



## PCR COOPERATIVA (Co-PCR): NUEVO MÉTODO DE AMPLIFICACIÓN SIMULTÁNEA Y COORDINADA PARA LA DETECCIÓN DE VIRUS DE ARN

OLMOS, A., BERTOLINI, E. Y CAMBRA, M.

*Dpto. de Protección Vegetal y Biotecnología. Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA). Carretera Moncada-Náquera km 4.5, 46113 Moncada, Valencia.*

La PCR es teóricamente uno de los métodos de detección más sensibles que existe. Sin embargo, en la práctica y aplicado a material vegetal, la sensibilidad se reduce drásticamente por la presencia de inhibidores. Para superar estos inconvenientes se emplean métodos de purificación de ácidos nucleicos y variantes basadas en nested PCR. Siguiendo esta línea, se ha desarrollado y patentado (P20002613, 31 octubre 2000) un nuevo sistema de amplificación, llamado Co-PCR, basado en la acción simultánea y coordinada de cuatro iniciadores, que permite la detección de virus de ARN. La reacción tiene lugar en un único cóctel, una única reacción y en un solo tubo cerrado. La transcripción reversa y simultánea de dos fragmentos, la coordinación entre iniciadores externos e internos y la cooperación de los amplicones a modo de iniciadores son la base del método. Co-PCR ha sido aplicado para la detección de diferentes virus: virus de las manchas anulares latentes de la fresa (SLRSV), virus del enrollado de la hoja del cerezo (CLRV), virus de la sharka (PPV), virus del mosaico del pepino (CMV) y virus de la tristeza de los cítricos (CTV). Para el estudio de la sensibilidad, se realizaron diluciones decimales seriadas de extractos vegetales de plantas infectadas y se compararon los resultados obtenidos mediante RT-PCR, nested RT-PCR y Co-PCR. Co-PCR alcanzó una sensibilidad similar a la del nested RT-PCR, que resultó ser 100 veces mayor que la obtenida con RT-PCR. Además, los tres métodos se aplicaron para la detección de: i) PPV (tipos D y M) en material vegetal de *Prunus persicae*, *P. salicina* y *P. domestica* libre de virus e infectado; ii) CMV, CLRV y SLRSV en muestras asintomáticas de *Olea europaea* y iii) CTV en muestras de *Citrus sinensis* sanas e infectadas. Los resultados fueron coincidentes entre RT-PCR, nested RT-PCR y Co-PCR en muestras con alta carga viral, pero en el caso de plantas asintomáticas de *O. europaea* se detectaron un mayor número de positivos por nested RT-PCR y Co-PCR. La visualización del resultado puede realizarse mediante revelado colorimétrico con oligonucleótidos marcados con digoxigenina. Así, Co-PCR permitió la caracterización de los aislados de PPV en los tipos D y M empleando oligonucleótidos específicos de cada tipo. Sin embargo, Co-PCR presenta como desventaja la necesidad de purificar los ácidos nucleicos, puesto que con métodos de preparación de dianas como la inmunocaptura, las inhibiciones limitan su uso. Como ventajas Co-PCR presenta su gran sensibilidad, la posibilidad de ser realizada en capilares y la facilidad de uso y comercialización puesto que sólo requiere un único cóctel de reacción.

## DETECCIÓN Y MAPEAMIENTO FÍSICO Y GENÉTICO DEL GENOMA DE *Spiroplasma kunkelii*

BARROS, T. S.L.<sup>1</sup>, DAVIS, R.E.<sup>2</sup>, DALLY, E.E.<sup>2</sup> Y RESENDE, R.O.

<sup>1</sup>Lab. de Virologia e Microscopia Eletrônica, Depto. de Biologia Celular, UnB, 70919-970, Brasília/DF;

<sup>2</sup>Molecular Plant Pathology Lab.

USDA-ARS, 20705, Beltsville/MD, USA; e-mail: resende@unb.br.

Actualmente el “Achaparramiento pálido del Maíz” también conocido como “corn stunt spiroplasma”, representa un de los factores limitantes en la producción de maíz (*Zea mays*) en las Américas. El agente causador de esta enfermedad es el *Spiroplasma kunkelii*, el cual posee un genoma compuesto por un ADN en doble hélice circular. En el presente trabajo, nosotros realizamos la construcción de unos oligonucleótidos para la detección rápida y específica de *S. kunkelii* a través de PCR, visando el desarrollo de un kit para el diagnóstico rápido y específico de patógenos causantes de esta enfermedad. En este trabajo fue utilizada la secuencia del gen para la Espiralina, proteína abundantemente presente en la membrana de los espiroplasmas. Nosotros realizamos la síntesis de seis oligonucleótidos para utilizarlos en cinco combinaciones diferentes. Todos los oligonucleótidos fueron específicos para *S. Kunkelii*, aunque los pares CSSF1/R1 y CSSF2/R6 fueron los más eficientes, ya que detectaron 100 fg y 1 pg de ADN, respectivamente. Los oligonucleótidos también detectaron *S. Kunkelii* en muestras de maíces infectados, provenientes del campo. Nosotros comparamos, a través de electroforesis en gel de campo pulsante, los genomas de tres linajes diferentes de *S. Kunkelii*, los cuales fueron FL80, I747 y CR2-3X. Después de esta comparación se vio que los cromosomas mostraban una variación en sus tamaños y padrones de restricción. Los aislados FL80, I747 y CR2-3X presentaron un tamaño de sus genomas estimados en 1,650; 1,620 y 1,520 pKb respectivamente. Utilizando digestiones dobles y recíprocas, con las enzimas *Apal*, *BssHII*, *EagI*, *SmaI* y *SaII*, fue construido un mapa físico del genoma del linaje CR2-3X. Los fragmentos obtenidos en esas digestiones fueron conectados e identificados a través de electroforesis de campo pulsante en gel bidimensional. Nosotros obtuvimos el mapa genético a través del análisis en southern-blot utilizando sondas homólogas para el gen de la espiralina. Las informaciones obtenidas por el mapeamiento de *S. kunkelii* confirmaron la existencia de variaciones intra-específicas en el genoma de los espiroplasmas, lo que está siendo utilizado en el proceso de anotación del proyecto genómico de *S. kunkelii*.

