

**Título: “Fusariosis de los cultivos de la fresa y el espárrago en España: Caracterización y métodos de control”**

Doctorando: D. Eduardo de la Lastra Alcalde

Fecha: 28 de octubre de 2021

Institución: Instituto Andaluz de Investigación y Formación Agraria, Pesquera, Alimentaria y de la Producción Ecológica (IFAPA), Grupo Protección Vegetal Sostenible, Laboratorio de Biotecnología

Director: Dra. Dña. María Nieves Capote Maínez

Calificación: Sobresaliente *Cum Laude*

### **Reseña**

**“Fusariosis de los cultivos de la fresa y el espárrago en España: Caracterización y métodos de control”**, defendida por D. Eduardo de la Lastra Alcalde en la Universidad de Sevilla (US), Instituto Andaluz de Investigación y Formación Agraria, Pesquera, Alimentaria y de la Producción Ecológica (IFAPA), Grupo Protección de cultivos, bajo la supervisión de la Dra. Dña. María Nieves Capote Maínez. El tribunal estuvo constituido por los doctores/as Julio Javier Diez Casero (Universidad de Valladolid, Palencia, España), Pedro Cermeño Sacristán (IFAPA, Sevilla, España), Manuel Avilés Guerrero (Universidad de Sevilla, Sevilla, España), María Leire Molinero Ruiz (Instituto de Agricultura Sostenible, CSIC, Córdoba, España) y Daniel Palmero Llamas (Universidad Politécnica de Madrid, Madrid, España). La Tesis fue calificada por unanimidad con Sobresaliente *Cum Laude*

### **Doctorando, Centro de realización de la Tesis Doctoral y/o Universidad**

D. Eduardo de la Lastra Alcalde, Instituto Andaluz de Investigación y Formación Agraria, Pesquera, Alimentaria y de la Producción Ecológica (IFAPA), Grupo Protección de cultivos, Departamento de Biotecnología.

### **Supervisión de la Tesis**

**Director:** Dra. María Nieves Capote Maínez, Investigadora del centro IFAPA Las Torres.

### **Título de la Tesis, composición del Tribunal y Calificación**

**Título:** Fusariosis de los cultivos de la fresa y el espárrago en España: Caracterización y métodos de control

**Tribunal:**

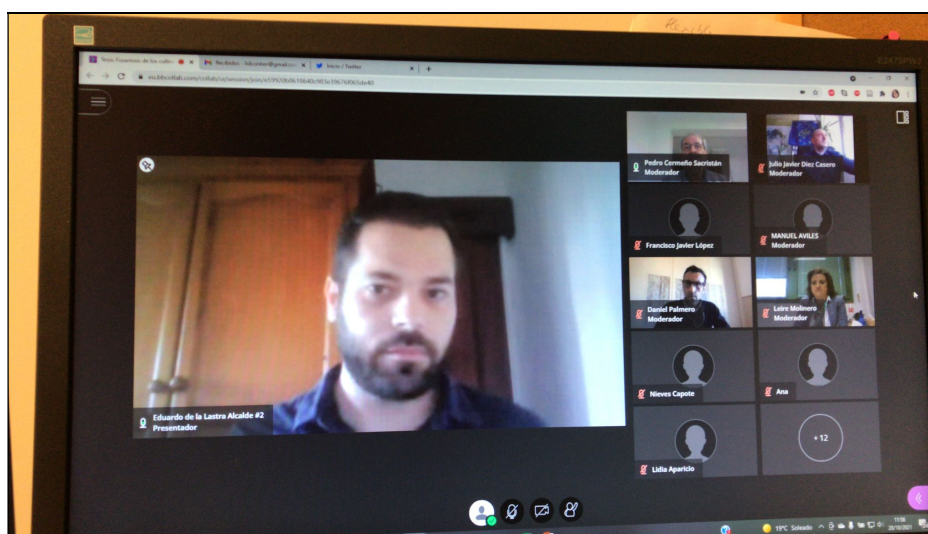
**Presidente:** Dr. Julio Javier Diez Casero, Universidad de Valladolid, Palencia, España.

