López, M.A.

Dpto. de Agronomía. ETSIAM. Universidad de Córdoba. Apdo. 3048. 14080. Córdoba.

La Verticilosis del olivo (VO) causada por *Verticillium dahliae* Kleb, es la enfermedad del olivar más difícil de controlar en la actualidad. La información disponible sobre la etiología y epidemiología de la VO refleja su complejidad y la necesidad de una estrategia de lucha integrada. En este marco, el uso de cultivares resistentes es, la medida más eficaz, económica y respetuosa con el ambiente. No obstante, la limitada resistencia encontrada hasta ahora en los cultivares de olivo evaluados y la existencia del patotipo defoliante, más virulento, hacen necesario continuar la búsqueda en cultivares de la colección de germoplasma y en caso negativo la obtención de cultivares más resistentes por otras vías. Las técnicas actuales disponibles permiten evaluar la resistencia de cultivares a *V. dahliae* aunque necesitan tiempo y espacio, ya que utilizan estaquillas enraizadas con edad superior a los 9 meses para obtener infecciones consistentes. Por ello, sería de gran interés encontrar técnicas alternativas más rápidas que pongan de manifiesto la susceptibilidad o resistencia entre cultivares y que permitan diferenciar el material potencialmente resistente del susceptible.

Se han realizado dos experimentos para determinar si las estaquillas de olivo sin enraizar son susceptibles a la infección por *V. dahliae* y comprobar si manifiestan diferencias de susceptibilidad entre cultivares en base a la expresión sintomatológica. En un primer experimento se utilizaron los cultivares de olivo, Picual y Oblonga, y los aislados, V4 (no defoliante) y V117 (defoliante) del hongo. La inoculación se realizó por inmersión de las estaquillas en una suspensión ajustada a 10^7 con/ml. Las estaquillas inoculadas se colocaron en fiambreras con perlita estéril y se incubaron en una cámara de ambiente controlado. Las observaciones se realizaron a los 2, 6, 12, 22, 50 y 91 días de la inoculación. Se realizaron aislamientos, identificando el nivel de la planta colonizado. En un segundo experimento se determinó el efecto del patotipo defoliante sobre el desarrollo de síntomas.

Los resultados obtenidos reflejan que los dos cultivares fueron infectados por ambos patotipos, siendo más intensa la colonización (frecuencia de aislamiento) por el aislado más virulento (defoliante). La defoliación fue la variable que mejor diferenció la susceptibilidad de cultivares. La reacción del cultivar Oblonga, moderadamente resistente, fue menos acusada que en el cultivar susceptible. Por ello la inoculación de estaquillas sin enraizar podría ser una técnica apropiada para realizar una evaluación rápida de cultivares susceptibles, sometiendo a los que manifiesten síntomas menos severos al procedimiento tradicional.

P-84

PRODUCCIÓN *in vitro* DE INÓCULO (MICROESCLEROCIOS) DE *Verticillium dahliae* MEDIANTE DISCOS DE PAPEL DE CELOFÁN

Mwanza, C. y Blanco-López, M.A.

Dpto. de Agronomía. ETSIAM. Universidad de Córdoba. Apdo. 3048. 14080. Córdoba.

Los microesclerocios (MS) constituyen las estructuras de supervivencia de *Verticillium dahliae* en el suelo. Los estudios epidemiológicos sobre el efecto de la densidad de inóculo en el suelo y la virulencia del patógeno sobre la enfermedad, requieren el uso de suelos infestados natural o artificialmente por el agente. En este caso, los MS han de ser obtenidos a partir de restos infestados o bien producidos de forma artificial, lo que supone mayor homogeneidad en su potencial de inóculo.

Uno de los medios utilizados para la producción de MS de *V. dahliae* es el papel celofán sobre PDA. Las láminas de celofán esterilizadas se recortan y extienden sobre placas de Petri con PDA y sobre éstas se siembra el hongo, que crece sobre su superficie produciendo, tras cierto tiempo, microesclerocios.

La cantidad de MS producidos y la facilidad de su recuperación parecen depender del tiempo de incubación; de la degradación que sufre el papel de celofán durante este periodo, del tipo de esterilización y de otras características del celofán como el grosor, permeabilidad etc. Por ello, el objetivo de este trabajo ha sido la optimización de estos parámetros para la producción masiva de MS de los aislados defoliante y no defoliante de *V. dahliae*, para su uso posterior en experimentos de potencial de inóculo. Adicionalmente, se ha valorado la capacidad germinativa de los MS obtenidos tras ser conservados en talco. En varios experimentos se han estudiado las características de 4 tipos de celofán (300, 400, 600 μm permeables, y 340 μm impermeable), su degradación en función del tiempo de incubación, los métodos de esterilización en horno (calor seco) o en autoclave (calor húmedo) y la capacidad germinativa de los MS. En cada placa de PDA- celofán se sembraron 0.5 ml de una suspensión de 10^7 con/ml del patógeno y tras un período de incubación, se determinó el número de MS/lamina de cada combinación de tratamientos. Los resultados obtenidos demuestran que la producción de los MS fue significativamente superior en el celofán de 600 μm y nulo en el de tipo impermeable, que el celofán esterilizado en horno (calor seco) se degrada más rápidamente que el esterilizado en autoclave. La germinación de los MS obtenidos por el método descrito y conservados en talco a 4°C fue superior al 90 por ciento para ambos aislados.

Nuestros resultados ponen de manifiesto que el inóculo así obtenido representa una técnica adecuada para la producción de inóculo estándar, disponible para estudios epidemiológicos y de control de las Verticilosis causadas por *V. dahliae*.

P-85

EVALUACIÓN DE LA SUSCEPTIBILIDAD DE VARIEDADES DE MANZANO AUTÓCTONAS DE LA ZONA NORTE DE ESPAÑA A FUEGO BACTERIANO (*Erwinia amylovora*) Y MOTEADO DEL MANZANO (*Venturia inaequalis*)

Martínez, A.¹, Ortiz-Barredo, A.¹, Montesinos, E.², Lizar, B.³ y Murillo, J.¹

¹Laboratorio de Patología Vegetal, Dpto. Producción Agraria, Universidad Pública de Navarra, 31006 Pamplona. ²Unidad de Tecnología Agroalimentaria-CeRTA, Universitat de Girona, Avgda Lluís Santaló s/n, 17071 Girona; ³ITG Agrícola SA, Ctra El Sadar s/n, Edificio El Sario, 31006 Pamplona.

En el verano de 1995 se detectó en Guipúzcoa un brote de *Erwinia amylovora* en manzanos de sidra. En los años siguientes, el patógeno ha sido aislado de diferentes huéspedes y en diferentes lugares del Norte y Centro de España. A pesar de de medidas de control como la inspección para identificar plantas potencialmente infectadas, y un amplio programa de erradicación, es muy posible que el patógeno continúe propagándose. El control de esta enfermedad es difícil y, en general, poco efectivo, una vez que el patógeno se ha instalado en un área. La utilización de material vegetal sano y de variedades con baja susceptibilidad al patógeno, son las estrategias mas eficaces. Otra enfermedad de alta importancia económica en manzano es el "moteado," causado por *Venturia inaequalis*. Aunque la enfermedad se controla de manera efectiva, se requiere la utilización de varios tratamientos fitosanitarios. La tendencia actual de reducir la utilización de fungicidas ha estimulado la búsqueda de variedades poco susceptibles al patógeno, bien para su cultivo o bien como parentales en mejora. Nuestro grupo ha abordado la evaluación de la susceptibilidad a fuego bacteriano y moteado de 253 variedades de manzano autóctono de la zona Norte de España, que están bien adaptadas y presentan características agronómicas de interés. Los ensayos se llevaron a cabo sobre plantones de 8 a 10 meses de edad injertados en M9 (5 a 8 plantones/variedad). Actualmente se han analizado para fuego bacteriano 105 variedades. El ensayo se realizó sobre brotes tiernos mantenidos en cámara bajo condiciones controladas después de inocularlos con *E. amylovora* UPN500, aislada de peral en Guipúzcoa. A los doce días se midió el avance de la necrosis en los brotes inoculados, lo que permitió clasificar a estas variedades en tres grupos distintos de acuerdo a su sensibilidad. En el grupo de menor sensibilidad se incluyeron un 37% de las variedades. Por otro lado, se analizaron 25 variedades frente a un inóculo mixto de *Venturia inaequalis*, recogido en varias fincas del Norte de España. Los plantones se mantuvieron en invernadero, bajo condiciones controladas y los síntomas se registraron a los 30 días de la inoculación. En la variedad utilizada como control (Royal Gala) se observaron lesiones con abundante esporulación. Asimismo, 19 de las variedades ensayadas presentaron síntomas de la enfermedad, aunque en 11 de ellas no hubo esporulación, mientras que en el resto se observó esporulación intermedia (7 variedades) o abundante (1 variedad). No se observaron síntomas de moteado ni esporulación en las 6 variedades restantes, lo cual sugiere que podrían ser resistentes a la enfermedad.

P-86

CONCENTRACIÓN DE ZOOSPORAS DE *Phytophthora cinnamomi* EN MEDIO LÍQUIDO QUE CAUSAN EL MARCHITAMIENTO EN PLANTAS DE ENCINAS Y ALCORNOQUES

Cots, F., Hinarejos, C., Mira, J.L. y Tuset, J.J.

Micología. Dpto. de Protección vegetal y Biotecnología. Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias. Carretera Moncada-Naquera, Km 4,5. 46113 Moncada (Valencia).

La encina (*Q. rotundifolia*) y el alcornoque (*Q. suber*) son los principales *Quercus* de la Península Ibérica y ambos cubren, aproximadamente, el 10% de la superficie española. La "seca", es la principal enfermedad que los afecta desde comienzos de los años 80. Los síntomas más llamativos de la "seca" son: 1) decaimiento lento, caracterizado por una caída gradual de las hojas y presencia de ramas parcial o totalmente defoliadas. 2) muerte súbita, caracterizada por el secado de ramas, hojas muertas adheridas un tiempo a las ramas y árboles muertos. Estos síntomas son observados siempre, tanto en árboles aislados como en grupo. La implicación del hongo *P. cinnamomi* Rands, en árboles con ambas sintomatologías, se confirmó a partir de su aislamiento en 1990-91 en suelo y raíces absorbentes de encinas y alcornoques en zonas de Extremadura, Andalucía Occidental y Castilla-La Mancha.

La infección del hongo se produce mediante liberación en medio líquido de las zoosporas. Con el fin de determinar la concentración menor de estas que producen la infección a través del sistema radical de las plantas de *Quercus*, en nuestra experimentación se han utilizado cuatro valores: 10.000; 25.000; 50.000; 100.000 zoosporas/ml, de tres aislados de *P. cinnamomi* procedentes de *Q. suber* (IVIA-1), *Q. rotundifolia* (IVIA-2) y *Q. rubra* (IVIA-7). Los sistemas radicales de las plantas de un año de ambas especies de *Quercus* se mantuvieron en las distintas suspensiones de zoosporas, realizando el control de los daños observados en la parte aérea y sistema radical a los 50 días. En *Q. rotundifolia* concentraciones a partir de 10.000 zoosporas/ml, afectaron al 100% de las plantas, mientras que en *Q. suber* se necesitaron concentraciones de 100.000 zoosporas/ml para afectar al 40%, de los tres aislados de *P. cinnamomi* indistintamente. Esto demuestra una gran sensibilidad de *Q. rotundifolia* y una mayor resistencia de *Q. suber* a este hongo habitante del suelo.

P-87

CARACTERÍSTICAS ASOCIADAS A LA SUPERVIVENCIA EPIFÍTICA DE CEPAS DE *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*

Arrebola, E.¹, Cazorla, F.M.¹, Codina, J.C.¹, Torés, J.A.² y de Vicente, A.¹

¹Departamento de Microbiología, Facultad de Ciencias, Universidad de Málaga. Campus de Teatinos. 2971, Málaga.

² Estación Experimental "La Mayora". Algarrobo Costa. 29750, Málaga.

Pseudomonas syringae pv. *syringae* es el agente causal de la necrosis apical del mango. En cepas aisladas de árboles de mango se estudió la resistencia a cobre (uno de los agentes antimicrobianos más usados en agricultura) y a radiaciones ultravioleta A y B (agente antimicrobiano que limita la supervivencia de la bacteria en superficies expuestas). Estas propiedades se relacionaron con la presencia de plásmidos nativos y la detección de secuencias génicas homólogas a *copABCD* (resistencia a cobre) y *ruIAB* (resistencia a luz ultravioleta).

La mayoría de las 70 cepas estudiadas presentaban 1 ó 2 plásmidos (81.4%), detectándose en 51 cepas la presencia de un plásmido de 62kb, (72.9% del total). El 59% de las cepas analizadas resultaron ser resistentes a cobre (considerándose resistencia la capacidad de crecimiento a una concentración de 0.8mM de sulfato de cobre en agar MGY); en el 92.5% de dichas cepas se detectó un plásmido de 62kb. La supervivencia de las cepas de *P. syringae* pv. *syringae* frente a luz ultravioleta fue analizada mediante la exposición a radiaciones A y B (longitudes de onda de la radiación ultravioleta que alcanzan la superficie terrestre), y a radiación C (fracción microbicida que no penetra las capas atmosféricas). Una mayor supervivencia también fue asociada con la presencia de un plásmido de 62kb (cuyo papel se confirmó mediante transferencia del mismo por conjugación).

Utilizando técnicas de southern blot, el plásmido de 62kb aislado de cepas resistentes a cobre, mostró señal de hibridación empleando como sonda un fragmento del operón de resistencia a cobre (*copABCD*). Igualmente secuencias homólogas del determinante genético para la resistencia a luz ultravioleta (*ruIAB*), fueron puestas de manifiesto en el plásmido de 62kb. La importancia de este plásmido, por conferir resistencia a cobre y a luz ultravioleta, en la supervivencia de la bacteria sobre la superficie aérea de la planta, está siendo estudiado comparando la supervivencia sobre hojas de mango de cepas de *P. syringae* pv. *syringae* silvestres y cepas de *P. syringae* pv. *syringae* transformadas con el plásmido de 62kb.

En estas cepas también se ha puesto de manifiesto la producción de bacteriocinas y de toxina antimetabolito; que podían favorecer la competencia frente a otras cepas en la colonización epifítica. Ambas características no se han asociado con la presencia de plásmidos.

P-88

PAPEL DE LOS RESTOS DE COSECHA COMPOSTADOS E INCORPORADOS AL SUELO COMO POSIBLE FUENTE DE INÓCULO DEL VIRUS DEL MOTEADO SUAVE DEL PIMIENTO (PMMV)

Aguilar, M.I.¹, Melero, J.M.² y Gómez, J.¹

¹Sección de Micología. Centro de Investigación y Formación Agraria de La Mojonera-La Cañada (C.I.F.A.). 04279, La Mojonera, Almería.

²Instituto de Agricultura Sostenible, C.S.I.C. Apdo. 4084. 14080 Córdoba.

El moteado suave del pimiento, ocasionado por el pepper mild mottle virus, PMMV, causa pérdidas importantes en los cultivos de pimiento de Almería, obligando a la utilización generalizada de variedades resistentes. Este tobamovirus es fácilmente transmisible mediante el contacto entre las plantas al realizar las labores de cultivo y por medio de semilla, habiendo sido citada su transmisión a través del sustrato de cultivo a plantas de pimiento.

Ante la creciente utilización de suelos con compost procedente de restos de cultivos hortícolas en Almería y la posibilidad de que estos composts pudieran constituir una importante fuente de inóculo de PMMV para el cultivo del pimiento, se plantearon dos objetivos: comprobar la transmisión de este virus a plantas de pimiento por medio del suelo de la zona de la rizosfera de plantas enfermas y estudiar la permanencia del PMMV en los restos de plantas enfermas durante su compostaje.

Para comprobar la transmisión del PMMV a través del suelo, se recogieron muestras de suelo de un invernadero con cultivo de pimientos afectados por la virosis, distribuyéndose en contenedores donde se trasplantaron plántulas de pimiento cv. Gedeón. El cultivo se mantuvo durante 105 días, realizándose análisis serológicos de cada una de las plantas a los 60 y 85 días desde el trasplante.

Los experimentos realizados para comprobar la eliminación del PMMV en los restos de cosecha durante el compostaje consistieron en la meteorización de plantas enfermas durante 120 días y su introducción posterior en el interior de una pila de restos vegetales triturados para su compostaje durante 2 meses. Los restos vegetales se analizaron por serología mensualmente, mientras que para determinar la viabilidad del virus en el compost se cultivaron plantas de pimiento sobre un sustrato compuesto por vermiculita a la que se añadían los restos de plantas enfermas compostados.

PMMV se detectó en el 20-60% de las plantas cultivadas en sustrato preparado con suelo de la zona de la rizosfera de plantas enfermas en invernadero. Esta incidencia puede considerarse de gran importancia debido a la facilidad de dispersión de este virus entre plantas mediante las labores culturales.

El virus se detectó en los restos de plantas de pimiento a lo largo de la meteorización, mientras que durante el compostaje se produjo un descenso en la detección hasta llegar a la eliminación del virus al finalizar el proceso.

P-89

EPIDEMIOLOGÍA DEL VIRUS DEL BRONCEADO DEL TOMATE (TSWV) EN CULTIVOS DE PIMIENTO EN INVERNADERO. RELACIÓN ENTRE LA INCIDENCIA DE LA VIROSIS Y LAS POBLACIONES DE *Frankliniella occidentalis*.

Alcázar, A., Sánchez, J.A., Lacasa, A., Gutierrez, L., Fernández, P. y Oncina, M.

Depto. Protección Vegetal. Centro de Investigación y Desarrollo Agroalimentario, Consejería de Agricultura, Agua y Medio Ambiente. 30150 La Alberca, (Murcia).

El binomio formado por el Tomato Spotted Wilt Virus (TSWV) y su vector *Frankliniella occidentalis*, constituye el principal problema fitopatológico del pimiento cultivado en los invernaderos de Murcia y del Sur de la provincia de Alicante. Para paliar los efectos de la virosis se recurre al control de las poblaciones del trips, mientras no se disponga de variedades resistentes que satisfagan las exigencias comerciales de los productores. La problemática del control de la enfermedad se acentúa cuando el control de las poblaciones del vector se realiza por medios biológicos o integrados, al mediar un tiempo mayor entre la liberación de los depredadores y la reducción de las poblaciones del trips que cuando se aplican medios químicos.

Una herramienta fundamental para el manejo de los cultivos donde se apliquen estrategias con control biológico del trips, es el establecimiento de los modelos epidemiológicos que permitan predecir la evolución de la incidencia de la virosis en relación a la evolución de las poblaciones del vector. En las últimas campañas, y en invernaderos con diferentes estrategias de control del trips y del virus (control biológico, control químico, control integrado), se ha estudiado la relación entre las poblaciones del trips portadores y supuestamente transmisores de TSWV y la cantidad de plantas afectadas por el virus en el invernadero, como paso previo al establecimiento del modelo epidemiológico. A lo largo del ciclo de cultivo, semanalmente, se valoraba la incidencia del TSWV, se realizaban muestreos para estimar las densidades del trips y se tomaban muestras de las poblaciones de trips para analizarlas por inmunopresión con suero de TSWV.

Como cabía esperar, se ha encontrado una correlación estrecha entre la proporción de adultos portadores del virus y el porcentaje de plantas con virosis, considerando un período de retraso equivalente al tiempo necesario para que una larva de trips de primer estadio alcance el estado adulto. La relación se ajusta a un modelo logístico ($r^2 = 0.947$) y a una función de Gompertz ($r^2 = 0.948$), en la mayoría de los casos. Cuando todas las plantas del invernadero estaban virosadas la proporción de adultos portadores de TSWV no superó el 40%. La evolución de la relación entre ambas proporciones fue asintótica para niveles de adultos portadores del virus situados entre el 30% y el 33%, pudiendo ser considerada esta proporción como el máximo nivel alcanzable.

P-90

LA INCIDENCIA DEL TOMATO YELLOW LEAF CURL VIRUS (TYLCV) Y LA DINÁMICA DE LAS POBLACIONES DE *Bemisia tabaci* EN CULTIVOS DE TOMATE DEL SURESTE PENINSULAR.

Alcázar, A.¹, Lacasa, A.¹, Guerrero, M.M.¹, Jordá, C.², Miguel, M.¹, García, A.¹, Bielza, P.³ y Contreras, J.³

¹Dept. Protección Vegetal, C.I.D.A., Consejería de Agricultura, Agua y Medio Ambiente. 30150 La Alberca (Murcia). ²Dept. Protección Vegetal, E.T.S.I.A., Universidad Politécnica de Valencia. 44022 Valencia. ³Dept. Producción Agraria, E.T.S.I.A., Universidad Politécnica de Cartagena. 30203. Cartagena (Murcia).

Desde su aparición en 1992, el virus del rizado amarillo de las hojas del tomate (TYLCV) es el principal problema fitosanitario del cultivo del tomate en las zonas productoras del Sureste peninsular.

Las epidemias se suceden año tras año al amparo de la evolución de las poblaciones de *Bemisia tabaci* que se ha revelado como el principal agente dispersador de la virosis. En tanto no se disponga de variedades resistentes al TYLCV que satisfagan las exigencias comerciales de los productores, el control de la virosis pasa por la regulación de las poblaciones de la mosca blanca.

En los últimos años se ha estudiado la relación entre la evolución de las poblaciones de *B. tabaci* y la incidencia de la virosis, así como los hospedantes alternativos de los dos organismos.

Tanto en cultivos al aire libre como en los realizados en épocas de actividad de *B. tabaci* a las 2 o 3 semanas de alcanzarse máximos poblacionales de adultos de mosca se producen los mayores incrementos de plantas con síntomas, ya se trate de variedades sensibles o de variedades tolerantes. En cultivos en invernadero, donde no se realizó control del vector, los mayores incrementos en la incidencia de la virosis se producen en las 4 semanas siguiente a la aparición de las primeras plantas con síntomas, alcanzando al 70% de las mismas. Más del 40% de los adultos de *B. tabaci* son portadores de TYLCV cuando más del 20% de las plantas presentan síntomas del virus. Este porcentaje no supera el 52% cuando el 100% de las plantas presentan síntomas. No se ha llegado a establecer una correlación positiva entre la evolución de las poblaciones de adultos en las hojas y la evolución de la proporción de plantas virosadas. Densidades puntuales de 0'2 adultos por hoja supone un incremento en la proporción de plantas virosadas a las 2 o 4 semanas en cultivos de verano- otoño, realizados al aire libre. Las 4 a 6 semanas primeras después de la implantación de los cultivos al aire libre son las de mayor riesgo para las infecciones, al comprometer la productividad. Durante el invierno, *B. tabaci* se multiplica en malas hierbas como *Senecio sp.*, *Solanum nigrum*, *Chenopodium sp.*, *Malva sp.*, *Datura sp.* o *Conyza bonariensis* y en las plantas de tomate de los cultivos abandonados. Una reducida proporción de *S. nigrum* resultaron ser portadores de TYLCV en las plantaciones al aire libre.

P-91

CARACTERIZACIÓN DE *Rhizoctonia solani*: DISTRIBUCIÓN ESPACIAL EN EL SUELO Y COMPORTAMIENTO DEL MICELIO BAJO DISTINTAS CONDICIONES.

Ramirez , C., Acebes, R. y Ayala, J.
AIMCRA. Apartado 855 47080 Valladolid

Rhizoctonia solani es un hongo de suelo que produce podredumbre de la raíz de la remolacha azucarera. A lo largo de varios años de estudio de esta enfermedad, se comprobó el carácter errático e imprevisible del ataque del hongo, en cuanto al nivel de enfermedad y el lugar de aparición.

Para conocer la distribución espacial de *R. solani* en el suelo se realizaron una serie de análisis de muestras de suelo tomadas en distintas zonas de una parcela con la enfermedad declarada y a distintas profundidades. Se detectó una gran irregularidad de la distribución de *R. solani* en el suelo, lo cual indica la dificultad del muestreo en campo para la cuantificación del inóculo potencial del hongo.

En cuanto a la distribución del hongo en profundidad, se observó que el inóculo viable de *R. solani* está concentrado en los 5 cm. más superficiales del suelo.

Por otra parte, con el fin de conocer mejor la influencia de distintos factores ambientales sobre el comportamiento del hongo, en el año 1998 se llevaron a cabo una serie de estudio, en laboratorio, sometiendo muestras de suelo con inóculo de *R. solani* a distintas condiciones de temperatura, humedad y pH.

Los resultados de las experiencias realizadas indican que la temperatura no influye ni en la concentración de inóculo -en el rango entre 5º y 36ºC- ni en la agresividad del hongo.

En cuanto a la humedad, se comprobó que aunque *R. solani* necesita humedad para desarrollarse, no soporta condiciones anaerobias en periodos prolongados.

Para modificar el pH se utilizaron espumas de azucarera. Se observó que el pH no influía en la concentración ni en la agresividad del hongo.

Sin embargo se observó que el Calcio y el Magnesio, componentes de las espumas aplicadas al suelo, producían alteraciones morfológicas y de crecimiento en el micelio de *R. solani*.

No se conoce aún si existe relación entre estas anomalías del micelio y la capacidad patógena o la agresividad del hongo sobre la remolacha azucarera.

P-92

INCIDENCIA Y EPIDEMIOLOGIA DEL FITOPLASMA CAUSANTE DEL DECAIMIENTO DEL PERAL EN CATALUÑA

Laviña, A.¹, Sánchez, I.¹, Sabater, J.², García, M.¹, Medina, V.², Batlle A.¹

¹Dpto. Protección Vegetal. Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentàries. 08348 Cabrils (Barcelona). ²IRTA. UDL. Avda Rovira Roure 177. 25006-Lleida

El decaimiento del peral o pear decline es una enfermedad asociada a un fitoplasma, cuyos síntomas más importantes son: disminución importante del desarrollo vegetativo, enrojecimientos prematuros en hojas, enrrollamiento de hojas en forma de cuchara y manchas necróticas en algunas variedades. La sintomatología de la enfermedad se ha estado observando en nuestro país desde los años 70, pero el patógeno causante de la misma no fue identificado hasta 1994. Hasta el momento se han identificado tres especies del género *Cacopsylla* como vectores de la enfermedad, *Cacopsylla piricola*, *C.pyrosuga* y *C. pyri*.

El objetivo de este trabajo ha sido conocer la extensión e importancia de la enfermedad en la provincia de Lérida ya que es donde se encuentra una de las mayores superficies dedicada a este cultivo en nuestro país (16.000Ha). Para ello con la colaboración de los técnicos de las Asociaciones de Defensa Vegetal de esta provincia se determinó que un total de 101 parcelas sobre un total de 1500 observadas presentaban árboles con síntomas de decaimiento con una incidencia superior al 5%. Para determinar si la sintomatología de decaimiento observada era causada por el fitoplasma asociado al *Pear decline*, se tomaron hasta un máximo de 10 muestras de árboles con síntomas en 45 parcelas afectadas y se analizaron mediante PCR utilizando los iniciadores universales (P1/P7 y fU5/rU3) y los iniciadores específicos fPD/rPD. En las parcelas donde se determinó que la sintomatología era producida por PD se valoró la incidencia de árboles afectados mediante observación visual de 500 árboles por parcela. Por otro lado se ha llevado a cabo un estudio epidemiológico en el que se ha valorado el incremento de la incidencia en 7 parcelas desde el año 1997 al 2000 y se han identificado las especies de insectos portadoras del fitoplasma del PD. La incidencia de la enfermedad en las parcelas afectadas osciló entre un 9 y un 42 %. Mediante la utilización de iniciadores universales se determinó la presencia de fitoplasmas en los cicadelidos *Psammotettix striatus*, *Neoliturus fenestratus*, en el delfacido *Laodelphax striatellus* Fall y en el psílido *Cacopsylla pyri* L. Con los iniciadores específicos para PD únicamente se obtuvieron individuos positivos en *C.pyri*.

P-93

EPIDEMIOLOGÍA Y CONTROL DEL INÓCULO PRIMARIO DE *Stemphylium vesicarium* (f. asc. *Pleospora allii*) EN PERAL

Llorente, I. y Montesinos, E.

Institut de Tecnologia Agroalimentària-CeRTA, Universitat de Girona. Avgda. Lluís Santaló s/n, 17071, Girona. Fax: 972-418399.

La mancha marrón o estemfiliosis del peral es una de las enfermedades fúngicas que provocan mayores pérdidas económicas en determinadas zonas frutícolas como Logroño y Girona o Emili-Romagna (Italia). La enfermedad está causada por *Stemphylium vesicarium* y provoca principalmente manchas necróticas en hojas y frutos. Los métodos de control actuales se dirigen exclusivamente al control de la fase asexual del hongo. Durante otoño e invierno, el reservorio del patógeno corresponde principalmente a *Pleospora allii* (f. asc.) que forma pseudotecas en los restos de hojas y frutos caídos al suelo. De las pseudotecas maduras se liberan ascosporas que constituirán el inóculo primario y reiniciarán el ciclo de la enfermedad en la primavera siguiente. La reducción del inóculo de *P. allii* podría ser una alternativa en el control de la estemfiliosis del peral. En consecuencia, los objetivos de este trabajo son: i) obtener un sistema que permita predecir el momento de inicio de emisiones de ascosporas de *P. allii* en función de la temperatura, ii) determinar los principales factores climáticos implicados en la liberación y dispersión de estas ascosporas, y iii) evaluar la eficacia de diferentes métodos (químicos, biológicos y físicos) para reducir los niveles de ascosporas liberadas. Para determinar la maduración de las ascosporas en función de la temperatura y la humedad relativa, se realizaron varios ensayos durante tres años consecutivos. Se obtuvieron pseudotecas de *P. allii* en cultivo en placa de Petri y se expusieron a diferentes temperaturas y humedades relativas. Periódicamente se analizó el estadio de madurez. A partir de estos datos se obtuvo un modelo matemático que relaciona el porcentaje de ascosporas maduras con los grados-día acumulados. Paralelamente durante varios años se incubaron hojas de peral con pseudotecas de *P. allii* en condiciones naturales, en diferentes fincas comerciales y se compararon los porcentajes de maduración observados con los predichos según el modelo, observándose un ajuste importante. Durante dos años se siguió la dinámica de emisión de ascosporas durante los meses de enero a junio y se relacionó con los principales parámetros climáticos, observándose una correlación significativa entre períodos con lluvias y momentos de máxima emisión de ascosporas. También se realizaron cuatro ensayos para determinar la eficacia de diferentes métodos para reducir el inóculo primario. Se incubaron en condiciones naturales hojas con lesiones de *S. vesicarium*, durante los meses de octubre a junio. Se evaluaron de métodos químicos basados en tratamientos con productos derivados de cobre y urea, métodos biológicos mediante la utilización de cepas de *Pseudomonas fluorescens* y *Trichoderma* spp., así como un método físico consistente en la trituración del material vegetal. Se analizaron periódicamente los niveles de esporas liberadas mediante la captura en portaobjetos adhesivos y se observó una disminución significativa de los niveles de ascosporas liberadas cuando se trató con cepas de *Trichoderma* spp.

SANIDAD DE SEMILLAS DE PLANTAS AROMÁTICAS CULTIVADAS

Blanco, R.¹, Montoya, J.R.¹, Gómez Baena, A.A.¹, Núñez Simarro, F.J.¹, Santos, M., Gómez Vázquez, J.², Avilés, M.³, Tello J.C.¹

¹Dpto de Producción Vegetal. Universidad de Almería. Almería.

²CIFA. La Mojonera. Almería.

³Dpto. de Ciencias Agroforestales. Universidad de Sevilla. Sevilla.

Es conocido el hecho de que las semillas de las plantas pueden ser portadoras de inóculos patógenos. Esta vía ha difundido no pocas enfermedades en áreas del planeta muy alejadas. Una parte importante del mercado internacional de semillas está regulado por normas muy estrictas y, para constatarlo, existe la Asociación Internacional para la Sanidad de semillas (ISTA). Dicha asociación no cuenta entre sus cometidos con la normalización de las especies compendiadas en este trabajo. El interés de esta investigación radica en la determinación de la microbiota fúngica asociada a semillas de plantas aromáticas: ajedrea (*Satureja hortensis* L), cebollino (*Allium schoenoprasum* L), cilantro (*Coriandrum sativum* L), eneldo (*Anethum graveolens* L), estragón (*Artemisia dracuncululus* L), mejorana (*Origanum majorana* L), melisa (*Melisa officinalis* L), menta piperita (*Mentha piperita*), orégano (*Origanum vulgare* L), perejil (*Petroselinum hortense* L), perifollo (*Anthriscus cerifolium* L), salvia (*Salvia officinalis* L) y tomillo (*Thymus vulgaris* L), para así identificar posibles problemas causados por hongos asociados a las mismas. Este conocimiento permitirá prever las micosis que pudiesen enfermar tanto a las plántulas en los semilleros como al cultivo en terrenos de asiento, y además, incrementará la información, escasa, sobre este aspecto de la Patología de semillas.

Como objetivos principales de este trabajo se marcaron: Primero, la evaluación de la microbiota fúngica asociada a las semillas de las especies vegetales antes señaladas. Para ello, y siguiendo el método del Ulster para análisis de semillas, se analizaron en medios de cultivo generales y específicos para *Fusarium*. Segundo, la determinación y evaluación de la incidencia de los presuntos patógenos aislados en la germinabilidad de las semillas y en el posterior desarrollo de las plántulas. Para este último objetivo se compararon estadísticamente dos métodos de inoculación: triturado del hongo y con el extracto crudo de las toxinas del hongo.

Como principal conclusión de este estudio cabe destacar la notable sanidad fúngica de las semillas analizadas. No obstante, se inocularon sobre semillas *Alternaria tenuis* y *Stemphylium botryosum* aislados en algunas de las especies vegetales analizadas. Dichos hongos son conocidos como inhibidores de la germinación. De las inoculaciones realizadas destacar que ambos métodos inhibieron en gran medida la nascencia de las semillas de las especies vegetales ensayadas (cilantro, eneldo, menta piperita y perejil), siendo este efecto mucho más acusado con el extracto crudo. Durante el desarrollo posterior de las plántulas también se observaron efectos depresivos al tratarlas por ambas técnicas. Dichos efectos fueron más importantes en las plantas inoculadas con el extracto crudo de la toxina de los hongos.

P-95

NUEVA MICOSIS DE LA RAIZ Y EL TALLO DEL PEPINO EN ALMERÍA. ESTUDIO DE SU ESPECIFICIDAD PATOGENICA

Blanco, R.¹, Diáñez, F.¹, Moreno, A.², Alférez, A.², Avilés, M.³, Tello, J. C.¹

¹Dpto. de Producción Vegetal. Universidad de Almería. Almería.

²Aventis CropSciences. Torre de la Reina. Sevilla.

³Dpto. de Ciencias Agroforestales. Universidad de Sevilla. Sevilla.

En 1996 se publicó la descripción en Creta (Grecia), y en cultivos de pepino bajo invernadero, de una nueva enfermedad causada por una nueva "formae specialis" denominada *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-cucumerinum* (Vakalounakis, 1996). El objetivo de este trabajo es comprobar la especificidad patogénica del aislado recientemente encontrado en plantas de pepino, cultivadas en Almería sobre lana de roca y presuntamente perteneciente a la forma especial indicada, por la sintomatología sobre pepino y sus características morfológicas.

Su habilidad parasitaria (podredumbre de las raíces y la base del tallo) y su especificidad patogénica fue estudiada comparándola con una cepa procedente de Creta y cedida por el Dr. Jesús ABAD.

Las inoculaciones se hicieron sobre dos sustratos diferentes (turba y vermiculita), previamente desinfectadas en autoclave (1h, 121°C). El inóculo fue añadido a los sustratos en proporciones de 10^4 a 10^6 propágulos·ml⁻¹ de sustrato. Las incubaciones se dispusieron tanto en cámaras con condiciones ambientales controladas como en invernadero. Los estados fenológicos del material vegetal inoculado fueron diferentes: pre-germinación de semillas, plántulas con 1 ó 2 hojas verdaderas y plantas con 10 o más hojas verdaderas formadas. Las especies vegetales inoculadas fueron: sandía (*Citrullus lanatus*, 5 variedades); melón (*Cucumis melo*, 6 variedades); pepino (*Cucumis sativus*, 7 variedades); *Cucurbita maxima* x *Cucurbita mochata* (1 variedad); calabacín (*Cucurbita pepo*, 1 variedad) y *Luffa cylindrica*.