## AGRICULTURA SOSTENIBLE Y FITOPATOLOGÍA: ¿ESTAMOS HACIENDO FRENTE A LAS EXIGENCIAS QUE SE PLANTEAN?

JIMÉNEZ DÍAZ, R.M.

*Instituto de Agricultura Sostenible, CSIC; y Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos y de Montes, Universidad de Córdoba, Apartado 4084, 14080 Córdoba*

Una diversidad de casos recientes asociados a las nuevas formas de producción agrícola (i.e., ecológica, industrializada, intensiva, sostenible, etc.) y al libre intercambio de material vegetal, indican que Fitopatología y fitopatólogos tienen aún importantes retos que afrontar. Ejemplos de aquéllos son epidemias devastadoras de enfermedades re-emergentes asociadas con la introducción de nuevos agentes, cambios en prácticas agrícolas, extensión del monocultivo o rotaciones de cultivos demasiado reducidas, etc. En España, al menos 15 nuevos patógenos de diversa naturaleza han sido introducidos recientemente y se han establecido en diversas áreas de producción agrícola. Adicionalmente, las nuevas formas de producción agrícola y la demanda de los consumidores de seguridad alimentaria y protección ambiental confieren dificultades a los retos señalados, porque imponen serias restricciones sobre los procedimientos y tecnologías que pueden ser utilizadas para preservar la sanidad de los cultivos.

La implementación de programas de Control Integrado de Enfermedades (CIE) propuesta para satisfacer dichas exigencias sin renunciar al compromiso de sanidad vegetal, es en muchos casos dificultada por conocimientos insuficientes sobre los patosistemas de aplicación. En programas CIE, los fitopatólogos deben poner énfasis en la prevención más que en la intervención y atender a las características ambiente dependiente de los sistemas; y en ambos casos son necesarios conocimientos científicos y técnicos, y profesionales especializados. No obstante, a pesar de las dificultades, la presión de mercados y consumidores está promoviendo la puesta en práctica de “programas parecidos” a los CIE, que se basan únicamente en protocolos técnicos. Estos protocolos no generan nuevo conocimiento, sino que convierten el disponible en meros procedimientos orientados a satisfacer dicha presión. Por lo tanto, la eficacia de su aplicación depende significativamente de la solidez del conocimiento ya disponible y del entrenamiento profesional de los usuarios. Las enseñanzas fitopatológicas han experimentado una progresiva erosión con las sucesivas modificaciones curriculares en las ETSIAs. De hecho, es cuestionable que los *currícula* fitopatológicos actuales sean suficientes para asegurar una práctica profesional especializada, entendida como aplicación de los principios científico-técnicos desarrollados por la investigación fitopatológica en la promoción de la Sanidad Vegetal. Sin embargo, dicha profesión es necesaria para satisfacer las exigencias de las nuevas formas de producción agrícola antes señaladas, y para poner en práctica varios de los aspectos y acciones incluidas en la nueva Ley de Sanidad Vegetal.

## O-4

# IMPACTO DE LA EVALUACIÓN EUROPEA DE SUSTANCIAS ACTIVAS PLAGUICIDAS SOBRE LA PRODUCCIÓN SOSTENIBLE DE FRUTAS Y HORTALIZAS EN ESPAÑA

CADAHÍA BIELZA, J.I.

*Director Técnico de AEPLA. Asociación Empresarial para la Protección de las Plantas.  
C/ Almagro, 44. 4º Dcha. 28010 Madrid.*

En este trabajo, se presenta una visión en detalle de la actual situación sobre el sistema de evaluación de sustancias activas fitosanitarias, en el marco normativo del Registro Único Europeo y su incidencia en la disponibilidad de productos para la protección de los cultivos hortofrutícolas.

Se repasa el marco legislativo establecido por la UE y la trasposición de dicha normativa en España, para la evaluación, el registro y la comercialización de los productos fitosanitarios en los países Miembros de la UE. Se trata el nivel de requerimientos necesarios para la puesta en el mercado de los productos fitosanitarios, fijados en la Directiva marco 91/414/CEE, (15.07.91); estableciéndose la armonización de las diversas legislaciones nacionales, así como los principios y requisitos para un sistema único de registro. En su Anexo I, se establece una lista de sustancias activas fitosanitarias (lista comunitaria) que han superado la evaluación, que serán las únicas aptas para la preparación de formulados y susceptibles de su puesta en el mercado.

Se hace un recorrido por el programa de revisión de las sustancias activas comercializadas con anterioridad a julio de 1993, unas 835, cuyo estudio y evaluación se estableció en 4 etapas que finalizan en el 2003, 2005 y 2008. Teniendo en cuenta el ritmo de evaluación, el número de sustancias activas notificadas y finalmente defendidas, y el número estimado de compuestos que no superarán la evaluación, se piensa que quedarán menos de 200. A esto hay que añadir las nuevas sustancias activas, aspirantes a su inclusión al citado Anexo I. Finalmente, se realiza un análisis de las implicaciones de la citada revisión. Se observa una influencia negativa debida a los altos costes de investigación y desarrollo que sólo justifican inversiones en "grandes" cultivos continentales, dificultades para autorizar los preparados en el binomio cultivo/agente nocivo, en condiciones de gran variabilidad agronómica y finalmente escasez de medios de defensa vegetal, que podría dar como resultado un uso excesivo de los existentes, lo que incrementaría el riesgo de la aparición de resistencias, y posiblemente a un aumento del intrusismo y del fraude. También se observan consecuencias muy positivas, sobre el uso más racional de los productos fitosanitarios y otros insumos agrarios, dentro del marco de la agricultura sostenible y de la producción integrada, con la consiguiente minimización del impacto ambiental, sobre el operario y sobre el consumidor.