**Secretario:** Dr. Manuel Avilés Guerrero, Universidad de Sevilla, Sevilla, España.

**Vocales:** Dr. Pedro Cermeño Sacristán (IFAPA, Sevilla, España), Dra. María Leire Molinero Ruiz (Instituto de Agricultura Sostenible, CSIC, Córdoba, España) y Dr. Daniel Palmero Llamas (Universidad Politécnica de Madrid, Madrid, España)

**Calificación:** Sobresaliente *Cum Laude*.

### Fotografía del acto de Lectura y Defensa

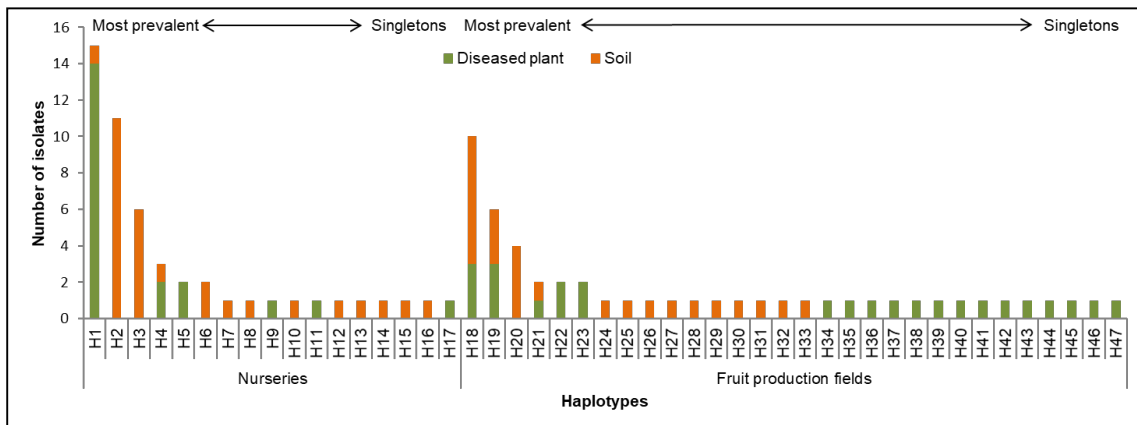


### Resumen

El género *Fusarium* es un hongo habitual del suelo, restos orgánicos, raíces y parte aérea de las plantas. Está ampliamente distribuido por todo el mundo debido a su capacidad para crecer en un amplio rango de sustratos y a la dispersión de sus esporas. Se han descrito multitud de especies pertenecientes a este género capaces de producir enfermedades en plantas. La fresa y el espárrago son dos cultivos hortícolas de gran importancia económica y social en Andalucía que se ven afectados por especies del género *Fusarium*, las cuales merman su producción, provocando pérdidas económicas en el sector. En concreto, el complejo de especies de *Fusarium solani* (FSSC) es el agente causal de la podredumbre de raíz y corona de fresa. A su vez, las especies *F. proliferatum*, *F. oxysporum* f. sp. *asparagi* y *F. redolens* están involucradas en el síndrome del decaimiento del espárrago (ADS, por sus siglas en inglés "Asparagus Decline Syndrome"). La caracterización de las poblaciones de *Fusarium* que afectan a los cultivos vegetales de interés económico aumenta el conocimiento sobre el patógeno, lo cual es de gran importancia para implementar estrategias de control más eficaces. Algunas estrategias de control frecuentemente utilizadas para el tratamiento de especies de *Fusarium* son: control químico mediante la aplicación de fumigantes en el suelo, medidas culturales como la biosolarización, control biológico mediante el uso de bacterias promotoras del crecimiento vegetal o PGPR (en inglés, "plant growth-promoting rhizobacteria") o control preventivo mediante la aplicación de técnicas basadas en PCR para la detección del hongo en el material vegetal y el suelo de una finca previo a su plantación.

El principal objetivo de esta Tesis ha sido adquirir un mayor conocimiento sobre las especies de *Fusarium* que afectan al cultivo de la fresa y del espárrago, mediante la caracterización molecular y biológica de sus poblaciones, la determinación de sus posibles fuentes de inóculo, y la obtención de medidas de control alternativas al uso de agentes químicos: 1) herramientas moleculares de detección basadas en qPCR como control preventivo, 2) métodos de desinfestación de suelo alternativos a la fumigación química y 3) control biológico.