Los resultados mostraron que ambas cepas de *Fusarium oxysporum* reprodujeron los síntomas de podredumbre de las raíces y de la base del tallo en melón y en pepino, mientras que fueron asintomáticas las plantas de calabacín y el híbrido de *C. maxima* x *C. mochata*. *Luffa cylindrica* no germinó cuando la inoculación se hizo inmediatamente después de la siembra y cuando se inocularon plántulas murieron con el síndrome descrito. Las sandías mostraron una manifestación de la enfermedad diferencial: las semillas inoculadas inmediatamente después de sembrar no germinaron o lo hicieron defectuosamente en una proporción muy baja. Cuando la inoculación se hizo sobre plántulas, éstas murieron con el síndrome de la micosis. Las inoculaciones sobre plantas con 10 o más hojas verdaderas no tuvieron respuesta.

Los resultados obtenidos son consistentes con lo previamente descritos y permiten, en una primera aproximación, asignar al síndrome observado en Almería como agente incitante a *Fusarium oxysporum* fsp *radicis-cucumerinum*

Vakalounakis, D.J. 1996. Root and stem rot of cucumber caused by *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-cucumerinum* f. sp. nov.. Plant Dis. 80:313-316.

P-96

INTERACCIÓN DEL HONGO *Geotrichum candidum* EN FRUTOS MADUROS DE *Citrus sinensis*

Marín, M. y Tuset, J.J.

Micología. Departamento de Protección Vegetal y Biotecnología. Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (I.V.I.A.). Carretera de Náquera-Moncada Km 4.5, E-46113 Moncada, Valencia, España.

La podredumbre ácida, debida al hongo *G. candidum*, es una de las mayores enfermedades de la postcosecha en muchas de las áreas citrícolas del mundo. La incidencia de la podredumbre ácida puede ser importante dependiendo del año, de las condiciones climáticas y de la zona geográfica. Esta enfermedad se desarrolla rápidamente sobre los frutos maduros y estos se infectan por el hongo solo a través de heridas o por contacto con otros frutos enfermos. El reservorio de propágulos de este hongo se encuentra comúnmente en los suelos de las plantaciones. La infección de los frutos cada temporada puede producirse en el campo por partículas de suelo transportadas con las gotas de lluvia y que alcanzan a estos en el árbol, o en almacén al pasar las cajas de fruta por el drencher sucias de tierra. En la última década, el avance en el control de otras podredumbres producidas en postcosecha, como es el caso de los *Penicillium*, ha ocasionado que se venga detectando en nuestros almacenes un aumento de las infecciones de *G. candidum* que anteriormente pasaban desapercibidas. Por esta razón, y como una nueva aproximación a la problemática, ha sido estudiada la incidencia de este hongo polífago en los frutos cítricos.

Frutos coloreados y con diferente índice de madurez de *C. sinensis*, de los cv. Washington Navel y Salustiana, fueron infectados con dos aislados de *G. candidum* procedentes de frutos cítricos y otro de tubérculo de patata. La infección se realizó con inoculación mediante herida en el flavedo de la corteza. Artrosporas en suspensión y micelio joven se emplearon como inóculo. Los dos aislados de frutos cítricos infectaron al 100% de los frutos inoculados. En cambio, el aislado de patata presentó un porcentaje menor de infección y una menor área de podrido respecto a los otros aislados. No hubo diferencias en el número de frutos infectados y en el área del podrido producido entre los inóculos de artrosporas y micelio. La capacidad de infección de *G. candidum* en los cítricos no fue afectada por el índice de madurez del fruto. Para conocer si los aislados de *G. candidum* procedentes de huéspedes diferentes a los cítricos podían desarrollar la misma aptitud patógena que los obtenidos de estos, el aislado de patata fue inoculado en serie correlativa en naranjas cv. Salustiana. Al cabo de cuatro resiembras se obtuvo áreas de podrido similares entre el aislado de patata y el de cítrico, lo que demostró una rápida adaptación a su nuevo huésped por parte del primero.

LA VERTICILOSIS VASCULAR DE LA ALFALFA EN ARAGÓN

González Torres, R.¹, López Cosme, E.¹ y Cambra Álvarez, M. A.²

¹ Unidad de Sanidad Vegetal. Servicio de Investigación Agroalimentaria. Gobierno de Aragón. Apartado 727. 50080 Zaragoza. ² Centro de Protección Vegetal. Departamento de Agricultura. Gobierno de Aragón. Apartado 727. 50080 Zaragoza

La Verticilosis vascular de la alfalfa (*Medicago sativa* L.), causada por *Verticillium albo-atrum* Reink & Berth. constituye una de las limitaciones más serias de las que gravitan sobre el cultivo a nivel mundial. Hasta la actualidad, esta enfermedad no había sido detectada en España. Sin embargo, en los últimos años, la escasez de semillas de alfalfa de variedades autóctonas debido al espectacular crecimiento del cultivo en España, que ha pasado del 3,73% de la producción total europea en 1987 a ser, en la actualidad, de un tercio del total, ha facilitado la introducción de variedades extranjeras. En 1998, en alfalfares de la variedad californiana Artal (5888) de segundo y tercer año de cultivo en Aragón, se observaron unos elevados porcentajes de plantas con síntomas de Verticilosis, distribuidas más o menos homogéneamente en los campos. Las plantas presentaban foliolos de menor tamaño, desecados desde el ápice, retorciéndose y adquiriendo un aspecto papiráceo. Las raíces eran normales, pero al realizarse cortes transversales se observaban necrosis vasculares de coloración variable, desde el amarillento al pardo. Los aislamientos realizados confirmaron la presencia de *Verticillium* sp. en el sistema vascular de las plantas. Dichos aislados fueron identificados como pertenecientes a la especie *V. albo-atrum*. Alfalfares del ecotipo Aragón, sembrados en campos aledaños a los de la variedad Artal, no mostraron síntomas de Verticilosis vascular. Con el objetivo de confirmar la patogenicidad de los aislados y de poner a punto un método rápido de detección de resistencia de cultivares de alfalfa del ecotipo Aragón y otros a *V. albo-atrum*, se realizaron inoculaciones: a) por riego con 100 ml de suspensión de inóculo a macetas conteniendo semillas pregerminadas; b) por riego con 100 ml de suspensión de inóculo a macetas conteniendo plántulas de 10 días y c) por inmersión en la suspensión de inóculo de raíces de plántulas de 10 días. El inóculo consistió en una suspensión en agua estéril de conidias obtenida de un cultivo de 10 días de crecimiento en caldo de patata dextrosa a 150 rpm. La concentración se ajustó a 4×10^6 conidias/ml mediante un hemocitómetro. Mediante cada método se inocularon 24 semillas o plántulas (tres/maceta) de los cultivares 9821, 9823 y 9825 de la variedad Artal, que se desarrollaron en una cámara de crecimiento a 22°C, bajo luz (14 h al día) durante 30 días. Se utilizó una escala de severidad de 0 a 4 (0 = no síntomas; 4 = planta muerta).

El método de inmersión de raíces de plántulas de 10 días resultó ser el más eficaz de los

probados, ya que no hubo escape y a los 30 días, prácticamente el 100% de las plantas estaban

muertas. Con los demás métodos, a los 30 días no se superaron severidades de 2,4.

P-98

HONGOS QUE AFECTAN A LAS PALMERAS (*Phoenix canariensis* Hort. Ex Chab.) EN EL PARQUE TAORO DE PUERTO DE LA CRUZ, TENERIFE

Prendes Ayala, C., Lorenzo Bethencourt, C.D. y Trujillo García, M^a E.

U.D.I. de Fitopatología. Dpto. Biología Vegetal. Universidad de La Laguna. Avda. Francisco Sánchez s.n. 38206 La Laguna Tenerife. Canarias.

Entre las plantas que pueden caracterizar gran parte de los paisajes isleños destaca, sin lugar a dudas, la Palmera canaria (*Phoenix canariensis* Hort. ex Chab.), declarada junto con “el canario” (*Serinus canarius canarius* L.) símbolos de Canarias, mediante la ley número 7, de 30 de abril de 1991, del Parlamento de Canarias.

Este endemismo canario es quizás el más internacional de nuestros vegetales y su esbeltez, sus amplias hojas y su tronco grueso la convierten en una especie favorita para su utilización en parques y jardines, tanto dentro como fuera de Canarias. El uso que actualmente se da a la Palmera canaria ha favorecido la recuperación de esta especie protegida.

En el Municipio de Puerto de la Cruz puede encontrarse un gran número de ejemplares adornando parques y jardines, aquejados de graves problemas fitosanitarios. Por esta razón hemos centrado nuestro trabajo en este municipio, concretamente en el Parque Taoro, donde pueden encontrarse casi mil palmeras, además de muchas otras especies no menos valiosas y una serie de endemismos en progresivo deterioro.

Hemos dividido el Parque en cuadrículas de 5000 m² de superficie cada una, muestreando 27, sobre un total de 32. Estudiamos 530 palmeras, tomando muestras de 115 de ellas. A partir de las muestras estudiadas hemos aislado dieciocho especies de hongos fitopatógenos.

Encontrándose que únicamente el 20.86 % de las palmeras del Parque puede considerarse sanas, mientras que el resto presenta síntomas de enfermedad, o deterioro.

En cuanto al control, éste se ve dificultado al tratarse de un parque público, por lo que recomendamos medidas de tipo cultural, limpieza de jardines y eliminación de las palmeras muertas que suponen un foco de dispersión para las enfermedades.

P-99

PRIMERA DESCRIPCIÓN DE PLANTAS DE CAPSICUM ANNUUM INFECTADAS POR TOMATO YELLOW LEAF CURL VIRUS (TYLCV)

Morilla, G., Reina, J. y Bejarano, E.R.

Dept. Biología Celular- Genética, Universidad de Málaga, 29071 Málaga, España.

El virus TYLCV (*Tomato Yellow Leaf Curl Virus*) infecta cultivos de tomate en el levante de España desde 1992. En 1997 se detectó la presencia de TYLCV en judía (*Phaseolus vulgaris*)(1). En el verano de 1999 se observaron, en plantas de pimiento (*Capsicum annuum*) procedentes de un invernadero de Almería, síntomas de clorosis internervial y marginal en las hojas, junto con un curvamiento hacia arriba del borde de la hoja.

Se extrajo DNA total de plantas con síntomas, y se analizó por southern blot, hibridación y PCR la presencia o no de geminivirus. Como sonda se usó un plásmido que portaba el genoma completo del aislado español de TYLCV-IS.(2)

Se obtuvo señal positiva en tres de las muestras. Por PCR, usando unos oligonucleótidos

diseñados para amplificar TYLCV, también se obtuvieron unos fragmentos del tamaño esperado

para TYLCV, en cuatro de las muestras. Los fragmentos amplificados fueron luego analizados por

RFLP con cuatro enzimas. El patrón de los fragmentos de restricción obtenidos correspondían en

todos los casos con el aislado español de TYLCV.-IS.

Uno de los fragmentos se secuenció, mostrando una identidad del 100% con TYLCV-IS. Se presenta en este trabajo la clonación y caracterización de este virus.

P-100

***Phytophthora* spp. AGENTE CAUSAL DE LA PODREDUMBRE DE CUELLO DE PLANTAS DE TOMATE Y PEPINO EN LA ZONA DE MOTRIL-CARCHUNA (GRANADA).**

Álvarez Tortosa, A. y Gómez Vázquez, J.

Sección de Micología. Centro de Investigación y Formación Agraria de la Mojonera-La Cañada (C.I.F.A.). Autovía del Mediterráneo, salida 420. C. P. 04279 La Mojonera. Almería.

Una nueva enfermedad se manifiesta, desde hace varios años, en los cultivos de invernadero de tomate y pepino en la vega de Motril-Carchuna. Sus síntomas más importantes son: una necrosis húmeda de color marrón del hipocotilo, la marchitez y muerte de las plantas. Los resultados obtenidos de los análisis de plantas enfermas recolectadas revelan su asociación con *Phytophthora* spp. Con el fin de conocer el poder patógeno de los aislados conseguidos se realizaron inoculaciones sobre plántulas y plantas adultas de tomate y pepino.

Los ensayos de inoculación sobre plántulas se realizaron en un invernadero tipo semitúnel de ambiente semicontrolado situado en el C.I.F.A. Cada uno de los 25 aislados seleccionados se inocularon sobre diez plántulas de tomate var. Josefina e igual número de pepino tipo holandés. A partir del sexto día de la inoculación, las plántulas mostraron marchitez de los cotiledones, necrosis húmeda y estrangulamiento en el tallo al nivel de la superficie del suelo, causando la caída de estas sobre el sustrato (Damping-off). Los síntomas en las plántulas inoculadas se repitieron en los tres experimentos realizados

El experimento de inoculación sobre plantas adultas se realizó en un invernadero con cubierta de polietileno situado en el C.I.F.A. Las plantas de tomate y pepino cultivadas sobre sacos con perlita se inocularon cuando estas tenían 5 ó 6 hojas verdaderas con una selección de 18 aislados de *Phytophthora* spp. Cada aislado se inoculó sobre 18 plantas de pepino y las mismas de tomate. El diseño experimental fue completamente aleatorio con tres repeticiones. Los síntomas comenzaron a los trece días de la inoculación, resultando más de un 99% de plantas con síntomas en las dos especies cultivadas.

Los síntomas obtenidos en los experimentos de inoculación, fueron similares a los observados en los invernaderos muestreados y el reaislamiento del patógeno de las plantas inoculadas parece confirmar que *Phytophthora* spp. es el agente causal de las podredumbres de cuello en la zona de Motril-Carchuna.

LA FUSARIOSIS VASCULAR DE LA ALBAHACA EN ALMERÍA

Guirado Moya, M.L. y Gómez Vázquez, J.

Sección de Micología. Centro de Investigación y Formación Agraria de La Mojonera-La Cañada (C.I.F.A). 04279 La Mojonera. Almería.

En las explotaciones dedicadas al cultivo de albahaca en Almería, y desde hace varios años, se manifiesta una enfermedad que produce cada año mayores pérdidas económicas. Los principales síntomas son: achaparramiento, epinastia y clorosis apicales, marchitez, decoloración del tallo y aparición de estrías negras longitudinales desde el ápice y peciolo que se extienden basípetamente, mientras la base del tallo y el sistema radicular permanecen intactos. Al realizar un corte transversal del tallo se observa necrosis del sistema vascular y finalmente la planta muere. En los análisis de plantas se detectó la presencia de *Fusarium oxysporum* que crecía de los vasos de las plantas enfermas. Los aislados que se obtuvieron se inocularon sobre plántulas de albahaca con el fin de determinar su patogenicidad, y sobre plántulas de otras especies de la misma familia para determinar la especificidad parasitaria del hongo.

El experimento de inoculación se realizó en un invernadero de ambiente semicontrolado en el C.I.F.A. de Almería. Se obtuvieron 24 aislados, y cada uno se inoculó sobre 20 plantas de albahaca cv. Genovesa, mediante dos métodos distintos. Los primeros síntomas aparecieron a los 12 días después de la inoculación. Al término del experimento, el 54,16% de los aislados inoculados resultaron patógenos y causaron la muerte del 100% de las plantas, de las cuales se aisló *Fusarium oxysporum*, reproduciendo los síntomas observados en campo.

Para comprobar la especificidad parasitaria se realizó otro experimento en el mismo invernadero de ambiente semicontrolado. Para ello se utilizaron 5 aislados de los que habían sido patógenos en albahaca, y se inoculó cada uno sobre 10 plántulas de las especies: melisa (*Melisa officinalis* L.), salvia (*Salvia officinalis* L.), mejorana (*Origanum majorana*), pipermita (*Mentha piperita*), ajedrea (*Satureja hortensis*) y tomillo (*Thymus vulgaris* L.), y albahaca como testigo positivo. Ninguno de los aislados produjo síntomas en las plantas que se inocularon, excepto en las de albahaca.

Los resultados obtenidos en los dos experimentos nos permiten afirmar que la marchitez y muerte de la albahaca en Almería es debida a *Fusarium oxysporum* f.sp. *basilicum*.

DIAGNOSTICO DE MANCHADO NECRÓTICO EN GREENS DE GOLF

Espadas, R. M.¹, Zita P.G.¹, Bautista H. M. A.², Martínez V. A.¹

¹Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, Universidad Nacional Autónoma de México. Col. San Sebastián Xhala, Cuautitlán Izcalli, Edo. de México. C.P. 54700. México. ²AgrEvo Mexicana.

El césped es atacado por numerosos agentes patógenos. Este problema fitosanitario se presentó en los greens de golf del Madeiras Country Club, en la Ciudad de Cuautitlán Izcalli, México; en donde se usa como césped a *Cynodon dactylon*. Las características sintomatológicas que se presentaron en el green fueron rodales cloróticos de tamaño irregular y conforme se agrava la enfermedad estas manchas se unen a otras más grandes e irregulares. En las hojas se desarrolla una lesión que al principio es clorótica, luego como mojada, y finalmente de color blanquecino limitada por un margen de color marrón a pardo rojizo. Cuando hay rocío el patógeno es activo, se puede observar en el césped enfermo el crecimiento de un micelio fúngico blanco, algodonoso o en forma de telaraña; el micelio desaparece cuando se secan las hojas

El objetivo del presente trabajo es definir al agente causal de esta enfermedad en los greens. Para lo cual se indujo la esporulación del patógeno en cámara húmeda por el método CIMMYT; así mismo se colocó bajo cámara húmeda directamente al cepellón enfermo, para un aislamiento posterior por método directo en PDA; para obtener al patógeno del suelo se usó el método de dilución en serie con reaislamientos y para identificarlo, se realizaron microcultivos deteniendo el desarrollo a diferentes intervalos de tiempo apoyados con la información generada por Kohn (1979) y CMI Description of Pathogenic Fungi and Bacteria No. 618. Se inoculó la parte aérea por aspersión y para la raíz se colocó al inóculo con aguja hipodérmica a 1 cm de profundidad del suelo y una vez que aparecieron los síntomas en la parte aérea se indujo la esporulación directamente en el cepellón.

El hongo crece rápidamente en PDA, desarrolló un micelio blanco esponjoso que queda a modo de fieltro con tonos de color pardo. El hongo no forma esclerocios, produce un estroma extenso, en forma de lámina después de 3 semanas de desarrollo en cajas de petri. Sobre *Sclerotinia homoeocarpa* en caja de petri, se desarrolla y esporula en 5 días la fase asexual: esta es *Botrytis sp.* El periodo de incubación en raíz fue de 3 semanas y en hojas fue de 9 días y la esporulación se presentó en forma abundante en la parte aérea de la planta en 48 horas.

Los resultados del agente causal presentan coincidencia con los reportados con CMI No. 618, Smiley et al (1996), Holliday (1980). Sin embargo Atilano (1985) citado por Chase (1987) reporta que *Sclerotinia homoeocarpa* en medio de cultivo Malta-agar desarrolla pequeños esclerocios cerca de la tapa de la caja de petri. Con los resultados anteriores concluimos que el agente causal de esta enfermedad en los Greens de golf es *Sclerotinia homoeocarpa*.

P-103

ESTUDIOS PRELIMINARES DEL “FALSO MAL DE PANAMÁ” EN LA PLATANERA

Hernández, J. y Sabadell, S.

Departamento de Protección Vegetal. Instituto Canario de Investigaciones Agrarias.

El mal de Panamá, cuyo agente causal es *Fusarium oxysporum* f. sp. *Cubense* (FOC), es la enfermedad más importante de la platanera en las Islas Canarias. En los últimos años, la incidencia de esta enfermedad puede haber estado sobrestimada debido a la aparición de un desorden con sintomatología similar que fue denominado en América Central “mata amarilla” y más recientemente en Sudáfrica “Falso Mal de Panamá”, al que se le ha atribuido un origen abiótico aunque nunca ha sido descartada la implicación de un agente biótico. El objetivo de esta comunicación es presentar los resultados preliminares de un estudio encaminado a determinar la etiología y la epidemiología del “Falso Mal de Panamá”, así como establecer un diagnóstico diferencial de ambas sintomatologías.

Para determinar la presencia de posibles agentes bióticos se han estudiado muestras de rizoma y de vasos de plantas sintomáticas tomadas en fincas de la Isla de Tenerife así como del resto de las islas productoras enviadas por agricultores o Agentes de Extensión Agraria. Las muestras fueron sembradas en medios específicos para aislamientos de especies fúngicas y bacterianas. Como complemento, y para determinar la influencia de los factores bióticos y abióticos en la expresión de síntomas, suelos de varias fincas afectadas de las zonas norte y sur de Tenerife, fueron esterilizados o no al autoclave, realizándose un ensayo en condiciones controladas de invernadero durante tres meses usando plántulas de platanera del cv. ‘Gran Enana’ utilizadas como “plantas trampa”. Finalmente, con una selección de aislados fúngicos y bacterianos obtenidos a partir de las muestras estudiadas se han realizado pruebas de patogenicidad.

Las especies fúngicas y bacterianas aisladas se corresponden en su mayoría con las descritas como especies saprofitas o como patógenos de debilidad. Los resultados obtenidos en el ensayo de determinación de efectos bióticos o abióticos muestran que las variables de crecimiento fueron mayores en los suelos esterilizados que en los no esterilizados. En plantas crecidas en suelos no esterilizados se observaron síntomas aéreos y del interior del rizoma similares a los asociados al “Falso Mal de Panamá”. Los resultados de las pruebas de patogenicidad están pendientes. Estos resultados preliminares sugieren que el “Falso Mal de Panamá” está causado por una interacción de agentes bióticos y de factores abióticos.

P-104

GRUPOS DE COMPATIBILIDAD VEGETATIVA (VCGs) DE *Fusarium oxysporum* f. sp. *cupense* PRESENTES EN BRASIL.

Hernández, J.M y Sabadell, S.

Instituto Canario de Investigaciones Agrarias (I.C.I.A.). Dpto. de Protección Vegetal

El mal de Panamá es una de las enfermedades más importantes de la platanera provocada por la especie *Fusarium oxysporum* f. sp. *cupense* (FOC), de la cual se han descrito 4 razas y 21 grupos de compatibilidad vegetativa (VCG), hecho que revela la gran diversidad genética del patógeno. Para Brasil se han descrito hasta el momento los siguiente VCGs: 0120 en los cultivares Pacovan, AAB y Prata, AAB; VCG 0124 en los cultivares Gross Michel, AAA y Maça, AAB; y el VCG 0125 en un cultivar desconocido. En las islas Canarias sólo se ha descrito el VCG 0120 para cultivares del grupo Cavendish, AAA (Pequeña Enana, Gran Enana).

El objetivo de este trabajo es determinar los VCGs presentes en las parcelas experimentales del EMBRAPA, Estado de Bahía (Brasil) de cultivares no estudiados previamente como Maça-Inibap, AAB; Yangambi Km 2, AAA y Saba, ABB así como caracterizar aislados canarios provenientes de un cultivar Dwarf Cavendish, AAA no estudiados hasta el momento. La metodología seguida consistió en la obtención de aislados de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cupense* a partir de vasos de plantas que presentaban los síntomas característicos del Mal de Panamá; preparación de líneas monospóricas; inducción de mutantes *nit* mediante siembras en un medio rico en clorato y determinación del fenotipo de los mutantes utilizando medios selectivos. De los 21 VCGs descritos sólo se utilizaron los indicadores de los grupos 0120-01215, exceptuando los 0126 y 0127. Los enfrentamientos se realizaron utilizando según los casos los *nit* 1, 3 o M disponibles.

Los resultados obtenidos mostraron que los aislados de los cultivares Maça-Inibap y Yangambi Km2 pertenecen al VCG 0120, no descrito previamente para estos. El aislado del cultivar Saba pertenece al VCG 0128 no descrito hasta el momento para Brasil. El aislado canario del cultivar Dwarf Cavendish pertenece al VCG 0120, el único citado hasta la fecha para Canarias.

P-105

IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DEL VIRUS DEL MOSAICO DEL TOMATE (TOMV) INFECTANDO PEPINO DULCE (*Solanum muricatum*)

Touriño, A.¹, Sánchez, F.¹, Leiva-Brondo, M.², Prohens, J.², Nuez, F.² y Ponz, F.¹

¹Dpto. de Mejora Genética y Biotecnología. Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA). 28040-Madrid; España.

²Area de Genetica. Departamento de Biotecnología. Universidad Politecnica de Valencia. Camino de Vera, 14. 46022. Valencia, España.

En cultivos experimentales de pepino dulce en la región mediterránea se han detectado síntomas asociados a infecciones virales, siendo el posible agente causal un tobamovirus. La relación taxonómica existente entre los diversos tobamovirus de Solanáceas no permite una identificación a nivel de virus mediante ELISA con anticuerpos comerciales contra la proteína de la cápsida.

Mediante inmunocaptura con anticuerpo contra el virus del mosaico del tabaco, seguido de RT-PCR con cebadores específicos de ToMV, se amplificó la región correspondiente al extremo 3' del gen de la proteína de la cápsida y la zona 3'UTR. El fragmento amplificado se clonó y se determinó la secuencia de nucleótidos. Se presentarán los resultados del análisis de homologías de secuencia entre diversos tobamovirus.

P-106

**EVALUACIÓN DEL PODER PATOGENICO DE *Pestalotia stevensonii* Peck
SOBRE *Pinus pinea* L.**

Veroz, D., Pajares, J. y Diez, J.

Universidad de Valladolid. Departamento de Producción Vegetal y Silvopascicultura.
(Unidad de Entomología y Patología Forestales). Escuela Técnica Superior de
Ingenierías Agrarias (E.T.S.I.I.A.A.). Avenida de Madrid 57. Palencia

Pestalotia stevensonii es un hongo deuteromicete que aparece con bastante frecuencia en acículas necrosadas de pino piñonero. Pero apenas existen estudios sobre la biología, distribución o poder patogénico de este hongo.

En el presente trabajo se han obtenido 6 aislamientos diferentes recogidos en dos provincias de Castilla y León (Ávila y Palencia), sobre los cuales se ha evaluado su crecimiento en diferentes medios de cultivo, comprobándose la existencia de diferencias en su desarrollo. El crecimiento de *Pestalotia stevensonii* también fue distinto según el medio utilizado. Su temperatura óptima de crecimiento en el medio de cultivo de mayor desarrollo (PDA) fue de 25 °C.

Para determinar el poder patogénico de *Pestalotia stevensonii* se realizaron inoculaciones, sobre acículas aisladas en el laboratorio, sobre plántulas de vivero de 2 savias y sobre ramillos de un pino adulto con diferentes concentraciones de esporas. La inoculación se realizó colocando una gota de la suspensión de esporas sobre las acículas, en algunos tratamientos tras la realización de una herida.

Pestalotia stevensonii se ha revelado como un hongo patógeno débil, causante de necrosis terminales en las acículas de pinos piñoneros adultos, que ve favorecida su infección tras la realización de heridas en las acículas.

P-107

ESTUDIO DE LOS DAÑOS CAUSADOS POR *Diplodia pinea* (*Sphaeropsis sapinea*) EN BIZKAIA

García, B.¹, Puig, P.² y Diez, J.¹

¹Universidad de Valladolid. Departamento de Producción Vegetal y Silvopascicultura (Unidad de Entomología y Patología Forestales). Escuela Técnica Superior de Ingenierías Agrarias (E.T.S.I.I.A.A.). Avenida de Madrid 57. Palencia.

²Dirección General de Montes y Espacios Naturales. Diputación Foral de Bizkaia. Gran Vía, 25. 48009. Bilbao (Bizkaia)

El 1 de junio de 1999 se produjo una fuerte granizada que produjo graves heridas en las ramas de los árboles de una amplia extensión de masas de coníferas de la provincia de Bizkaia. La llegada de un tiempo caluroso y húmedo en el verano facilitó la infección, a través de las heridas ocasionadas por el granizo, de gran número de árboles por el patógeno facultativo *Diplodia pínea*. Esta enfermedad causó daños en una importante extensión de monte público y privado que, debido entre otras cosas a la necesidad de distribuir las subvenciones que concede la diputación de Bizkaia para estos casos, era necesario valorar con la máxima precisión posible.

Una vez caracterizados los síntomas de la afección por el hongo, se delimitó la franja afectada. Ésta fue de 15.900 has, que se distribuyeron a lo largo de la provincia de Bizkaia en la dirección NE-SO. También se registraron daños en la provincia de Álava.

Los daños causados por el hongo se evaluaron mediante dos metodologías diferentes: muestreo por rodales y muestreo sistemático (126 parcelas de 1 km x 1 km distribuidas de forma homogénea por la zona afectada). Se establecieron 8 grados de daño en los 10 árboles muestreados aleatoriamente, en función del porcentaje de copa afectado y de la afección en la guía principal.

Mediante ambas metodologías se determinó la zona afectada, el grado de daño de las unidades de muestreo y los pies atacados en función del grado de daño y de la edad del arbolado.

De las dos metodologías empleadas la más adecuada resultó ser la sistemática, ajustándose el nivel de detalle a la malla a emplear en la determinación del número de parcelas a muestrear. Los pies más fuertemente atacados fueron los pertenecientes al fustal joven y adulto.

P-108

MICOFLORA ASOCIADA A ACÍCULAS DE *Pinus nigra*, *Pinus pinaster*, *Pinus silvestris* y *Pinus uncinata* EN EL NOROESTE DE LA PROVINCIA DE PALENCIA

Zamora, P., Pajares, J. y Diez, J.

Universidad de Valladolid. Departamento de Producción Vegetal y Silvopascicultura. Escuela Técnica Superior de Ingenierías Agrarias (E.T.S.I.I.A.A.). Palencia.

En el presente trabajo se seleccionaron 6 parcelas repobladas con *Pinus nigra*, *P. pinaster*, *P. sylvestris* y/o *P. uncinata* de las que se tomaron muestras de acículas, ramas, piñas y pinocha, de las especies presentes, que se procesaron convenientemente para el estudio de su flora fúngica. Las muestras se analizaron en cámaras húmedas y en medio de cultivo. En general, el material vegetal más colonizado por los hongos fue la pinocha y las acículas secas, debido a su mayor estado de degradación. La presencia de micetes en las piñas fue prácticamente nula, debido posiblemente a la lignificación de los tejidos. Mediante el análisis diario de las muestras se identificaron 46 especies fúngicas (Tabla 1), en las que aparecen tanto hongos patógenos, como facultativos, como saprófitos. Las especies patógenas no se han encontrado causando daños de consideración. Sin embargo, es necesario mantener un cierto control sobre las masas, ya que su nivel de inóculo podría aumentar en un futuro por problemas de granizo, sequía, etc., o por no realizarse en su momento los tratamientos selvícolas, necesarios ya desde hace tiempo, en algunas de las masas estudiadas.

Tabla 1. Hongos encontrados colonizando acículas y ramillos de pino.

<i>Alternaria alternata</i> (Fr.) Keissler	<i>Leptostroma pinastris</i> (Desm.)
<i>Arthrimum caricicola</i> Kunze ex Fr.	<i>Lophodermium pinastris</i> (Schard. ex Hook.) Chev.
<i>Aspergillus</i> sp. Micheli. ex Link.	<i>Mucor hiemalis</i> Wehmer
<i>Aureobasidium pullulans</i> (De Bary) Arnaud.	<i>Naemacyclus niveus</i> (Pers. ex Fr.) Fuck. ex Sacc.
<i>Botrytis cinerea</i> Pers. ex Nocca Balb.	<i>Nigrospora oryzae</i> (Berkeley et Broome) Petch.
<i>Cenangium ferruginosum</i> Fr.	<i>Oidium</i> sp.
<i>Cercospora</i> sp. <i>Ceuthospora</i> sp. Fr. em. Grev.	<i>Penicillium</i> sp. Link. ex Fr.
<i>Chaetomium cochliodes</i> Palliser.	<i>Pestalotia stevensonii</i>
<i>Chaetomium erectum</i> Skolko & Groves	<i>Pestalotiopsis funerea</i> Desm.
<i>Chaetomium fusiforme</i> Chivers.	<i>Phoma</i> sp. Sacc.
<i>Cladosporium herbarum</i> (Pers.) Link. ex S.F.Gray	<i>Phomopsis</i> sp. (Sacc.) Bubak.
<i>Cladosporium</i> sp. tipo A Link ex Fr.	<i>Preussia</i> sp. Fuckel.
<i>Cladosporium</i> sp. tipo B Link ex Fr.	<i>Rhizopus stolonifer</i> (Ehrenb. ex Fr.) Vuill.
<i>Coniothyrium fuckelii</i> Sacc.	<i>Sclerophoma pithyophila</i> (Cda.) Höhn.
<i>Cytospora</i> sp. Ehrenb. ex Fr.	<i>Sirococcus strobilinus</i> G. Preuss
<i>Dothistroma septospora</i> (Dorog.) Morelet.	<i>Sordaria fimicola</i> (Robergo ex Desmaz.) Ces & De Not
<i>Dydimella</i> sp. Sacc.	<i>Sphaeropsis sapinea</i> (Fr.) Dyko & Sutton
<i>Epicoccum nigrum</i> Link.	<i>Stachylidium</i> sp. Link. ex S.F.Gray
<i>Fusarium poae</i> (Peck) Wr.	<i>Trichoderma viride</i> Pers. ex S.F.Gray
<i>Fusarium</i> sp.	<i>Trichotecium roseum</i> (Persoon) Link ex S.F.Gray
<i>Geotrichum</i> sp. Link ex Pers.	<i>Verticillium albo-atrum</i> Reinke & Berthold
<i>Harzia acremonoides</i> (Harz) Cost.	<i>Verticillium dahliae</i> Kleb.
<i>Leptosphaeria coniothyrium</i> (Fuckel) Sacc.	

P-109

ESTUDIO DE LOS HONGOS ASOCIADOS A *Populus X cerratensis* DE LA PROVINCIA DE PALENCIA

García, N. y Díez, J.

Universidad de Valladolid. Departamento de Producción Vegetal y Silvopascicultura. Escuela Técnica Superior de Ingenierías Agrarias (E.T.S.I.I.A.A.). Palencia.

El *Populus x cerratensis* es un híbrido que suele situarse en las inmediaciones de las turberas fósiles de la comarca del Cerrato, junto a arroyos y zonas húmedas, y que tiene características comunes con las especies *Populus canescens* y *Populus tremula*. Este híbrido es interesante ya que crece en suelos calizos, no aptos para la mayoría de los chopos. Sin embargo, en la actualidad sus poblaciones se encuentran reducidas a unos pocos rodales. Es importante conocer los hongos asociados a este álamo como una forma de asegurar su conservación en un futuro.

Para el estudio se eligieron los siete rodales catalogados de *Populus x cerratensis*, en el sur de la provincia de Palencia, sobre los que se realizaron dos muestreos, uno en otoño y otro en primavera, con objeto de encontrar las fases de teleomorfo y anamorfo de los micetes. Para el diagnóstico de los hongos se han utilizado dos metodologías diferentes: cámaras húmedas y medios de cultivo agarizados (PZA).

Todas las cámaras húmedas y placas de cultivo se analizaron bajo lupa binocular, con el fin de detectar fructificaciones fúngicas, y posteriormente en el microscopio, para observar los propágulos del hongo.

Colonizando las muestras analizadas han aparecido hasta el momento algunos hongos patógenos como *Pollacia radiosa*, *Cladosporium maculícola* o *Hypoxylon sp.*, aunque salvo excepciones, ninguno de ellos se ha encontrado causando daños de importancia.

P-110

MICOSIS ASOCIADAS A PLÁNTULAS DE VIVEROS EN CASTILLA Y LEÓN

Martín, P., Pajares, J. y Díez, J.

Universidad de Valladolid. Departamento de Producción Vegetal y Silvopascicultura. Escuela Técnica Superior de Ingenierías Agrarias (ETSIIAA). Palencia.

El crecimiento inicial de las plantas una vez transplantadas al campo, depende en gran medida de la calidad fisiológica de las mismas en vivero (RINCÓN, *et al.* 1997), por eso se considera importante el análisis de micosis en esta fase de desarrollo.