## ESTRUCTURA DE POBLACIONES E INCIDENCIA DE VIRUS SIMBIÓTICOS EN *Epichloë festucae*

ZABALGOGEAZCOA, I.<sup>1</sup>, MARTÍNEZ ZAPATER, J.M.<sup>2</sup>, ARROYO, R.<sup>2</sup> Y GARCÍA CRIADO, B.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología de Salamanca, Cordel de Merinas 40-52, 37008 Salamanca.

<sup>2</sup> Departamento de Genética Molecular de Plantas, Centro Nacional de Biotecnología, CSIC, Campus de la Universidad Autónoma de Madrid, Cantoblanco, 28049 Madrid

El hongo endofítico *Epichloë festucae* infecta a la gramínea *Festuca rubra*. La reproducción sexual de este hongo sucede con baja frecuencia y su resultado es la esterilización de la planta al producirse un estroma que impide la emergencia de la espiga. El mecanismo más corriente de reproducción de *E. festucae* es la transmisión vertical por semilla, con este mecanismo de reproducción asexual no se producen síntomas en las plantas infectadas. Debido a la presencia de alcaloides fúngicos, las plantas infectadas por *E. festucae* son más resistentes a herbívoros; este efecto ha despertado un interés en el uso de endofitos para la mejora de variedades de *F. rubra* destinadas a césped.

La península ibérica es un centro de diversidad de *F. rubra* y en los pastos naturales de las dehesas de Salamanca, el 70% de las plantas de esta especie están infectadas por *E. festucae*.

Para determinar el potencial de los ecosistemas de dehesa como reservorios de germoplasma endofítico se estudio la estructura genética de dos poblaciones de *E. festucae* utilizando marcadores moleculares de tipo AFLP. Se detectó la existencia de diferenciación genética entre poblaciones, mientras que dentro de cada población existe un predominio de la reproducción clonal, pero también una variabilidad considerable.

En estas dos poblaciones de *E. festucae*, una media del 67% de los aislados están infectados por uno o dos micovirus (EfV-1 y EfV-2). Estos virus son persistentes en los linajes de sus hospedadores, que no muestran síntomas obvios, y se transmiten eficientemente en los propágulos asexuales del hongo.

## ESTRUCTURA GENÉTICA DE LA POBLACIÓN DEL *VIRUS DEL MOSAICO DE LA SANDÍA* EN ESPAÑA

MORENO, I.M.<sup>1</sup>, DÍEZ, J.A.<sup>2</sup>, MALPICA, J.M.<sup>3</sup>, FRAILE A.<sup>1</sup>, Y GARCÍA-ARENAL, F.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Biotecnología, E.T.S.I. Agrónomos de Madrid, Ciudad Universitaria s/n., 28040 Madrid.

<sup>2</sup> Estación Experimental "La Mayora"-CSIC, Algarrobo-Costa, 29750 Málaga.

<sup>3</sup> Departamento de Biotecnología, I.N.I.A., Carretera de La Coruña km 7.5, 28049 Madrid.

El *virus del mosaico de la sandía* (WMV, *Potyvirus*), es uno de los virus de mayor incidencia en cultivos de cucurbitáceas en España. A partir de una colección de aislados de campo procedentes de las principales áreas de producción de melón en España, obtenida entre los años 1995 y 1999, se ha llevado a cabo un estudio de la estructura genética de la población de WMV en melón en España. Un total de 44 aislados fueron clonados biológicamente mediante pases en huéspedes de lesión localizada (dos pases en *Chenopodium amaranticolor* y un pase en *Chenopodium quinoa*) y posteriormente multiplicados en calabacín. A partir del material infectado de calabacín se llevó a cabo el clonaje y la secuenciación de tres regiones del genoma viral en cada uno de los aislados. Los segmentos genómicos clonados y secuenciados corresponden a la porción aminoterminal del gen que codifica la proteína P1 (700 nt), la región carboxiterminal del gen de la proteína de los cuerpos de inclusión (CI, 700 nt), y el gen completo de la proteína de la cápsida (CP, 840 nt).

A partir de los datos obtenidos se analizan las distancias genéticas y las relaciones filogenéticas entre los distintos aislados. Los resultados obtenidos indican 1) que los distintos genes analizados presentan distintas historias evolutivas, 2) que todos los aislados analizados pertenecen a dos subtipos definidos por dos de los genes, 3) existe evidencia de recombinación y 4) la recombinación no afecta a los cistrones. Estos datos cuestionan las ideas más comunes sobre evolución de virus y son relevantes para el uso de la resistencia en el control.

## RÁPIDA EVOLUCIÓN DE LA POBLACIÓN DE GEMINIVIRUS IMPLICADOS EN EL RIZADO AMARILLO DEL TOMATE EN ESPAÑA

MONCI, F., GARCÍA-ANDRÉS, S., SÁNCHEZ-CAMPOS, S., NAVAS-CASTILLO, J. Y MORIONES, E.

Laboratorio de Virología. Estación Experimental "La Mayora", CSIC, 29750 Algarrobo-Costa, Málaga.