El cultivo de fresa en España tiene su producción diferenciada en dos zonas geográficas separadas a lo largo de su ciclo anual, con notables condiciones agroclimáticas distintas. La producción vegetativa de plantas se lleva a cabo en los llamados viveros de altura de Castilla y León (principalmente en las provincias de Segovia, Ávila y Valladolid), mientras que el cultivo para la obtención de frutos se realiza mayoritariamente en los campos de producción de la provincia de Huelva. Con el objetivo de obtener un mayor conocimiento sobre la incidencia de *F. solani* en el cultivo de la fresa en España, se caracterizaron 100 aislados de este hongo provenientes de muestras de suelo y plantas de fresa de las dos zonas de cultivo. Los aislados se caracterizaron biológica (identificación de los grupos de compatibilidad vegetativa, VCG) y filogenéticamente (secuenciación de tres regiones del genoma: *EF-1 $\alpha$* , ITS + 28S y *RPB2*). Con estos resultados se determinó que las plantas de viveros no son la principal fuente de inóculo de FSSC en las áreas productoras de fruto de fresa, ya que ambas regiones presentaron una composición de especies de FSSC distinta. Además, se observó una mayor diversidad en la población de FSSC procedente de campos de producción de fruto, con un mayor número de especies distintas, de haplotipos (Figura 1) y de VCGs diferentes. Por último, a excepción de dos especies, el resto de especies de FSSC detectadas presentaron aislados patógenos procedentes indistintamente de planta sintomática de fresa y suelo. Algunos de estos aislados compartieron el mismo haplotipo (Figura 1) y pertenecieron al mismo grupo de compatibilidad vegetativa (VCG). Esto sugiere que el suelo es una importante fuente de inóculo de FSSC.

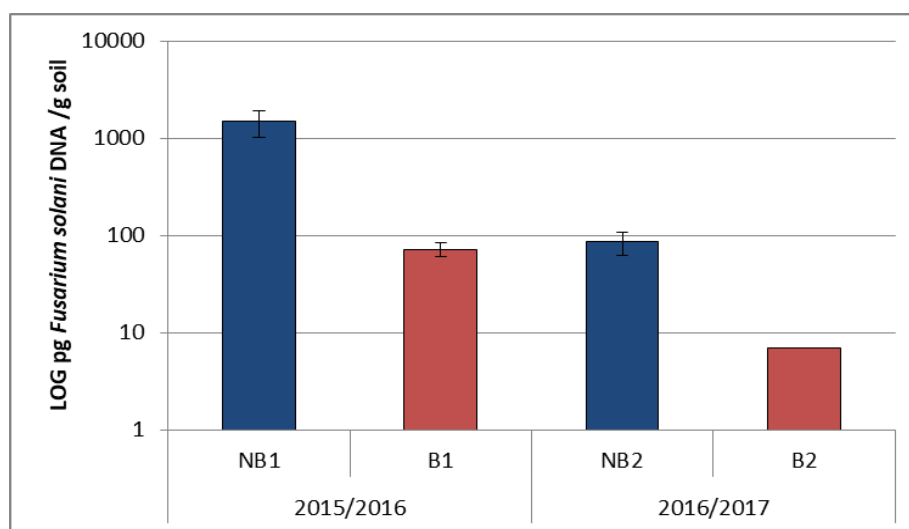


**Figura 1:** Histograma mostrando la distribución de los aislados del complejo de especies de *Fusarium solani* de plantas sintomáticas y de suelo provenientes de viveros y de campos de producción de fruto de fresa en España. Número de aislados por haplotipo multilocus.