En el presente trabajo, se lleva a cabo un estudio exhaustivo de los hongos asociados a plántulas de especies de importancia forestal, en las primeras fases de desarrollo de la planta en vivero en la comunidad de Castilla y León.

Las especies forestales empleadas para desarrollar este trabajo son *P. nigra*, *P. sylvestris*, *P. pinea*, *Q. ilex* y *Q. pyrenaica*. El material utilizado para el análisis de presencia de posibles patógenos ha sido tanto material vegetal (acículas, tallos, raíces, semillas) como material asociado a la producción de la planta en los viveros y que se han considerado de interés (sustratos, agua de riego, suelo de rizosfera).

En esta primera fase del estudio, se están analizando las muestras recopiladas para determinar los posibles hongos asociados, con especial atención a los que presentan un comportamiento patógeno.

En una segunda fase se llevarán a cabo los correspondientes trabajos de inoculación de los hongos patógenos seleccionados. Se pretende así determinar cuáles son fuente de problemas en los viveros y las características fitopatógenas de algunos hongos que aparezcan con gran frecuencia y cuya patogeneidad esté aún por determinar.

RINCÓN, A.; ÁLVAREZ, I.; PARLADÉ, J. y PERA, J. 1997 "Micorrización controlada de *Pinus pinea* L. en vivero". En PUERTAS, F. y MARTÍN, V. (Eds): "Actas del II Congreso Forestal Español. Pamplona 23-27 de junio de 1997". Sociedad Española de Ciencias Forestales/Sociedade Portuguesa de Ciências Florestais. Pamplona. pp 545-550.

P-111

***Phytophthora cinnamomi* Rands, UN PATÓGENO POTENCIAL PARA LOS BOSQUES DE LAURISILVA DE LAS ISLAS CANARIAS**

Domínguez Correa, P.¹, Siverio de la Rosa, F.², Díaz Hernández, S.¹ y Gallo Llobet, L.¹

¹Dpto. Protección Vegetal del Instituto Canario de Investigaciones Agrarias (I.C.I.A.), Apartado 60, 38200 La Laguna-Tenerife, Islas Canarias.

²Dirección Gral. de Desarrollo Agrícola de la Consejería de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentación del Gobierno de Canarias.

Phytophthora cinnamomi Rands es uno de los patógenos más polífagos que se conoce. Desde su zona de origen se ha distribuido ampliamente por todo el mundo produciendo daños considerables en ecosistemas naturales de bosques húmedos en Australia y Estados Unidos. En Canarias se detectó por primera vez en 1975 y en la actualidad produce severos daños en el cultivo del aguacate. La laurisilva es un bosque húmedo relíctico de gran valor por su biodiversidad y en el que habitan dos especies muy sensibles al patógeno, *Erica arbórea* L. (brezo) y *Persea indica* (L.) Spreng. Rkse. (viñátigo), sin embargo se desconocía la existencia de otras especies que pudieran ser susceptibles a *P. cinnamomi* y el posible daño que su infección pudiera causar en el bosque. Con este fin se inocularon 11 especies arbóreas, obtenidas de semilla y representativas de la laurisilva, con una cepa de *P. cinnamomi*. Se demostró que *Erica scoparia* L. ssp *platicodon* Webb et Berth (tejo) y *Arbutus canariensis* Veill. (madroño) son sensibles al patógeno.

Se recogieron muestras de suelo de laurisilva en la isla de Tenerife para valorar su supresividad a *P. cinnamomi*, utilizándose como control un suelo agrícola. Se estudió el efecto de la esterilización del suelo sobre la aparición de síntomas y el desarrollo de la enfermedad en aguacatero y viñatigo (ambos susceptibles al patógeno), no observándose capacidad supresiva en el suelo de laurisilva.

Asimismo, se aislaron 131 cepas bacterianas del suelo de laurisilva que se enfrentaron *in vitro* a un aislado de *P. cinnamomi* y se identificaron por su composición en ácidos grasos. Se seleccionaron 12 cepas con distinta capacidad antagonista que también mostraron antagonismo frente a una colección de 28 cepas de *P. cinnamomi* aisladas de distintos hospederos. El mayor antagonismo *in vitro* fue obtenido con seis cepas de *Pseudomonas putida* y dos cepas de *Bacillus polymyxa*, observándose inhibiciones superiores al 50%. Además, *P. putida* llega en ocasiones a producir la muerte del patógeno.

Estos resultados indican que *P. cinnamomi* es un patógeno potencial para la laurisilva, ya que encierra varias especies muy sensibles y sus suelos no mostraron supresividad en las condiciones de ensayo, aunque contenga microorganismos antagonistas *in vitro*. El riesgo de daño aumenta si consideramos que las especies arbóreas encontradas susceptibles al patógeno son colonizadoras primarias y contribuyen a la regeneración de este bosque.

P-112

PROBLEMÁTICA DE LOS NEMATODOS FITOPARÁSITOS EN LA CUENCA DEL DUERO.

López-Robles, J., de Aymerich Vadillo, B. y González Carcedo, S.

Área de Edafología y Química Agrícola. Universidad de Burgos. Plaza de Misael Bañuelos S/N . 09001 Burgos.

Se ha efectuado una revisión de los trabajos y ponencias sobre nematodos, en los que se hace referencia a la Comunidad de Castilla y León.

Se analizan las características principales de los nematodos fitoparásitos que se han detectado asociados a nuestros cultivos y zonas sin cultivar, indicando para cada uno de ellos su distribución. También se efectúa una valoración sobre la repercusión económica en los principales cultivos de la Cuenca del Duero.

Se han estudiado desde el punto de vista nematológico 47 especies vegetales, de las que 18 corresponden a frutales; 6 son cereales; 7 son especies forestales; 2 ornamentales; 8 plantas hortícolas y 6 plantas espontáneas o malas hierbas.

Se citan unas sesenta especies de nematodos de los cuales gran número presentan un importante interés agrícola.

En cuanto a la problemática de los nematodos fitoparásitos en esta Comunidad, son de destacar por su importancia económica las pérdidas producidas por las especies de nematodos formadoras de quistes, pertenecientes a los géneros *Globodera* spp. y *Heterodera* spp., nematodos que parasitan a los cultivos de patata, cereales, remolacha azucarera y lúpulo; sigue en importancia las especies de los géneros *Longidorus* spp. y *Xiphinema* spp., transmisoras de virosis en viñedos y frutales y con menor repercusión económica especies de nematodos ectoparásitos y de partes aéreas y formadoras de nódulos del género *Meloidogyne*. Por último es también destacable el gran número de especies que no se han descrito en la Cuenca del Duero y la importancia que supone la necesidad de establecer medidas de cuarentena adecuadas que impidan su introducción o intensificar las investigaciones que permitan detectar los posibles focos existentes.

Tras la observación de los mapas de distribución de las diferentes especies, hay que señalar que esta zona es una de las menos conocidas desde el punto de vista nematológico y se apunta la conveniencia de avanzar en este aspecto.

P-113

DETECCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DEL *PELARGONIUM ZONATE SPOT VIRUS* EN TOMATE EN ARAGÓN

Luis Arteaga, M.¹, Cambra, M.A.² y Fernández-Cavada, S.²

¹Servicio de Investigación Agroalimentaria, D.G.A., Apartado 727, 50080 Zaragoza.

²Centro de Protección Vegetal, D.G.A., Apartado 727, 50080 Zaragoza.

Durante la primavera de 1996 se observaron síntomas sospechosos de virosis en plantas de tomate, variedad Royesta, cultivado en invernaderos de plástico, situados en Santa Engracia (Zaragoza). Los síntomas consistían en círculos, anillos y dibujos, cloróticos y/o necróticos, en las hojas apicales y en anillos concéntricos, círculos y dibujos cloróticos en tallos y frutos. Dichos síntomas eran similares a los producidos por el *Virus de las manchas zonales del Pelargonium (Pelargonium zonate spot virus, PZSV)* en tomate, descritos en Italia por Gallitelli (1982), Vovlas *et al.* (1986) y Crescenci *et al.* (1992).

Se hicieron transmisiones por inoculación mecánica sobre una gama de especies indicadoras a partir de hojas, tallos y frutos enfermos. Se obtuvo reacción local, en forma de lesiones cloróticas, en *Chenopodium amaranticolor*, *C. quinoa*, *Cucumis sativus* y *Cucurbita pepo* y reacción sistémica, a veces con reacción local también, en *Capsicum annuum* "Doux des Landes" y "Yolo Wonder", *Datura stramonium*, *Gomphrena globosa*, *Nicotiana clevelandii*, *N. glutinosa*, *N. megalosiphon*, *N. rustica*, *N. sylvestris*, *N. tabacum* 'Paraguay', 'Samsun' y 'Xanthi nc', *Ocimum basilicum*, *Petunia hybrida*, *Physalis floridana*, *Solanum melongena* y *Vigna unguiculata*. Los síntomas observados en hojas de tomate en infección natural fueron reproducidos por inoculación mecánica de plántulas de tomate con extractos de *Nicotiana glutinosa*, *N. tabacum* 'Paraguay' y *Physalis floridana* con infección sistémica.

En la primavera de 1999 volvió a aparecer sintomatología análoga a la de 1996 en los mismos invernaderos, sobre plantas de las variedades Royesta y Bond. Utilizando un antisuero comercial (Agdia Inc.), obtenido frente a un aislado italiano del PZSV, se hicieron análisis serológicos, por ELISA-DAS, a partir de hojas, tallos y frutos de plantas enfermas en 1999 y de las especies indicadoras con infección sistémica, procedente de muestras de 1996 y 1999. Se obtuvieron resultados positivos (valores de A_{405nm} superiores al triple del valor de las plantas sanas) en todos los casos. Los resultados serológicos positivos fueron confirmados mediante análisis por hibridación molecular, realizados por el Dr. Gallitelli (Bari, Italia), utilizando una ribosonda específica del PZSV.

Se presentan y discuten también los resultados obtenidos en los análisis serológicos efectuados a partir de muestras de la flora arvense existente en los alrededores de dichos invernaderos, recogidas en Mayo de 1999 y Mayo de 2000.

Crescenci A., *et al.* (1992). *Informatore Fitopatologico*, 3:36

Gallitelli D., (1982). *Ann. Appl. Biol.* 100:457

Vovlas C., *et al.* (1986) *Informatore Fitopatologico*, 2:39,

P-114

INFECCIÓN NATURAL DE LA BORRAJA (*Borago officinalis* L.) POR EL VIRUS DEL MOSAICO DE LA ALFALFA.

Luis Arteaga, M.¹, Mallor, C.¹, Cambra, M.A.² y Fernández-Cavada S.²

¹Servicio de Investigación Agroalimentaria, D.G.A., Apartado 727, 50080. Zaragoza

²Centro de Protección Vegetal, D.G.A., Apartado 727, 50080. Zaragoza.

El virus del mosaico de la alfalfa (*alfalfa mosaic virus*, AMV) está distribuido mundialmente y tiene una gama de hospedantes amplia. Además de ser uno de los virus más frecuentes en alfalfa, es capaz de producir enfermedades en varias especies hortícolas, entre ellas: judía, apio, lechuga, guisante, pimiento y tomate (1). En España ha sido encontrado en infección natural en pimiento y tomate (2, 4).

Durante el otoño de 1999, en cultivos comerciales al aire libre de borraja, situados en los alrededores de Zaragoza, aparecieron plantas con sintomatología sospechosa de virosis. Los síntomas consistían en mosaicos foliares con manchas grandes de color amarillo vivo que depreciaban comercialmente a las plantas y eran similares a los obtenidos previamente en plantas de borraja inoculadas experimentalmente con aislados de AMV procedentes de tomate (3). Las parcelas de borraja tenían alrededor numerosos cultivos de alfalfa. Se recolectaron muestras de hojas de las plantas enfermas y se realizaron análisis serológicos por ELISA-DAS, utilizando un antisuero comercial (Loewe) de AMV. Se incluyeron extractos de plantas de *Ocimum basilicum* con síntomas sistémicos, producidos por inoculación mecánica con AMV de tomate, como control positivo, y de plantas sanas de borraja, tomate y *O. basilicum*, como controles negativos. En dichos análisis serológicos, las muestras de borraja enferma dieron resultados positivos (los valores de A_{405nm} fueron muy superiores al triple de los valores de las plantas sanas).

Además se inoculó mecánicamente una gama de especies indicadoras que incluía plantas sanas de borraja. Se obtuvo reacción local (lesiones necróticas) y/o reacción sistémica (mosaico en manchas de color verde-claro y/o amarillo) en las siguientes especies: *Capsicum annuum* L. Doux des Landes y Yolo Wonder, *Chenopodium amaranticolor* Coste & Reyn, *Ch. quinoa* Willd, *Gomphrena globosa* L., *Nicotiana clevelandii* Gray, *N. glutinosa* L., *N. sylvestris* Speg. et Comes, *N. tabacum* L. Paraguay y Xanthi nc, *Ocimum basilicum* L., *Petunia hybrida* Vilm., *Physalis floridana* Rybd. y *Vigna unguiculata* (L.) Walp. Se reprodujeron los síntomas naturales en plantas sanas de borraja inoculadas a partir de *Ch. amaranticolor* y *O. basilicum* con síntomas sistémicos. Teniendo en cuenta las reacciones de las especies indicadoras y los resultados de los análisis serológicos, se puede deducir que se trata del AMV. Esta es la primera cita de este virus en borraja.

(1) CMI/AAB, No 229, 1980. (2) Luis Arteaga M. 1989. Tesis Doctoral. E.T.S.I.A.Madrid. (3) Información Técnica Económica Agraria, 92V(2),70-80, 1996. (4) Las enfermedades del tomate. Bases para el control integrado. Ministerio de Agricultura, 115-143, 1993.

P-115

P-116

PRIMERA CITA DE PODREDUMBRE DE RAICES Y CUELLO EN PEPINO CAUSADO POR *Fusarium oxysporum* EN ESPAÑA

Moreno, A.¹ , Alférez, A. ¹, Tello, J.C.² y Avilés, M. ³

¹Centro de Investigación Agrícola Torre de la Reina, Aventis CropSciences España S.A.

²Departamento de Producción Vegetal, Universidad de Almería.

³Departamento de Ciencias Agroforestales, Universidad de Sevilla.

Durante Diciembre de 1999, El Servicio de Diagnóstico de Aventis CropSciences, España recibió procedentes de invernaderos de Almería plantas de pepino (tipo holandés) cultivado sobre lana de roca, con daños en cuello y tallos, que ocasionaron graves pérdidas de plantas en algunos invernaderos (el 75% en menos de tres semanas).

Las plantas presentaban podredumbre generalizada de raíces, con carácter húmedo/blando en cuellos, y lesiones cloróticas y longitudinales en tallos. En los casos más avanzados, abundantes desarrollo de masas de esporas color salmón anaranjado cubrían totalmente los cuellos y las lesiones de tallos.

A partir de trozos de raíces, cuellos y tallos afectados desinfectados superficialmente y colocados en PDA acidificado, se aislaron consistentemente colonias fúngicas de aspecto idéntico en todos los casos. Basados en la morfología de las colonias, conidias, fiálidas y clamidosporas, el hongo se identificó como *Fusarium oxysporum*.

Los tests de patogenicidad se realizaron en cámara de cultivo a 25°C y 28°C sobre plántulas de pepino (primera hoja verdadera). La inoculación se realizó con una suspensión de microconidias en el agua de riego (200ml suspensión/planta), producida en PDB y ajustada a 4×10^5 microconidias/ml.. Las plantas testigos no inoculadas recibieron agua estéril.

Los tests de patogenicidad se repitieron 2 veces. Todas las plantas inoculada desarrollaron los mismos síntomas a partir de los 15 días de la inoculación , manifestándose de modo más lento y progresivo a 25°C que a 28°C.

No se desarrollaron síntomas en las plantas testigos no inoculadas.

Fusarium oxysporum se reaisló exitosamente de cuellos, raíces y tallos de plantas inoculadas.

Los síntomas observados en las plantas afectadas coinciden con los descritos por Vakalounakis (1996).

Esta es la primera cita de podredumbre de raíz y cuello en pepino por *Fusarium oxysporum* en España.

P-117

P-118

DETECCIÓN DE FITOPLASMAS SOBRE PLANTAS LEÑOSAS SINTOMÁTICAS EN CATALUÑA

García-Figueres, F.¹, Martín, M. P.² y Torres, E.¹

¹Servei Laboratori Sanitat Agrària. DARP. Via Circulació Nord, Tram VI, 08004 Barcelona.

²Real Jardín Botánico (CSIC). Pza. de Murillo, 2. 28014 Madrid.

Con la puesta en marcha de técnicas moleculares para la detección de organismos patógenos de difícil diagnóstico, se ha puesto a disposición de los laboratorios de diagnóstico una importante herramienta que permite detectar la etiología de muchas enfermedades poco conocidas, como es el caso de los fitoplasmas. En Cataluña, a partir de 1998, se han detectado fitoplasmas en diversas especies de plantas leñosas que presentaban síntomas que coincidían con los descritos para esa enfermedad y que hasta este momento no se podía dar un diagnóstico concluyente.

Los síntomas observados presentaban distintos grados de severidad dependiendo de la especie afectada, de su estado fenológico, edad y también de la clase de fitoplasma asociado a la patología. En general, aparecen síntomas de tres clases: decaimientos, brotaciones alteradas (escobas de bruja) y cambios de coloración. Entre las especies afectadas se encuentran plantas de elevado valor comercial: *Vitis vinifera*, *Olea europaea*, *Prunus* sp., *Pyrus communis*; especies forestales: *Pinus* sp.; y especies de interés para vegetación urbana: *Celtis australis* y *Nerium oleander*.

La detección de los fitoplasmas se ha realizado mediante la técnica de Nested-PCR utilizando iniciadores específicos de grupo: P1-P7 como externos y U5-U3 como internos. Los análisis de digestión enzimática de restricción, permitió establecer a que grupo pertenecían.

Los análisis revelan que en la mayoría de casos nos encontramos fitoplasmas compatibles con los grupos del "Aster Yellows" y "Stolbur".

P-119

INCIDENCIA DE *Dematophora necatrix* EN OLIVO

Celada, B.¹ y Garcia-Figueres, F².

¹Servei de Protecció dels Vegetals. Avgda Catalunya 50. Tarragona.

²Servei Laboratori Sanitat Agrària. DARP. Via Circulació Nord, 08004 Barcelona.

Numerosos estudios han puesto de manifiesto la importancia de los hongos del suelo en la mortalidad de plántulas de olivo. A menudo estas alteraciones están relacionadas a condiciones culturales que favorecen tanto un desarrollo rápido de la planta como de los patógenos del suelo.

En las comarcas cercanas a Tarragona se ha incrementado considerablemente la plantación de olivares intensivos utilizando la variedad Arbequina en un sistema de riego para favorecer el crecimiento y producción de esta variedad. A menudo, se han reconvertido campos en los que se había cultivado almendro, melocotonero, algarrobo y avellano.

Con la adaptación al riego de los olivares en esta zona, empezaron a aparecer problemas de cuello y raíz. A pesar de la creencia de agricultores y técnicos que la causa de estas alteraciones era *Armillaria mellea*, los análisis ponían de manifiesto la presencia casi exclusiva de *Dematophora necatrix*, apareciendo casi de forma testimonial *Phytophthora*, *Cylindrocarpon*, *Armillaria*, etc.

Desde 1991, se ha venido observando una creciente presencia de *Dematophora necatrix* en cuello y raíz, tanto en olivos de reciente plantación como en ejemplares adultos. En plántulas puede producir la muerte en pocos meses. En árboles adultos el proceso ha sido algo más lento, pero la creciente incidencia que se observa en estos árboles hace temer que se pueda convertir en una grave enfermedad en el olivar del campo de Tarragona.

La valoración realizada en campo pone de manifiesto la gravedad de esta afección. En plantaciones de menos de 4 años, la mayoría presentan entre 5-10 % de árboles afectados; en tres parcelas se presentó entre 60-70 % de bajas. En plantaciones de más de 10 años, se ha podido apreciar una incidencia entre 5-10 % recientemente detectadas.

P-120

LA MANCHA FOLIAR DE *Arbutus unedo* CAUSADA POR *Septoria unedinis*.

Romero, M.A. y Trapero, A.

Dpto. de Agronomía, ETSIAM, Universidad de Córdoba. Apdo. 3048, 14080 Córdoba.

Durante los años 1996-1999, asociada con períodos excepcionalmente lluviosos, se ha podido observar una mancha foliar necrótica de color negro que presenta una elevada incidencia y severidad en los madroños (*Arbutus unedo* L.) de Andalucía, llegando a ocasionar una grave defoliación de las plantas más afectadas. La identificación del agente causal de esta enfermedad y la caracterización de aislados de dicho agente constituyen los objetivos de nuestro trabajo.

Las observaciones de campo en seis zonas diferentes de Andalucía (Córdoba, Jaén, Málaga y Sevilla) indican que la enfermedad se encuentra ampliamente distribuida. Las manchas necróticas de color negro presentaban el centro de color blanco-ceniciento y toda ella rodeada de una estrecha franja rojiza en estados más avanzados de la infección. A partir del tejido foliar afectado por las lesiones necróticas se obtuvieron un total de 15 aislados de una misma especie fúngica. Tras la caracterización morfológica de los aislados, el hongo se ha identificado como *Septoria unedinis* var. *vellanensis*, especie mitospórica citada como agente de la mancha foliar del madroño en Italia. La caracterización del crecimiento micelial en función de la temperatura de incubación ha permitido estimar una temperatura óptima de crecimiento para nuestros aislados de 21 °C. El estado sexual del hongo, identificado como *Mycosphaerella unedinis*, se observó en las hojas afectadas que habían permanecido en el suelo durante el invierno. Las ascosporas obtenidas mediante descarga de las pseudotecas presentes en los tejidos afectados dieron lugar a colonias de *S. unedonis* var. *vellanensis*, confirmando la conexión entre los dos estados del mismo hongo. Los ensayos de patogenicidad de los aislados de *S. unedonis* se realizaron sobre plántulas de madroño sanas, vigorosas y en condiciones ambientales favorables para su crecimiento. En estos ensayos, se reprodujeron los síntomas característicos de la enfermedad, tras un largo periodo de incubación de las infecciones (3-7 meses). El posterior reaislamiento de *S. unedonis* de los tejidos afectados de las plantas inoculadas, permitió confirmar la eficacia del hongo como patógeno de madroño, como ya indicaban las observaciones de campo.

Este trabajo constituye la primera descripción de *S. unedinis* como causante de la mancha foliar necrótica de *A. unedo* en España. También es la primera vez que se establece la conexión entre el anamorfo *S. unedinis* y el teleomorfo *M. unedinis*.

P-121

EL CHANCRO DE *Cistus ladanifer* CAUSADO POR *Botryosphaeria ribis*

Gutiérrez, J., Sánchez, M.E. y Trapero, A.

Dpto. de Agronomía. ETSIAM. Universidad de Córdoba. Apdo. 3048. 14080. Córdoba.

Durante los años 1997-98, asociado con periodos excepcionalmente lluviosos, se ha podido observar un síndrome de desecación y muerte de ramas de jara pringosa (*Cistus ladanifer*), que frecuentemente ocasiona la muerte de la planta completa. La caracterización de la enfermedad y de su agente causal, así como su posible relación con la “seca de los *Quercus*”, constituyen los objetivos de nuestro trabajo.

Las observaciones realizadas en 15 parcelas de muestreo distribuidas por jarales situados en el norte de la provincia de Córdoba, mostraron la presencia de chancros asociados al desarrollo de la enfermedad. A partir del tejido cortical necrótico de estos chancros se obtuvieron un total de 58 aislados de una misma especie fúngica. Tras la caracterización morfológica de los aislados, el hongo se ha identificado como *Botryosphaeria ribis* (anamorfo: *Fusicoccum* sp.), ascomiceto frecuentemente asociado a la producción de chancros de debilidad en numerosas especies leñosas. La caracterización del crecimiento micelial en función de la temperatura de incubación ha permitido estimar una temperatura óptima de crecimiento para nuestros aislados cercana a 30° C. Estas altas temperaturas también han mostrado ser las más favorables para la germinación de sus conidias, mostrando la adaptación del patógeno a las condiciones ambientales en las que se desarrolla su huésped. La patogenicidad de los aislados se ha evaluado mediante diferentes técnicas de inoculación, tanto en condiciones parcialmente controladas como en campo. En todos los casos se han reproducido los síntomas de la enfermedad en las plantas inoculadas, con elevados porcentajes de reaislamiento del hongo. No obstante, los valores de severidad de síntomas más elevados se registraron en las inoculaciones llevadas a cabo sobre plantas de jara mantenidas en umbráculo y libres de cualquier situación de estrés, demostrándose así el comportamiento de *B. ribis* como patógeno primario de *C. ladanifer*.

Además, a partir de ramas puntisecas de alcornoques afectados de “seca” también se pudo aislar *Fusicoccum* sp.

El chancro causado por *B. ribis* representa la primera descripción de una enfermedad en *C. ladanifer*, constituyendo un problema grave que afecta al matorral leñoso típico de zonas secas y suelos pobres. Por otra parte, el aislamiento de *Fusicoccum* sp. a partir de ramas puntisecas de alcornoque, sugiere la posible implicación de este hongo como agente contribuyente del decaimiento de los *Quercus* mediterráneos.

P-122

MUERTE DE PLÁNTULAS CAUSADA POR *Phytophthora* spp. EN VIVEROS FORESTALES ANDALUCES

Andicoberry, S., Sánchez, M.E. y Trapero, A.

Dpto. de Agronomía. ETSIAM. Universidad de Córdoba. Apdo. 3048. 14080. Córdoba.

Durante el año 1998, asociado con encharcamientos de los sustratos de cultivo, se ha podido observar un síndrome de muerte de plántulas de encina y pino carrasco de 6 meses a 1 año de edad, en tres viveros forestales andaluces. Las observaciones realizadas mostraron una alta incidencia de clorosis, marchitez y, en ocasiones, defoliación, en los plántulas afectados. Asociado al desarrollo de estos síntomas foliares, en todos los casos se constató la presencia de una podredumbre extensa de las raicillas absorbentes.

A partir del tejido necrótico de las raicillas sintomáticas se obtuvieron y purificaron aislados de *Phytophthora*, género fúngico frecuentemente asociado al "damping-off" en viveros forestales. Tras la caracterización morfológica de las estructuras vegetativas y de reproducción asexual y sexual, se identificaron tres especies distintas asociadas a la podredumbre radical de la encina: *P. cinnamomi*, *P. cryptogea* y *P. drechsleri*. Esta última especie ha sido la única asociada a la enfermedad en pino carrasco. La caracterización del crecimiento micelial en función de la temperatura de incubación, ha permitido estimar una temperatura óptima de crecimiento para todos nuestros aislados cercana a 24° C.

La patogenicidad de los aislados se ha evaluado mediante diferentes técnicas de inoculación de plántulas sanas de encina, alcornoque y pino carrasco. También se ha ensayado el efecto del encharcamiento del suelo en el desarrollo de la enfermedad. En todos los casos se han reproducido los síntomas de la enfermedad en las plantas inoculadas, tanto a nivel foliar como radical, con elevados porcentajes de reaislamiento del hongo inoculado. Los valores de severidad de síntomas radicales más elevados se registraron en las inoculaciones llevadas a cabo con micelio en suspensión acuosa y en condiciones de encharcamiento continuo del sustrato. En general, la severidad de la infección radical resultó más elevada en encina que en alcornoque, siendo *P. cinnamomi* la especie más patogénica para ambas especies de *Quercus*, y también para el pino carrasco. No obstante, el aislado de *P. drechsleri* de pino resultó igualmente muy virulento para la encina y el pino carrasco, aunque no así en el caso del alcornoque.

Este trabajo constituye la primera descripción de *P. cinnamomi*, *P. drechsleri* y *P. cryptogea*, como agentes de colapso tardío en viveros de encina, y de *P. drechsleri* en pino carrasco. Igualmente, se ha demostrado la potencial patogenicidad de estas tres especies de *Phytophthora* en alcornoque, y de *P. cinnamomi* en pino carrasco.

P-123

DETECCIÓN DE *Phytophthora cinnamomi* EN SUELOS AFECTADOS POR LA SECA DE LOS *Quercus*

Hermoso, R., Sánchez, M.E. y Trapero, A.

Dpto. de Agronomía. ETSIAM. Universidad de Córdoba. Apdo. 3048. 14080. Córdoba.

El aislamiento directo de especies de *Phytophthora* a partir de muestras de suelo ofrece muchas dificultades, incluso cuando se utilizan medios de cultivo selectivos para este género fúngico. Por este motivo, tradicionalmente se vienen utilizando métodos de aislamiento indirecto mediante el uso de "cebos biológicos". En el caso particular de *P. cinnamomi*, de entre los cebos más comúnmente utilizados destacan los pétalos de clavel y los frutos de manzana y aguacate. Este tipo de cebos ha sido comúnmente utilizado para el aislamiento de *P. cinnamomi* a partir de muestras de suelo donde crecían pies de *Quercus ilex* y *Q. suber* afectados de podredumbre radical.

El principal objetivo de nuestro trabajo ha sido la puesta a punto de un método más efectivo, además de sencillo, barato y rápido, para la detección de este hongo y su aislamiento del suelo en el patosistema *P. cinnamomi* / *Quercus* spp. Para ello se ha realizado un primer experimento con suelo estéril infestado separadamente con micelio de dos aislados distintos de *P. cinnamomi* en suspensión acuosa. Se han ensayado, utilizando como cebos pétalos inmaduros de clavel y hojas de olivo, dos factores importantes en este tipo de ensayos: el tiempo de incubación y la proporción agua:suelo empleados. Una vez fijadas estas variables, se ha realizado un segundo experimento en las mismas condiciones que el anterior, con distintos tipos de cebo: hojas nuevas y viejas de distintas especies vegetales, así como frutos, cotiledones y radículas. En general, las hojas han resultado los cebos más efectivos, con diferencias significativas frente al resto de materiales ensayados. No obstante, los dos aislados de *P. cinnamomi* utilizados se han comportado de forma distinta frente a estos cebos de hoja. Por este motivo, en un tercer experimento, se han ensayado cebos de hoja para el aislamiento del hongo de suelos infestados separadamente con una batería de aislados de *P. cinnamomi* de distintos orígenes, para determinar así el cebo más efectivo para la mayoría de los aislados.

El método puesto a punto en condiciones de laboratorio se está ensayando, ajustando cuando es preciso las variables fijadas, en muestras de suelo natural procedentes de fincas donde previamente se ha diagnosticado podredumbre radical en *Quercus* asociada a *P. cinnamomi*.

P-124

ACUMULACIÓN DE ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO Y REFORZAMIENTO DE LA PARED CELULAR EN DOS VARIEDADES DE MELÓN EN RESPUESTA A LA INFECCIÓN POR *Sphaerotheca fusca*

Rivera, M.E., Olea, F., Romero, D., Arrebola, E., de Vicente, A. y Pérez-García, A.

Departamento de Microbiología. Fac. de Ciencias. Univ. de Málaga. 29071-Málaga.

En respuesta a la infección por patógenos las células vegetales producen distintas especies reactivas de oxígeno (EROs) tales como el ión superóxido (O_2^-), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el radical hidroxilo ($OH\bullet$). Estas EROs pueden tener un efecto antimicrobiano directo o bien participar en la inducción de distintos mecanismos de defensa, como la peroxidación de lípidos, la producción de fitoalexinas, la reacción de hipersensibilidad y otras actividades enzimáticas que conducen al reforzamiento de la pared celular, como la biosíntesis y acumulación de compuestos como calosa y lignina en la superficie de la pared de la célula vegetal, que van a actuar bloqueando los puntos de penetración del patógeno. La lignina es uno de los productos finales de la ruta de biosíntesis de los fenilpropanoides, donde fenilalanina amonio liasa (PAL) es la primera enzima de dicha ruta. El objetivo de nuestro trabajo es determinar las diferencias que existen en la acumulación de EROs y de compuestos relacionados con el reforzamiento de la pared celular, en interacciones compatibles e incompatibles entre *Sphaerotheca fusca* y melón. El estudio se ha realizado con un aislado de raza 1 del hongo y dos cultivares de melón, PMR-6, como variedad resistente, y Rochet, como variedad susceptible.

Tanto la detección de las EROs como la acumulación de lignina y calosa se ha llevado a cabo mediante técnicas histoquímicas. El H_2O_2 se puso de manifiesto por la aparición de un precipitado marrón al reaccionar con 3,3'diaminobencidina (DAB); el O_2^- por la coloración azul que adquieren las células que reducen una sal de tetrazolio (NBT). La lignina se detectó mediante una tinción con azul de toluidina y la calosa con una tinción con azul de anilina. En el caso de la interacción incompatible (PMR-6-raza 1) se observó una respuesta rápida al ataque del patógeno. El H_2O_2 y O_2^- se detectaron en las primeras horas después de la inoculación, y lignina y calosa presentaron un máximo de acumulación a las 24 h. Por el contrario en la variedad susceptible (Rochet) la respuesta fue más lenta, también se detectaron EROs pero más tardíamente y a niveles inferiores. En cuanto al reforzamiento de la pared solo algunas células vegetales mostraron acumulación de calosa y lignina 7 días después de la inoculación. Además se está realizando un estudio sobre la inducción de los mRNAs específicos de PAL en ambas variedades. Para ello se está empleando como sonda un clon parcial de PAL de melón que se ha obtenido mediante RT-PCR a partir de RNA de hojas infectadas de la variedad resistente.

P-125

CARACTERIZACION DE UNA PROTEINA CELULAR QUE INTERACCIONA CON LA REPLICASA DEL VIRUS DEL RIZADO AMARILLO DEL TOMATE (TYLCV)

Donoso, I., Flores, A. y Bejarano, E.R.

Departamento de Genética. Facultad de Ciencias. Universidad de Málaga.

Los geminivirus son virus de planta con un genoma de DNA circular de cadena sencilla, que contiene entre 6-8 genes. El gen Rep es el único gen viral esencial para su replicación. Este gen codifica una proteína multifuncional que se une específicamente al origen de replicación viral.

La presencia de esta proteína en células vegetales induce la aparición de proteínas específicas de fase S. Esta inducción se asemeja a la que ocurre en algunos virus animales (adenovirus, poliomavirus, etc.). Como en estos virus, la desregulación del ciclo celular podría implicar interacciones de la proteína Rep con proteínas celulares implicadas en control del ciclo.

Utilizando la técnica de Two Hybrid System, hemos aislado una proteína de *S. pombe* que interacciona con pRep.

Se ha llevado a cabo el estudio funcional del gen en *S. pombe*, donde se ha visto que la disrupción del gen es letal. La construcción de un mutante condicional para este gen ha permitido hacer un análisis funcional de la proteína. La búsqueda de homólogos de este gen tanto informática como físicamente ha permitido concluir que el gen que codifica para esta proteína está conservada en todos los eucariontes. Se presentarán los datos obtenidos del análisis funcional de este gen en levaduras, incluidos experimentos de complementación con el homólogo de *A. thaliana*.

P-126

UN GEN tRNA-Lys ACTUA COMO UN CASSETTE PARA EL INTERCAMBIO DE GENES QUE DETERMINAN EL ESPECTRO DE HUÉSPED EN *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*

Jackson, R. W.¹, Sesma, A.², Arnold, D. L.¹, Murillo, J.², Mansfield, J. W.³, Taylor, J. D.⁴ y Vivian, A.¹

¹Dept. Biological & Biomedical Sciences, University of the West of England, Bristol BS16 1QY, G.B. ²Laboratorio de Patología Vegetal, Depto. Producción Agraria, Universidad Pública de Navarra, 31006 Pamplona. ³Dept. Biological Sciences, Wye College, Wye, Kent TN25 5AH, G.B. ⁴Horticulture Research International, Wellesbourne, Warwick CV35 9EF, G.B.