La enfermedad del rizado amarillo del tomate se detectó por primera vez en España en el año 1992 siendo la especie *Tomato yellow leaf curl Sardinia virus* (TYLCSV) (género *Begomovirus*, familia *Geminiviridae*) la causante de las epidemias. En el año 1997, la cepa Mld de otro geminivirus, el *Tomato yellow leaf curl virus*, TYLCV-Mld (de ahora en adelante TYLCV), apareció asociado con TYLCSV en las infecciones en tomate y se identificó como causante de una nueva enfermedad de judía. Como consecuencia de la aparición de este nuevo geminivirus, se produjo un rápido desplazamiento de TYLCSV por TYLCV en las epidemias en tomate. Estas dos especies de geminivirus poseen una gama de huéspedes distinta, así solamente TYLCSV infecta *Solanum nigrum* y solamente TYLCV infecta judía. En prospecciones de campo realizadas durante 1999 en la provincia de Almería se detectaron plantas de judía que al ser analizadas por hibridación molecular hibridaban tanto con sondas específicas a TYLCSV como a TYLCV. El análisis detallado de una de estas muestras reveló que el virus causante de la infección era el resultado de una recombinación natural entre TYLCSV y TYLCV. Hemos secuenciado su genoma completo y disponemos de un clon infectivo de un aislado del mismo. Los estudios biológicos realizados indican que este recombinante posee nuevas características patogénicas que pueden conferirle una mayor eficacia biológica. Se ha estudiado la frecuencia en campo de aislados con sitios de recombinación equivalentes a los detectados en el recombinante natural a partir de muestras de tomate y judía recogidas durante 1998, 1999 y 2000 en parcelas comerciales de las principales zonas de cultivo del sudeste español. Nuestros resultados indican que desde 1999 estos aislados se están imponiendo en las poblaciones de geminivirus que afectan a judía y están incrementando su frecuencia en tomate. En otoño del año 2000, se detectó una muestra de *Solanum nigrum* infectada con otro recombinante natural, en este caso entre TYLCSV y otra cepa de TYLCV diferente a Mld. Los estudios de caracterización biológica y molecular de este nuevo recombinante están actualmente en curso. En conjunto estos trabajos muestran el gran dinamismo y la rápida evolución de la población de geminivirus presente en España y la importancia de la recombinación como fuente de diversificación genética en esta población.

# UNA PROPUESTA EVOLUTIVA EN PATOTIPOS Y RAZAS PATOGENICAS DE *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*, EL AGENTE DE LA *Fusariosis* VASCULAR DEL GARBANZO

JIMÉNEZ GASCO, M.M.<sup>1</sup> Y JIMÉNEZ DÍAZ, R.M.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Instituto de Agricultura Sostenible, CSIC, Apartado 4084, Córdoba.

<sup>2</sup> Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos y de Montes, Universidad de Córdoba, Apartado 3408, 14080 Córdoba (ag1jidir@uco.es)

*Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* es paradigmática entre las *formae speciales* de *F. oxysporum* en cuanto a diversidad patogénica, ya que en sus poblaciones naturales pueden ser diferenciados los patotipos de Amarillez y Marchitez y las razas patogénicas 0, 1A, 1B/C, y 2-6. Las razas 0 y 1B/C son del patotipo de Marchitez, mientras que las 1A-6 pertenecen al de Marchitez. Además, estas razas se encuentran distribuidas de forma distintiva: las razas 2, 3, y 4 se han identificado únicamente en la India, mientras que las razas 0, 1A, 1B/C, 5 y 6 están principalmente distribuidas en la Cuenca Mediterránea y California.

Esta diversidad patogénica y geográfica sugiere que este taxón pueda ser de origen polifilético. Sin embargo, el análisis de la extensión y naturaleza de la variación en las secuencias de intrones de genes altamente conservados en genomas fúngicos [factor de traducción y elongación 1a (*EF1a*), b-tubulina, histona 3, actina, y calmodulina], indicó que los aislados de *F. o. ciceris* poseen secuencias idénticas para estos genes. Además, el análisis de máxima parsimonia del gen *EF1a* agrupó a los aislados de *F. o. ciceris* de forma distintiva respecto a otras *formae speciales* de *F. oxysporum*, sugiriendo un origen monofilético de *F. o. ciceris*. La interpretación más simple y lógica sobre el origen monofilético de *F. o. ciceris* es que sus aislados derivan de una población inicial fundadora pequeña que adquirió patogenicidad sobre *Cicer* spp., y que la posterior diversificación patogénica de dicho agente ha resultado de acumulación de cambios genéticos. La diversidad genética y relación filogenética entre razas de *F. o. ciceris* ha sido analizada utilizando 'fingerprints' de ADN genómico de aislados *F. o. ciceris* representativos de su diversidad racial y geográfica, mediante hibridaciones con tres sondas de ADN repetitivo del propio genoma del patógeno que constituyen secuencias similares a transposones. El análisis de los 'fingerprints' mostró que los aislados de *F. o. ciceris* presentan patrones de hibridación altamente correlacionados con el patotipo y con la raza patogénica a la que pertenecen, independientemente del tipo de análisis fenético o cladístico que se realizó con ellos. Además, las razas patogénicas evolutivamente más cercanas en los análisis presentan patrones de virulencia más similares que con los de razas más alejadas evolutivamente. Nuestros resultados apoyan un modelo evolutivo para *F. o. ciceris* en el que el avance en la evolución de las razas patogénicas va unido un incremento en la virulencia de éstas, i.e., las razas evolutivamente más antiguas son las de menor virulencia.



## RELACIÓN DE LAS INFECCIONES LATENTES DE *Monilinia* spp. EN EL MOMIFICADO DE FRUTA DE HUESO EN POSTCOSECHA

GELL, I., DE CAL, A. Y MELGAREJO, P.

Dept. Protección Vegetal, INIA, Ctra. De la Coruña km. 7., 28040 Madrid.