Por otro lado, en esta Tesis se han desarrollado herramientas moleculares basadas en TaqMan qPCR para detectar y cuantificar las especies de FSSC (basada en la región *EF-1 $\alpha$* ), *F. oxysporum* (región ITS del ADN ribosomal), *F. proliferatum* (región IGS del ADN ribosomal) y *F. redolens* (región IGS del ADN ribosomal) en las que se ha incluido la detección de un control interno positivo en multiplex para aumentar la fiabilidad de la detección. Los protocolos desarrollados fueron validados mediante el análisis de muestras vegetales provenientes de plantas sintomáticas y muestras de suelo provenientes de fincas con historial de la enfermedad, donde se comprobó su mayor fiabilidad y sensibilidad, comparándolo con los métodos tradicionales de cultivo en placa. La gran sensibilidad, fiabilidad y reproducibilidad de

los protocolos de qPCR diseñados, convierten a esta técnica en una poderosa herramienta de diagnóstico y de control preventivo de las enfermedades.

Además, los protocolos fueron aplicados para evaluar la eficacia de tratamientos de desinfección del suelo alternativos al uso de fumigantes químicos. Para ello, biosolarización con gallinaza fue aplicada durante dos temporadas consecutivas en una finca experimental del cultivo de la fresa, muestras de suelo fueron tomadas tras los tratamientos y analizadas con el protocolo de qPCR para la detección de las especies de FSSC. Los análisis demostraron la eficacia de la biosolarización con gallinaza, ya que produjo una disminución significativa del nivel de inóculo en el suelo, en comparación con el control, lo que correlacionó con un aumento significativo de la producción de fruto (Figura 2).



**Figura 2:** Densidad de inóculo de *Fusarium solani* en suelo pre-plantación biosolarizado (B) (2500 g gallinaza/m<sup>2</sup>) y no biosolarizado (NB) medido como pg ADN/g suelo por qPCR. Los datos son la media  $\pm$  error estándar de cuatro lomos tratamiento, cada lomo muestreado por triplicado.

Del mismo modo, los protocolos de qPCR para la detección de las especies *F. oxysporum*, *F. proliferatum* y *F. redolens* fueron aplicados para evaluar la eficacia de tratamientos de biosolarización con pellet de gallinaza y pellet de *Brassica carinata*. Estos tratamientos, junto con la fumigación química con dazomet, fueron aplicados en una finca experimental de producción de espárrago antes de su plantación. Se tomaron muestras de suelo antes y tras los tratamientos, y se analizaron con los protocolos de qPCR para comparar la disminución en los niveles de inóculo tras los tratamientos. Los análisis demostraron la eficacia de la biosolarización con pellet de *Brassica*, ya que produjo significativamente una mayor disminución en los niveles de inóculo en el suelo en comparación con el control, similar a la de la fumigación química (Tabla 1). Los niveles de inóculo en el suelo correlacionaron negativamente con la producción de turiones.

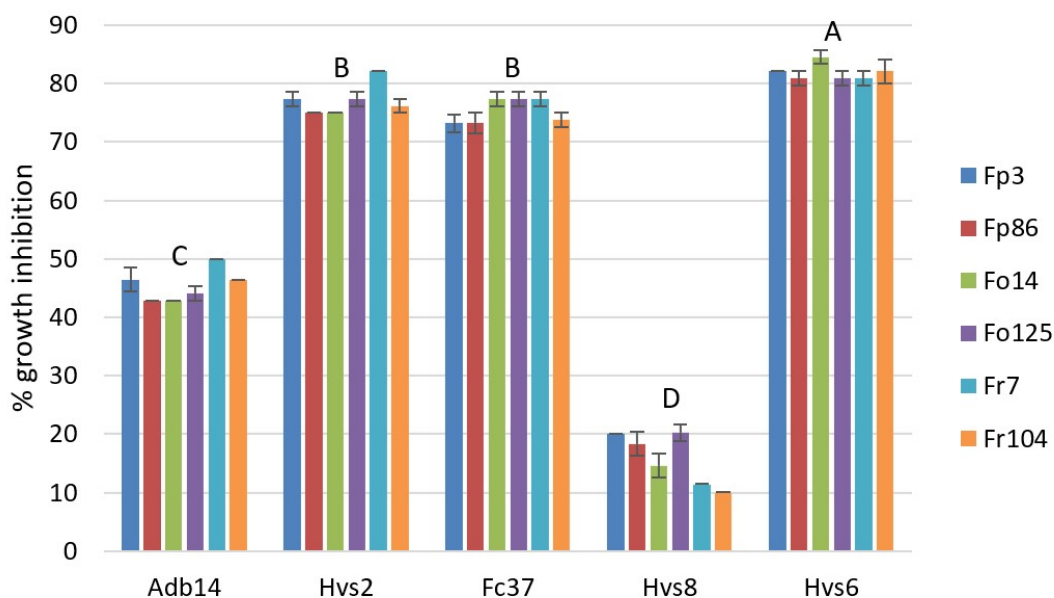
**Tabla 1:** Porcentaje de reducción de inóculo de *Fusarium proliferatum*, *F. oxysporum* y *F. redolens*, medido por qPCR, tras los tratamientos, y producción acumulada en gramos y número de turiones recolectados durante la temporada productiva. PPM, pellet de gallinaza (500 g/m<sup>2</sup>); PB, pellet de *Brassica carinata* (500 g/m<sup>2</sup>); QF, químico dazomet (600 g/m<sup>2</sup>); C, control no tratado.