A partir un sector observado en un cultivo de *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* (*Pph*) 1302A (raza 4), se ha aislado y purificado una variante que se ha denominado RJ3. La cepa RJ3 no muestra diferencias a nivel de crecimiento *in planta* con respecto a la cepa silvestre en cvs. susceptibles de judía. Sin embargo, sobre la base de las reacciones producidas en cultivares de soja y judía, la cepa RJ3 muestra un espectro de huésped típico de la raza 2 de *Pph*. Mediante diversos experimentos, hemos determinado que este fenotipo es debido a la ausencia en el cromosoma de RJ3 del gen de avirulencia *avrPphB*, que sí está presente en la cepa parental 1302A. De hecho, La introducción de un clon que contiene *avrPphB* en RJ3 restaura el fenotipo silvestre, de manera que RJ3 se comporta como una cepa de la raza 4. Los análisis mediante PCR e hibridación con DNA colindante a *avrPphB*, indican que la cepa silvestre 1302A contiene una región de al menos 40 kb (región *avr*) que está ausente en RJ3. Utilizando los extremos flanqueantes de esta región como sonda, se ha determinado la colinearidad de los genomas a ambos lados de la delección, y que el extremo 5' de la delección se encuentra a aprox. 19 kb de *avrPphB* mientras que el extremo 3' está al menos a 20 kb de este gen. La secuenciación ha revelado la presencia de parte del gen de una integrasa en ambas cepas seguido por un gen tRNA de prolina (tRNA^{PRO}). En los extremos de la región *avr* en 1302 se encuentran un pseudogen del tRNA de lisina (tRNA^{LYS}) y un gen tRNA de lisina diferente (tRNA^{LYS-RJ3}). El cambio de colinearidad de los genomas en 1302A tiene lugar en el interior del gen tRNA^{LYS}, que está localizado por encima del gen tRNA^{PRO}. En esta misma posición en RJ3 hay una copia del tRNA^{LYS-RJ3}. Todos los genes tRNAs están en idéntica orientación en el cromosoma en ambas cepas. Sobre la base de estos datos, postulamos que un fragmento de DNA de alto peso molecular que contiene *avrPphB* se insertó en el gen tRNA^{LYS-RJ3}, conduciendo a la generación de una variante con espectro de huésped tipo raza 2 a partir de la cepa de la raza 4 1302A. Adicionalmente, esta región de DNA puede excindirse mediante recombinación homóloga entre los genes tRNA^{LYS} and tRNA^{LYS-RJ3}, que actúan como repeticiones directas, conduciendo a un nuevo cambio de raza y a la extensión del espectro de huésped.

P-127

DISTRIBUCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE GENES HOMÓLOGOS AL GEN DE PATOGENICIDAD *virPphA* EN PATOVARES DE *Pseudomonas syringae*

Ortiz-Barredo, A.¹, Sesma, A.¹, Jackson, R.W.², Tsiamis, G.³, Butcher, D.², Wharton, B.², Vivian, A.², Mansfield, J.W.³, Arnold, D.L.² y Murillo, J.¹

¹Laboratorio de Patología Vegetal, ETS Ingenieros Agrónomos, Universidad Pública de Navarra, 31006 Pamplona. ²Dept. Biological Sciences, University of the West of England, Bristol, Reino Unido. ³Dept. of Biological Sciences, Wye College, Ashford, Kent TN25 5AH, UK.

Pseudomonas syringae pv. *phaseolicola* (*Pph*) es el agente causal de la “grasa de la judía”, aunque también puede infectar a otras especies de *Phaseolus* y a soja (*Glycine max* L.), entre otros. En la cepa 1449B de *Pph*, los principales determinantes que le permiten producir enfermedad en judía y en soja se localizan en el plásmido nativo pAV511 en una región de aprox. 30 kb que tiene las características de una isla de patogenicidad (PAI; ver resumen de Sesma *et al.*). Un gen localizado en dicha región, *virPphA*, es esencial para la patogenicidad de 1449B en judía y para la producción de la HR en diversos cvs. de soja. Mediante experimentos de hibridación de DNA, utilizando una sonda específica de *virPphA* contra 27 cepas de diversos patovares de *P. syringae*, se ha detectado la presencia de DNA homólogo a *virPphA* en aislados de los patovares *glycinea* (*Pgy*), *pisi* (*Ppi*), *savastanoi* (*Psv*), *tabaci* (*Pta*) y en todos los aislados de *Pph* examinados. En aislados de *Ppi*, *Pph* y *Pgy*, la homología se localizó en plásmidos nativos; las cepas de *Psv* mostraron homología en DNA plasmídico o cromosómico, mientras que las cepas de *Pta* mostraron homología exclusivamente en el cromosoma. El estudio de la conservación de otros genes asociados a *virPphA* indica asimismo que la estructura de la PAI no está conservada en los patovares que contienen homólogos de este gen. En conjunto, estos datos sugieren que los homólogos de *virPphA* han estado sometidos a frecuentes reorganizaciones. A partir de genotecas genómicas de dos cepas de *Pgy* y *Ppi*, se han aislado diversos cósmidos que contienen secuencias homólogas a *virPphA*. Ninguno de estos clones restauró la patogenicidad en judía de la cepa RW60, una variante de 1449B curada de pAV511 y no patogénica en judía. Sin embargo, el gen aislado de la cepa 49a/90 de *Pgy*, denominado *virPgyA*, indujo una rápida respuesta hipersensible en los cvs. de judía Tendergreen y Red Mexican, aunque los experimentos preliminares sugieren que no es esencial para producir enfermedad en soja. La secuencia deducida de *virPgyA* presenta un 96 % de identidad con *virPphA*, y contiene una delección de 15 aa. Estos resultados parecen indicar que la distribución de *virPphA* está relativamente restringida y que los distintos alelos del gen pueden no ser funcionalmente intercambiables.

P-128

¿CUÁL ES EL PAPEL DE LOS PLÁSMIDOS NATIVOS DE *Pseudomonas syringae* EN LA DISEMINACIÓN DE DETERMINANTES DE ESPECTRO DE HUÉSPED?

Sesma, Ane¹; Robert Jackson²; George Sundin³, Alan Vivian², y Jesús Murillo¹

¹Laboratorio de Patología Vegetal, Depto. Producción Agraria, Universidad Pública de Navarra, 31006 Pamplona. ²Dept. Biological Sciences, University of the West of England, Bristol, GB. ³Dept. Microbiology & Plant Pathology, Texas A&M University, EEUU.

Nuestros grupos están interesados en el estudio de los determinantes que en general definen el espectro de huésped en *Pseudomonas syringae*, y en los mecanismos moleculares que intervienen en la distribución horizontal de estos genes. La mayoría de las cepas de *P. syringae* contiene uno o más plásmidos nativos, que en muchos casos portan genes importantes o esenciales para la interacción con la planta. El ejemplo más relevante es el de pAV511, que porta los determinantes de especificidad de huésped en *P. syringae* pv. *phaseolicola* (ver resúmenes de Sesma et al. y Ortiz-Barredo et al.). Muchos de estos plásmidos comparten grandes zonas de homología, incluidas las secuencias implicadas en la replicación del plásmido (plásmidos pPT23A-like). Como parte de un estudio más amplio, y debido a su posible implicación en virulencia, hemos abordado el estudio de las relaciones filogenéticas entre plásmidos pPT23A-like de *P. syringae*. Con este fin, hemos obtenido y analizado las secuencias 5' y 3' del gen *repA* (replicasa esencial para la replicación) de 17 plásmidos pPT23A-like aislados de cepas pertenecientes a 6 patovares de *P. syringae*. En el dendrograma resultante, pueden distinguirse 4 grupos filogenéticos bien diferenciados, con identidades $\geq 88.8\%$ entre sus miembros. El primer grupo contiene los plásmidos de tres cepas de *P. syringae* pv. *tomato*, una cepa de *P. syringae* pv. *apii* y 5 de las 7 cepas de *P. syringae* pv. *syringae*, con porcentajes de homología entre el 88.8 y 100 %. Este agrupamiento de las cepas de pv. *syringae* no se correlaciona con su especialización de huésped. El segundo grupo contiene los plásmidos de dos cepas pertenecientes a las pvs. *tomato* y *glycinea* (95.5 % de identidad), y también incluye a pAV511, que contiene la PAI de *P. syringae* pv. *phaseolicola*. Los plásmidos de las dos cepas restantes de pv. *syringae* son los más distantes filogenéticamente del resto. Los experimentos de hibridación con sondas específicas de genes o elementos transponibles descritos en plásmidos pPT23A-like de *P. syringae*, han mostrado que el contenido génico de estos plásmidos no está conservado. Adicionalmente, la filogenia de los distintos plásmidos nativos examinados no siempre se correlacionó con la filogenia de las cepas que los contienen. Estos resultados, en su conjunto, sugieren que: i) los diversos plásmidos pPT23A-like han sufrido importantes reorganizaciones plasmídicas, ii) posiblemente estos plásmidos surgieron en una etapa anterior al momento de la evolución en que se diversificaron las cepas en patovares; y iii) que la transferencia horizontal de estos plásmidos entre patovares, y la consiguiente disseminación de genes de virulencia, es limitada.

P-129

CORRELACIÓN ENTRE LA REPLICACIÓN DE LOS TOBAMOVIRUS PMMoV Y TMV Y SU PATOGÉNESIS

Castillo, S., Garcia Luque, I. y Serra, M.T.

Departamento de Biología de Plantas. Centro de Investigaciones Biológicas. Consejo Superior de Investigaciones Científicas. C/ Velázquez, 144. 28006 Madrid.

Las denominadas cepas de pimiento de los tobamovirus, virus del moteado suave de la paprika y del pimiento (PaMMV y PMMoV), son unos de los principales agentes etiológicos de enfermedades víricas de cultivos de pimiento, y reúnen características patogénicas propias que las distinguen claramente de otros tobamovirus (por ej. TMV).

Así, en distintas especies del género *Nicotiana*, la infección por PMMoV o PaMMV produce síntomas más atenuados y con menores niveles de acumulación viral que los inducidos por TMV o ToMV.

Para establecer las bases moleculares de estas diferencias de patogenicidad, hemos analizado la replicación de los RNAs así como la acumulación de las proteínas virales en protoplastos de *N. tabacum* var. Xanthi nc y *N. clevelandii* transfectados con PMMoV-S y TMV. En este sistema se observa un retraso en la acumulación de los RNAs y de las proteínas de cubierta y de movimiento virales. Por tanto, las diferencias de patogenicidad en estos huéspedes reflejan la menor eficiencia replicativa de PMMoV respecto a TMV.

P-130

IDENTIFICACIÓN DE UNA PROTEÍNA RELACIONADA CON LA PATOGÉNESIS DEL GRUPO 4 EN *Capsicum chinense*.

Guevara, M.A., Elvira, M.I., Garcia-Luque, I. y Serra, M.T.

Departamento de Biología de Plantas. Centro de Investigaciones Biológicas. Consejo Superior de Investigaciones Científicas. C/ Velázquez, 144. 28006 Madrid.

El gen L³ confiere resistencia en plantas de *Capsicum* a todos los tobamovirus que infectan pimiento, excepto a la cepa italiana del virus del moteado suave del pimiento (PMMoV-I) que es capaz de sobrepasar la resistencia en este huésped produciendo una infección sistémica. La resistencia se manifiesta con la formación de lesiones locales necróticas y restricción del patógeno a la zona de infección.

En la caracterización de este mecanismo de resistencia vegetal frente a patógenos se han utilizado plantas de *Capsicum chinense* y dos cepas de PMMoV, la cepa S (que desencadena la reacción hipersensible) y la cepa I (cepa virulenta).

Se ha purificado una proteína de peso molecular 13,3 kDa y pI 7,5 que se induce en plantas inoculadas con la cepa española (PMMoV-S). La hidrólisis con tripsina de la proteína purificada libera un fragmento cuya secuencia aminoacídica presenta homología con proteínas relacionadas con la patogénesis (PRs) del grupo 4. A partir de esta secuencia se ha clonado la secuencia nucleotídica completa del mRNA. La secuencia codifica para una proteína de 143 aminoácidos, con un peso molecular calculado de 15,8 kDa y un péptido señal de 23 aminoácidos, datos que concuerdan con el peso molecular de la proteína purificada.

La expresión del gen que codifica para la PR-4 está regulada a nivel transcripcional en la reacción de defensa puesto que sólo se detecta su mRNA en plantas inoculadas con PMMoV-S a partir del segundo día post-inoculación.

Este gen constituye por lo tanto un marcador específico de la respuesta hipersensible conferida por el gen L³ de *Capsicum chinense*.

P-131

EVIDENCIAS DE RECOMBINACIÓN HOMÓLOGA ENTRE DOS VARIANTES DE SECUENCIA PRESENTES EN UN AISLADO DEL VIRUS DE LA TRISTEZA DE LOS CÍTRICOS

Vives, M.C.¹, López, C.², Flores, R.², Moreno, P.¹ y Guerri, J.¹

¹Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias, Apdo. oficial, Moncada, Valencia.

²Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas (UPV-CSIC), Universidad Politécnica de Valencia, Av. de los Naranjos s/n, 46022 Valencia.

La importancia de la recombinación en la evolución de virus con genoma de RNA ha sido ampliamente documentada. En el virus de la tristeza de los cítricos (CTV) es frecuente la formación de RNAs defectivos mediante procesos de recombinación no homóloga. La primera evidencia de recombinación homóloga en CTV se encontró al alinear la secuencia completa del RNA genómico de los aislados T385 de España (EMBL Y18420), un aislado prácticamente asintomático, y SY568 de California (GenBank AF001623), un aislado virulento (Vives et al. 1999. J. Gen. Virol. 80, 811-814). Estas secuencias mostraban un 90% de identidad nucleotídica en las regiones 3' y 5' terminales, mientras que en una región central de aproximadamente 6000 nt era superior al 99%.

Para comprobar si las dos secuencias que dieron origen a la recombinación se hallaban en el aislado SY568, se diseñaron cebadores derivados de secuencias conservadas en los aislados caracterizados de CTV, y mediante RT-PCR, se obtuvieron clones que cubrían toda la región central. El alineamiento de las secuencias de estos clones puso de manifiesto la presencia de tres tipos: 1) El más abundante presentaba 85% de identidad con la secuencia conocida (AF001623). 2) El segundo tipo más abundante tenía una identidad con AF001623 o Y18420 superior al 99%. 3) Finalmente, algunos clones tenían parte de su secuencia idéntica a las del tipo 1) y el resto idéntica a las del tipo 2). Estos resultados indican que SY568 contiene dos variantes de secuencia y recombinaciones homólogas entre ellas.

El alineamiento de las secuencias del tipo 3) con las dos variantes de tipo 1) y 2) presentes en SY568, mostró que en todos los casos el punto de unión estaba situado en una región de entre 8 y 89 nt con secuencia idéntica en las dos variantes parentales. Esta región tiene un alto contenido en AT y está precedida de una región rica o moderadamente rica en GC y seguida de otra región rica en AT. En el virus del mosaico del bromo se ha observado mediante mutagénesis dirigida que este tipo de entorno favorece la recombinación homóloga.

ALTERACIONES CELULARES PRODUCIDAS POR LOS CRINIVIRUS

Medina, V.¹, Rodrigo, G.¹, Achon, M.A.¹, Tian, T.² y Falk, B.W.²

¹ Dept. Producció Vegetal i Ciència Forestal. Universitat de Lleida (UdL). Avda. A. Rovira Roure 177, 25198 Lleida.

² Plant Pathology Dept. of University of California in Davis (UCDavis). Davis, 95616 CA.

Mediante microscopía óptica y electrónica de transmisión, se ha estudiado en distintos huéspedes los cambios ultraestructurales producidos por los Crinivirus: "Lettuce infectious yellows crinivirus" (LIYV), "Cucurbit yellow stunting disorder crinivirus" (CYSDV), "Beet pseudo-yellows crinivirus" (BPYV), "Tomato infectious chlorosis crinivirus" (TICV) y "Tomato chlorosis crinivirus" (ToCV).

Los cambios ultraestructurales se han localizado principalmente en las células que componen el tejido del floema. La infección de crinivirus induce la alteración de la estructura de los cloroplastos de las células del floema y la formación de agregados de vesículas tipo-BYV ("Beet yellows closterovirus") en el citoplasma, con grandes masas de partículas virales.

Los depósitos cónicos de material electrodens, típicos de la infección inducida por LIYV, únicamente se han encontrado en las muestras infectadas con este virus, aunque en el resto de crinivirus se han observado estructuras similares pero de morfología diferente. En el caso de BPYV, algunos de estos depósitos se han localizado en el lado interno del tonoplasto, como ocurre en los protoplastos infectados con BYV.

Los viriones se han observado en células cribosas y acompañantes o de transferencia, apareciendo tanto dispersos como en grandes masas dispuestas en paralelo que dan lugar haces o inclusiones "cross-banded", que como en el caso de CYSDV, en que aparecen rodeadas por estructuras similares a las del retículo endoplasmático.

En las muestras de melón y de tomate, se han detectado un gran número de inclusiones cristalinas, localizadas generalmente en las células del parénquima del floema y de la vaina del haz, aunque no se ha podido establecer su relación con la infección viral. En el caso de las muestras de tomate infectadas con ToCV, se han observado vesiculación y cuerpos osmiófilos en el interior de los cloroplastos.

P-133

PRESENCIA DEL BIOTIPO CITRUS DE *Tylenchulus semipenetrans* “EL NEMATODO DE LOS CÍTRICOS” EN PIURA-PERÚ. ESTUDIOS DE LA RESPUESTA DE DIEZ PATRONES ANTE LA INFECCIÓN DEL BIOTIPO.

Murguía, C. A.¹, Abad, P.¹, Jordá, C.¹ y Bello, A.²

¹Unidad docente de Patología, Dpto. de Producción Vegetal. Universidad Politécnica de Valencia. Camino de Vera 14, 46020, Valencia.

²C.S.I.C. Centro de Ciencias Medioambientales, Dpto. de Agroecología. C/ Serrano 115 Apdo. 28006-Madrid.

Las zonas productoras de cítricos en el norte del Perú, esta basada en el uso generalizado de la variedad *C. aurantifolia* sobre el patrón *C. jambhiri*, combinación sobre la cual *T. semipenetrans* es el nematodo más común e importante, dado que ocasiona severos daños económicos a la producción. Estudios para la caracterización biológica y patogénica del nematodo no se habían realizado, por lo que, el presente trabajo tuvo como meta aportar nuevos conocimientos sobre estos aspectos. Muestras de raíces infectadas con *T. semipenetrans* procedentes de la zona citrícola San Lorenzo-Piura, se utilizaron para infestar contenedores con plantas de *C. jambhiri*, altamente susceptible al nematodo. Un año después de la infestación del substrato se logró con éxito la multiplicación de la población y el inóculo suficiente para realizar los ensayos correspondientes. Nos planteamos dos objetivos, primero, identificar que biotipo de *T. semipenetrans* existe en el norte del Perú. Y segundo, evaluar la respuesta de susceptibilidad o resistencia de distinto material genético (patrones proporcionados por el Dr. Forner del Dpto. de Citricultura del IVIA-España) frente a la población Perú. Se realizó un test de patogenicidad sobre los siguientes hospedantes diferenciales: dos selecciones de *P. trifoliata* Bennecke y Rubidoux, Olivo (*O. europaea* var. Manzanilla), vid “141-R” (*V. berlandieri* x *V. rupestris*), *Citrus jambhiri* y *C. volkameriana*. Plantas de 8 meses de edad repetidas cinco veces/hospedante fueron inoculadas con una suspensión 10.000 huevos + juveniles por planta. Siete meses después se evaluó la infectividad y el potencial reproductivo del nematodo. Los resultados, demostraron que la población Perú de *T. semipenetrans* pertenece al biotipo “Citrus”, ya que éste tuvo una significativa reproducción e infectividad sobre el Olivo, asimismo la respuesta de las dos especies del género *Citrus* fue de una alta susceptibilidad. Sobre *P. trifoliata* se encontró una muy baja reproducción sobre la selección Rubidoux, no detectándose infección sobre Bennecke.

La evaluación de resultados sobre la respuesta del distinto material genético a la infección del biotipo “Citrus” (población Perú) demostraron que los patrones híbridos: 03018, 030140, 030142 (M. Cleopatra x *P. trifoliata*), 020317y 020418 (citrange Troyer x M. Cleopatra), citrange Carrizo y Swingle citrumelo 4475 (*C. paradisi* x *P. trifoliata*) expresaron una alta resistencia al nematodo. En todos ellos los niveles de reproducción e infectividad fueron significativos en comparación con los niveles superiores de infección determinados sobre *C. jambhiri*, *C. volkameriana* y mandarina Cleopatra. Este nuevo conocimiento de la existencia del biotipo “Citrus”, así como, la información aportada por el test de respuesta de los distintos patrones evaluados bajo condiciones de invernadero, deben ser factores relevantes a tener en cuenta en futuros programas de adaptación y compatibilidad de este y otro material genético bajo las condiciones edáficas, agronómicas y ambientales de la citricultura peruana, con la finalidad de dinamizar este sector.

P-134

INDUCCIÓN DE TOLERANCIA A *Meloidogyne javanica* EN EL HÍBRIDO DE ALMENDRO X MELOCOTONERO MAYOR (*Prunus dulcis* x *Prunus persica*) POR EL HONGO MICORRÍFICO *Glomus intraradices*.

Hernández-Dorrego, A.², Calvet, C.¹, Pinochet, J.³, Estaún, V.¹ y Camprubí, A.¹

¹ Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentàries (IRTA), Dept. de Protecció Vegetal, Ctra. de Cabrils s/n, 08348 Cabrils, Barcelona.

² Sustancias y Tecnologías Naturales, S.L. (SYTEN). Calle Provença 288 Pral., 08008 Barcelona.

³ Agromillora Catalana, S.A., El Rebato s/n, 08739 T.M. Subirats, Barcelona.

El híbrido interespecífico Mayor (*Prunus dulcis* Mill. x *Prunus persica* (L.) Batsch.) se comenzó a difundir hace muy pocos años y su producción comercial se encuentra actualmente en aumento en España. La mayoría de sus características agronómicas son favorables. No obstante, es un patrón altamente susceptible al ataque de nematodos agalladores. Estudios previos de investigación han demostrado la elevada aptitud para la micorrización de este portainjerto; sin embargo, los criterios clásicos actuales en la obtención de material vegetal no consideran los beneficios aportados por la inoculación artificial temprana de los portainjertos con hongos formadores de micorrizas arbusculares (HMA), a pesar de tratarse de una alternativa biotecnológica factible para aumentar la tolerancia a patógenos del suelo. Se realizó un ensayo en condiciones de invernadero con la finalidad de estudiar a corto plazo la respuesta del portainjerto micorrizado artificialmente a una población del nematodo agallador (*Meloidogyne javanica* (Treub.) Chitwood). Las plantas se inocularon con un aislado del HMA *Glomus intraradices* Schenk y Smith en el momento del trasplante a contenedores, y cinco meses después (período que simulaba la fase de vivero) se inocularon con el nematodo. Tras nueve meses de crecimiento, la colonización micorrícica de las raíces superó el 75% y se produjo a su vez una estimulación significativa del desarrollo de los portainjertos micorrizados con respecto a los no inoculados. Los resultados del estudio indicaron que ambos microorganismos (el simbionte beneficioso y el patógeno) son capaces de colonizar simultáneamente los mismos espacios en el sistema radical de la planta. Sin embargo, el índice de agallamiento producido por el nematodo, así como la población final del mismo en suelo y raíces, fueron significativamente superiores en las plantas no micorrizadas.

P-135

EFEECTO DE *Glomus manihotis* SOBRE LA REPRODUCCIÓN DE *Meloidogyne javanica* EN PLATANERA

Rodríguez Romero, A.S., Jaizme-Vega, M.C. y Tenoury Domínguez, P.

Dpto. Protección Vegetal del Instituto Canario de Investigaciones Agrarias, Apdo. 60, 38200 La Laguna-Tenerife, Islas Canarias.

La importancia del nematodo agallador *Meloidogyne javanica* como patógeno de la platanera, ha sido puesta de manifiesto en numerosas publicaciones. Este hecho resulta especialmente significativo en aquellos cultivos intensivos bajo invernadero, en donde la acción del nematodo puede llegar a limitar la producción. Por otra parte, la micorrización temprana incrementa la tolerancia de la planta frente al patógeno, como consecuencia de una mejora en la nutrición y de un cierto efecto supresor en la reproducción del nematodo.

Con el propósito de estudiar los efectos de la interacción entre *Glomus manihotis* y *M. javanica*, planteamos un experimento bajo condiciones de invernadero con platanera micropropagada 'Gran Enana' (*Musa acuminata* AAA). Se observó la evolución de la población de *M. javanica* durante un periodo de 6 meses y medio, realizando análisis secuenciados cada 40 días a partir de los 4 meses de la inoculación.

La presencia del patógeno no afectó a la colonización micorrícica. Sin embargo, los parámetros referidos al nematodo (número de individuos por gramo de raíz, población final en raíz, porcentaje de raíz agallada, así como tasa de reproducción), sí se vieron afectados por la presencia del hongo formador de micorriza. Esto fue especialmente notable al principio del ensayo cuando los niveles de colonización del hongo fueron altos. A medida que se desarrolló el experimento y dicha colonización descendió, los parámetros relacionados con *M. javanica* se vieron favorecidos. Otras variables medidas (aspectos físicos de la planta como peso fresco total y superficie foliar), mostraron una evolución en consonancia.

P-136

RESULTADO DE LA INTERACCIÓN DE HONGOS FORMADORES DE MICORRIZAS Y RIZOBACTERIAS SOBRE LA REPRODUCCIÓN DE *Meloidogyne incognita* EN PAPAYA

Jaizme-Vega, M.C., Barroso Nuñez, L., Rodríguez Romero, A.S. y Tenoury Domínguez, P.

Dpto. Protección Vegetal del Instituto Canario de Investigaciones Agrarias, Apdo. 60, 38200 La Laguna-Tenerife, Islas Canarias.

Los hongos formadores de micorrizas arbusculares (MA) y las bacterias promotoras del crecimiento (PGPR) son componentes habituales de la rizosfera y sus efectos pueden influir tanto sobre el crecimiento y la nutrición vegetal, como en la defensa y protección de la planta frente al ataque de patógenos.

Con el propósito de evaluar el resultado de la interacción de estos dos tipos de microorganismos sobre el desarrollo de papayas infectadas con nematodos agalladores, hemos diseñado un experimento en el cual plántulas previamente micorrizadas durante la fase de semillero con *Glomus mosseae* y *Glomus manihotis* eran inoculadas con un cóctel de cepas de *Bacillus subtilis* (IRTA, Cabrils). Posteriormente, y tras ser transplantadas a macetas, las papayas fueron infectadas con una población local de *Meloidogyne incognita*.

Cinco meses más tarde, se evaluaron los efectos de la interacción de los tres microorganismos sobre el desarrollo y nutrición de las plantas, así como la evolución de la población de nematodos. En general, la presencia de las micorrizas incrementó significativamente el desarrollo de las papayas y su tolerancia frente a *Meloidogyne*. Este efecto positivo se veía potenciado en aquellas plantas inoculadas además con bacterias promotoras del crecimiento. Las poblaciones de *Meloidogyne* y el número de agallas en raíz disminuían drásticamente ante los hongos MA, tanto solos como combinados con *Bacillus subtilis*, lográndose en estos casos tasas de multiplicación de nematodos con valores despreciables.

P-137

APLICACIÓN DE FORMULADOS DE *Penicillium oxalicum* PARA EL CONTROL DE LA FUSARIOSIS VASCULAR DEL TOMATE

De Cal, A., Larena, I. y Melgarejo, P.

Departamento de Protección Vegetal. SGIT-INIA. Carretera de La Coruña km7. 28040. Madrid.

La inducción de mecanismos de defensa en las plantas es una aplicación de gran interés en el control de enfermedades. La aplicación de conidias de *Penicillium oxalicum* a las raíces de plantas de tomate induce resistencia frente a la marchitez vascular causada por *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* reduciendo en un 80% la gravedad de la enfermedad. Hemos desarrollado un proceso de producción de conidias de *P. oxalicum* mediante fermentación sólida obteniendo 10^8 ó 10^9 conidias/g de sustrato a los 5 días de incubación.

Se ha comprobado la eficacia de las conidias producidas en fermentación sólida frente a la marchitez vascular del tomate en ensayos de campo, invernadero y cámara de cultivo. Los ensayos de campo se realizaron en parcelas comerciales de la Comunidad de Madrid donde, en años anteriores, se habían detectado plantas con síntomas de marchitez. El ensayo de invernadero se llevó a cabo sobre turba infectada con clamidosporas de *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici*. Los ensayos de eficacia en cámaras de cultivo se realizaron sobre plantas que posteriormente crecían en solución nutritiva infectada con microconidias del patógeno.

Se utilizaron tres sistemas de aplicación de las conidias de *P. oxalicum* a semillero de plantas de tomate antes del trasplante. En todos los casos la concentración final de conidias de *P. oxalicum* era de 6×10^6 conidias/g de sustrato de semillero. Los sistemas de aplicación utilizados fueron: 1) utilización del sustrato final de la fermentación sólida directamente como semillero, 2) espolvoreo de dicho sustrato sobre el semillero 7 días antes del trasplante y 3) riego en el semillero 7 días antes del trasplante con una suspensión de conidias de *P. oxalicum* procedentes del sustrato final.

Los resultados muestran que las plantas inducidas con *P. oxalicum* presentan en todos los casos menor desarrollo de marchitez que las plantas no tratadas con el agente de biocontrol, y nos permiten discutir los sistemas de aplicación utilizados

P-138

MÉTODOS DE ALMACENAJE DE FORMULADOS DE *Penicillium oxalicum*

Larena, I., De Cal, A. y Melgarejo, P.

Departamento de Protección Vegetal. SGIT-INIA. Carretera de La Coruña km7. 28040. Madrid.

Penicillium oxalicum induce resistencia en plantas de tomate frente a *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*. La aplicación a semilleros de plantas de tomate de este agente de biocontrol obtenido mediante fermentación sólida reduce el desarrollo de la enfermedad causada por el patógeno. La fermentación sólida se realiza en bolsas de plástico microporosas para la industria. La formulación de los agentes de biocontrol ha de garantizar las condiciones necesarias para mantener la viabilidad durante toda la vida útil del producto, favoreciendo su supervivencia durante el almacenaje del mismo.

Se ha estudiado la supervivencia de las conidias de *P. oxalicum* producidas mediante fermentación sólida en diferentes condiciones de almacenamiento. Para ello se mantuvieron durante 6 meses las bolsas de fermentación con *P. oxalicum* a diferentes temperaturas: ambiente, 20-25°C, 4°C, -20°C y -80°C. Las bolsas contenían turba, vermiculita y polvo tamizado de cebada o lenteja. Estas bolsas habían sido inoculadas con *P. oxalicum* e incubadas durante 5 días en la oscuridad a 20-25°C antes de ser almacenadas. Se estimó mensualmente la cantidad de conidias y la viabilidad de las mismas. La concentración de las conidias se mantiene durante los 6 meses a un nivel de 10^8 conidias/g peso seco a todas las temperaturas ensayadas. Sin embargo, la viabilidad de estas conidias depende mucho de la temperatura de almacenamiento y del tipo de nutrientes que se añade a las bolsas. La viabilidad de las conidias producidas con polvo de lenteja se mantiene durante más tiempo que las obtenidas con polvo de cebada. Las conidias procedentes de las bolsas que habían permanecido a -80°C pierden rápidamente su viabilidad, seguidas a las cuatro semanas por las conidias que habían permanecido a temperatura ambiente y en la estufa a 20-25°C. Las bolsas almacenadas en la nevera mantienen su viabilidad hasta las 8 semanas. Las conidias que permanecieron en el congelador a -20°C mantuvieron una viabilidad superior al 70% hasta el final del ensayo.

Al finalizar el ensayo, se estudió la eficacia de las conidias almacenadas frente a la marchitez vascular del tomate en plantas de tomate situadas en cámara de cultivo.

P139

EFFECTO DE NEMATICIDAS QUÍMICOS Y BIOLÓGICOS SOBRE FITONEMATODOS EN TOMATE VAR. ATLÉTICO CULTIVADO BAJO INVERNADERO EN ALMERÍA

Julca, A.¹, Gallego, E.¹, Moreno, J.² y Cordovilla, M.P.³

¹Dpto. Biología Vegetal y Ecología. Escuela Politécnica Superior. Universidad de Almería. 04120 La Cañada de S. Urbano. Almería.

²Dpto. Biología Aplicada, Universidad de Almería.

³Dpto. Biología Animal, Vegetal y Ecología. Universidad de Jaén.

En la localidad de Níjar (Almería), se estudió el efecto de nematicidas químicos y biológicos sobre las poblaciones nematológicas en un campo comercial de tomate var. Atlético. Se usó un Diseño de Bloques Completos al Azar, con cuatro repeticiones y 11 tratamientos (**T1**= Testigo , **T2**= 2,5 l/ha Biomor®, **T3** = 5,0 l/ha Biomor®, **T4**= 5+5 l/ha Biomor®, **T5**= 10 l/ha Biomor®, **T6**= 2,5 l/ha Biomor® + 2l/ha Fenzimin®, **T7** = 5,0 l/ha Biomor® + 2l/ha Fenzimin®, **T8**= 5+5 l/ha Biomor® + 2l/ha Fenzimin®, **T9**= 10 l/ha Biomor® + 2l/ha Fenzimin®, **T10**= 20 l/ha Nemacur® 40 LE, **T11**= 40 l/ha Rugby® 10ME).

Los fitonematodos encontrados fueron *Pratylenchus* y *Meloidogyne*, el primero tanto en suelo como raíces, el segundo exclusivamente en suelo. Las mayores poblaciones correspondieron a *Pratylenchus*.

El Biomor® disminuyó significativamente la población de los nematodos parásitos y tuvo un efecto estadísticamente similar al Nemacur®. El Rugby® fue el que mejor controló los nematodos parásitos y estadísticamente fue similar al Nemacur®.

Sin embargo, el peso del fruto fue mayor con un tratamiento de Biomor® (**T8**), aunque estadísticamente similar a otros tratamientos estudiados. El brix fue mayor en el testigo, pero también similar a otros tratamientos.

P140

VARIACION DE LA MICROBIOTA, POR EFECTO DE NEMATICIDAS, EN LA RIZÓSFERA DEL TOMATE VAR. ATLÉTICO BAJO INVERNADERO

Julca, A.¹, Gallego, E.¹, Moreno, J.² y Cordovilla, M.P.³

¹Dpto. Biología Vegetal y Ecología. Escuela Politécnica Superior. Universidad de Almería. 04120 La Cañada de S. Urbano. Almería.

²Dpto. Biología Aplicada, Universidad de Almería.

³Dpto. Biología Animal, Vegetal y Ecología. Universidad de Jaén

En la localidad de Níjar (Almería), se estudió el efecto de nematicidas químicos y biológicos sobre la microbiota asociada a la rizósfera del tomate var. Atlético, cultivado en invernadero. Se usó un Diseño de Bloques Completos al Azar, con cuatro repeticiones y 11 tratamientos (**T1**= Testigo , **T2**= 2,5 l/ha Biomor®, **T3** = 5,0 l/ha Biomor®, **T4**= 5+5 l/ha Biomor®, **T5**= 10 l/ha Biomor®, **T6**= 2,5 l/ha Biomor® + 2l/ha Fenzimin®, **T7** = 5,0 l/ha Biomor® + 2l/ha Fenzimin®, **T8**= 5+5 l/ha Biomor® + 2l/ha Fenzimin®, **T9**= 10 l/ha Biomor® + 2l/ha Fenzimin®, **T10**= 20 l/ha Nemacur® 40 LE, **T11**= 40 l/ha Rugby® 10ME).

Se evaluaron las poblaciones (ufc/g suelo) de actinomicetos, bacterias y hongos. Con respecto al testigo, Biomor® disminuyó significativamente la población de actinomicetos ; mantuvo el nivel poblacional de bacterias y aumentó significativamente la población de hongos. Rugby® y Nemacur®, con respecto al testigo, disminuyeron significativamente los actinomicetos; pero mantuvieron el nivel poblacional de bacterias y hongos.

P-141

CONTROL BIOLÓGICO DEL AHOGAMIENTO DE PLÁNTULAS (*Pythium aphanidermatum*) MEDIANTE TRISAN[®] Y LARMINAR[®].