*Monilinia* spp. (*M. laxa* y *M. fructigena*) son los hongos que causan la podredumbre parda y el momificado de los frutales de hueso en España. En los últimos años las pérdidas en la producción de la fruta de hueso debidas a estos patógenos son cuantiosas, debido a la climatología favorable para su desarrollo. El control de la enfermedad se realiza mayoritariamente con tratamientos químicos en precosecha que, en años favorables, no controlan la enfermedad, llegándose a tener podredumbres de hasta el 80% o incluso superiores. Una de las causas de esta falta de control es la aplicación de los tratamientos en momentos no adecuados, sin conocer el riesgo potencial de infección. La epidemiología de *M. laxa* y de *M. fructigena* es poco conocida en España. Se han estudiado las fuentes de inóculo de la podredumbre parda y en especial la contribución de las infecciones latentes a las pérdidas en recolección y postcosecha en fruta de hueso. Para ello se han realizado muestreos en huertos de melocotón y nectarino de la provincia de Lleida durante tres campañas consecutivas 1999-2000, 2000-2001 y 2001-2002 antes de la floración, en floración, en frutos inmaduros desde el cuajado hasta la recolección, y en postcosecha. Se ha demostrado la importancia de los brotes secos y de las momias que quedan en los árboles como fuente de inóculo primaria, así como la relación existente entre las infecciones latentes y la podredumbre en postrecolación. Se discuten los resultados en relación al control de la enfermedad.

O-10

## DESARROLLO ESPACIO-TEMPORAL DE EPIDEMIAS DE VERTICILOSIS EN UNA PLANTACIÓN DE OLIVO

NAVAS CORTÉS, J.A. Y TRAPERO CASAS, J.L.

Instituto de Agricultura Sostenible, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Apartado 4084, 14080 Córdoba. e-mail: [ag1nacoj@uco.es](mailto:ag1nacoj@uco.es)

La Verticilosis causada por los patotipos defoliante (D) y no defoliante (ND) de *Verticillium dahliae*, es una de las enfermedades más importantes de las que afectan al olivar en el mundo. En España la enfermedad se ha extendido en los últimos años asociada con el establecimiento de nuevas plantaciones de olivar en regadío y la dispersión del patotipo D de *V. dahliae* a nuevas áreas. La infección de plantas de olivo por este patotipo provoca la caída de hojas infectadas que resulta en una defoliación extensa y en algunos casos la muerte del árbol. La dispersión del patógeno a larga distancia puede producirse por material de plantación infectado y por la diseminación de restos vegetales de cultivos susceptibles afectados de Verticilosis (i.e., algodónero, olivo). La dispersión a corta distancia puede ocurrir por medio de hojas infectadas o suelo infestado.

Las epidemias de Verticilosis estudiadas en este trabajo se desarrollaron en una plantación de olivo cv Arbequina de 3 años de edad (4,6 ha, 1.800 árboles) establecida con plantas certificadas en un campo sin historia de la enfermedad en Córdoba. La incidencia de Verticilosis en esta plantación, se incrementó de 3 a 106 árboles infectados en el período entre noviembre 1999 a junio 2002. En cada uno de estos árboles se caracterizó el patotipo de *V. dahliae* mediante aislamientos en medio de cultivo y análisis de PCR específica. El 79,5% de los árboles estuvieron infectados por el patotipo D, y el 20,5% por el patotipo ND de *V. dahliae*. El progreso temporal de la incidencia acumulada de Verticilosis se describió por un modelo logístico de doble sigmoide. En el modelo ajustado, la tasa de infección fue máxima para el período invierno-primavera, decreciendo hasta alcanzar valores mínimos durante el verano y otoño. La dinámica espacial se estudió utilizando análisis de dinámica de focos y análisis de clases de distancia de dos dimensiones. Los focos de Verticilosis fueron en su mayoría isodiamétricos, y el incremento en el número de focos estuvo directamente correlacionado con el incremento de incidencia. La tasa de incremento de focos fue inferior a la de incremento de incidencia. El análisis de clases de distancia de dos dimensiones indicó una distribución espacial no aleatoria de la incidencia de Verticilosis. El nivel de agregación de árboles afectados se incrementó con el tiempo y estuvo asimismo correlacionado con el incremento de incidencia de enfermedad. Además, se detectó un nivel de agregación superior al esperado en uno de los bordes de la parcela, que sugiere la dispersión del inóculo de *V. dahliae* desde un campo de algodónero afectado por Verticilosis próximo a la plantación de olivo.

## RELACIÓN COSTE-EFICACIA DEL GEN Mi DE RESISTENCIA EN TOMATE PARA EL CONTROL DE *Meloidogyne javanica* EN INVERNADERO

ORNAT, C.<sup>1</sup>, SORRIBAS, F.J.<sup>1</sup>, VERDEJO-LUCAS, S.<sup>2</sup> Y GALEANO, M.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Dpto. Ingeniería Agroalimentaria y Biotecnología. UPC. Comte d'Urgell, 187. 08036 Barcelona.

<sup>2</sup>Dpto. Protección Vegetal. IRTA.. Crta Cabrils, s/n. 08348 Cabrils, Barcelona.

El control de *Meloidogyne* en cultivos hortícolas se realiza principalmente mediante la aplicación de nematicidas fumigantes y no fumigantes, aunque ninguno de ellos es comparable al bromuro de metilo en cuanto a la relación coste-eficacia, y son pocos los autorizados para su uso en Producción Integrada. La búsqueda de alternativas al bromuro de metilo debe considerar el impacto ambiental y la relación coste-eficacia. El objetivo de este estudio fue determinar la relación coste-eficacia del gen Mi de resistencia en tomate para el control de *Meloidogyne javanica* en invernadero como alternativa al bromuro de metilo.

Los cultivares de tomate Monika (resistente) y Durinta (susceptible) se cultivaron de marzo a julio en suelo fumigado con bromuro de metilo (75 g/m<sup>2</sup> y coste 2,44 euros/m<sup>2</sup>) en octubre de 1998 y sin tratar en un invernadero infestado por *M. javanica* durante tres años consecutivos. Las parcelas eran de 9,2 m<sup>2</sup> y la densidad de plantación fue de 2,9 plantas/m<sup>2</sup>. El diseño experimental fue al azar con cuatro repeticiones por tratamiento. La densidad de nematodos se determinó al inicio (Pi) y al final (Pf) de cada cultivo. La producción se determinó cosechando los tomates de 8 plantas por repetición semanalmente durante seis semanas. El precio del tomate se estimó según los precios del mercado central de Barcelona durante el período de cosecha.