Tratamientos Desinfestación	Densidad Inóculo (pg ADN/g suelo)			Producción acumulada turiones (g)	Número de turiones
	<i>F. proliferatum</i> % reducción*	<i>F. oxysporum</i> % reducción*	<i>F. redolens</i> % reducción*		
PPM	41 ± 15 c	33 ± 16 c	60 ± 7 c	5055	265
PB	98 ± 1 a	84 ± 1 a	80 ± 1 a	5720	325
QF	97 ± 1 a	81 ± 4 a	78 ± 4 a	5634	313
C	86 ± 4 b	69 ± 1 b	69 ± 2 b	4615	255

\*Se llevaron a cabo análisis de varianza sobre la media de los tratamientos para la reducción de inóculo (nivel de significancia  $p < 0.05$ ).

Finalmente, en la búsqueda de otros métodos sostenibles de control del síndrome del decaimiento del espárrago, se evaluaron cinco cepas bacterianas rizosféricas pertenecientes a los géneros *Bacillus*, *Brevibacterium* y *Streptomyces* como potenciales agentes de biocontrol de aislados patógenos de *F. proliferatum*, *F. oxysporum* f. sp. *asparagi*, y *F. redolens*. Se han descrito bacterias promotoras del crecimiento vegetal que ejercen actividad antagonista sobre hongos patógenos, mediante la producción de enzimas hidrolíticas de la pared celular de los hongos y de compuestos volátiles tóxicos, como el HCN.

Mediante cultivos de enfrentamientos duales *in vitro*, se demostró que todas las cepas bacterianas evaluadas produjeron inhibición del crecimiento micelial de los aislados fúngicos en mayor o menor medida. Las cepas que mostraron mayor antagonismo fueron *Streptomyces fradiae* Hvs6, *Bacillus velezensis* Fc37 y *B. paralicheniformis* Hvs2 (Figura 3).



**Figura 3:** Porcentaje de inhibición del crecimiento micelial de los aislados de *Fusarium proliferatum* (Fp), *F. oxysporum* f. sp. *asparagi* (Fo) y *F. redolens* (Fr) por las cepas bacterianas *Bacillus amyloliquefaciens* Adb14, *B. paralicheniformis* Hvs2, *B. velezensis* FC37, *Brevibacterium frigoritolerans* Hvs8, y *Streptomyces fradiae* Hvs6 en los enfrentamientos duales *in vitro*. Los resultados son la media de tres réplicas ± el error estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas entre las cepas bacterianas basadas en el test ANOVA a  $P \leq 0.05$ .

Estas tres cepas fueron ensayadas en plantas de espárrago, mediante la coinoculación con las bacterias rizosféricas y los aislados fúngicos. Este ensayo se llevó a cabo en cámara de cultivo con condiciones controladas y se fueron anotando los síntomas en las plantas provocados por los patógenos fúngicos durante dos meses. La cepa Fc37 mostró el mayor efecto protector, reduciendo el porcentaje de mortalidad de las plantas inoculadas con *F. proliferatum* y *F. oxysporum* f. sp. *asparagi* y aumentando la biomasa de las plantas; Hvs2 tuvo un efecto protector intermedio para estas dos especies, en menor medida que Fc37; y Hvs6 mostró un menor efecto protector que las dos anteriores. No se observó efecto de protección contra los aislados de *F. redolens* por parte de ninguna de las cepas bacterianas ensayadas. Estos ensayos han demostrado el potencial uso de estas cepas bacterianas, sobretodo Fc37, como agentes de biocontrol para dos de las principales especies de *Fusarium* asociadas al síndrome de decaimiento del espárrago: *F. proliferatum* y *F. oxysporum* f. sp. *asparagi*.