Sánchez, J., Castillo P. y Gallego, E.

Dpto. Biología Vegetal y Ecología. Escuela Politécnica Superior. Universidad de Almería. Ctra. Sacramento, s/n. 04120 La Cañada de S. Urbano. Almería.

El control biológico de las enfermedades causadas por hongos edáficos se encuentra en fase de desarrollo. La comercialización de estos productos microbianos, sin embargo, requiere de ensayos que determinen sobre los patógenos locales su efectividad. Por su parte, el ahogamiento de plántulas causado por *Pythium aphanidermatum* es uno de los principales problemas en los semilleros de Almería.

Se ensayaron los siguientes productos de control biológico, proporcionados por la empresa AGRIMOR S.A.: TRISAN[®] (*Trichoderma harzianum*), LARMINAR[®] (*Bacillus subtilis*) para el control del ahogamiento de plántulas causado por *Pythium aphanidermatum*, en pepino (*Cucumis sativus*).

Los bioensayos se han desarrollado a 22-28°C de temperatura ambiente y un fotoperíodo de 12 h luz/12 h oscuridad, en vermiculita sobre 10 semillas/maceta de pepino (*Cucumis sativus*) cv. *Ashley*, como cultivo estándar. Las macetas se regaron al 90% de capacidad de retención y se cerraron con una lámina de plástico transparente.

La inoculación con el patógeno y la aplicación del producto de control biológico se han efectuado de forma simultánea en el momento de la siembra. La dosis del patógeno (*Pythium aphanidermatum*) se ha calculado en ensayos previos. La dosis empleada del producto biológico ha sido la dosis máxima aconsejada: TRISAN[®]: 12 kg/ha ; LARMINAR[®]: 2 kg/ha.

Se han efectuado 5 repeticiones/tratamiento en cada ocasión. Se han repetido en 3 ocasiones, siendo los resultados mostrados la media del total de repeticiones (n). Los resultados expresan la cantidad de plántulas sanas en las macetas al final del ensayo (duración del ensayo: 3 semanas, tiempo desde el momento de la siembra-inoculación-aplicación).

Se ha observado con respecto al testigo del patógeno un aumento significativo de plántulas sanas (32,0%) con la aplicación de LARMINAR[®]. Con TRISAN[®] se observó un ligero aumento (11,3%) que no resultó significativo.

P-142

ENSAYO DE EFECTIVIDAD DE *Trichoderma* PARA EL CONTROL DE *A. cucurbitacearum* Y *Monosporascus* spp., CAUSANTES DE COLAPSO EN MELÓN

Sanz, L.¹, Sales, R.², Armengol, J.², Monte, E.¹, García-Jiménez, J.² y Grondona, I.¹

¹Dpto de Microbiología y Genética. Universidad de Salamanca. Edificio Departamental. Plaza Doctores de la Reina S/N. 37007. Salamanca.

²Dpto de Producción Vegetal. ETSI Agrónomos. Universidad Politécnica de Valencia. Camino de Vera, 14. 46020. Valencia.

Las plantas de melón no tienen un sistema radical muy vigoroso. El ataque de diferentes patógenos a la raíz puede provocar una muerte más o menos rápida de la planta, generalmente en estados avanzados del cultivo, que es lo que vulgarmente se ha venido en llamar “colapso” o “muerte súbita”. *Acremonium cucurbitacearum* y *Monosporascus* spp. son los principales patógenos fúngicos asociados a esta enfermedad en nuestro país.

En un intento por controlar a estos patógenos hemos realizado ensayos de efectividad de *Trichoderma* en macetas en invernadero con semillas de melón variedad Piel de Sapo. Se han probado dos formulaciones de biocontrol distintas (I y II) frente a dos aislados virulentos de origen español: *A. cucurbitacearum* A-419 y *Monosporascus* sp. M-1. Las formulaciones introducidas fueron seleccionadas previamente tras realizar ensayos de antagonismo *in vitro*, analizar la supervivencia frente a condiciones adversas y evaluar su compatibilidad. Los resultados obtenidos han sido muy variables debido a que, fundamentalmente, la composición del suelo ha condicionado en gran medida tanto la actividad patogénica de *A. cucurbitacearum* y *Monosporascus* sp. como la capacidad de biocontrol de *Trichoderma* spp. En un suelo procedente de Salamanca, de textura arenosa y ligeramente ácido, la formulación II, compuesta por una mezcla de cuatro cepas de *Trichoderma* de diferentes especies, redujo significativamente los daños en hipocotilo, raíz principal y raíces secundarias. En dos suelos procedentes de Valencia y Almenara, de mayor alcalinidad, tal reducción no se produjo o no llegó a alcanzar valores significativos, no mostrando las formulaciones de biocontrol por sí solas ser eficaces en el control del colapso. Un factor muy importante para que el control biológico tenga éxito frente a los patógenos indicados, es la tolerancia de los agentes de biocontrol al pH alcalino de los suelos del Levante español. *Trichoderma* puede ser eficaz en este patosistema, siempre que pueda formularse adecuadamente.

P-143

CARACTERIZACIÓN DE ISOENZIMAS Y ACTIVIDADES LÍTICAS TOTALES EN AGENTES DE CONTROL BIOLÓGICO DEL GÉNERO *Trichoderma*

Montero, M.¹, Sanz, L.¹, Grondona, I.¹, González, F.², Llobell, A.³ y Monte, E¹.

¹Dpto. de Microbiología y Genética. Universidad de Salamanca. Edificio Departamental. Plaza Doctores de la Reina S/N. 37007 Salamanca.

²Newbiotechnic S.A. Isla de la Cartuja. Sevilla

³IBVF-CSIC. Universidad de Sevilla. Isla de la Cartuja. Sevilla

El género *Trichoderma* incluye un conjunto de especies con variadas características bioquímicas y moleculares. Algunas de ellas presentan un gran interés al haber sido descritas como agentes de control biológico. La sistemática de este género ha sufrido en los últimos años cambios considerables y todavía hoy se haya bajo continua revisión. Este hecho hace difícil la clasificación e identificación de los agentes de biocontrol pertenecientes a este género. Se han empleado diversos criterios morfológicos, bioquímicos y moleculares para el estudio taxonómico del género *Trichoderma*. Entre los moleculares destaca la amplificación de la región ITS1-ITS2, que ha sido una herramienta útil para el estudio de las relaciones filogenéticas existentes entre las diferentes especies de *Trichoderma*.

En este trabajo hemos abordado la caracterización bioquímica de diversos agentes de control biológico del género *Trichoderma* utilizando perfiles isoenzimáticos en inducciones con quitina. Se ha realizado el análisis de las actividades -1,3-glucanasa, -1,6-glucanasa, celulasa, quitinasa y proteasa, y el de sus correspondientes perfiles de isoenzimas, en extractos concentrados de 18 cepas de *Trichoderma*, pertenecientes a 6 especies distintas según el último criterio molecular basado en secuencias ITS1-ITS2. Hemos comprobado la falta de correlación entre los grupos definidos molecularmente y los resultados bioquímicos aquí obtenidos; sin embargo, hemos detectado todo un conjunto de enzimas líticas posiblemente implicados en la degradación de la pared celular de aquellos hongos que son atacados por estos agentes de biocontrol.

P-144

INFLUENCIA DE LOS NUTRIENTES EN LA EXPRESIÓN DE ENZIMAS LÍTICAS POR CEPAS DE *Trichoderma* UTILIZADAS COMO AGENTES DE BIOCONTROL

Castillejo, M. A.¹, Santorum, P.¹, Monte, E.¹ y García Roig, M.²

¹Dpto. de Microbiología y Genética. Universidad de Salamanca. Edificio Departamental. Plaza Doctores de la Reina S/N. 37007. Salamanca.

²Dpto. de Química-Física. Universidad de Salamanca.

Actualmente, en el control de fitopatógenos se emplea como práctica habitual la aplicación de productos químicos. Sin embargo, este abusivo control químico implica la utilización de bromuro de metilo y otros pesticidas de uso generalizado, los cuales plantean serios problemas medioambientales y de competición de los productos en los sensibilizados mercados europeos. Las formulaciones biológicas se presentan como alternativas viables al control químico de los fitopatógenos fúngicos, dado que son menos agresivas y tan eficaces como éstos a la hora de incrementar los rendimientos en cosecha.

Uno de los géneros microbianos con mayor potencial en el control biológico de hongos fitopatógenos es *Trichoderma*. Hasta la fecha se han descrito varias especies de *Trichoderma* que poseen actividad antifúngica sobre un amplio espectro de fitopatógenos. Atendiendo a la clasificación mediante secuenciación de la región ITS del gen rDNA 5,8S realizada en este laboratorio, las cepas de *Trichoderma* empleadas en este estudio corresponden a los siguientes grupos: *T. longibrachiatum*, *T. harzianum*, *T. inhamatum*, *T. atroviride* y *T. asperellum*.

La actividad antagonista de *Trichoderma* se lleva a cabo, entre otros factores, gracias a las enzimas líticas que excretan al medio. En este trabajo se monitorizó la actividad de las siguientes enzimas expresadas por *Trichoderma*: β -1,6-glucanasa, β -1,4-glucanasa, β -1,3-glucanasa, quitinasa y proteasa. Dado que estas enzimas líticas son inducibles, tiene una gran importancia el sustrato presente en el medio de inducción en el que son producidas. Con el fin de obtener una amplia batería de enzimas líticas, se han empleado diferentes sustratos como medios de inducción enzimática. Además de los sustratos comerciales, se han empleado sustratos que provienen de residuos de la industria alimentaria.

P-145

CONTROL BIOLÓGICO EN VIVEROS DE FRESA

Grondona, I.¹, Morales R.², Llobell, A.³, Fernández de Castro, G.⁴, Rodríguez, A⁵. y Monte, E¹.

¹Departamento de Microbiología y Genética, CSIC/Universidad de Salamanca

²Departamento de Construcción y Agronomía, Universidad de Salamanca

³Departamento de Bioquímica, CSIC/Universidad de Sevilla

⁴Aplicaciones Bioquímicas, San Juan de Aznalfarache, Sevilla

⁵Newbiotechnic S.A., Sevilla

Durante la campaña de 1999 se han llevado a cabo ensayos de biocontrol con cepas del género *Trichoderma* en viveros de altura dedicados a la producción comercial de plantas de fresa. Se eligieron dos localidades: Santervás de la vega (Palencia) y Navalmanzano (Segovia). Las aplicaciones de los agentes de control biológico se realizaron por pulverización y por inmersión. El cultivar de fresa utilizado fue Camarosa con un marco de siembra de 22.220 plantas/Ha, a una distancia de 1.5x0.3 m en Santervás de la Vega, y 12.120 plantas/Ha, a una distancia de 1.5x0.55 m en Navalmanzano. El diseño fue de bloques al azar con 4 repeticiones de cada tratamiento y parcelas elementales de 15 m² en Santervás de la Vega y de 22.5 m² en Navalmanzano. Los ensayos se llevaron a cabo en ausencia de patógenos, sobre campos previamente bromurados, con objeto de conocer el efecto correspondiente a la acción de *Trichoderma* como agente potenciador del crecimiento de plantas. Se utilizaron tres formulaciones de *Trichoderma*: una norteamericana, una israelí y una española.

En todos los casos los tratamientos con *Trichoderma* a doble concentración dieron plantas con mayor vigor. En términos generales, no se observaron diferencias significativas entre las tres formulaciones de *Trichoderma* utilizadas aunque si se detectaron respecto a los controles. El número de plantas hijas comerciales se incrementó con los tratamientos de *Trichoderma* por inmersión respecto a los de pulverización. También se obtuvieron diferencias significativas al 95% en los diámetros de corona pero no en el peso seco de la planta.

Estos ensayos se han continuado, con similares tratamientos, en cultivos definitivos en la provincia de Huelva (Palos de la Frontera y Cartaya). Los resultados de el ensayo completo se discuten en el presente trabajo.

Proyecto financiado por la UE: FAIR6-CT98-4140, con la colaboración de D. Ramón Aguilar (Viveros Huelva) y D. Javier Palacios (Viveros Río Eresma)

P-146

**SUSCEPTIBILIDAD DE VARIEDADES DE OLIVO A LA TUBERCULOSIS:
METODOLOGÍA DE EVALUACIÓN**

García, A.¹, Peñalver, R.¹, Del río, C.², Caballero, J. M.² y López, M. M.¹

¹Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA), Apartado Oficial, 46113 Moncada, Valencia. ²Centro de Investigación y Formación Agraria (CIFA) “Alameda del Obispo”, Apartado 3092, 14008 Córdoba.

La tuberculosis del olivo es una enfermedad cuyo agente causal es la bacteria *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* (Pss), que produce tumores en ramas y menos frecuentemente en hojas y frutos. La lucha directa contra esta enfermedad es compleja, por lo que tiene gran interés el conocimiento de la sensibilidad relativa de las variedades cultivadas en España. Ello permitiría utilizar las variedades menos sensibles en las zonas con elevada incidencia de la enfermedad.

Se realizaron ensayos de inoculación para evaluar la agresividad de distintas cepas del patógeno y se estudió el efecto de la dosis de inóculo y de la edad de la planta en la susceptibilidad varietal a la tuberculosis. La comparación de la agresividad de 22 cepas de Pss en siete variedades de olivo, mostró que la mayoría presentaron una agresividad similar en todas ellas. Cuando se estudió la respuesta de las plantas a diferentes dosis de Pss, inoculando diluciones seriadas desde 10^2 a 10^6 ufc/herida, se observaron diferencias en la aparición de tumores a las distintas dosis de inóculo.

La metodología utilizada en la evaluación de 16 variedades de olivo, consistió en inocular en primavera 44 plantas por variedad. Se inocularon dos cepas de Pss con dos dosis de inóculo (11 plantas por cepa y dosis), realizándose cuatro heridas por planta. Se tuvo en cuenta el número de tumores aparecidos en los puntos de inoculación, el tiempo de aparición de los mismos, el peso de los tumores y en algunos casos el número de tumores aparecidos fuera de los puntos de inoculación.

Los primeros resultados obtenidos de estos estudios comparativos permitieron clasificar las 16 variedades en tres grupos con respecto a su susceptibilidad a la tuberculosis. Se comportaron como muy sensibles las variedades Arbequina, Callosina, Cornicabra, Changlot real, Morisca, Nevado blanco de Jaén y Picudo, como medianamente sensibles Frantoio (Oblonga), Gordal sevillana y Picual, y como poco sensibles las variedades Chemlali, Dulzal de Carmona, Lechín de Granada, Manzanilla cacereña y Villalonga.

P-147

ALTERNATIVAS AL BROMURO DE METILO. SITUACION ACTUAL

Cebolla, V., Busto, J. y Bartual, R.

IVIA Moncada (Valencia)

El Bromuro de Metilo, se considera una de las sustancias cuya emisión a la atmósfera contribuye a la destrucción de la capa de ozono. Por este motivo las Naciones Unidas han establecido un calendario de reducción progresiva del mismo. En España se ha visto reducido su uso en un 25% desde 1.998 y continuará disminuyendo, hasta Enero del 2.005 en que tiene prevista la desaparición total. Excepto aquellos usos críticos para los que no se encuentre alternativa técnica y económicamente viable.

Impulsado por el MAPA estamos realizando un estudio de nuevas alternativas para emplear en la desinfección de suelos en los cultivos más dependientes del uso del Bromuro de Metilo, como en cultivos de huerta (escarola, patata, sandia, cebolla y chufa), cítricos, pimiento y fresón. Proyecto financiado por el INIA y la Conselleria de Agricultura.

En estos cultivos se realizan tratamientos que se comparan con un control. El efecto a largo plazo se estudia mediante la repetición de los tratamientos en la misma parcela durante varios años. Los tratamientos estudiados son Bromuro de Metilo a 60g/m² con cubierta de Polietileno, Bromuro de Metilo 30 g/m² con plástico VIF, Solarización con 5Kg/m² de estiércol, Solarización con Metham-Na a varias dosis, Metham-Na Varias dosis, Biofumigación con varios estiércoles y dosis, Telone 18 g/m² seguido de Metham-Na 72 g/m², Telone C35 a 28 g/m² y a 40 g/m². Aplicados como gas en el caso del BM y los demás en el agua de riego o mediante inyección.

En el cultivo de sandia se ha introducido además en el estudio el injerto como una alternativa a valorar.

Los resultados obtenidos en fresón en cuanto a producción total y comercial en los tratamientos a base de BM, de Solarización con estiércol o con Metham-Na no difieren significativamente en el primer año. En el segundo año la Solarización con Metham-Na pierde eficacia frente a tratamientos que incluyen BM o con la Solarización con estiércol.

En cuanto a los cultivos de huerta el primer cultivo de escarola sufre un ataque de *Sclerotinia minor* y sólo los tratamientos con BM y Telone con Metham-Na tienen una buena eficacia sin diferencias significativas entre ambos. En sandia los tratamientos de Solarización no difieren significativamente del control mientras que el tratamiento de Telone con Metham-Na resulta tan efectivo en algunos casos como el BM, pero el uso del BM resulta necesario en el caso de no utilizar sandia injertada.

El Telone C35 en el cultivo de fresón ofrece resultados muy similares al BM desde el punto de vista de producción, tamaño de fruto y control de malas hierbas

En el momento actual tenemos algunos tratamientos capaces de dar resultados como el BM, sin embargo este gas sigue siendo el más fiable para el control de patógenos y fatiga de suelo. Es necesario insistir en métodos de aplicación que mejoren la fiabilidad de las actuales alternativas.

P-148

EVALUACIÓN DE MICROORGANISMOS ANTAGONISTAS DE *Spilocaea oleagina*

Segura, R. y Trapero, A.

Dpto. de Agronomía. ETSIAM. Universidad de Córdoba. Apdo. 3048, 14080 Córdoba.

Spilocaea oleagina es un patógeno específico del olivo que se desarrolla en la cutícula de los tejidos infectados. Como ocurre en las roñas de otros frutales, este hábitat subcuticular del patógeno podría favorecer la acción de microorganismos antagonistas o de productos de dichos organismos que presenten una fácil difusión en la cutícula foliar.

Se han obtenido un total de 80 aislados fúngicos procedentes de hojas de olivo de diferentes comarcas olivareras. Los aislados obtenidos se clasificaron en los géneros *Aureobasidium*, *Cladosporium*, *Coniothyrium*, *Phoma*, así como *Alternaria* y *Aspergillus*, aunque estos dos últimos aparecen con menor frecuencia. Estos aislados se han evaluado *in vitro*, determinando el efecto del antagonista en la germinación y elongación del tubo germinativo de conidias de *S. oleagina*. Se depositaron 10 µl de suspensión conidial de *S. oleagina* (10^5 conidias/ml), 10 µl de la suspensión conidial del antagonista (10^6 conidias/ml) y 50 µl de agua estéril en placas microtest, se incubaron a 15°C en oscuridad durante 48 horas y se evaluaron 100 conidias de cada combinación experimental. Asimismo, se ha evaluado *in vivo* la capacidad de los antagonistas para reducir la infección y el desarrollo de la enfermedad mediante inoculación tanto de hojas separadas como de plántulas de olivo en condiciones controladas. En el primer caso se colocaron sobre la misma hoja gotas de inóculo de *S. oleagina*, de *S. oleagina* más el antagonista y sólo del antagonista. Para la evaluación se adoptó una escala referida al tamaño de la lesión producida por *S. oleagina* en la gota testigo de cada hoja. La inoculación en plántulas se realizó mediante pulverización de una suspensión conidial de *S. oleagina*, dichas plántulas habían sido pulverizadas previamente con suspensiones de los antagonistas 24 horas antes.

Para evaluar el efecto del antagonista en la germinación se definieron dos parámetros IRG (Inhibición Relativa de la germinación) e IRT (Inhibición Relativa de la longitud del tubo germinativo). De los 80 aislados, 6 de ellos inhibieron la germinación en más del 50% de la observada en el testigo. En los restantes aislados los resultados de la IRG fueron: 17 aislados con 30-45%, 21 aislados con 20-30%, 13 aislados con 10-20%, 11 aislados con 1-10% y 8 aislados con el 0%. Resultados similares se obtuvieron cuando la variable analizada fue IRT. Cuando se analizó la capacidad de los antagonistas para reducir la infección sobre hojas separadas de olivo, ninguno de los aislados inhibió completamente la infección y únicamente en uno de ellos se observó una disminución marcada (75%) en el tamaño de la lesión latente respecto a la de su testigo correspondiente. En las plántulas tratadas con cuatro de los aislados fúngicos la severidad de los síntomas estuvo por debajo del 25% de superficie foliar afectada frente a las plántulas testigo que presentaron un 60% de superficie afectada. Los aislados fúngicos no se comportaron igual *in vivo* que *in vitro*, lo que concuerda con lo observado por otros autores en un patosistema muy similar como es *Venturia inaequalis*/manzano.

P-149

PERSPECTIVAS DE LA TERMOTERAPIA CON AGUA CALIENTE COMO MÉTODO DE CONTROL DE *Verticillium dahliae* EN ZUECAS DE ALCACHOFA

Márquez, B., Armengol, J., Vicent, A., Sales, R. y García-Jiménez, J.

Unidad de Patología Vegetal, Dpto de Producción Vegetal. Universidad Politécnica de Valencia, Camino de Vera s.n. 46022 Valencia.

La verticilosis, enfermedad causada por *Verticillium dahliae* Kleb. es un factor limitante en la producción de alcachofa (*Cynara scolymus* L.) en la Comunidad Valenciana. Este hongo causa clorosis y necrosis de las hojas basales, reducción del crecimiento, marchitez y muerte de plantas provocando importantes pérdidas económicas. La alcachofa se propaga principalmente por zuecas, siendo ésta una importante vía de diseminación del patógeno.

El control de un patógeno vascular mediante la aplicación de fungicidas tiene un éxito muy limitado. Con el objetivo de obtener un control efectivo de *V. dahliae* en material de propagación, en este trabajo se propuso evaluar las condiciones adecuadas para el tratamiento con agua caliente de zuecas de alcachofa.

Se realizaron dos experiencias con objeto de estudiar la tolerancia de la alcachofa a diversas temperaturas y diferentes períodos de tratamiento.

En la primera, zuecas de alcachofa sanas se trataron a 40, 43, 46, 49, 52, 55 y 58 °C durante dos períodos de tiempo, 20 y 30 min. Cuatro grupos de 25 zuecas sin tratar se tomaron como controles. Estas zuecas se plantaron en una parcela sin antecedentes de verticilosis. El desarrollo de las plantas y la producción fueron evaluados durante un ciclo de cultivo.

Las plantas murieron a 55° C y 58° C, y las plantas tratadas a 52° C tuvieron una brotación irregular, mientras que el resto de temperaturas mostraron un desarrollo normal comparado con los controles. No hubo diferencias significativas en producción entre los controles y los tratamientos a 40, 43 y 46 °C. Los tratamientos de 49 y 52 °C mostraron una menor producción por planta.

En una segunda experiencia, zuecas sanas de alcachofa se trataron como se ha descrito previamente a 40 °C 60 min., 42 °C 45 min., 42 °C 60 min., 44 °C 30 min., 44 °C 45 min., 44 °C 60 min., 46 °C 30 min., 46 °C 45 min. y 48 °C 30 min. Las primeras observaciones indican un comportamiento agronómico adecuado para las plantas de todos los tratamientos.

Adicionalmente, plantas de alcachofa afectadas obtenidas de una parcela donde se observó la enfermedad fueron expuestas a un tratamiento por agua caliente a 46 °C 30 min. El reaislamiento de *V. dahliae* no fue posible después del tratamiento mediante cultivo en PDAS de fragmentos internos de plantas.

Estos primeros resultados aparecen como altamente prometedores con vistas a un control efectivo de *V. dahliae* en material de propagación de alcachofa. Este método podría ser usado en combinación con métodos de desinfestación de suelos en un programa de manejo integrado de enfermedades de suelo en alcachofa.

P-150

DESARROLLO DE UNA ESTRATEGIA PARA CONSEGUIR PLANTAS RESISTENTES AL GEMINIVIRUS TYLCV.

Franco, M.I., Morilla, G., Bejarano, E.R.

Departamento de Genética. Universidad de Málaga. Campus de Teatinos s/n 29071. Málaga.

La enfermedad producida por el virus del rizado amarillo del tomate (tomato yellow leaf curl virus, TYLCV) es una de las plagas más importantes que sufre este cultivo a escala mundial. El virus TYLCV pertenece a la familia geminiviridae y se transmite por medio de la mosca blanca *Bemisia tabaci*. Como los demás geminivirus descritos hasta la fecha poseen un genomio formado por DNA de cadena sencilla (DNAs) circular.

Desde principios de los años ochenta la enfermedad se ha extendido a muchas partes del mundo.

La resistencia a las infecciones por virus observada en algunos cultivos, puede tener su origen en el agente patógeno y no en las características genéticas de la planta. En virus, se conocen dos mecanismos que conllevan a este tipo de resistencia: la formación de partículas subgenómicas del virus que interfieren con la replicación del mismo y los fenómenos de protección cruzada.

P151

COMPETENCIA INTRAESPECÍFICA ENTRE DIFERENTES AISLADOS DEL VIRUS Y DE LA PATATA (PVY) Y SUS IMPLICACIONES EPIDEMIOLÓGICAS

Gai, Y. ¹, Wang, X. ², Romero, A. ², Ponz, F. ² y Fereres, A. ¹

¹Departamento de Protección Vegetal. Centro de Ciencias Medioambientales. CSIC. 28006 Madrid. ²Departamento de Mejora Genética y Biotecnología. INIA. 28040 Madrid.

El virus Y de la patata (PVY) es el miembro tipo de la familia Potyviridae. Está distribuido a nivel mundial y causa daños económicos en diversos cultivos de solanáceas. PVY se transmite de manera no persistente por al menos 25 especies de pulgones. Los diferentes aislados de PVY se clasifican atendiendo a su afinidad genética en los grupos: Y^N, Y^O, e Y^{NP}. Los aislados que infectan patata se agrupan según la sintomatología inducida en distintas plantas en las razas: Y^N, Y^O, e Y^C. Finalmente, los aislados de PVY que infectan pimiento se agrupan en 3 patotipos distintos que se denominan: 0, 1 y 1-2. Todos estos aislados son diferenciables mediante "restrictotipos", técnica que permite generar diferentes patrones RFLPs del gen de la proteína de la cápsida después de realizar una inmunocaptura-RT-PCR.

El objetivo de nuestro trabajo es estudiar el papel del vector (pulgones) en la competencia intraespecífica entre aislados con diferente grado de afinidad genética y distinta capacidad de transmisión. Dichos estudios van encaminados a mejorar nuestro conocimiento sobre la epidemiología de PVY en condiciones de campo. Para ello, se ha elegido el patosistema formado por el pulgón *Myzus persicae* Sulzer, plantas de tabaco *Nicotiana tabacum* L. cv. Xanthi-nc y varios aislados de PVY.

Los resultados de experimentos de transmisión en laboratorio entre aislados de PVY muy separados genéticamente (A134, perteneciente a la raza N de patata y el P21-82, perteneciente al patotipo 0 de pimiento) indicaron que ambos aislados se transmiten independientemente y sin interferencia entre ellos con una elevada eficiencia. También se observó que un aislado no transmisible del grupo PVY-1, llamado P62-81 era transmitido eficientemente en presencia del aislado A134, probablemente por complementación heteróloga del componente de ayuda del aislado transmisible. Dicho aislado P62-81 conservó la propiedad de no transmisibilidad después de ser inoculado, por lo que hay que descartar la posibilidad de recombinación o mutación en la fuente de infección mixta.

Otros ensayos en invernadero realizados en grandes jaulones empleando formas aladas liberadas completamente al azar, dieron como resultado una tasa muy baja de infección de los aislados A134 y P21-82 (4/169). En otros ensayos se forzó la adquisición confinando a los alados durante 10 minutos en las plantas infectadas antes de ser liberados. Dichos ensayos dieron como resultado una mayor tasa de infección, indicando que los aislados A134 y P21-82 se dispersan independientemente y sin interferencia entre ambos. En futuros trabajos se evaluará el grado de dispersión de aislados no transmisibles cuando se encuentran aislados transmisibles en su proximidad.

P152

ESTUDIO EPIDEMIOLÓGICO DE LA “TRISTEZA” EN EL PIMIENTO DE PADRÓN EN GALICIA.

Bernal, M.A., Collar, J., Díaz, J., Caramelo, C., Gayoso, C., Pomar, F., Prego, C., Saavedra, A., Silvar, C. y Merino*, F.

Departamento de Biología Animal, Biología Vegetal e Ecología. Facultade de Ciencias. Universidade da Coruña, 15071 A Coruña.

La “tristeza” es una de las principales enfermedades del pimiento, causada bien por los hongos *Phytophthora capsici* Leon. y *Verticillium dahliae* Kleb., bien por asfixia radicular. Se ha realizado una prospección para conocer la situación epidemiológica de esta enfermedad en las explotaciones de pimiento de Padrón en Galicia. Se han mostrado explotaciones de varias localidades, que se han agrupado en tres zonas: la zona Norte, con las localidades de Arteixo, Betanzos y Cambre. La zona Centro con la localidad de Padrón, y la zona Sur con las localidades de Cambados y El Rosal. Se han llevado a cabo dos muestreos durante el año 98. Las fechas del primer muestreo estuvieron comprendidas entre el 15 de mayo y el 24 de Junio, y las del segundo entre el 28 de julio y el 24 de Setiembre.

Además de *Phytophthora capsici* y *Verticillium dahliae*, se ha determinado la presencia de una abundante micoflora, hasta un total de 37 hongos diferentes. Entre ellos podemos destacar la presencia de *Botrytis cinerea* Pers., *Fusarium roseum* Link., *Fusarium solani* (Martius) Saccardo, *Rhizoctonia solani* Kühn. y *Sclerotinia sclerotiorum* (Libert) de Bary, considerados también como hongos patógenos.

Con respecto *Phytophthora capsici*, uno de los hongos responsables de la “tristeza”, hemos podido observar como en el primer muestreo aparecen un 40% de explotaciones afectadas en la zona N, un 50% en la zona C y un 50% en la zona S. En el segundo muestreo la incidencia es de 0 % en la zona N, un 45,8% en la zona C y un 18,8 en la zona S. En el estudio realizado con *Verticillium dahliae*, el otro hongo responsable de esta enfermedad, los resultados han sido los siguientes: en el primer muestreo aparecen un 20% de explotaciones afectadas en la zona N, un 20,8% en la zona C, y un 50% en la zona S. En el segundo muestreo un 20% en la zona N, un 12,5% en la zona C y un 37,5% en la zona S.

La incidencia de la “tristeza” en el pimiento de Padrón en Galicia es bastante elevada, ya que en el primer muestreo aparece en casi un 50% del total de las explotaciones, porcentaje que disminuye en el segundo muestreo, aproximadamente a un 30%. En la prospección se han obtenido más de 150 aislados de *Phytophthora capsici* y *Verticillium dahliae*, que servirán para estudios posteriores de patogenicidad y de resistencia.

El presente trabajo ha sido financiado por la CICYT (Proyecto AGF97-0499).

P-153

PROBLEMAS ASOCIADOS CON LA DETECCIÓN CUANTITATIVA DE *Verticillium dahliae* EN EL SUELO EN MEDIOS SELECTIVOS

López-Escudero, F.J., Martos-Moreno, C., Blanco-López, M.A.

Dpto. de Agronomía. ETSIAM. Universidad de Córdoba. Apdo. 3048. 14080. Córdoba.

La determinación de niveles de riesgo de enfermedades en los cultivos es esencial para desarrollar métodos de control preventivo. Esto es especialmente importante en las enfermedades causadas por organismos de suelo, tales como las marchiteces producidas por *Verticillium dahliae*. Esta especie produce estructuras de supervivencia (microesclerocios, MS), que constituyen su principal estructura de infección y dispersión. Existe una extensa variedad de técnicas para detectar y cuantificar a *V. dahliae* en el suelo, cuya aplicación puede incidir significativamente en la estimación de la densidad de inóculo (DI). En nuestros estudios, utilizando el medio semiselectivo Agar Pectato Sódico Modificado, con la técnica del Tamizado Húmedo, para el análisis de suelos de cultivos herbáceos extensivos, especialmente algodónero, *V. dahliae* produce colonias típicas con MS dispuestos en forma de estrella. En ocasiones, aunque generalmente bien reconocibles, se observan colonias similares incompletas, otras de morfología irregular o mixta, o pequeños grupos de MS.

Sin embargo, en los últimos años, en muestreos de suelos de olivar, aparecen con frecuencia superior otras especies fúngicas, destacando especies formadoras de picnidios y otras especies no identificadas que producen estructuras similares a MS de *V. dahliae* que podemos agrupar en: A) colonias con estructuras más o menos esféricas, más oscuras y superiores en tamaño a los MS de *V. dahliae* y B) colonias estrelladas con estructuras irregulares, ramificadas, con proyecciones celulares cortas, similares a las formadas por *V. tricorpus*, unidas entre sí por hifas pigmentadas y septadas.

En este trabajo se presentan resultados de análisis de suelos muestreados durante 1998-2000, procedentes en su mayoría de olivares afectados de Verticilosis, en los que se confirmó la presencia del patógeno mediante aislamientos de material vegetal afectado. *V. dahliae* se detectó en el 53% de estos suelos, con DI comprendidas entre 0,4 y 3,0 MS/g de suelo. Además, en estas muestras, se cuantificaron colonias del tipo A y B descrito, presentando DI variables que, en ocasiones, llegaron a ser 10 veces superiores a las de *V. dahliae* (0,4-20,4 y 0,8-16,4 respectivamente). En el resto de suelos, *V. dahliae* no pudo ser recuperado, aunque se obtuvieron cantidades considerables de las colonias del tipo A y B comprendidas entre 2,8-26,4 y 0,4-21,6 MS/g de suelo respectivamente. De este trabajo se desprende que para la cuantificación de la DI de *V. dahliae* en el suelo, como paso esencial para la predicción de epidemias, es necesaria la identificación precisa de las colonias que forma este patógeno sobre los medios semiselectivos.

P-154

EFFECTO DE LA TEMPERATURA EN LA INFECCIÓN DE ACEITUNAS POR *Colletotrichum* spp.

De Oliveira, R. y Trapero, A.

Dpto. de Agronomía, ETSIAM, Universidad de Córdoba. Apdo. 3048, 14080 Córdoba.

La aceituna jabonosa o antracnosis, causada por *Colletotrichum* spp., afecta gravemente a algunos cultivares de olivo durante los años de otoños lluviosos. Además de la lluvia, la temperatura es también un factor determinante de la severidad de las infecciones. En este trabajo se ha estudiado el efecto de diferentes temperaturas constantes (5, 10, 15, 20, 25, 30 y 35 °C) sobre el crecimiento y la germinación de conidias del patógeno, así como sobre la infección de aceitunas, utilizando dos aislados del hongo pertenecientes a las dos especies morfológicas, *C. acutatum* y *C. gloeosporioides*, que han sido asociadas recientemente con esta enfermedad en Andalucía.

Los dos aislados presentaron un patrón similar de crecimiento en PDA a las diferentes temperaturas, con un intervalo de crecimiento de 10-30 °C, temperatura óptima ligeramente superior a 21 °C y una tasa máxima de crecimiento de 6.1-6.8 mm/día. Respecto a la germinación de las conidias, los dos aislados tuvieron un comportamiento similar: el intervalo de temperatura fue de 5-30 °C, con el óptimo próximo a 25 °C y un tiempo medio de germinación de 11.4, 5.8, 4.2, 3.4, 3.5, y 5.3 hr para 5, 10, 15, 20, 25 y 30 °C, respectivamente. Prácticamente la totalidad de las conidias germinadas formaron apresorios y la rapidez de formación de apresorios estuvo correlacionada con la germinación de las conidias. También en este caso los dos aislados tuvieron una respuesta similar; si bien, el aislado de *C. gloeosporioides* formó los apresorios más rápidamente.