La población inicial del nematodo fue de 480 y 660 J2/250 cm<sup>3</sup> de suelo en las parcelas plantadas con tomate susceptible y resistente, respectivamente. La densidad al final del cultivo fue de 10.356 y 190 J2/250 cm<sup>3</sup> de suelo después de tres años de cultivar tomate susceptible y resistente, respectivamente. El beneficio neto medio de cultivar tomate resistente en parcelas infestadas fue de 30.000 euros/ha y año respecto el cultivo de tomate susceptible y de 10.600 euros/ha respecto el cultivo de tomate resistente en parcelas fumigadas con bromuro de metilo. La pérdida neta media de cultivar tomate susceptible en parcelas infestadas respecto las fumigadas con bromuro de metilo fue de 21.000 euros/ha y año. La relación coste-eficacia del gen Mi de resistencia en tomate para el control de *Meloidogyne* es mejor que la del bromuro de metilo.

Proyecto financiado CICYT AGF99-0560

O-12

## COLONIZACIÓN PREFERENTE DE LA RIZOSFERA DE GUI-SANTE POR GENOTIPOS DE *Pseudomonas fluorescens* PRODUCTORES DE 2,4-DIACETILFLOROGLUCINOL

LANDA B.B.

USDA-ARS Root Disease and Biological Control Research Unit. Washington State University, 99164-6430 Pullman, WA, USA, y Dpto. de Agronomía. Universidad de Córdoba. Apdo. 3084. 14080, Córdoba.

Los aislados de *Pseudomonas fluorescens* (*Pf*) que producen el antibiótico 2,4-diacetilfloroglucinol (2,4-DAFG) se encuentran entre las bacterias más efectivas como agentes de control biológico (ACBs) de enfermedades causadas por hongos de suelo. Las poblaciones nativas de *Pf* productoras de 2,4-DAFG en suelos supresivos pueden ser una fuente prometedora de ACBs para su utilización en estrategias de control integrado de enfermedades. La colonización adecuada del sistema radical de la planta es un aspecto fundamental para la utilización de ACBs a gran escala, ya que su eficiencia de biocontrol requiere que se establezcan y persistan en el nicho ecológico donde han de ser operativos. El objetivo de este trabajo fue determinar si genotipos específicos de *Pf* productoras de 2,4-DAFG colonizan preferencialmente la rizosfera de guisante.

Se obtuvieron más de 300 aislados de *Pf* productores de 2,4-DAFG a partir de raíces de plantas de guisante, que se cultivaron repetidamente en dos suelos con historia de monocultivo de guisante o trigo y que son, respectivamente, supresivos de la Fusariosis Vascular del guisante o del Mal del Pie del trigo. Análisis PCR utilizando secuencias repetitivas con el iniciador BOXA1R (BOX-PCR), o de polimorfismos de patrones de restricción (RFLPs), permitieron identificar siete genotipos de *Pf* en ambos suelos. Estos resultados incrementaron en tres (O, P y Q) los 14 (A-N) genotipos que se habían identificado previamente. Los genotipos D y P se aislaron con mayor frecuencia en todas las muestras y durante todos los ciclos de crecimiento de la planta. Para determinar si estos genotipos colonizan de forma preferencial las raíces de guisante, se llevaron a cabo ciclos continuados de cultivo utilizando 14 aislados de *Pf* pertenecientes a 8 genotipos seleccionados (A, B, D, E, L, O, P y Q), que se incorporaron al suelo únicamente en el primer ciclo de crecimiento. Las densidades de población de aislados de los genotipos D y P resultaron significativamente mayores que las de los otros genotipos, y fueron siempre superiores a  $10^6$  ufc/g de raíz durante las 15 semanas del experimento.

Este trabajo demuestra que los aislados de *Pf* pertenecientes a los genotipos D y P colonizan más eficientemente la rizosfera de plantas de guisante que los aislados pertenecientes a otros genotipos. Además, los perfiles genéticos generados mediante BOX-PCR y RFLPs pueden ser utilizados para predecir la competencia rizosférica de los genotipos de *Pf* productoras de 2,4-DAPG.

## ANÁLISIS POLIFÁSICO DE UN GRUPO DE CEPAS DE *Pseudomonas fluorescens* ACTIVAS EN EL CONTROL BIOLÓGICO DE BACTERIAS Y HONGOS FITOPATÓGENOS

BADOSA, E., MORENO, C., PUJOL, M., ALEMANY, J., GAJU, N. Y MONTESINOS, E.

*Institut de Tecnologia Agroalimentaria-Certa-CIDSAV. Universitat de Girona. Campus Montilivi. 17003 Girona. E-mail: ebadosa@intea.udg.es*

Muchas bacterias del grupo fluorescente del género *Pseudomonas* son capaces de controlar enfermedades causadas por hongos y bacterias fitopatógenos (ACBs) o muestran actividad como bacterias promotoras del crecimiento de las plantas (BPCPs). Se han descrito diversos metabolitos que intervienen en su actividad como ACBs y BPCPs entre los que destacan el 2,4-diacetilfloroglucinol (PhI), ácido fenazin-1-carboxílico (PCA), pirrolnitrina (Prn), pioluteorina (Plt) ácido cianhídrico (HCN), ácido 3-indolacético (IAA), ácido salicílico (SA), sideróforos y quitinasas.

Nuestro laboratorio ha constituido una colección de 72 cepas de *Pseudomonas* del grupo fluorescente que incluye 52 aislados productores de distintos metabolitos y 20 cepas de referencia de cultivos tipo o cedidas por otros investigadores.