Un mayor conocimiento sobre los hongos causantes de las enfermedades, junto a una estrategia de control integrado, hacen que esta Tesis represente un gran avance en el control de las enfermedades provocadas por *Fusarium* en el campo andaluz, mediante el uso de técnicas más sostenibles y respetuosas con el medioambiente.

### Publicaciones derivadas de esta Tesis

- **De la Lastra, E.\***, Villarino, M.\*, Astacio, J.D., Larena, I., De Cal, A., Capote, N. (2019). Genetic diversity and vegetative compatibility of *Fusarium solani* species complex of strawberry in Spain. *Phytopathology* 109: 2142-2151. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-05-19-0173-R>
- **De la Lastra, E.**, Basallote-Ureba, M.J., De los Santos, B., Miranda, L., Vela-Delgado, M. D., Capote, N. (2018). A TaqMan real-time polymerase chain reaction assay for accurate detection and quantification of *Fusarium solani* in strawberry plants and soil. *Scientia Horticulturae* 237: 128-134. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2018.04.007>
- **De la Lastra, E.**, Marín-Guirao, J.I., López-Moreno, F.J., Soriano, T., De Cara-García, M., Capote, N. (2021). Potential inoculum sources of *Fusarium* species involved in asparagus decline syndrome and evaluation of soil disinfestation methods by qPCR protocols. *Pest Management Science* 77: 4749-4757. <https://doi.org/10.1002/ps.6519>
- **De la Lastra, E.**, Camacho, M., Capote, N. (2021). Soil bacteria as potential biological control agents of *Fusarium* species associated to asparagus decline syndrome. *Applied Sciences* 11: 8356. <https://doi.org/10.3390/app11188356>
- Villarino, M., **De la Lastra, E.**, Basallote-Ureba, M.J., Capote N., Larena, I., Melgarejo P., De Cal, A. (2019). Characterization of *Fusarium solani* populations associated with Spanish strawberry crop. *Plant Disease* 103: 1974-1982. DOI: [10.1094/PDIS-02-19-0342-RE](https://doi.org/10.1094/PDIS-02-19-0342-RE)
- Brizuela, A.M., **De la Lastra, E.**, Marín-Guirao, J.I., Gálvez, L., De Cara-García, M., Capote, N., Palmero, D. (2020). *Fusarium* consortium populations associated with asparagus crop in Spain and their role on field decline syndrome. *Journal of Fungi* 6: 336. <https://doi.org/10.3390/jof6040336>

Publicaciones en revistas de divulgación:

- **De la Lastra, E.**, De Cara, M., Soriano, T., Capote, N. (2020). Especies de *Fusarium* relacionadas con el síndrome del decaimiento del espárrago en Andalucía. *Phytoma* 322: 2-9. <https://www.phytoma.com/la-revista/phytohemeroteca/324-diciembre-2020/especies-de-fusarium-relacionadas-con-el-sindrome-del-decaimiento-del-esparrago-en-andalucia>

- Rodríguez-Navarro, D., Rodríguez-Berbel, N., Galiano, M., **De la Lastra, E.**, Barrau, C., Basallote-Ureba, M.J., Capote, N. (2019). Estudios *in vitro* de la capacidad de biocontrol de hongos y oomicetos fitopatógenos por cepas de *Bacillus* y *Pseudomonas*. Phytoma 311: 1-7. <https://www.phytoma.com/la-revista/phytohemeroteca/311-agosto-septiembre-2019/estudios-in-vitro-de-la-capacidad-de-biocontrol-de-hongos-y-oomicetos-fitopatogenos-por-cepas-de-bacillus-y-pseudomonas>