En inoculaciones artificiales, el desarrollo de la podredumbre de las aceitunas también resultó sensiblemente influido por la temperatura. Así, la podredumbre sólo se desarrolló en el intervalo 10-30 °C y la severidad máxima se alcanzó para los 25 °C a los 10-12 días de la inoculación. Excepto para 30 °C, no se observaron diferencias significativas de virulencia entre los dos aislados del patógeno para las diferentes temperaturas estudiadas. A 30 °C, el aislado de *C. acutatum* resultó marcadamente más virulento que el aislado de *C. gloeosporioides*. Los modelos de regresión ajustados están siendo ampliados para un mayor número de aislados y servirán para caracterizar las epidemias de esta enfermedad en condiciones de campo.

P155

EFFECTO DE FACTORES AMBIENTALES EN LA DISPERSIÓN DE CONIDIAS DE *Spilocaea oleagina*

Viruega, J.R. y Trapero, A.

Dpto. de Agronomía, ETSIAM, Universidad de Córdoba. Apdo. 3048, 14080 Córdoba.

S. oleagina, agente del Repilo del olivo, es un patógeno específico que carece de estado sexual, por lo que las únicas estructuras de dispersión son las conidias asexuales que se producen en las lesiones foliares. Se acepta generalmente que estas conidias son desprendidas de los conidióforos y diseminadas, sobre todo en sentido vertical, por la acción del agua de lluvia. No obstante, la influencia de factores ambientales en este proceso clave de la epidemiología de la enfermedad ha sido escasamente estudiada.

La dispersión de conidias se evaluó durante 1994-97 en un olivar experimental (cv Picual) del CIFA de Córdoba, que presentó severos ataques de Repilo, mediante tres métodos: con el uso de portaobjetos de microscopio impregnados con la sustancia adhesiva Tangle-foot® y colocados a diversas distancias, con un muestreador volumétrico de esporas Burkard® colocado equidistante a cuatro olivos y por aplicación de una corriente de succión sobre las lesiones secas.

La utilización de portas de microscopio impregnados con adhesivo resultó ser el único método que permitió cuantificar la dispersión de conidias de *S. oleagina* a diversas distancias de la fuente de inóculo. La cantidad de conidias dispersadas (Y) fue muy variable en función de la lluvia y disminuyó drásticamente en el exterior del área bajo la copa de los olivos, estableciéndose la relación $Y = \exp(5.47X^{-3.77})$, siendo X la distancia a la fuente de inóculo. En todos los períodos de estudio, existió una correlación positiva entre la cantidad de lluvia acumulada durante el período y la densidad de conidias detectada sobre los portaobjetos colocados bajo la copa de los olivos. Además, en ausencia de lluvia, se detectaron conidias sólo bajo la copa de los olivos, como consecuencia del lavado ocasionado por el rocío. En períodos lluviosos y de fuertes vientos se detectaron conidias hasta a 40 m de los olivos afectados. Ni el Burkard® ni la aplicación de una corriente de succión sobre las hojas en seco resultaron adecuados para cuantificar la dispersión. No obstante, en tiempo seco se detectaron con el Burkard® conidias asociadas a pelos aparasolados de la hoja de olivo.

Los resultados de los experimentos han confirmado el papel preponderante de la lluvia en la dispersión de conidias de *S. oleagina*. Se ha puesto de manifiesto, además, otro mecanismo, el de los pelos aparasolados, que opera en tiempo seco. Este mecanismo, aunque de menor importancia cuantitativa, podría ser responsable de la dispersión a larga distancia, similar a la diseminación por insectos detectada en Italia. La humectación foliar provocada por rocíos o nieblas es responsable de una dispersión que ocurre exclusivamente en sentido vertical pero que puede tener importantes implicaciones epidemiológicas.

P-156

FACTORES QUE AFECTAN A LA INFECCIÓN DE PLANTONES DE OLIVO POR *Phytophthora megasperma*

Guerrero-Barquero, N. y Trapero, A.

Dpto. de Agronomía, ETSIAM, Universidad de Córdoba. Apdo. 3048, 14080 Córdoba.

La principal enfermedad asociada con la “seca” de olivos jóvenes en Andalucía es la podredumbre radical causada por *Phytophthora megasperma*. Esta enfermedad origina una desecación y muerte de los plantones, con o sin amarilleamiento previo o pérdida de las hojas marchitas, una vez que los olivos jóvenes ya han superado la etapa de establecimiento en el campo, además de la podredumbre de raicillas y debilitamiento general de los olivos adultos. Con objeto de profundizar en el estudio de la patogenicidad de *P. megasperma* y, al mismo tiempo, conocer el efecto de factores decisivos en la infección del olivo por este patógeno, se han realizado varios experimentos de inoculación en condiciones controladas.

En estos ensayos se ha estudiado el efecto del método de inoculación, de la densidad de inóculo, del contenido hídrico y del tipo de suelo, así como de la micorrización sobre plantones de olivo inoculados con el patógeno. Para ello, se han utilizado plantones de dos cultivares de olivo susceptibles ('Picual' y 'Arbequina') y dos aislados seleccionados del patógeno.

Los resultados han mostrado que los diferentes tipos y densidades de inóculo no han resultado significativamente diferentes; si bien, las condiciones experimentales han influido de forma significativa en estos resultados. Para los siguientes ensayos se seleccionó el riego con el inóculo líquido, compuesto por una suspensión de oosporas y micelio, como el método de inoculación más adecuado. Así mismo, se ha observado que las condiciones de saturación hídrica constante del suelo son necesarias para el desarrollo de la podredumbre radical causada por *P. megasperma*. La enfermedad no se desarrolló cuando el suelo se mantuvo a capacidad de campo o entre capacidad de campo y 400 mm Hg. En lo que respecta a los tres tipos de suelo ensayados (arenoso, arcilloso y la mezcla 1:1 de ambos), se ha visto que no influyeron significativamente en el desarrollo de la podredumbre radical en plantones de olivo inoculados con los dos aislados de *P. megasperma* y mantenidos en condiciones de saturación hídrica constante del suelo. Los plantones de olivo micorrizados con *Glomus intraradices* e inoculados con los dos aislados del patógeno han mostrado una menor severidad de las infecciones que los plantones no micorrizados. No obstante, dicho efecto estuvo influido por la susceptibilidad del cultivar, siendo menos acusado en el cultivar más susceptible ('Arbequina') que en el menos susceptible ('Picual').

P-157

**SUPERVIVENCIA EN SUELO DE *Fusarium solani* f.sp *cucurbitae* RAZA 1
AGENTE CAUSAL DE LA PODREDUMBRE SECA DEL CUELLO DE LA
CALABAZA, EN DISTINTAS CONDICIONES HIDRICAS**

José, C. M., Armengol, J. y García-Jiménez J.

Patología Vegetal. Dpto. Producción Vegetal. Universidad Politécnica de Valencia,
Camino de Vera s/n. 46022 – Valencia.

Dos aislados de *Fusarium solani* (Mart.) Sacc. f.sp. *cucurbitae* W. C. Snyder & H. N. Hans raza 1, agente causal de la podredumbre seca del cuello de la calabaza (*Cucurbita maxima* Duchesne), han sido conservados en dos tipos de suelo procedentes de Valencia y Almenara (Castellón), en distintas condiciones hídricas (0, 25, 50, 75, 100, 150% de la capacidad de campo y agua destilada estéril) realizándose observaciones secuenciales de la viabilidad del hongo y estudios de la patogenicidad a calabaza de los reaislados así como de sus formas de conservación.

Los resultados indican que en el primer mes después de la inoculación del sustrato se produce un aumento brusco de la cantidad de unidades formadoras de colonias, tras lo cual, a partir del segundo mes comienza un descenso progresivo de éstas. Después de dos años de estudio se han observado diferencias en la aptitud de los dos tipos de suelos para la conservación del patógeno. En el suelo de Valencia el hongo ya no es viable en la mayoría de condiciones hídricas de conservación mientras que en el suelo de Almenara sí se mantienen propágulos viables en casi todas ellas. La conservación en agua se ha mostrado como la más adecuada para mantener la supervivencia del hongo.

Se ha comprobado la presencia de clamidosporas y conidios como forma de conservación estudiándose la patogenicidad a calabaza tras dos años de conservación.

P-158

***Monosporascus cannonballus*: RÉGIMEN HÍDRICO Y SUPERVIVENCIA EN SUELO**

García-Jiménez, J., Beltrán, R., Lafuente, M., Sales, R., Vicent, A. y Armengol, J.

Patología Vegetal. Dpto. Producción Vegetal. Universidad Politécnica de Valencia, Camino de Vera s/n. 46022 – Valencia.

Monosporascus cannonballus Pollack & Uecker es uno de los principales agentes fúngicos implicados en el colapso del melón (*Cucumis melo* L.) en diversos países productores de este cultivo y en los últimos años está adquiriendo una importancia creciente en España.

En toda la bibliografía se cita a este patógeno del suelo como adaptado a zonas cálidas y áridas. Sin embargo, en algunas zonas españolas *M. cannonballus* se aísla habitualmente de raíces de melón cultivado en terrenos de marjal que sufren un encharcamiento en los meses de invierno por elevación de la capa freática.

A fin de clarificar la supervivencia de *M. cannonballus* en estos suelos se ha realizado un estudio secuencial durante dos años de extracción del hongo de suelo con y sin encharcamiento invernal. Para ello se ha puesto a punto un método de extracción de las ascosporas del suelo utilizando cedazos de 30 y 75 μm que mejora los métodos descritos en la bibliografía.

El encharcamiento apenas afecta a la supervivencia del hongo en campo: en el tiempo que ha abarcado el estudio se ha observado sólo una ligera disminución de la presencia de ascosporas en suelo que no llega a ser significativa. Estos resultados han sido complementados con otros ensayos llevados a cabo en laboratorio donde *M. cannonballus* también ha sobrevivido muy bien en frascos de agua estéril.

Los resultados obtenidos invitan a hacer una revisión sobre la epidemiología de este hongo y su definición como agente adaptado a zonas áridas.

P-159

VALORACIÓN DE LA DIVERSIDAD GENÉTICA DE *Acremonium cucurbitacearum* MEDIANTE RAPD-PCR

Abad, P.¹, Laurín, M.C.¹, Pérez-Piqueres, A.¹, Bruton, B.D.² y García-Jiménez, J.¹

¹Patología Vegetal. Dpto. de Producción Vegetal. Universidad Politécnica de Valencia. Camino de Vera s.n. 46022 Valencia.

²United States Department of Agriculture, Agricultural Research Service, South Central Agricultural Research Laboratory, Lane, Oklahoma 74555.

El colapso del melón constituye un factor limitante en la producción de esta cucurbitácea, tanto en España como en California y Texas. Diversos hongos del suelo están implicados etiológicamente en este síndrome, siendo *Acremonium cucurbitacearum* (A. Alfaro-García, W. Gams y J. García-Jiménez) uno de los patógenos con mayor incidencia en nuestro país. Recientemente, *A. cucurbitacearum* se ha aislado también en el sur de Portugal, de plantas de melón con síntomas de colapso.

En estudios previos se realizó un análisis de la compatibilidad vegetativa de una colección de aislados españoles y norteamericanos de *A. cucurbitacearum*. En el presente trabajo se valora la diversidad genética de una amplia colección de aislados de esta especie originales de España, EEUU y Portugal mediante marcadores RAPDs. Para ello, el ADN extraído de cultivos monospóricos se amplifica mediante PCR, utilizando como iniciadores de la reacción los 40 oligonucleótidos de 10 bases de tamaño y secuencia aleatoria de las series A y B de Operon. De estos iniciadores, se seleccionan los que den una amplificación satisfactoria de todos los aislados. Algunos de los marcadores RAPDs identificados son específicos para un determinado grupo de compatibilidad vegetativa. El análisis UPGMA estructura en grupos distintos los aislados de origen ibérico y los norteamericanos. Este resultado indica la existencia de diferencias intraespecíficas entre poblaciones de *A. cucurbitacearum* según el continente de procedencia; sin embargo no hay correlación entre el origen geográfico y el grado de semejanza entre aislados cuando proceden de un mismo país.

P-160

DETECCIÓN E INCIDENCIA DE *Rhizopycnis vagum* EN CUCURBITÁCEAS EN ESPAÑA.

Armengol, J.¹, Pellicer, I.¹, Vicent, A.¹, Sales, R.¹, Bruton, B.D.² y García-Jiménez, J.¹

¹Patología Vegetal. Dpto. Producción Vegetal. Universidad Politécnica de Valencia, Camino de Vera s/n. 46022 – Valencia.

²US Dept. of Agriculture. Agricultural Research Service. Lane, Oklahoma 74555. USA.

Rhizopycnis vagum D. F. Farr es un nuevo género y especie de coelomycete que ha sido recientemente descrito asociado a raíces de melón en campos que mostraban síntomas de colapso en Estados Unidos, Guatemala y Honduras. La sintomatología asociada a este hongo incluye necrosis y podredumbre de raíces y raicillas y, ocasionalmente, la presencia de pigmentación rosada y microesclerocios en las zonas afectadas.

En prospecciones realizadas entre los años 1996 a 1999 en parcelas de melón con colapso en diferentes zonas productoras españolas se han detectado numerosos casos de raíces afectadas que presentaban coloraciones rosadas. Asimismo se detectaron también estos síntomas en raíces de otras cucurbitáceas. De ellas se aislaban con frecuencia variable hongos cuyas colonias esporulaban con dificultad y cuya morfología en medio de cultivo patata-dextrosa agar (micelio abundante de coloración grisácea o marrón y reverso marrón oscuro con zonas de coloración rojiza o rosada) se ajustaba a la descrita para este patógeno.

Se obtuvieron un total de 41 aislados de *R. vagum* procedentes de melón (38), sandía (2) y portainjerto de sandía (1). *R. vagum* produce picnidios esféricos superficiales o parcialmente inmersos en el material vegetal de 170 a 480 μm de diámetro que presentan normalmente un ostiolo central con una papila de longitud variable. Los conidios son cilíndricos a fusiformes, de dimensiones 20,0-27,5 x 4,4-6,3 μm , con el ápice redondeado y la base obtusa o truncada, tienen de uno a tres tabiques (normalmente tres), y aunque al principio son hialinos adquieren una pigmentación oscura a medida que maduran. En el micelio se suelen presentar cadenas de clamidosporas también de pigmentación oscura.

Se ha realizado un estudio de patogenicidad en melón de algunos de los aislados de diferentes orígenes (melón, sandía y portainjerto de sandía) comparándolos con aislados de referencia para este hongo procedentes de Estados Unidos, demostrándose su patogenicidad a este cultivo.

P-161

LA PODREDUMBRE BASAL DEL PUERRO CAUSADA POR *Fusarium culmorum*.

Rodríguez, J. M.¹, Vicent, A.², Sales, R.², Armengol, J.² y García-Jiménez, J.²

¹Sección de Protección de Cultivos, C.I.D.A., Crta. Logroño-Mendavia (NA-134) km 88. 26080 – Logroño.

²Patología Vegetal. Dpto. Producción Vegetal. Universidad Politécnica de Valencia, Camino de Vera s/n. 46022 – Valencia.

En verano del año 1996 en Sueca (Valencia) y posteriormente en el año 1998 en la zona de Haro (La Rioja) se detectó una nueva enfermedad en puerro (*Allium porrum* L.) no descrita anteriormente en España: las plantas afectadas presentan una podredumbre en la zona basal acompañada de una intensa coloración rojiza. Esta coloración puede observarse en ocasiones en la zona de las raíces que también pueden presentar daños. Posteriormente esta podredumbre se extiende por el cuello de las plantas provocando la marchitez de las hojas exteriores que llegan a desecarse totalmente imposibilitando cualquier aprovechamiento comercial de las mismas.

Estos síntomas se detectaron no sólo sobre plantas adultas sino también en plantas jóvenes a los 15-20 días del trasplante. En este caso se aprecia un retraso en su desarrollo acompañado de seca de hojas y podredumbre basal rojiza similar a la descrita anteriormente que en ocasiones puede provocar su muerte.

De las plantas afectadas se aisló consistentemente *Fusarium culmorum* (Wm. G. Sm.) Sacc. Inoculaciones de diversos aislados del hongo en plántulas de puerro reprodujeron los síntomas observados en campo.

Los ensayos de patogenicidad llevados a cabo con distintas variedades de puerro (Alora, Axel, Casado, Goliath y Varea) mostraron que todas ellas eran susceptibles frente a diversos aislados de *F. culmorum* aunque la variedad más sensible al patógeno en inoculación artificial fue la variedad Casado, siendo Alora y Axel las más tolerantes.

Actualmente esta enfermedad está afectando a la producción de puerro en La Rioja donde se ha recomendado la desinfección de bandejas en los semilleros y se están realizando ensayos experimentales de tratamientos con benomilo para su control.

P-162

ECOLOGIA DE VIRUS DE PLANTAS HORTICOLAS EN LA COMUNIDAD DE MADRID

Sacristán, S., Fraile, A. y García-Arenal, F.

Dpto de Biotecnología, E.T.S.I. Agrónomos. 28040 Madrid.

Durante los últimos siete años hemos realizado prospecciones con objeto de determinar cuales son los agentes causales de virosis en los principales cultivos hortícolas de la Comunidad de Madrid. Los cultivos prospectados han sido melón y otras cucurbitáceas, pimiento, tomate, judía verde y lechuga. Aunque la incidencia de virosis varía mucho de unos años a otros, los virus más frecuentes se repiten de año en año. Estos virus son el *Virus del mosaico del pepino* (CMV) en todos los cultivos, el *Virus del bronceado del tomate* en tomate, pimiento y lechuga, y distintos potyvirus según el cultivo, principalmente WMV-2 en cucurbitáceas, LMV en lechuga y BCMV en judía. No se tiene información sobre la incidencia de estos virus en huéspedes silvestres potenciales. Esta información es relevante para determinar cuales son las fuentes de inóculo primario al principio de la estación, ya que este puede provenir de larga distancia, o haber pasado la estación en la que no hay cultivo en especies perennes, bisanuales, o anuales en las que haya transmisión por semilla. Además esa información es relevante a la hora de determinar que flujo genético puede haber entre las poblaciones virales en cultivos y en plantas silvestres.

Con el fin de obtener esta información se ha hecho un seguimiento de la flora espontánea en lindes, parcelas en periodo entre cultivos, y eriales a pastos. En primer lugar se ha analizado la composición florística de la vegetación en estos espacios sin cultivo, y su variación en el tiempo. Para cada una de las especies principales se ha estimado el porcentaje de superficie y volumen que ocupa en cada muestreo. En las plantas muestreadas se ha analizado, directamente en el material recogido de campo y tras inoculación de distintos huéspedes experimentales, la incidencia de CMV, TSWV y los potyvirus señalados.

Los datos presentados son preliminares, en cuanto a que se deben a un solo año de estudio, pero son una aportación importante al conocimiento de la ecología de virus que afectan a hortícolas en una zona representativa de la horticultura al aire libre del centro de España.

P-163

LA SITUACIÓN DEL VIRUS DEL CRIBADO EN LA COMUNIDAD VALENCIANA

Juárez, M.¹, Ortega, A.¹, Aucejo, S.² y Jordá C.²

¹Dpto. Producción Vegetal. Escuela Superior Politécnica. Universidad Miguel Hernández. Carretera de Beniel Km. 3,2. 03312- Orihuela (Alicante)

²Dpto. Producción Vegetal. Patología. Universidad Politécnica . Cno. de Vera,14. 46022-Valencia.

El virus del cribado del melón (Melón necrotic spot carmovirus) ha sido desde hace varios años una de las enfermedades de mayor importancia en el Sur-Este español. Su sintomatología típica, que le da nombre, el cribado, no siempre se hace evidente y otros síntomas menos específicos hacen su aparición, como son el de marchitamiento y muerte súbita que de nuevo etiquetan a este virus. Con este nombre y otros de similar significado tal como Colapso se mezclan entre sí y definen enfermedades de distinta etiología.

La distribución geográfica de la enfermedad había quedado delimitada a los cultivos protegidos y de aire libre de la amplia zona citada anteriormente llegando hasta Murcia. En la Comunidad Valenciana no se ha hecho un estudio rutinario y concienzudo de la posible presencia de este virus en las distintas áreas de cultivo de las dos especies más importantes de las Cucurbitáceas, el melón y la sandía, donde aparecen los síntomas citados de la muerte de plantas, salvo puntuales diagnósticos.

El presente trabajo aborda el estudio de esta problemática y recoge los datos preliminares de la extensión y localización de esta enfermedad en esta Comunidad en estos dos cultivos al aire libre.

P-164

FACTORES QUE INFLUYEN EN EL DESARROLLO DEL “FALSE BROOM” DEL TABACO

Cordoba, M.C., Martínez, P.V., Tello, J., y Jordá, C.

Unidad de Patología Vegetal, Dpto. de Producción Vegetal, Universidad Politécnica de Valencia, Camino de Vera s/n, 46020 Valencia, Spain.

En cultivos de tabaco procedentes de Guatemala se desarrollaron tumoraciones en raíces con evolución a pequeñas hojas cloróticas que adquieren el color verde cuando alcanzan la superficie. Su aspecto, similar al presentado por una planta parásita, la Orobanche, le ha dado el nombre de “False broom” a esta sintomatología. Estas brotaciones disminuyen el desarrollo de la planta y afectan a la calidad de la hoja, redundando en un peor secado de la misma. Uno de los posibles agentes causales es la bacteria *Rhodococcus fascians*, cuya presencia se ha asociado a dicha sintomatología en un total de 59 géneros de plantas diferentes.

Con el objetivo principal de comprobar si estaba presente *R. fascians* en los tumores encontrados en las plantas de tabaco, se realizaron aislamientos empleando diferentes medios de cultivo. Las pruebas bioquímicas y fisiológicas que se realizaron indicaron la presencia de dicha bacteria en varios de los aislamientos realizados. Posteriormente, se realizó un diagnóstico molecular mediante PCR. Se utilizaron oligonucleótidos específicos para amplificar por PCR, el DNA de todos aquellos aislamientos en los que se había encontrado la bacteria mediante las pruebas anteriores. El análisis electroforético de la reacción de PCR reveló la presencia de un producto de amplificación de 220 pb tal y como cabía esperar para una cepa de *R. fascians*. Una posterior secuenciación de dicho fragmento sería necesaria para confirmar la presencia de *R. fascians* en los tumores de tabaco.

En el presente trabajo se presenta también un estudio del síndrome en cuanto a condiciones ambientales óptimas para el desarrollo, nutrición, productos, transmisión y sensibilidad varietal.

P-165

IDENTIFICACION DE UNA SINTOMATOLOGÍA PRODUCIDA POR UN FITOPLASMA EN AGUACATE

Laviña, A.¹, Batlle, A.¹, López Herrera, C.J.² y Garcia Faraco, J.³.

¹Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentàries. IRTA. 08348 Cabrils, Barcelona.

²Instituto de Agricultura Sostenible. CSIC. Córdoba.

³Oficina Comarcal Agraria. Consejería de Agricultura. Junta de Andalucía. Estepona Málaga.

El aguacate (*Persea americana* Mill.) se ha presentado desde su implantación en el litoral andaluz a finales de la década de los setenta como un cultivo alternativo de regadío, a los tradicionales y poco productivos de secano, olivo, almendro y vid. Las plantaciones de aguacate en esta zona se han incrementado desde sus comienzos presentando actualmente una superficie de unas 8.000 Has.

En 1998 la producción de aguacate obtenida de esta zona fue de 62.300 Tm, lo que generó un producto bruto superior a 11.000 M de pesetas. El aguacate es el segundo cultivo subtropical de España en importancia después de la platanera, exportándose anualmente unas 44.000 Tm a países de la CEE.

En el verano de 1999 se comenzaron a observar en una plantación de aguacates de 7 años de edad, rodeada de pinos y monte bajo, en el termino municipal de Istan (Málaga) árboles del cultivar Hass con síntomas similares a aquellos producidos por los fitoplasmas. Estos consistían en hojas jóvenes enrolladas a lo largo del nervio central, alargamiento del ápice, clorosis y deformaciones. Las clorosis se localizaban principalmente en los nervios centrales. En algunas hojas mas viejas también se observaban deformaciones. Algunos arboles presentaban un pobre desarrollo vegetativo (enanismo)

Para determinar si esta sintomatología estaba asociada a la presencia de un fitoplasma, muestras con los síntomas descritos se analizaron mediante la técnica de la PCR. La extracción de ADN se realizó a partir de nervios centrales de las hojas siguiendo la metodología de Ahrens y Seemüller 1992. Se utilizaron distintos pares de iniciadores universales (P1/P7, P1/tint, fU5/rU3), y de iniciadores específicos de Stolbur (stol 4 f/r y stol 12 f/r).

Mediante la utilización de iniciadores universales se determinó la presencia de fitoplasmas. Con los iniciadores específicos de stolbur se identificó la presencia de este fitoplasma en las muestras analizadas.

P-166

SENSIBILIDAD DE LA DETECCIÓN DEL FITOPLASMA ASOCIADO *PEAR DECLINE* EN DISTINTOS ESTADIOS VEGETATIVOS

García, M.¹, Rodríguez, O.G.², Laviña, A.¹, Medina V.¹ y Batlle A¹.

¹Dpto Protección Vegetal. Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentàries (IRTA) 08348 Cabrils (Barcelona).

²IRTA. UDL. Avda Rovira Roure 177. 25006-Lleida

Los fitoplasmas son patógenos que se encuentran localizados en el floema de las plantas en muy bajas concentraciones, especialmente en las plantas leñosas. Una de las enfermedades más graves producidas por un fitoplasma en frutales es el decaimiento del peral o *Pear decline*, considerándose además como uno de los que se encuentran en más baja concentración. Esta enfermedad está extendida en todos los países donde se cultiva el peral, entre ellos España y es considerada de cuarentena según la OEPP, por lo que es necesario la certificación del material vegetal y el control de la enfermedad y sus insectos vectores. Para un adecuado control es básico disponer de técnicas sensibles, así como conocer la sensibilidad de la detección en distintos estadios vegetativos del árbol y cuales son los órganos o tejidos más adecuados para la detección del patógeno en cada época.

Debido a su alta sensibilidad, la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa es uno de los métodos más utilizados actualmente para la detección e identificación de fitoplasmas. En este trabajo se ha evaluado la sensibilidad de la técnica para la detección del PD a lo largo del año, así como la distribución de éste en el árbol. Para ello se han tomado muestras quincenalmente durante todo el año de arboles identificados previamente como positivos. Las muestras se han tomado de tres niveles diferentes del árbol y la identificación se ha realizado en corteza, yemas vegetativas, yemas florales, nervios de hojas y peciolo.

La detección se ha realizado mediante nested PCR con los iniciadores universales P1/P7, fU5/rU3 y los iniciadores específicos fPD/rPD

Se ha descrito la detección de fitoplasmas durante el período de reposo invernal en algunos frutales pero no en peral. Los resultados obtenidos en este trabajo, muestran la posibilidad de detectar el ADN del fitoplasma durante el período de latencia invernal, ya que ha sido detectado en las variedades Abatte Fettel, Decana de Comice, Flor de invierno y Limonera durante esta época. Esto indica que la PCR es una técnica apta para el control de estaquillas procedentes de vivero.

P-167

LOS VIROIDES DE LOS CÍTRICOS Y EL CONTROL DEL TAMAÑO DE LOS ÁRBOLES: CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DEL VIROIDE III (CVd-III).

Corvera, J.M.¹, Velázquez, K.², Romero-Durbán, J.¹, Pina, J.A.³ y Duran-Vila, N¹.

¹Instituto Valenciano de Investigaciones. Apartado oficial. 46113 Moncada (Valencia).

²Instituto de Investigaciones de Cítricos y Frutales. La Habana. Cuba.

³Area de Protección de los Cultivos. Alcalde Domingo Torres 2, 1^a. 46020 Valencia.

Se han descrito en cítricos 5 especies de viroides (CEVd, CVd-I, HSVd, CVd-III y CVd-IV). El CEVd y determinadas variantes de HSVd inducen enfermedades de importancia económica (exocortis y cachexia) en especies sensibles. La información disponible indica que las otras tres especies y las variantes no virulentas de HSVd inducen distintos grados de enanismo en árboles injertados sobre patrones sensibles, un efecto de interés para el establecimiento de plantaciones de alta densidad, que no ha sido evaluado en las condiciones de cultivo de la Comunidad Valenciana.

Se seleccionaron cepas puras de cada una de las especies de viroides para determinar su efecto en *Poncirus trifoliata*, naranjo amargo y tangelo Orlando. El efecto más interesante se observó en *P. trifoliata* infectado con CVd-III ya que los árboles tenían una altura (76.5%) y volumen de copa (50.4%) significativamente inferiores a los controles, sin ningún otro síntoma asociado a la infección. Este mismo efecto se confirmó en una parcela comercial de naranjo dulce Navelate injertado sobre *P. trifoliata* y una parcela experimental de naranjo dulce Washington Navel injertado sobre citrange Carrizo (*P. trifoliata* × *C. sinensis*) aunque en todos los casos el efecto fue inferior. No se encontraron diferencias significativas entre las distintas cepas de CVd-III incluidas en estos ensayos.

Se procedió a la caracterización molecular de distintas fuentes de CVd-III aisladas en España y en Cuba. Mediante una estrategia de RT-PCR, se sintetizaron cDNAs de los aislados que se ligaron al vector pUC18. Los insertos de los clones obtenidos se amplificaron por PCR y se sometieron a análisis conformacional del DNA monocatenario (SSCP), lo que permitió realizar una primera estimación de la variabilidad e identificar aquellos que contenían las secuencias mas frecuentes. La comparación de las secuencias obtenidas con las secuencias de referencia CVd-IIIa y CVd-IIIb permitió establecer que a diferencia de otros viroides, el CVd-III presenta poca heterogeneidad tanto dentro de un aislado como entre aislados.

P-168

IDENTIFICACIÓN DE RNAs BICATENARIOS EN PALMERAS AFECTADAS POR LA ENFERMEDAD DE LAS HOJAS QUEBRADIZAS

Fadda, Z.¹, Daròs, J.A.², Flores, R.² y Durán-Vila, N.²

¹Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA). 46113 Moncada, Valencia.

²Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas (UPV-CSIC). Universidad Politécnica. Avenida de los Naranjos s/n. 46022 Valencia.

La enfermedad de las hojas quebradizas (“maladie des feuilles cassantes”) de la palmera datilera fue descrita en 1986 en el oasis de Nefta y se ha difundido a prácticamente todos los oasis del Jerid (Túnez). Esta enfermedad se caracteriza por el amarilleamiento progresivo de algunas palmas cuyos folíolos se vuelven translúcidos y quebradizos. En fases avanzadas, los síntomas se manifiestan en todas las palmas y conducen a la pérdida del valor de las palmeras, cuyos dátiles no son comercializables, y en última instancia a la muerte de las mismas. La rápida difusión de la enfermedad en los últimos años está poniendo en peligro la supervivencia de los oasis del sur de Túnez de gran importancia ecológica y económica.

La hipótesis de que estos síntomas obedezcan a causas fisiológicas o a prácticas culturales inadecuadas parece poco probable, pero los esfuerzos dirigidos a encontrar un patógeno (hongo, bacteria, fitoplasma o virus) asociado con las plantas enfermas no han dado resultados. El análisis de preparaciones de ácidos nucleicos mediante dos electroforesis sucesivas en geles de poli(acrilamida) no desnaturalizantes y naturalizantes ha permitido detectar en plantas enfermas dos RNAs, de movilidad similar a las formas circulares de los viroides, que no se detectan en plantas asintomáticas. Sin embargo, dichos RNAs se marcaron radiactivamente con [γ -³²P]ATP y polinucleótido quinasa, indicando que se trata de moléculas lineales. El comportamiento cromatográfico de estos RNAs en celulosa iónica sugirió que podrían ser RNAs bicatenarios (dsRNA), posibilidad que se confirmó mediante digestión con RNasa en alta fuerza iónica. Para determinar su secuencia, los dsRNAs se poliadenilaron en sus extremos 3' con poli-A polimerasa y seguidamente se sintetizó un cDNA por transcripción reversa utilizando el cebador (5'-GCTAGCAAGCTTCTCGACT₁₇-3'). A los cDNAs obtenidos se les incorporó una cola de poli-C en los extremos 3' con transferasa terminal. La síntesis de la segunda hebra y la amplificación del DNA por PCR se efectuó con *Taq* DNA polimerasa y los cebadores (5'-GCTAGCAAGCTTCTCGACTT-3') y (5'-G₂₅N-3', donde N es A, C ó T). Los productos amplificados se ligaron al vector pGEM-T-Easy y se transformaron células competentes. La secuenciación de cinco clones mostró que los RNAs bicatenarios identificados en las palmeras afectadas corresponden a un fragmento del genoma del cloroplasto. Uno de estos clones se utilizó para preparar sondas radiactivas de ambas polaridades que generaron señales de hibridación de intensidad similar con los dsRNAs, confirmando su naturaleza bicatenaria. Estos resultados muestran que los dsRNAs no proceden del agente inductor de la enfermedad sino que más bien son un efecto de la misma.

P169

UNA ENFERMEDAD DE “LES ALFABEGUES DE BETERA” *OCIMUM BASILICUM* PRODUCIDA POR *Fusarium oxysporum*

Cebolla, V.¹ y Asensi, R.²

¹ IVIA Moncada (Valencia), ² Ayuntamiento de Bétera

El cultivo de la albahaca *Ocimum basilicum* para su uso como condimento alimentario se ha extendido recientemente desde Italia a muchos otros países. Sin embargo desde muy antiguo, esta planta se cultiva en algunos pueblos valencianos no ya como comestible sino como ornamental-aromática y sobre todo en las ofrendas florales a la Virgen de la Asunción el 15 agosto. Bétera es uno de los pueblos con mayor tradición ofreciendo además las "Alfàbegues" de mayor tamaño, las cuales llegan a alcanzar frecuentemente los 2m de altura.

El cultivo tradicional se realiza en grandes contenedores de barro profusamente decorados. Como substrato se usa estiércol de oveja, muy descompuesto, sobre el que se hacen germinar un número abundante de semillas. El crecimiento continuado de las plantas se garantiza mediante pinzamientos de las inflorescencias, la posición erecta mediante un entutorado artesanal realizado con cañas e hilo a manera de tela de araña. Los riegos muy frecuentes (varias veces al día) junto a una fertilización orgánica y mineral abundante garantizan un crecimiento rápido

En la primavera de 1997 se detectó una marchitez con necrosis vascular y muerte de planta de donde se aisló *Fusarium oxysporum*. Las pruebas de patogenicidad demostraron la relación clara de este hongo con la enfermedad. Se detectó el hongo en el substrato, en el ambiente pero sobre todo en la semilla. El substrato esterilizado, con semillas desinfectadas con una solución de Cl₂Hg al 0.1% durante 1 minuto resultó suficiente para eliminar el hongo y la enfermedad. Los medios de transmisión de la enfermedad eran por una parte la reutilización de los contenedores, a causa de su coste, y por otra el que en el mismo local se establecía un vivero para seleccionar la semilla para el año siguiente. La manipulación de las semillas después de haber tocado las plantas enfermas aseguraba la infección de la simiente.

En la primavera del 1998 volvió a aparecer la enfermedad, que se intentó controlar mediante tratamientos muy frecuentes al substrato con benomilo con lo que se consiguió llegar a la fecha de la ofrenda con las plantas vivas aunque en un estado deplorable. Finalmente, el cambio de contenedores usados por otros nuevos, similares, de plástico junto a la limpieza y desinfección del local, substrato de cultivo, semillas y una profilaxis adecuada se consiguió un cultivo sano. Paralelamente se realizaron estudios para mejorar el sistema de cultivo, mediante riego localizado y la sustitución de estiércol puro, por fibra de coco, y algunas combinaciones de fibra de coco y turba sphagnum. Solo una de las plantas volvió a presentar síntomas de la enfermedad, pero ya en la etapa final del cultivo, y sin incidencia alguna en el desarrollo de las plantas. Tanto las plantas cultivada en estiércol como las de la fibra de coco crecieron de manera similar, y mejor que las combinaciones con turba. Las plantas este año alcanzaron el récord de 2.27m de altura, recuperándose el esplendor de la fiesta.

P-170

PLANTA ROJA EN EL FRESÓN: IDENTIFICACIÓN DEL PATÓGENO Y EPIDEMIOLOGÍA DE LA ENFERMEDAD.