Las cepas se han caracterizado fenotípica y genotípicamente. La caracterización fenotípica se ha llevado a cabo mediante la identificación a nivel de especie con las galerías API 20NE, pruebas bioquímicas específicas y análisis FAME; producción de metabolitos como PCA, PhI, Prn, Plt, SA, IAA, HCN, sideróforos y quitinasas mediante diferentes técnicas; antagonismo *in vitro* en diversos medios frente a dos hongos (*Stemphylium vesicarium* y *Penicillium expansum*) y tres bacterias fitopatógenas (*Erwinia amylovora*, *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* y *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis*); eficacia de la inhibición de la infección en bioensayos *in vivo* sobre material vegetal frente a *P. expansum* en manzana, *S. vesicarium* en hojas de peral y, *E. amylovora* en frutos inmaduros de peral y, finalmente, en ensayos de promoción del crecimiento en dos portainjertos comerciales de *Prunus*. La caracterización genotípica se ha realizado mediante el análisis de los polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción de DNA ribosomal (RFLP-rDNA) y de los fragmentos de macrorestricción genómica de DNA cromosómico separados por electroforesis de campo pulsante (MRFLP-PFGE).

Con los datos obtenidos en la caracterización fenotípica y genotípica se ha realizado un análisis multivariable (correspondencias, correlaciones de Spearman y de frecuencias con variables categóricas) para determinar las correlaciones entre la inhibición de la infección o la promoción del crecimiento con las características fenotípicas y genotípicas de las cepas.

## COMBINACIÓN DE BARRERAS ÓPTICAS E INDUCCIÓN DE RESISTENCIA SISTÉMICA PARA EL CONTROL DEL RIZADO AMARILLO DE TOMATE EN CULTIVO PROTEGIDO

MONCI, F.<sup>1</sup>, GARCÍA-ANDRÉS, S.<sup>1</sup>, ESPÍ, E.<sup>2</sup> Y MORIONES, E.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Estación Experimental «La Mayora», CSIC. 29750 Algarrobo-Costa, Málaga;

<sup>2</sup> Repsol-YPF, Embajadores 183, 28045 Madrid.

La enfermedad del rizado amarillo del tomate (TYLCD) es el principal factor limitante del cultivo de tomate en el sur y sudeste peninsular español. Esta enfermedad está causada por un complejo de virus de la familia *Geminiviridae*, que en condiciones naturales se transmite a través de la mosca blanca *Bemisia tabaci* (Gennadius). La ineficacia de los tratamientos insecticidas en el control de la enfermedad hace imprescindible la búsqueda de estrategias de control alternativas. En cultivos bajo plásticos, la utilización de filmes fotoselectivos con aditivos que filtran la luz ultravioleta se ha descrito como un buen método de control de las infecciones por TYLCD, alcanzándose reducciones en la incidencia superiores al 50%. La protección se ha relacionado con la interferencia en la visión de *B. tabaci*. Además, existen compuestos químicos capaces de activar los mecanismos de autodefensa de la planta. Uno de estos compuestos es el Acibenzolar-S-methyl comercialmente conocido con el nombre de BION, que en ensayos previos en nuestro laboratorio ha mostrado cierta capacidad para reducir las pérdidas debidas a TYLCD. Se ha estudiado la combinación del efecto del plástico fotoselectivo y la utilización de BION para el control de TYLCD. En dos invernaderos tipo parral, uno con plástico de polietileno normal y otro con plástico fotoselectivo, se ha estudiado la evolución de las infecciones de TYLCD en plantas tratadas y no tratadas con BION. Los resultados muestran una reducción significativa de las infecciones por TYLCD y un aumento de la producción por planta bajo la cubierta fotoselectiva, así como en las parcelas en las que se aplicó BION. La combinación de ambas estrategias ha supuesto una notable reducción de la incidencia de TYLCD y un incremento en la producción mayor que en cada tratamiento individual. Por tanto, la utilización de plásticos fotoselectivos a la luz UV junto con la inducción de resistencia sistémica por el BION se presenta como una alternativa muy aconsejable en el caso de cultivos protegidos pudiéndose incorporar en los programas de manejo integrado de TYLCD una vez conocido el efecto sobre los insectos polinizadores y la fauna útil.

## INMUNOMODULACIÓN DE LA INFECCIÓN DEL VIRUS DE LA SHARKA MEDIANTE EXPRESIÓN EN *Nicotiana benthamiana* DE ANTICUERPOS RECOMBINANTES ESPECÍFICOS DE LA PROTEÍNA DE LA CÁPSIDA

ESTEBAN, O.<sup>1</sup>, PEÑA, L.<sup>1</sup>, MARTÍNEZ, M.C.<sup>1</sup>, GORRIS, M.T.<sup>1</sup>, GARCÍA, J.A.<sup>2</sup> Y CAMBRA, M.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Dpto. de Protección Vegetal y Biotecnología. Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA). Carretera Moncada-Náquera km 4.5, 46113 Moncada, Valencia.

<sup>2</sup>Centro Nacional de Biotecnología. CSIC. 28049 Cantoblanco, Madrid

A partir de una genoteca semisintética de anticuerpos humanos se ha seleccionado un anticuerpo recombinante (scFv4C) específico de la capsida (CP) de aislados no transmisibles por pulgón (NAT) del virus de la sharka (plum pox virus-PPV). El fragmento scFv4C se subclonó en el vector pDAP2/S(tet<sub>R</sub>) para ser expresado como fusión a una versión mutada de la fosfatasa alcalina de *Escherichia coli*. La proteína de fusión resultante reaccionó específicamente con la CP de aislados NAT, tanto en Western-blot como en ELISA convencional e inmunoimpresión-ELISA. Se transformaron *N. benthamiana* con dos versiones citoplasmáticas del fragmento scFv4C, una de ellas conteniendo en su extremo carboxiterminal el tetrapéptido KDEL. El carácter transgénico de los distintos regenerantes fue analizado por PCR y Southern blot y la expresión del fragmento scFv por inmunoimpresión-ELISA. Las plantas con fenotipo Kan<sub>R</sub> (nptII +) de la progenie R1 de 19 líneas transgénicas se inocularon mecánicamente con el aislado RB 3.3/Nb de PPV y se seleccionaron dos líneas que fueron desafiadas con distintas concentraciones del mismo aislado NAT de PPV. El grado de infección viral de las plantas desafiadas se determinó mediante evaluación visual de los síntomas a distintos periodos post-inoculación y por ELISA-DASI.