Maudes, J.¹, Bernal J.J.², Rodríguez Cerezo, E.² y García-Arenal, F.³

¹Viveros El Pinar, c/ Marieles s/n. 40.216 Chañe (Segovia).

²Dpto. de Genética Molecular de Plantas, CNB, CSIC, Campus de Cantoblanco, UAM, 28.049 Madrid.

³Dpto. de Biotecnología, ETSI Agrónomos. UPM, 28.040 Madrid.

En el cultivo de producción de planta de fresón (*Fragaria X ananassa*) en los viveros de las provincias de Ávila, Segovia y Palencia, se puede observar la siguiente sintomatología: las hojas maduras tienden a mostrarse abarquilladas y enrojecidas, el enrojecimiento de las hojas avanza progresivamente desde los bordes hacia el centro, siendo cada vez más intenso, la hoja termina necrosándose y deja de ser fotosintéticamente activas, las hojas jóvenes se caracterizan por ser poco vigorosas, más pequeñas de lo normal (enanismo), de peciolo cortos, el sistema radicular, típicamente fasciculado de una planta sana de fresón, se extrae fácilmente del suelo mostrando una pérdida considerable de raíces secundarias. La planta produce menos estolones y su vida se acorta considerablemente. Esto lleva a una merma considerable del rendimiento del cultivo y a una pérdida importante a nivel económico en dichos viveros. Este síndrome se conoce en la zona como "planta maricona".

La presencia de fitoplasmas se ha encontrado asociada consistentemente con este síndrome. La detección se ha realizado por la técnica de PCR usando cebadores universales que amplifican el ADN ribosómico de fitoplasmas y la región codificante de las proteínas ribosómicas rps 3, rp122 y rp116, de esta misma manera se detectó que en otros cultivos típicos en la zona también se veían infectados (como por ejemplo, la zanahoria), así como en malas hierbas.

La determinación de la secuencia de estas regiones ha permitido identificar el fitoplasma asociado a la planta roja del fresón y sus relaciones con fitoplasmas detectados en otros cultivos de la zona y de otras regiones españolas. La homología es máxima con el subgrupo Strawberry 2 del grupo I de fitoplasmas.

Además, mediante esta metodología se ha puesto a punto un método de diagnóstico que permite la detección precoz, así como la realización de estudios epidemiológicos. Estos se centrarán en la identificación de posibles vectores y huéspedes alternativos.

P-171

DETECCIÓN DE *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib) de Bary EN TUBÉRCULOS DE PATACA

García Benavides, P. Cortés Barbero, J. y Palomo Gómez, J.L.

Centro Regional de Diagnóstico. Consejería de Agricultura y Ganadería. Apdo. 61. 37080 Salamanca.

La pataca o aguaturma *Helianthus tuberosus* L. es una planta herbácea anual de la familia de las compuestas. Su cultivo está prácticamente extinguido, pero en los últimos años se programan, a través del Plan de Experimentación Agraria de la Comunidad Autónoma, experiencias agrícolas por el interés que presentan sus tubérculos ricos en inulina, en fructosa y por la posibilidad de producir etanol.

En una experiencia con trece variedades, se detectaron tubérculos con podredumbre blanda y en algunos presencia de micelio externo. Se efectuaron siembras en medios de cultivo PDA, CMA y MEA.

El aislado fúngico obtenido se ha identificado como grupo *Sclerotinia sclerotiorum* Mordue J. M .M. (1986) en función:

- del color de la masa miceliar
- del color de los esclerocios
- de la distribución de los esclerocios
- del tamaño, forma y estructura de los esclerocios

En nuestras condiciones geográficas la pataca es una planta de reproducción vegetativa, por lo que este patógeno puede suponer un problema dada su alta gama de plantas hospedantes y habrá que tenerlo en cuenta en consideraciones epidemiológicas.

P-172

SECUENCIAS DE FITOPLASMAS DEL DECAIMIENTO DEL PERAL PRESENTES EN EL SUROESTE ESPAÑOL

Martín, R.¹, Carazo, G.¹, Arribas, C.², Colino, I.², Santiago, R.² y de Blas, C.¹

¹ Depto Protección Vegetal. INIA. Carretera Coruña Km 7'5. 28040 Madrid.

² Laboratorio Diagnóstico Servicio Sanidad Vegetal. Consejería de Agricultura. Ctra. de San Vicente 3. 06071 Badajoz.

El decaimiento del peral ("pear decline") es una grave enfermedad asociada a la presencia de fitoplasmas, detectada en Europa y norte América y transmitida por homópteros de la familia *Psyllidae*.

En general, la detección de los fitoplasmas es difícil, debido a su baja concentración e irregular distribución en las plantas hospederas, sobre todo en las leñosas. Actualmente, la técnica más utilizada es la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), debido a su sensibilidad y cada vez mayor conocimiento de las secuencias, que permite diseñar oligonucleótidos cebadores más específicos. Gracias a esta técnica se ha avanzado notablemente en la clasificación de los fitoplasmas, que sitúa el decaimiento del peral en el grupo de las proliferaciones de manzano (AP), junto con el fitoplasma de enrollado amarillo del melocotonero (PYLR) y los fitoplasmas de frutales de hueso europeos (ESFY).

A fin de optimizar los métodos de detección, quisimos saber si las secuencias de los aislados españoles eran similares a las de dos secuencias europeas hasta ahora publicadas, una italiana (nº accesión Y16392) y otra alemana (nº accesión X76425).

Entre mayo y julio de 1999 se muestrearon campos de perales comerciales en los que anteriormente se habían detectado fitoplasmas, en Sevilla (cv. Tosca) y Badajoz (cv. Ercolini), injertados sobre membrilleros o BA-29. Los perales de Sevilla mostraban aproximadamente dos tercios del porte normal, menor follaje, proliferaciones, amarilleamientos y frutos pequeños. Los perales de Badajoz mostraban escasa vegetación, madera y hojas enrojecidas, menor tamaño de hoja, entrenudos cortos y debilitamiento generalizado. Se realizaron extracciones de DNA y se llevaron a cabo hibridaciones *dot blot* con sondas de oligonucleótidos biotiniladas y utilizando el kit de detección de quimioluminiscencia ECL (Amersham). También se realizó *nested* PCR: una primera PCR con los oligonucleótidos conservados P1/Tint (amplifican aprox. 1600 nt) y la segunda con f01/r01 (amplifican aprox. 1100 nt). De los 15 árboles muestreados en Badajoz y 7 en Sevilla, fueron positivos por alguna de las técnicas 10 (66'6%) y 4 (57'1%), respectivamente. La discriminación de muestras positivas fue superior utilizando la PCR, puesto que las hibridaciones con sondas biotiniladas dieron unas señales muy bajas. Se secuenciaron directamente productos f01/r01 de PCR de dos muestras de cada zona. Las cuatro muestras mostraron más de un 96% de homología con las secuencias alemana e italiana. Se compararon con las secuencias de otros aislados del grupo de las proliferaciones del manzano y se realizaron árboles filogenéticos.

P-173

ESTUDIO DE LA DIVERSIDAD GENÉTICA DE POBLACIONES ESPAÑOLAS DE *Monilinia laxa*

Gell, I., Larena, I., y Melgarejo, P.

Dept. de Protección Vegetal. Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria. Carretera de la Coruña km. 7. Madrid 28040.

Monilinia laxa es el hongo fitopatógeno causante de la podredumbre parda y momificado de fruta de hueso. También causa marchitamiento de flores y brotes y chancros en ramas. En años favorables para su desarrollo ocasiona graves pérdidas en las plantaciones. La epidemiología de la enfermedad ha sido poco estudiada en España y estudios de diversidad genética de sus poblaciones pueden aclarar aspectos importantes de ésta.

La diversidad genética y la estructura de la población de *Monilinia laxa* en España se ha estudiado usando marcadores moleculares RAPDs debido a que no se tenía información previa del genoma del hongo. Inicialmente se han determinado las condiciones de la PCR en las que se obtenían mejores resultados. Para ello se utilizaron dos aislados (ES-37 y T-5). Las condiciones estándar fueron: una desnaturalización inicial a 94 °C durante 6 minutos, seguida de desnaturalización a 94 °C durante 1 minutos, anillamiento a 38 °C durante 2 minutos y extensión a 72 °C durante 2 minutos. La amplificación se terminó a una extensión final de 5 minutos a 72 °C.

Una vez establecidas las condiciones estándar se realizó un screening con esos mismos dos aislados de *M. laxa* y con 40 cebadores pertenecientes a las series B y D de Operon Technologies Inc. Se han seleccionado los cebadores OPB-06, OPB-08, OPD-05, y OPD-19, con los que se obtenían bandas polimórficas en los aislados estudiados. Se han obtenidos 10 marcadores polimórficos y 11 monomórficos.

Con estos marcadores se han analizado 22 aislados procedentes de 7 huertos comerciales de diferentes zonas de cultivo de frutales de hueso en España. Se discuten los resultados obtenidos en relación con la epidemiología de la enfermedad.

P-174

VARIABILIDAD MOLECULAR DEL VIRUS DEL MOSAICO ENANIZANTE DEL MAÍZ (MDMV)

Sobreperere, M. y Achón, M.A.

Area de Protecció de Conreus, Centre UdL-IRTA Alcalde Rovira Roure 177, E-25198 Lleida.

El virus del mosaico enanizante del maíz (Maize dwarf mosaic potyvirus, MDMV) es endémico en los cultivos de maíz en Cataluña, con una incidencia constante en el tiempo superior al 20%. La información disponible sobre la variabilidad de MDMV es muy limitada, especialmente de aislados de campo. El análisis de restricción de 1200 p.b. de la región 3' del ARN genómico de más de 300 aislados obtenidos de maíz y *Sorghum halepense* durante varios años consecutivos indica que esta variabilidad es elevada. Los aislados estudiados se pueden clasificar en más de 20 grupos distintos, aunque el 80% de los aislados pertenecen a cuatro grupos. De las seis secuencias de restricción analizadas, dos se hallan presentes en más del 60% de los grupos y se mantienen en el tiempo y, es en una de estas secuencias donde se ha determinado el mayor polimorfismo. Hay grupos poco frecuentes pero que se mantienen a lo largo de los años. En general, se ha observado una buena concordancia entre los aislados recogidos en primavera y los recogidos en verano, así como también entre los obtenidos de *S.halepense* y los de maíz.

P-175

ESTUDIO DE LA VARIABILIDAD GENÉTICA DE *Phytophthora cinnamomi* Rands MEDIANTE RAPD

Rodríguez Pérez, A.¹, Siverio de la Rosa, F.², Grajal Martín, M.J.³ y Gallo Llobet, L.¹

¹Dpto. Protección Vegetal del Instituto Canario de Investigaciones Agrarias (I.C.I.A.), Apartado 60, 38200 La Laguna-Tenerife, Islas Canarias.

²Dirección Gral. de Desarrollo Agrícola de la Consejería de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentación del Gobierno de Canarias.

³Dpto. Fruticultura Tropical del Instituto Canario de Investigaciones Agrarias (I.C.I.A.), Apartado 60, 38200 La Laguna-Tenerife, Islas Canarias.

La podredumbre de la raíz en aguacate es un problema de amplia distribución que ha frenado el desarrollo del cultivo en todos los países productores. La enfermedad, causada por *Phytophthora cinnamomi*, ocasiona una disminución en el peso y la calidad del fruto, además de terminar matando al árbol. El objetivo de este trabajo ha sido determinar la variabilidad genética del patógeno, utilizando para ello amplificaciones al azar de ADN polimórfico (RAPD).

Se utilizaron 22 aislados, 12 de *Phytophthora cinnamomi* y 10 de otras especies de *Phytophthora* pertenecientes a los grupos II, III, V y VI definidos por G. Waterhouse en 1963. Se incluyeron cepas de *Phytophthora cinnamomi* de diverso origen geográfico (Canarias, Península, Europa y California) así como del tipo A1 y A2. La mayoría de los aislados provenían de aguacate, incluyéndose también aislados de otros hospedadores como la viña y el roble. De los 40 iniciadores probados se seleccionaron los 15 que dieron mejores amplificaciones.

Los resultados obtenidos indican que los aislados de *Phytophthora cinnamomi* utilizados son muy similares, siendo claramente distinguibles mediante RAPD del resto de los aislados de las otras especies del género *Phytophthora* utilizadas. Los dos aislados de las variedades *parasitica* y *nicotianae*, ambas pertenecientes a la especie *Phytophthora parasitica*, dieron amplificaciones similares, siendo indistinguibles con los iniciadores ensayados. Estos resultados son consistentes con los descritos en la bibliografía que indican una gran homogeneidad genética dentro de la mencionada especie, incluyendo a las dos variedades existentes. Dentro del grupo de *Phytophthora cinnamomi* hay poco polimorfismo, observándose marcadores específicos únicamente en tres de los aislados utilizados, sin que esta variabilidad pueda asociarse al hospedador, origen geográfico o tipo.

P-176

ENSAYO DE DETECCIÓN DE ACTIVIDADES ENZIMATICAS SIMPLES DE HONGOS DEL AZULADO POR EL METODO API ZYM

Troya, M.T., Llinares, F., Muñoz-Mingarro, D., Pozuelo, M.J., Acero, N., Rodríguez-Borrajo, C. y Navarrete, A.

Univ. San Pablo CEU, Apdo. 67, 28668-Boadilla del Monte, Madrid (Spain)

CIFOR-INIA, Apdo. 8111, 28080-Madrid (Spain)

El azulado producido en monte sigue siendo un problema en los países de clima templado. Se ha observado en la práctica selvícola de determinadas áreas geográficas españolas, que los productos antiazulado no siempre son eficaces, pues su poder fungicida varía en ocasiones en función de la especie de madera y microbiota existente en la región. No siempre es fácil identificar las especies causantes de este daño, por lo que el objetivo de este trabajo ha sido el agrupamiento de diversos aislados en función de la detección de actividades enzimáticas sencillas siguiendo un método de fácil y rápida aplicación como es el API-ZYM.

Se han ensayado 36 cepas de *Ceratocystis* spp. aisladas en diversas especies de *Pinus* sp., cuyos resultados se contrastaron con las actividades detectadas en las mismas condiciones de *Pullularia pullulans* y *Sclerophoma pityophila*. Para ello, se inocularon dichas cepas en medios de cultivo con solución salina base de Eggins y Pugh adicionados con serrín de *Pinus sylvestris* al 1 % en una serie, y otra con una mezcla de los monosacáridos más frecuentes en las células leñosas (glucosa, manosa, galactosa, arabinosa y xilosa) al 1 %. Los extractos centrifugados tras 20 días de incubación, se inocularon en las galerías del API-ZYM.

El análisis de los componentes principales realizado con los resultados obtenidos mostró que el serrín induce actividades enzimáticas implicadas en la degradación de polisacáridos, como la α -manosidasa, α -galactosidasa, β -glucuronidasa, β -glucosidasa y β -galactosidasa, que aparecieron como los factores de mayor peso específico en la dispersión de datos sobre los dos ejes principales primeros. También se observó que diversas cepas de *Ceratocystis* mostraron actividades similares o mayores a las de *P. pullulans* y *S. pityophila*, lo que sugiere que éstas podrían presentar mayor virulencia que el resto de las cepas ensayadas.

P-177

CARACTERIZACIÓN DE LAS POBLACIONES DE *Fusarium* Link DE SUELOS DE DEHESA DE EXTREMADURA

Rodríguez-Molina, M.C.¹, Torres-Vila, L.M.¹, Tello Marquina, J.C.², Blanco Santos, A.¹ y Palo Núñez, E.J.¹

¹Departamento de Fitopatología. Servicio de Investigación y Desarrollo Tecnológico (SIA). Finca La Orden. Apartado 22, 06080 Badajoz.

²Departamento de Biología Vegetal, Producción Vegetal y Ecología. Universidad de Almería. Escuela Politécnica Superior. La Cañada de San Urbano, 04120 Almería.

El género *Fusarium* Link es ampliamente conocido debido, fundamentalmente a las graves enfermedades que algunas de sus especies causan en los cultivos. Aunque se han realizado algunos estudios comparativos sobre la abundancia y distribución de las distintas especies de *Fusarium* en suelos cultivados y no cultivados, en realidad poco se conoce sobre este aspecto. El papel que desempeñan los *Fusaria* en los ecosistemas de suelos no cultivados podría ser diferente al desempeñado en los suelos de cultivo. Aunque las dehesas pueden representar áreas perturbadas, normalmente no están sometidas a la misma acción antrópica que las zonas de cultivo agrícola, y la micoflora de sus suelos es similar a la de los de áreas no cultivadas.

Con el objeto de caracterizar la flora fusárica de los suelos de dehesas de Extremadura se realizó una prospección en 18 dehesas de Badajoz con arbolado de encina.

Para la cuantificación de las especies de *Fusarium* presentes en las muestras de suelo se utilizó el medio selectivo de Komada, y la identificación específica se realizó según la sistemática de Messiaen y Cassini.

En todos los suelos estudiados estuvo presente el género *Fusarium*, con densidades de población total oscilando entre 2357 y 33624 u.f.c./g de suelo. Las densidades fueron en general elevadas, ya que en tan sólo 5 de los suelos muestreados fueron inferiores a 10000 u.f.c./g de suelo. Las especies aisladas fueron *F.oxysporum*, *F.roseum* y *F.solani*. *F.oxysporum* fue la especie predominante en la mayoría de las muestras, llegando a representar hasta el 98% de la población en algunas de ellas. Sin embargo, en 2 de los suelos muestreados esta especie se vio desplazada por *F.roseum*, que llegó a representar en estos casos más del 60% de la población total. *F.solani* tan sólo estuvo presente en 7 de las muestras, y en todas ellas en una densidad muy baja, no superior a 8 u.f.c./g de suelo.

El hecho de que el género *Fusarium* estuviera presente en todos los suelos muestreados y con unas densidades de población considerables en muchos de ellos sugiere que los *Fusaria* son pobladores naturales de los suelos de dehesa en Extremadura.

P-178

CARACTERIZACIÓN BIOLÓGICA Y MOLECULAR DE CEPAS DE *Sphaerotheca fusca* AISLADAS DE CUCURBITÁCEAS EN EL SUR DE ESPAÑA

Del Pino, D.^{1,2}, Olalla, L.¹, Cánovas, I.¹, Pérez García, A.², García, S.³, de Vicente, A.² y Torés, J.A.¹

¹ Estación Experimental “La Mayora”. CSIC. Algarrobo, Málaga.

² Departamento de Microbiología, Facultad de Ciencias, Universidad de Málaga.

³ Departamento de Sanidad Vegetal. Junta de Andalucía. Málaga.

El cultivo de cucurbitáceas es una actividad que posee gran importancia económica en Andalucía. El oídio es una enfermedad causada fundamentalmente por *Sphaerotheca fusca* que produce importantes pérdidas en cultivos de cucurbitáceas en el sur de España, sobre todo en melón. En campo la enfermedad se controla mediante la continua aplicación de diferentes fungicidas durante todo el periodo de cultivo.

El objetivo de nuestro estudio es caracterizar cepas aisladas en las provincias de Almería y Málaga de cultivos tanto al aire libre como en invernadero. Se dispone de cepas aisladas desde el año 1993 y se continúan actualmente aislando. Se obtienen aislados monospóricos sobre cotiledones de melón cv Iran-H en medio de Bertrand, que se mantienen por transferencia de conidios a material vegetal fresco una vez al mes y/o se conservan congeladas a -80°C . Dicha caracterización permitirá obtener información de interés epidemiológico y útil para el diseño de estrategias de control. Entre las características biológicas que se están estudiando:

Establecimiento de razas según la clasificación de Pitrat, empleando los genotipos de melón PMR 6, PMR 45, WHR 29, PI 124112, PI 414723, Edisto 47 y Rochet que permiten diferenciar 7 razas diferentes.

También se realizan ensayos para determinar el espectro de huésped de nuestros aislados empleando diferentes cultivares de varias cucurbitáceas: calabaza, calabacín, sandía, pepino y melón, siendo el calabacín la especie más susceptible a los aislados ensayados.

La compatibilidad sexual se estudia enfrentando cada uno de nuestros aislados con las cepas de referencia de diferente tipo de compatibilidad sexual para determinar con cuál de ellas se observa la formación de cleistotecios.

En relación con la sensibilidad de los diferentes aislados frente a fungicidas antioídio se han empleado varios métodos tanto “in vitro” como en campo observándose resistencia en algunas de las cepas estudiadas.

Además se ha empezado a realizar una aproximación molecular a la caracterización de dichas cepas mediante la puesta a punto de métodos de RAPD-PCR que más adelante podría completarse con el empleo de secuencias específicas o cebadores no al azar.

P-179

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DEL VIRUS DEL MOSAICO DEL NABO (TuMV) MEDIANTE RESTRICCIÓN DEL GENOMA TOTAL.

Wuang , X.¹, Gallego, F.J.¹, Sánchez, F.¹, Dopazo, J.², Núñez-Moreno, Y.¹ y Ponz, F.¹

¹Departamento de. Mejora Genética y Biotecnología. Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA). Autovía A-6, Km 7,5, 28040 Madrid.

²Glaxo Wellcome S.A. Apartado de Correos 36094. 28080 Tres Cantos. Madrid.

El virus del mosaico del nabo es uno de los virus vegetales que más daños producen en cultivos hortícolas en el mundo. Es un virus extremadamente variable en sus propiedades patogénicas y serológicas, siendo de extrema importancia su caracterización con criterios genéticos. En este sentido, hay estudios centrados en el análisis del gen de la proteína de la cápsida (CP) y en la región 3'-UTR. En este trabajo se presenta un nuevo sistema para el análisis genético de la práctica totalidad del genoma viral.

El método está basado en la inmunocaptura y RT-PCR de una región de 9,4 Kb del genoma de TuMV (96% del genoma total) y su posterior digestión con la enzima *Msel*. A los fragmentos resultantes se les liga un adaptador marcado con fluorescencia, pudiendo de este modo separarlos mediante electroforesis capilar. Como control de la fiabilidad de la metodología se empleó el aislado UK1 y un clon infectivo, construido a partir de UK1, mostrando ambas muestras idéntico patrón de bandas. En los once aislados estudiados se detectaron un total de 165 fragmentos de ADN, con un elevado número de fragmentos específicos de aislado.

Con estos datos se pudieron calcular las distancias genéticas entre aislados y realizar agrupamientos. La comparación de estos resultados con los obtenidos por análisis de restricción del gen CP puso de manifiesto una baja correlación entre ambos (0.6500). La mayor capacidad de resolución con el estudio del genoma total quedó demostrada al poder diferenciar con este método aislados que tenían idéntico patrón de bandas por análisis del gen CP. Estos resultados demuestran que la caracterización molecular con un pequeño porcentaje del genoma del virus no es representativa la variación genética total.

La potencialidad de esta nueva herramienta de análisis molecular y su utilidad para detectar recombinantes son también aspectos que serán discutidos en este trabajo.

P-180

EL POTYVIRUS DEL MOSAICO DEL NABO: TAXONOMÍA Y CORRELACIÓN CON SÍNTOMAS INDUCIDOS EN *Arabidopsis thaliana*

Sánchez, F.¹, Wang, X.¹, Jenner, C.², Walsh, J.² y Ponz, F.¹

¹ Dpto. Mejora Genética y Biotecnología. INIA. Madrid. España.

² Horticulture Research International, Wellesbourne, Warwick, UK.

El potyvirus del mosaico del nabo (TuMV) tiene una gama de huéspedes muy amplia, incluyendo más de 300 especies de plantas y muestra un gran nivel de variabilidad a nivel biológico, serológico y de patotipos. Se ha abordado la taxonomía molecular de este virus en una colección de aislados en la que están representados diversos orígenes geográficos y diversas familias de plantas como huésped original de los aislados. Se presentarán los resultados correspondientes a dicha taxonomía molecular.

TuMV infecta el huésped modelo *Arabidopsis thaliana*. La inoculación de diversos ecotipos de *Arabidopsis* con diversos aislados del virus indica una correlación entre el tipo de síntomas inducidos y la raza genética del aislado viral. La disponibilidad de un clon infectivo de TuMV permitirá el mapeo de determinantes virales implicados en la inducción diferencial de síntomas.

P-181

CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA Y PATOGENICA DE AISLADOS DE *Colletotrichum* CAUSANTES DE LA ACEITUNA JABONOSA EN ANDALUCÍA

Bouhmidi, K., Luque F. y Trapero, A.

Dpto. de Agronomía, ETSIAM, Universidad de Córdoba. Apdo. 3048, 14080 Córdoba.

Durante el período otoño-invernal de los años 1996-98 se han registrado fuertes ataques de la enfermedad conocida como antracnosis o aceituna jabonosa en varios cultivares de olivo en Andalucía. El carácter ocasional de estas epidemias ha motivado que apenas existan estudios sobre esta enfermedad. En este trabajo se ha realizado la caracterización morfológica, cultural y patogénica de los aislados de *Colletotrichum* obtenidos de aceitunas y ramas de olivos afectados en diferentes comarcas olivareras andaluzas.

Para la caracterización morfológica y cultural, se han utilizado 27 aislados de olivo que se compararon con 4 aislados de referencia: *C. acutatum*, *C. fragariae* y dos de *C. gloeosporioides*. Se evaluaron diversos caracteres morfológicos (micelio, colonia, acérvulos, clamidosporas, conidias y apresorios), así como el crecimiento a diferentes temperaturas y la sensibilidad a fungicidas. Los resultados de este estudio han puesto de manifiesto que los caracteres morfológicos y culturales son insuficientes para separar claramente a los aislados. No obstante, 26 de los 27 aislados podrían identificarse como *C. acutatum* y el aislado restante como *C. gloeosporioides*, atendiendo a la forma y tamaño de la conidias. Los 27 aislados tuvieron un patrón similar de crecimiento a diferentes temperaturas, con un intervalo de 10-30 °C, temperatura óptima de 21.8 °C y una tasa máxima de crecimiento de 6.2 mm/día. Estos datos difirieron notablemente de los aislados de referencia, que presentaron una mayor tasa de crecimiento, sobre todo a altas temperaturas. La sensibilidad al fungicida benomilo no varió para dos aislados seleccionados de *C. acutatum* y *C. gloeosporioides*.

Con estos dos aislados seleccionados se realizó el estudio de patogenicidad en aceitunas y en plántones jóvenes. La infección de las aceitunas por los dos aislados de *Colletotrichum* aumentó notablemente al avanzar la maduración y con la presencia de heridas en los frutos. Estos factores modificaron totalmente la susceptibilidad de los cultivares. De los tres cultivares ensayados, 'Picual' resultó resistente, 'Hojiblanca' susceptible y 'Picudo' muy susceptible, cuando se evaluaron las aceitunas inmaduras sin heridas; pero los tres cultivares resultaron muy susceptibles al evaluar las aceitunas maduras o heridas. Los dos aislados de *Colletotrichum* infectaron hojas y tallos de los plántones jóvenes de olivo inoculados, pero apenas produjeron síntomas, aunque se mantuvieron en los tejidos infectados durante más de 1 año.

P-182

CARACTERIZACIÓN GENÉTICA DE AISLADOS ESPAÑOLES DE *Erwinia amylovora*

Rico, A., Ortiz, A. y Murillo, J.

Laboratorio de Patología Vegetal. Depto. de Producción Agraria, Universidad Pública de Navarra, 31006 Pamplona.

Erwinia amylovora es el agente causal del Fuego Bacteriano, enfermedad que afecta gravemente a diversas especies de rosáceas, y que produce pérdidas económicas de importancia en peral y manzano. Esta enfermedad es altamente contagiosa, ocasiona la muerte progresiva de las variedades sensibles y es de difícil control una vez que se ha introducido en una zona. Desde que en 1995 se detectara por primera vez en España, han sido numerosos los focos encontrados, principalmente en la zona del noreste español. Se considera que la causa más importante de dispersión de la enfermedad, tanto a largas como a cortas distancias, es debida al transporte de material vegetal infectado, aunque no se conoce con certeza cuál es la contribución de ésta y otras vías a la diseminación del patógeno. Las técnicas genómicas basadas en la PCR, (como RAPD, PCR-ribotyping, rep-PCR y PFGE) se han revelado como herramientas útiles en la caracterización genética de diversas enfermedades bacterianas y se están aplicando actualmente para los estudios epidemiológicos de este patógeno. Aunque estas técnicas han puesto de manifiesto que *E. amylovora* es genéticamente muy homogénea, la técnica de PFGE ha permitido diferenciar y agrupar aislados. Debido a su alta sensibilidad, nuestro grupo ha abordado la técnica de AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) para caracterizar un grupo de cepas de distintos orígenes geográficos, huéspedes y año de aislamiento. Atendiendo a la reproducibilidad de las amplificaciones y a su aptitud en la producción de polimorfismos, se seleccionaron cuatro combinaciones de cebadores *EcoRI/MseI* con una sola extensión nucleotídica a partir de 30 combinaciones examinadas. Se obtuvieron entre 40 y 127 bandas por combinación, siendo el número de bandas por cepa muy variable, de forma que prácticamente se obtuvo un patrón característico con cada cepa. Se creó una matriz de datos binarios en las que se anotó la presencia y ausencia de cada banda en cada cepa y mediante el coeficiente de Jaccard se obtuvo una matriz de disimilaridad. El análisis de clusters se realizó aplicando el algoritmo UPGMA (Unweighted Pair Group Arithmetic Method) y se construyó un dendrograma. Las cepas examinadas provenían de peral, manzano, *Rubus* spp. y de otras especies ornamentales. No se observó correlación entre grupos genómicos y huésped de aislamiento, excepto en las cepas aisladas de *Rubus* spp., que, como han descrito otros autores, formaron un grupo claramente diferenciado. La técnica de AFLP ha permitido la discriminación de cepas supuestamente muy homogéneas y se constata que los aislados españoles no parecen tener un mismo origen. Por tanto la combinación de los datos obtenidos por esta técnica junto con la información obtenida por PFGE nos permitirá analizar con alta fiabilidad las vías de dispersión del patógeno.

P-183

EVALUACIÓN DE LA VARIABILIDAD GENÉTICA DE *Plectosporium tabacinum* MEDIANTE AFLP Y SECUENCIACIÓN

Pérez-Piqueres, A.¹, Palm, M.E.², Castlebury, L.A.², O'Neill, N.R.³, Abad, P.¹ y García-Jiménez, J.¹

¹Patología vegetal. Dpto. Producción Vegetal. Universidad Politécnica de Valencia. Camino de Vera s/n. 46022. Valencia.

²USDA. Systematic Botany and Mycology Laboratory. Beltsville. Maryland 20705-2350.

³USDA. Soybean and Alfalfa Research Laboratory. Beltsville. Maryland 20705-2350.

Plectosporium tabacinum (van Beyma) M.E. Palm, W. Gams et Nirenberg es un hongo que se aísla frecuentemente de plantas de melón afectadas por el síndrome denominado "colapso" o "muerte súbita del melón". Se trata de una especie con morfología variable que además cuenta con un amplio rango de hospedantes y distribución geográfica.

Con el objetivo de determinar su variabilidad genética se realizó el análisis de 40 aislados empleando la técnica Amplified Fragment Length Polymorphism DNA fingerprinting (AFLP). Para ello el DNA fue digerido con las enzimas *EcoRI* y *MseI* y tras la unión de adaptadores se realizó una amplificación selectiva con los primers *EcoRI*+AG y *MseI*+C. Los productos resultantes de la PCR fueron separados de acuerdo a su tamaño en un gel de poliacrilamida. En base a las bandas obtenidas se construyó un árbol de semejanza mediante el método de reconstrucción filogenética UPGMA (Unweighted Pair-Group Method with Arithmetic Average).

Los numerosos fragmentos resultantes y el bajo porcentaje de similitud encontrado, sugerían la posibilidad de que se trataran de diferentes especies en lugar de distintos aislados pertenecientes a una sola especie.

Para aclarar este punto se secuenció la región ITS (Internal Transcribed Spacer) del DNA ribosómico. Esta región ha sido empleada en numerosos hongos en estudios evolutivos a nivel de especie. Las secuencias de las regiones ITS1 e ITS2 así como del gen 5.8s se obtuvieron empleando los primers ITS4 e ITS5. A partir de las secuencias alineadas se construyó un dendrograma empleando el método de Neighbor Joining, comprobando su fiabilidad por el método bootstrap.

Los resultados obtenidos parecen indicar que se trata de una sola especie, pero el bajo número de sitios informativos encontrados no permite subagrupar los aislados de forma fiable. Para conocer la relación existente entre ellos sería interesante realizar análisis adicionales como, por ejemplo, la secuenciación de otras regiones del genoma que evolucionen más rápido.

P184

VARIABILIDAD DEL VIRUS DEL MOTEADO SUAVE VERDE DEL TABACO EN POBLACIONES NATURALES DE *Nicotiana glauca*

Obies, C.I.¹, Malpica, J.M.², García-Arenal, F.¹ y Fraile, A.¹

¹Dpto. de Biotecnología, E.T.S.I. Agrónomos, Avda Complutense s/n, 28040 Madrid.

²Área de Biología Molecular y Virología Vegetal, Centro de Investigación y Tecnología, Instituto Nacional de Investigaciones Agrarias, Ctra de La Coruña km.7, 28040 Madrid.

El *Virus del moteado suave verde del tabaco* (TMGMV) pertenece al Género de los *Tobamovirus*, virus tubulares de plantas con un genoma consistente en una cadena de RNA de sentido positivo. TMGMV se encuentra infectando poblaciones silvestres de *Nicotiana glauca*, un arbusto nativo de Sudamérica que es subespontáneo en la mayoría de las regiones del mundo con clima árido o mediterráneo. En nuestro laboratorio se han realizado con anterioridad estudios poblacionales de este virus en los que se mostró su poca variabilidad genética. Por otra parte, el análisis de una amplia colección de aislados de *N. Glauca* procedentes de la región sureste de Australia, permitió concluir que TMGMV habría desplazado al *Virus del mosaico del tabaco* (TMV) de dicha población, a lo largo de una convivencia de 100 años.

Se ha caracterizado una colección más amplia de aislados de TMGMV que incluye otras regiones con el objeto de analizar dos puntos relevantes para entender la evolución de este virus: el efecto de cuellos de botella en la colonización de una nueva área, y la posibilidad de selección positiva. Estos aspectos no se habían podido resolver con los datos anteriores.

Además, se ha analizado una población viral procedente de *N. glauca* del Oeste de Australia. En ella coexiste TMGMV con un tobamovirus no descrito. Con este material se han analizado los factores que llevan a la coexistencia de estos dos virus, en vez de a la extinción de uno de ellos por fusión mutacional o por desplazamiento competitivo.

P-185

ESTIMACIÓN DE LA DIVERSIDAD GENÉTICA DE *Botrytis cinerea* POR RAPDs Y AFLPs.

Moyano, C¹., Alfonso, C¹., Gallego, J. ², Raposo, R. ¹, Torres, V. ² y Melgarejo, P.¹

¹ Dept. de Protección Vegetal, ² Dept. de Biotecnología. Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria. Madrid 28040.

La diversidad genética y la estructura de la población de *Botrytis cinerea* en Almería se ha estudiado usando marcadores moleculares RAPDs y AFLPs. Se utilizaron 44 aislados procedentes de 6 invernaderos comerciales con diferentes cultivos hortícolas, 79 marcadores RAPDs (46 polimórficos y 33 monomórficos), y 152 marcadores AFLPs (47 polimórficos y 105 monomórficos).

El análisis de la estructura poblacional de *B. cinerea* reveló que la diversidad genética dentro de las subpoblaciones (invernaderos) representa un 96% de la diversidad genética total, mientras que la diversidad genética entre subpoblaciones solamente supone un 4 % de la total, tanto si se analiza con marcadores RAPDs o con AFLPs. La magnitud relativa de diferenciación genética entre subpoblaciones, G_{ST} , es muy parecida tanto si se estima por marcadores RAPDs (0.036) como AFLPs (0.039). Sin embargo la diversidad genética total (H_T) es de 0.41 cuando se estima con marcadores RAPDs, y de 0.20 por AFLPs.

Se generaron dendrogramas por el método UPGMA basados en las matrices de distancia calculadas con el coeficiente de similitud de Dice. El dendrograma generado con marcadores RAPDs mostró una mayor variabilidad en los aislados que el generado con AFLPs.

Se discute la importancia relativa de las diferentes fuerzas evolutivas en la población de *B. cinerea* de Almería, junto con las implicaciones para el manejo de la podredumbre gris.

P-186

SECUENCIAS DEL GEN P23 DEL VIRUS DE LA TRISTEZA DE LOS CÍTRICOS SE AGRUPAN SEGÚN LA PATOGENICIDAD DE LOS AISLADOS

Sambade, A.¹, López, C.², Flores, R.², Guerri, J.¹ y Moreno, P.¹

¹Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias, Apto. Oficial, Moncada, Valencia,

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

El genoma del virus de la tristeza de los cítricos (CTV) (familia Closteroviridae, género Closterovirus) es un RNA monocatenario de polaridad positiva con 12 marcos de lectura abierta (ORFs) y capacidad para codificar al menos 17 proteínas. Entre éstas, la poliproteína p349 está relacionada con la replicación del virus, las proteínas p25 y p27 forman parte de la cápsida, y la p65 tiene similitudes con las proteínas de choque térmico HSP70. Recientemente, se ha demostrado que la proteína p23 tiene una estructura del tipo “dedo de zinc” adyacente a una región básica, que es característica de proteínas que se unen a ácidos nucleicos. Se ha demostrado además que p23 presenta capacidad de unión a RNA *in vitro* (López *et al.*, 2000. *Virology* 269, 462-470).

Los aislados de CTV difieren ampliamente en sus características biológicas y en particular en el tipo e intensidad de síntomas que causan en distintas especies de cítricos. Sin embargo, hasta la fecha no se ha identificado ningún determinante molecular de patogenicidad. En este trabajo se comparó la secuencia mayoritaria del gen p23 de 19 aislados de CTV pertenecientes a distintos biogrupos según su patogenicidad en un panel de especies indicadoras.

Para ello se diseñaron cebadores basados en secuencias conservadas del gen p23 en distintos aislados, y los cDNAs obtenidos mediante RT-PCR se clonaron en un plásmido. Con el fin de seleccionar los clones correspondientes a la secuencia mayoritaria se analizaron mediante SSCP (polimorfismo conformacional de DNA monocatenario) al menos 10 clones por aislado.

El análisis de la secuencia de los clones mayoritarios de los distintos aislados puso de manifiesto que el dominio implicado en la unión a RNAs (tanto los aminoácidos básicos como los que forman el 'dedo de zinc') están conservados en todos los casos. Por otra parte, se identificaron dos regiones cuya secuencia permite clasificar los aislados en tres grupos: 1) Aislados que producen síntomas en lima Mexicana y decaimiento de plantas sobre patrón naranjo amargo. 2) Aislados que producen, además, acanaladuras en la madera de pomelo o naranjo dulce. 3) Un grupo reducido de aislados atípicos, algunos de los cuales producen amarilleamiento en plantas de semilla de pomelo o naranjo amargo. Las diferencias de secuencia observadas permiten la identificación selectiva de los aislados comunes de la zona mediterránea, que sólo producen decaimiento de los árboles sobre patrón amargo, de aquellos que causan daños directos en las variedades con independencia del patrón.

P-187

VIROIDE DEL MOSAICO LATENTE DEL MELOCOTONERO: NUEVAS VARIANTES DE SECUENCIA DE DOS AISLADOS ITALIANOS

Malfitano, M.¹, Di Serio, F.¹, Covelli, L.¹, Ragozzino, A.², Hernández, C.¹ y Flores, R.¹

¹Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas (UPV-CSIC). Universidad Politécnica. Avenida de los Naranjos s/n. E-46022 Valencia. ²Dipartimento di Arboricoltura, Botanica e Patologia Vegetale. Università di Napoli, I-80055 Portici, Italia.

La enfermedad del mosaico latente del melocotonero está causada por un viroide (peach latent mosaic viroid, PLMVd) y se halla muy difundida en las áreas del mundo en que se cultiva este frutal, entre ellas la cuenca mediterránea. El término "latente" hace referencia por una parte a que la mayoría de las infecciones naturales transcurren sin inducir síntomas foliares aparentes y, por otra, a que las primeras alteraciones patológicas se presentan transcurridos al menos dos años después de efectuada la plantación con material infectado. Sin embargo, ocasionalmente se observan síntomas en hojas consistentes en un típico mosaico amarillento cremoso que en algunos aislados agresivos llegan a ser clorosis que cubren toda la superficie foliar ("calico") o necrosis de los márgenes de las hojas. En trabajos previos hemos clonado y secuenciado el PLMVd a partir de aislados franceses que inducen el mosaico característico en el melocotonero de semilla GF305, o que infectan de manera asintomática este indicador (Hernández y Flores, R. *PNAS USA* 89, 3711-3715, 1992; Ambrós *et al.*, *J. Virol.* 72, 7397-7406, 1998).

Con el fin de ampliar estos estudios sobre la variabilidad del PLMVd, estamos procediendo a caracterizar dos aislados italianos, el primero mostrando una sintomatología de tipo "calico" y el segundo de mosaico amarillo en las hojas de las variedades de melocotonero de donde se han obtenido. El análisis de la estructura primaria de 16 variantes de secuencia del "calico" y de 8 del mosaico amarillo, obtenidas mediante RT-PCR con dos parejas de cebadores adyacentes y de polaridad opuesta en cada pareja, ha mostrado un gran número de posiciones polimórficas, destacando en algunas variantes del "calico" una inserción de 12-13 nt. La heterogeneidad de secuencia observada no afecta a una serie de restricciones previamente propuestas para este viroide, que incluyen la estabilidad de las estructuras ribozimáticas de cabeza de martillo que median la segunda etapa del ciclo replicativo, la estructura global ramificada, y una interacción de tipo pseudonudo. Esto se debe a que las mutaciones ocurren en los bucles, o a que son compensatorias cuando afectan a tramos de doble hélice. El análisis filogenético ha permitido distinguir cuatro grupos en el aislado "calico" y tres en el mosaico amarillo, cada uno de ellos caracterizado por cambios informativos específicos. Bioensayos en curso sobre GF305 muestran que la inoculación con RNAs obtenidos por transcripción *in vitro* de plásmidos recombinantes conteniendo insertos diméricos en tándem, dan lugar en la mayoría de los casos a infecciones, que en el caso de una variante del aislado "calico" con una inserción de 12 nt reproduce esta sintomatología. La posibilidad de que la asociación entre el fenotipo de "calico" y la inserción refleje una relación causal entre ambas se está estudiando actualmente.

P-188

VARIABILIDAD POBLACIONAL EN PEPINO DE LAS VARIANTES DEL VIROIDE DEL ENANISMO DEL LÚPULO (HSVd) AISLADAS EN CÍTRICOS

Romero-Durbán, J. y Duran-Vila, N.

Dpto. de Protección Vegetal y Biotecnología. Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias. Apartado Oficial. 46113 Moncada (Valencia).

Las dos variantes del viroide del enanismo del lúpulo (HSVd) encontradas en los cítricos forman el llamado grupo CVd-II de los viroides de los cítricos, siendo la variante CVd-IIb la causante de la xiloporosis, también llamada cachexia, enfermedad a la que son sensibles algunos cítricos como mandarinos, clementinos y satsumas.

Estas dos variantes del HSVd muestran una gradación sintomatológica según las especies huésped en las que se replican y acumulan. Así, en cidro (*Citrus medica L.*) la infección por viroides del grupo CVd-II da lugar a síntomas muy leves (necrosis en el vértice foliar o en el peciolo), mientras que en pepino (*Cucumis sativus L.*) la sintomatología es severa (epinastia, enanismo, deformación foliar).

Estudios realizados en cidro indicaron que mediante la técnica del análisis del polimorfismo de conformación de DNA monocatenario (SSCP) se podía discriminar entre aislados inductores de la xiloporosis (CVd-IIb) y aislados causantes de infecciones latentes (CVd-IIa). Se observó una alta heterogeneidad de perfiles del SSCP dentro de cada aislado de CVd-IIb en contraste con los aislados de CVd-IIa. Además, mediante la comparación de secuencias, se determinó la existencia de cinco nucleótidos en el dominio variable (dominio V) que son característicos de las variantes de CVd-IIb.

A la vista de estos antecedentes nos hemos planteado como objetivo el estudio de la variabilidad poblacional de las variantes del grupo CVd-II en pepino, donde la sintomatología es severa.

Hasta el momento se ha estudiado la variabilidad en pepinos infectados con el viroide CVd-IIa. En contraposición a lo observado en cidro, el análisis del SSCP parece mostrar una alta heterogeneidad para las variantes de CVd-IIa procedentes de pepino. Todas las variantes secuenciadas muestran un cambio nucleotídico (C→A) en el dominio T_L con respecto a la secuencia obtenida para el aislado de CVd-IIa de cidro, siendo éste el único cambio observado en las variantes secuenciadas correspondientes al perfil mayoritario del SSCP. Los cambios observados en las otras secuencias obtenidas con respecto a la de cidro oscilaron entre dos y tres nucleótidos afectando a todos los dominios definidos en la molécula viroidal. Finalmente, ninguna de las secuencias mostró los cinco cambios característicos que se habían observado en las secuencias de variantes de CVd-IIb de cidro con respecto a las de CVd-IIa.

P-189

EVOLUCIÓN DE LOS HONGOS CAUSANTES DE PODRIDO EN LAS MANDARINAS DURANTE LA POSTCOSECHA

Perucho, R. y Tuset, J.J.

Departamento de Protección Vegetal y Biotecnología. Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (I.V.I.A.). 46113 Moncada, Valencia, España.

Los frutos cítricos son afectados en postcosecha por diversos patógenos fúngicos que causan tasas de podrido del orden del 3–5%, siendo en los años de climatología anormal de un 8–12 %. En la campaña 1999–2000 se ha realizado un seguimiento de la presencia de éstos en las variedades de mandarinas: Oronules, Clemenules, Clemenvilla, Hernandina, Fortune y Ortanique. En el periodo de octubre de 1999 a mayo de 2000 se tomaron muestras que se sometieron al proceso normal en dos almacenes de la Ribera Alta (Valencia). Las muestras se tomaron al final de la línea de procesado, conservándose la mitad de cada muestra a temperatura ambiente (12 días) y la otra mitad en cámara frigorífica (30 días) más 7 días a T^a ambiente. Se dejaron los correspondientes testigos sin recibir tratamientos.

La tasa de podrido medio de las muestras conservadas a T^a ambiente fue del 2.15 % y del 6.01 % para las conservadas en cámara frigorífica (T^a 4–8°C). Los principales hongos causantes de podrido fueron los *Penicillium*, especialmente *P. digitatum*, con unos porcentajes del 58.71 % para muestras a T^a ambiente y de un 52,08 % para muestras conservadas en cámara frigorífica. En menor medida *P. italicum*, con porcentajes del 6.42 % para muestras a T^a ambiente y con un 17.36 % para las conservadas en cámara frigorífica. *R. stolonifer* con un 11 % (T^a ambiente) y 14.24 % (cámara) fue el tercer hongo con mayor incidencia. Con porcentajes menores al 5 % se presentaron otros hongos como *A. citri*, *C. herbarum*, *P. citrophthora*, *G. candidum*, *B. cinerea* y *Fusarium sp.* Hubo en levaduras un 11.93 % para muestras a T^a ambiente y 9.02 % para conservación frigorífica. *G. candidum* y *R. stolonifer*, no fueron detectados en las muestras testigo.

En función del momento de la campaña (inicio: octubre–diciembre; media: enero–febrero; final: marzo–mayo), la distribución de los podridos en *P. digitatum* solo ofreció variaciones significativas en las muestras a temperatura ambiente al final de la misma con un incremento mayor del 20 % de estos respecto al inicio y mitad. En *P. italicum* no hubo variaciones significativas, así como tampoco en *A. citri*. En este último hongo, y para las muestras a temperatura ambiente, solo se detectó al inicio y mitad. *C. herbarum* y *P. citrophthora* únicamente aparecieron al inicio. *R. stolonifer* y *G. candidum* estuvieron presentes de forma irregular a lo largo de toda la campaña en las muestras a T^a ambiente y en las conservadas en cámara frigorífica, dándose el mayor porcentaje de podridos en *G. candidum* al inicio de campaña en los frutos en cámara frigorífica (16.66%). *B. cinerea* se presentó de forma mínima durante mediados de campaña. Finalmente, las levaduras patógenas se detectaron únicamente en mitad y final de campaña, con una incidencia significativa de podridos (28.57 %), en las muestras a T^a ambiente correspondientes a la mitad de la campaña.

P-190

ESTUDIO DE LA COLONIZACIÓN DE LA RIZOSFERA DE *Hordeum vulgare* POR EL HONGO NEMATÓFAGO *Verticillium chlamydosporium* MEDIANTE MICROSCOPIA ÓPTICA Y ELECTRÓNICA DE BARRIDO A BAJA TEMPERATURA

Lopez-Llorca, L.V., Bordallo, J. J., Monfort, E., López, M. L. y Salinas, J.

CIBIO (Centro Iberoamericano de la Biodiversidad). Departamento de Ciencias Ambientales y Recursos Naturales. Universidad de Alicante. Apto Correos 99. 03080 Alicante.

El hongo nematófago *Verticillium chlamydosporium*, es capaz de colonizar el sistema radicular de *Hordeum vulgare*. Tanto la microscopía óptica (MO) como la electrónica de barrido a baja temperatura (MEBBT), revelaron detalles del proceso a escala celular. El hongo colonizó la rizoplanea de *H. vulgare* produciendo a menudo dictioclamidosporas. A partir de un apresorio, el hongo penetra directamente las células epidérmicas y posteriormente coloniza la epidermis y el córtex de *H. vulgare*. En estos tejidos vegetales era frecuente encontrar apresorios asociados al paso de las hifas de una célula a otra. También se observó una red de hifas en las células epidérmicas y del córtex. Así mismo, se encontraron arrollamientos de hifas en el interior de algunas células radiculares cerca de sus paredes transversales. Las células del córtex marcaron el límite de la colonización fúngica, apareciendo el cilindro vascular desprovisto de estructuras fúngicas.

En los tejidos radiculares de *H. vulgare* colonizados por el hongo, se apreciaron modificaciones de los contenidos celulares (probablemente gotas de sustancias fenólicas y deposiciones de calosa) a las 3 semanas de la inoculación con *V. chlamydosporium*. Estas alteraciones fisiológicas observadas en las células de los tejidos colonizados, podrían indicar que se inducen reacciones de defensa durante los estadios tardíos de colonización de la raíz por el hongo. Tanto la MO como la MEBBT junto a la crimicrotomía han demostrado ser técnicas muy adecuadas para describir la colonización de la raíz por el hongo.

Los resultados de este trabajo pudieran tener profundas implicaciones en el modo de acción de los hongos nematófagos contra los nematodos fitopatógenos.

P-191

EVALUACIÓN DE LA VIRULENCIA DE AISLADOS DE *Verticillium dahliae* Kleb., HONGO CAUSANTE DE LA TRISTEZA EN EL PIMIENTO DE PADRÓN

Novo, M. y Merino, F.

Departamento de Biología Animal, Biología Vegetal y Ecología Universidade da Coruña. A Zapateira s/n 15071 A Coruña.

Una de las enfermedades más importante que sufre el pimiento es la verticilosis, micosis vascular causada por el hongo *Verticillium dahliae* Kleb., comúnmente conocida como "tristeza" o "seca". Los síntomas característicos que se aprecian en una planta enferma son la marchitez y el enanismo de la planta. Esta enfermedad causa considerables pérdidas económicas en las cosechas no solo en el pimiento sino también en una gran variedad de plantas hortícolas como el tomate o la patata. Recientemente hemos realizado en Galicia una prospección para conocer la incidencia de la enfermedad y se ha podido determinar que las explotaciones de pimiento están altamente afectadas por este patógeno. Hasta el momento no hay un método de lucha disponible, ni biológico ni químico, que sea efectivo para el control de *V. dahliae* por lo que se propone como solución la introducción de cultivares resistentes. El primer paso para buscar plantas resistentes consiste en caracterizar patogénicamente los aislados del parásito para establecer su escala de virulencia.

Se han seleccionado trece aislados, obtenidos en la prospección, e identificados como *V. dahliae*. Para evaluar el distinto grado de virulencia de dichos aislados se han inoculado en dos variedades de pimiento con distinto grado de tolerancia al patógeno, Yolo Wonder, susceptible, y Luesia, tolerante. Se utilizaron 10 plantas de cada variedad, de 10 semanas de edad, a las que se le dio un corte de 1cm en el ápice de la raíz. Las raíces se sumergían durante 45 minutos en un inóculo con una concentración de 10^6 conidios por ml. Una vez inoculadas se transplantaron a tierra con perlita (2:1) manteniéndolas en un invernadero a temperaturas entre los 25°C durante el día y en torno a los 18°C durante la noche. Durante un mes se siguió el desarrollo de la enfermedad y finalmente se recogieron las plantas, estableciéndose el grado de virulencia en base a diferentes criterios de valoración. Se ha determinado el peso fresco, seco y la altura porque uno de los síntomas más característicos de esta enfermedad es el enanismo. También a lo largo del mes se ha realizado un recuento de las hojas marchitas por planta para determinar la severidad del daño causado. Finalmente y con objeto de observar el pardeamiento producido en los vasos conductores se hicieron diversos cortes del tallo para relacionarlo con el grado de virulencia del aislado.

Todos los aislados causaron la enfermedad en las dos variedades y los análisis estadísticos de las medidas realizadas reflejaron diferencias en el grado de virulencia, pero estas diferencias no fueron significativas en cuanto al pardeamiento en aislados con distinta agresividad.

P-192

EFFECTO DE LA INOCULACIÓN CON *Verticillium dahliae* Kleb. SOBRE EL SISTEMA PEROXIDASA Y LOS PROCESOS DE LIGNIFICACIÓN EN EL PIMIENTO DE PADRÓN (*Capsicum annuum* L. var. *annuum*)

Pomar, F., Bernal, M.A. y Merino, F.

Departamento de Biología Animal, Biología Vegetal e Ecología. Facultad de Ciencias. Universidade da Coruña. Campus da Zapateira s/n 15071. A Coruña.

El deuteromiceto *Verticillium dahliae* Kleb. es uno de los agentes causantes de la "seca" o "tristeza" del pimiento, enfermedad que puede producir graves daños en las explotaciones de esta solanácea.

Cuando un patógeno invade una planta desencadena en ella una serie de respuestas de tipo metabólico, que tienen como objeto proteger a la planta del ataque de este agente. De todas estas respuestas destacan los procesos de lignificación, y en general todos aquellos encaminados al reforzamiento de la pared celular. La lignificación inducida provoca que las paredes celulares sean mucho más resistentes a una penetración mecánica e incluso a la degradación enzimática, ya que la lignina puede proteger físicamente a los polisacáridos de la pared de las enzimas degradativas del hongo.

Habitualmente, la fase de lignificación activa está precedida por un incremento de ciertas actividades enzimáticas relacionadas con la síntesis de las ligninas, como son la fenilalanina amonio liasa (PAL), la cinamil alcohol deshidrogenasa (CAD) y las peroxidasa asociadas a la pared celular. Estas últimas son enzimas muy relacionadas con los mecanismos de respuesta ante los patógenos, ya que además de su participación en los procesos de lignificación, están implicadas en la regulación de especies activas de oxígeno, en el metabolismo de las fitoalexinas y en la incorporación de proteínas y fenoles a la pared celular.

Con el fin de estudiar la respuesta, tanto de los procesos de lignificación como de la actividad peroxidasa, del pimiento a la infección con *Verticillium dahliae* Kleb., se inocularon plantas de 15 días con una suspensión de conidios a una concentración de 10^6 conidios \cdot ml⁻¹. Tras la infección, se recogieron muestras de raíces, tallos y hojas a las 12, 24 y 48 horas y a los 7, 14, 21 y 28 días, determinando a continuación la cantidad de ligninas presentes por medio del método del bromuro de acetilo. Asimismo se estudió el comportamiento de la actividad peroxidasa en los distintos órganos utilizando para su medida la oxidación de los precursores de la lignina: alcohol coniferílico, alcohol sinapílico, coniferilaldehído y sinapilaldehído.

* Este trabajo ha sido financiado por el proyecto XUGA 10303A97

P-193

INFECCIÓN DE FRUTOS DE MANZANA POR *Penicillium expansum*. ASPECTOS BIOQUÍMICOS Y MOLECULARES DE PATOGÉNESIS Y RESISTENCIA.

Sánchez-Torres, P., Maldonado-Vallejo, M.T., Lafuente, M.T. y González-Candelas, L.

Laboratorio de Postcosecha. Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos. Consejo Superior de Investigaciones Científicas. Aparado de Correos 73, Burjassot. 46100-Valencia

El hongo *Penicillium expansum* es el principal agente patógeno de manzanas y peras durante su almacenamiento. El control de los agentes patógenos durante la postcosecha de frutos se basa actualmente en el empleo de fungicidas químicos. Los problemas que plantean dicho productos desde el punto de vista de la salud del consumidor, del medio ambiente y el incremento en la aparición de cepas resistentes está conduciendo a desarrollar nuevas alternativas menos nocivas para el control de los mismos. En la postcosecha de manzanas y peras los tratamientos en los que se está investigando más activamente son los basados en el acondicionamiento térmico de los frutos previo a la frigoconservación.

El presente trabajo pretende caracterizar el proceso de infección causado por el hongo *Penicillium expansum* en frutos de manzana, tanto desde el punto del patógeno como del fruto. Se han llevado a cabo dos aproximaciones complementarias, molecular y bioquímica. La primera, pretende aislar fragmentos de cDNAs, tanto del hongo como del fruto, que se expresen diferencialmente durante el proceso de infección, reflejando aspectos tanto de patogénesis como de resistencia. Para ello se han seleccionado fragmentos de cDNAs mediante la técnica de "differential display" y se ha procedido a su clonación y caracterización. Dentro de los estudios bioquímicos se han analizado la evolución espacial y temporal de diversas actividades enzimáticas implicadas en las reacciones de defensa de plantas a patógenos. En concreto, actividades implicadas en el sistema antioxidante, catalasa (CAT) y peroxidasa (POD), en el metabolismo de fenilpropanoides, fenilalanina amonio-liasa (PAL) y relacionadas con el daño mecánico, lipoxigenasa (LOX). De estas enzimas, destaca la inducción de la PAL, sobre todo en frutos sometidos a un tratamiento térmico previo a la infección.

P-194

LA POLARIDAD DE SECUENCIAS TRANSGÉNICAS DE PSTVd AFECTA NOTABLEMENTE A LA ACUMULACIÓN DE TRANSCRITOS EN *Arabidopsis thaliana*

Montes, M., Martínez-Herrera, D., Romero, J., Martínez-Zapater, J.M. y Ponz, F.

Dpto. de Mejora Genética y Biotecnología; Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA), Carretera de la Coruña, Km. 7; 28040 Madrid; ESPAÑA.

El viroide del tubérculo fusiforme de la patata (PSTVd) es un patógeno subviral de plantas, cuya forma infectiva consiste en una molécula de RNA monocatenario circular de 359 nucleótidos, que no codifica ninguna proteína, y que se replica en el núcleo y se acumula en el nucleolo de la célula infectada.

Arabidopsis thaliana no es huésped de PSTVd. Las líneas transgénicas de *A. thaliana* transformadas con dímeros de PSTVd clonados delante del gen marcador GUS no muestran replicación del patógeno. La situación obtenida en plantas de tabaco huésped del viroide es exactamente la contraria, pues las mismas construcciones dan lugar a replicación viroidal. La actividad enzimática GUS en *A. thaliana* transgénicas está fuertemente influenciada por la polaridad de las secuencias de PSTVd insertadas, observándose una notable disminución de actividad GUS cuando la polaridad es positiva. Los datos obtenidos indican que el transcrito que contiene PSTVd en la polaridad positiva en esta construcción es secuestrado en el núcleo de la célula.

Nosotros proponemos que este es un buen sistema para identificar determinantes viroidales y de la planta implicados en el transporte nuclear de RNA.

Se mostrarán los resultados obtenidos en la caracterización del sistema.

P-195

PRODUCCIÓN DE ANTICUERPOS POLICLONALES ESPECÍFICOS PARA EL FACTOR DE ADQUISICIÓN (HC) DEL VIRUS DE LA SHARKA: APLICACIÓN EN LA PURIFICACIÓN DE LA PROTEÍNA VIRAL

Martínez-García, B., Atencio, F.A., Llave, C., Díaz-Ruíz, J.R. y López-Abella, D.

Departamento de Biología de Plantas. Centro de Investigaciones Biológicas. CSIC. C/Velázquez, 144. 28006, Madrid.

La sharka es el nombre con el que se conoce una enfermedad que afecta a los frutales de hueso (albaricoquero, ciruelo, melocotonero, cerezo) y cuyo agente causal es el potyvirus de la viruela del ciruelo (Plum pox virus, PPV). El material genético de PPV se constituye por una cadena sencilla de ARN de sentido positivo que codifica una única poliproteína con capacidad de autoprocesamiento para rendir los diferentes productos virales. PPV se transmite planta a planta en la naturaleza por medio de pulgones, interviniendo en el proceso dos proteínas virales: la proteína de la cápsida (CP) y el factor de adquisición (HC).

El procedimiento de purificación del HC descrito para potyvirus no había resultado fructífero hasta el momento para PPV. Por ello, se ha llevado a cabo la obtención de anticuerpos policlonaes que reconozcan al HC de PPV, de modo que nos permitan realizar un seguimiento de esta proteína durante el proceso de purificación.

La secuencia codificadora del HC de PPV se clonó en el vector pMal-p2 de expresión en bacteria. El HC se expresó fusionado a la proteína de unión a maltosa (MBP), y se purificó a partir de geles de poliacrilamida para, posteriormente, proceder a la inmunización de conejo. El suero obtenido fue ensayado frente a distintas muestras e inmunoabsorbido para evitar uniones contra otras proteínas. Alícuotas de las diferentes fases del proceso de purificación del HC de PPV fueron analizadas en Western blot con el suero policlonaal frente al HC. Las fases finales del proceso de purificación resultaron positivas en el ensayo, demostrando que el protocolo de purificación de HC descrito para potyvirus puede ser empleado con éxito en el caso de PPV.

En este trabajo se discuten, asimismo, la capacidad del HC purificado de PPV de unirse a la CP viral en ensayos *in vitro*, así como la funcionalidad de dicho HC en la transmisión de PPV por pulgones.

P-196

ATAQUE DE *Acremonium cucurbitacearum* A RAÍZ DE MELÓN: ESTUDIO HISTOPATOLÓGICO

Sales, R.¹, Vicent, A.¹, Armengol, J.¹, García-Jiménez, J.¹ y García-Luis, A.²

¹Patología Vegetal. Dpto. Producción Vegetal. Universidad Politécnica de Valencia, Camino de Vera s/n. 46022 Valencia.

²Departamento de Biología Vegetal. Universidad Politécnica de Valencia, Camino de Vera s/n. 46022 Valencia.

Acremonium cucurbitacearum Alfaro-García, W. Gams et J. García-Jiménez es uno de los principales agentes implicados en el síndrome del “colapso” o “muerte súbita” del melón en España.

Estudios histopatológicos realizados mediante microscopía óptica y electrónica de barrido (MEB) en plantas de melón Piel de Sapo cv. PS1430 infectadas con este hongo han demostrado que el ataque a las raíces de la planta se da muy tempranamente, ya desde los tres días después de la inoculación, observándose al poco tiempo un ligero pardeamiento, que comienza generalmente en la zona de unión de raíz e hipocotilo, ocasionado por la suberificación del tejido afectado.

A. cucurbitacearum es capaz de penetrar por cualquier zona de la raíz o hipocotilo aunque una de las zonas preferentes de entrada parecen ser la zona de emergencia de raicillas secundarias donde se puede observar una gran cantidad de hifas fúngicas.

La MEB permitió observar la colonización y circulación de las hifas del hongo, que se produce de forma inter- e intracelular en el interior de los tejidos afectados: *A. cucurbitacearum* circula por los espacios intercelulares y su paso de una célula a otra parece darse a través de las punteaduras primarias y yendo acompañado de la degradación de la pared celular.

En estados avanzados de la infección se puede observar una marcada reducción del córtex que llega a dejar completamente expuestos y separados los haces vasculares. En ningún caso se detectó la presencia de hifas o tálides en el interior de los haces vasculares.

P-197

ANÁLISIS DEL MOVIMIENTO SISTÉMICO DEL VIRUS DEL MOSAICO DEL PEPINO (CMV)

Domínguez Álvarez, M., Moreno, I. M. y García-Arenal, F.

Dpto de Biotecnología, E.T.S.I. Agrónomos. 28040 Madrid.

La traslocación de la infección viral de las plantas infectadas es un proceso clave en el ciclo viral de los virus, puesto que si la infección se limita a las hojas inoculadas, las plantas son resistentes en condiciones naturales.

Hay evidencias de que el movimiento a larga distancia no es un fenómeno pasivo, y requiere tanto factores del huésped como del virus. Conocer la forma en la que se mueve el virus dentro del floema es una información esencial para entender cómo interaccionan factores del virus con factores del huésped. En el caso de los *Cucumovirus*, trabajos en nuestro laboratorio han demostrado que la proteína de la cápsida (CP) del *Virus del mosaico del pepino* (CMV) es necesaria para el movimiento sistémico en pepino, puesto que, aunque tanto CMV como el *Virus de la aspermia del tomate* (TAV) son capaces de replicarse y moverse de célula a célula en las hojas inoculadas, sólo se hace sistémica la infección de CMV. La CP de CMV complementa el movimiento sistémico de TAV.

Con el fin de caracterizar las estructuras en las que se realiza el movimiento sistémico de CMV en pepino, hemos analizado el exudado floemático de plantas infectadas con el virus. En este exudado se detecta el RNA viral, que presenta una resistencia a RNasa A mayor que el RNA encapsidado en partículas purificadas; la incubación de partículas purificadas con exudado floemático de plantas sanas, resulta en una mayor protección del RNA frente a RNasa A, pero menor que la del RNA del floema de plantas infectadas. La sedimentación en gradientes de sacarosa del exudado floemático de plantas infectadas muestra que el RNA viral está en las mismas fracciones que cuando se sedimentan viriones purificados incubados con exudado floemático de plantas sanas. Sin embargo, no se ha detectado en el exudado floemático la CP ni por Inmunoprecipitación ni por Western Blot. Por inmunomicroscopía electrónica no se observan partículas virales en el exudado floemático de plantas infectadas, pero sí la CP. Por tanto, los resultados indican que la estructura presente en el floema no es la partícula viral aunque si tiene su misma masa.

El papel de la CP de CMV en el movimiento sistémico de pepino se ha estudiado, además, mediante la construcción de una serie de virus quiméricos que intercambian segmentos de la CP de CMV y de TAV. Se han construido ocho recombinantes distintos, y se está analizando su capacidad de replicación e infección sistémica en tabaco (huésped sistémico de TAV y CMV) y en pepino.

P-198

CLONES MEJORADOS DE BANANO: COMPORTAMIENTO EN CAMPO FRENTE AL MAL DE PANAMÁ DE MATERIAL DE PLANTACIÓN OBTENIDO POR MULTIPLICACIÓN EN CAMA CALIENTE A PARTIR DE MATERIAL “IN VITRO”

Hernández, J. M. y Sabadell, S.

Instituto Canario de Investigaciones Agrarias.

El Mal de Panamá es una de las enfermedades más graves de la platanera producida por *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (FOC). Para el patosistema platanera-FOC se han descrito cuatro razas: 1, 2, 4 subtropical y 4 tropical. En Canarias está presente la raza 4 subtropical. La obtención de variedades resistentes o tolerantes sigue siendo una de las estrategias de lucha más aceptadas. Por ello, el INIBAP (International Network for the Improvement of Banana and Plantain) ha puesto en marcha un programa internacional de valoración de distintos materiales obtenidos en los diferentes centros de Mejora.

En un primer ensayo en el que se evaluaron veintidós genotipos distintos incluyendo clones mejorados y variedades silvestres, se seleccionaron nueve (504, 506, 1261, 1262, 1264, 1265, 1271, 1282) por su respuesta a la enfermedad y por su posible interés agronómico para las condiciones de Canarias. Con la finalidad de comprobar si los resultados se repetían en un segundo ciclo en el que se emplearon plantas obtenidas en cama caliente en lugar de plantas in vitro, se diseñó un ensayo de campo en el que se incluyeron esos nueve clones además de un referente de susceptibilidad (Gran Enana, AAA) y un referente de resistencia (cv. “Rose”, AA) que se dispuso en campo natural y homogéneamente infestado con FOC según un diseño totalmente al azar. Durante el ensayo se han tomado datos de las principales variables fenológicas así como de la incidencia y severidad de síntomas.

Los resultados obtenidos hasta el momento indican que los clones se han comportado de manera similar a lo ocurrido en el primer ensayo. El clon 1261 de EMBRAPA ha presentado los valores más bajos de incidencia y severidad de síntomas externos, seguido del clon 1264. El clon 1261 podría tener cierto interés agronómico aunque es un poco más alto que los cv. Cavendish. En General, el ciclo ha sido más corto para todos los clones. Estos resultados no son definitivos pues la valoración final de los clones sólo podrá hacerse cuando acabe la recolección y se valoren los daños en el interior del rizoma.

IDENTIFICACIÓN DE FUENTES DE RESISTENCIA EN TOMATE AL VIRUS DEL MOSAICO DEL PEPINO DULCE (PepMV)

Soler, S. y Nuez, F.

Centro de Conservación y Mejora de la Agrobiodiversidad Valenciana (COMAV) de la UPV. Universidad Politécnica de Valencia. Camino de Vera, 14. 46022 Valencia.

El virus del mosaico del pepino dulce (Pepino Mosaic Virus, PepMV) está causando daños considerables en los cultivos de tomate bajo invernadero de Murcia, Almería y Canarias. Los porcentajes de plantas afectadas oscilan entre el 15 y el 80%, encontrándose infección por PepMV en un 75-90% de los invernaderos de Murcia y Almería. En las plantas afectadas de estas regiones pueden apreciarse mosaicos más o menos acentuados que causan una deformación grave de las hojas e incluso puede producirse el marchitamiento más o menos intenso de las plantas; el fruto suele presentar un Ajaspeado@ o Amanchado@ que lo inutiliza comercialmente.

La falta, en ocasiones, de síntomas graves en las plantas ocasiona que el agricultor se muestre reacio a eliminar las plantas infectadas por el virus. Además, la muy eficiente transmisión por contacto del PepMV contribuye a que la enfermedad se extienda rápidamente. El desarrollo de variedades resistentes parece ser la mejor estrategia de control de la enfermedad. Para ello es necesario la búsqueda de fuentes de resistencia a este virus. En este trabajo hemos abordado el cribado de una colección de entradas pertenecientes a distintas especies del género *Lycopersicon* mediante la inoculación mecánica del PepMV. Se han ensayado 9 variedades comerciales de tomate, 3 entradas de *L. esculentum* var. *cerasiforme*, 4 de *L. pimpinellifolium*, 7 de *L. peruvianum*, 4 de *L. hirsutum*, 3 de *L. chilense*, 3 de *L. pennellii*, 3 de *L. parviflorum* y 3 de *L. chesmanii*. Todas las variedades de tomate comerciales ensayadas se han mostrado susceptibles con un 100% de plantas infectadas, produciéndose síntomas iniciales severos de mosaico que posteriormente se agravaron con desarrollo de abullonado y filimorfismo en las hojas más jóvenes. Lo mismo ocurrió con la casi totalidad de las entradas de especies silvestres probadas. Sin embargo, la entrada LA 1708 de *L. peruvianum* mostró segregación para la resistencia al PepMV con un 75% de plantas que no mostraban síntomas y no daban DAS-ELISA positivo. Lo mismo ocurrió en las entradas PI-126935 de *L. peruvianum* y LA-2774 de *L. chilense* con un 70 y 45% de plantas que no se infectaban respectivamente. La identificación de estas entradas resistentes al PepMV posibilita el desarrollo de variedades de tomate comerciales resistentes a este virus.