La expresión del fragmento scFv4C confirió protección frente a la infección por PPV, aunque sólo fue claramente apreciable a dosis moderadas-bajas de inóculo (<0.36 mg/ml). La menor susceptibilidad a la infección por PPV de las líneas transgénicas se confirmó a 0.2 mg/ml. A esta dosis de inoculación, el desarrollo de síntomas en las líneas transgénicas fue más lento que en las líneas control y un menor número de plantas (entre el 24 y el 38%) resultaron infectadas (frente al 95% de las plantas control). Varias plantas que al cabo de 15 días presentaron niveles detectables de PPV, aunque inferiores a los del resto de las plantas infectadas, no mostraron acumulación de PPV cuando fueron analizadas por ELISA-DASI al cabo de 30 días, ni mostraron síntomas de la enfermedad.

La estrategia de protección basada en la expresión de anticuerpos recombinantes no presenta riesgos y su potencial para bloquear o interferir funciones virales anima a ensayar la inmunomodulación con otros fragmentos scFv.

O-16

## LIOFILIZACIÓN Y ATOMIZACIÓN: MÉTODOS DE DESHIDRATACIÓN PARA LA FORMULACIÓN DEL AGENTE DE BIOCONTROL *Pantoea agglomerans* (CPA-2)

TEIXIDÓ, N., COSTA, E., USALL, J., ABADÍAS, M. Y VIÑAS, I.

Área de Postcosecha, CeRTA, Centro UdL-IRTA. Avda. Rovira Roure, 177. 25198-Lleida.

El control de las enfermedades de postcosecha de fruta, mediante la utilización del control biológico se presenta como la alternativa más prometedora a los productos químicos de síntesis. La cepa CPA-2 de *P. agglomerans* aislada de la superficie de manzana en el laboratorio de Patología del Área de Postcosecha del centro UdL-IRTA de Lleida, ha demostrado tener una gran eficacia en el control de los principales patógenos fúngicos en postcosecha de fruta de pepita y cítricos. Sin embargo, para su aplicación comercial, se requiere el desarrollo de una formulación de este agente de biocontrol que permita una alta viabilidad y estabilidad a lo largo del tiempo, que facilite su distribución y aplicación y mantenga su efectividad. Las formulaciones pueden ser de tipo sólido o líquido, pero la mayoría de los formulados que proporcionan una larga vida útil requieren mantener las células en estado seco.

En este trabajo se han estudiado dos sistemas de deshidratación del microorganismo; la liofilización y la atomización. Evaluando en cada caso, diversos factores que afectan al proceso como son sustancias protectoras, medios de rehidratación o temperatura (en el caso de atomización). Con el mejor de los formulados se evaluó su viabilidad a lo largo del tiempo en diferentes tipos de envasado y condiciones de conservación, así como el mantenimiento de su efectividad para el control de *Penicillium digitatum* en naranjas.

Las células de *P. agglomerans* mostraron una alta resistencia al proceso de liofilización, consiguiendo viabilidades del 100% al utilizar como protector una solución de sacarosa al 10% y como medio de rehidratación leche desnatada en polvo al 1%. El envasado de las células liofilizadas en envases de cristal y bolsas de plástico (de alta y baja barrera al O<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub>) al vacío, conservados a 4°C de temperatura, permitió mantener la estabilidad y eficacia de las células durante 3 meses. Los formulados presentaron efectividades similares a las células frescas.

Por el contrario, la bacteria resultó ser sensible a las altas temperaturas que se dan durante el proceso de atomización, por lo que no puede considerarse como un buen método de formulación para este agente de biocontrol.



## EMERGENCIA DE *Pseudomonas viridiflava* COMO PATÓGENO DE JUDÍA, KIWI Y LECHUGA EN EL PRINCIPADO DE ASTURIAS

GONZÁLEZ, A.J.<sup>1</sup> Y MENDOZA, M.C.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Laboratorio de Fitopatología, S.E.R.I.D.A. Carretera de Oviedo s/n, 33300 Villaviciosa. Asturias.

<sup>2</sup> Área de Microbiología. Departamento de Biología Funcional. Universidad de Oviedo, c/ Julián Clavería 6. 33006 Oviedo.

Durante el período 1999-2002, a partir de muestras de judía, kiwi y lechuga con síntomas de bacteriosis se aislaron *Pseudomonas* del grupo fluorescente. La identificación de los aislamientos se llevó a cabo mediante pruebas bioquímicas (LOPAT, Hugh-Leifson, tests de asimilación, etc), encontrando tres grupos de organismos. El primero compatible con *Pseudomonas savastanoi* pv. *phaseolicola* (en judía), el segundo compatible con *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* (en judía y kiwi) y un tercer grupo con características que no se ajustaban a un perfil definido y causando daño en las tres especies de plantas. Los organismos de este grupo eran oxidasa y arginina negativos; y esculina, gelatina, manitol, eritritol, sorbitol y m-inositol positivos. La hipersensibilidad en tabaco y producción de levano en medio hipersacarosado (colonias atípicas: abombadas y de color amarillento) frecuentemente se perdían por pases sucesivos en laboratorio, y la reacción de pectinólisis de la patata era variable y planteaba dificultades de interpretación. El poder patogénico de las bacterias «atípicas» se demostró verificando los postulados de Koch mediante inoculación en la planta huésped de procedencia, y el grado de virulencia era superior al de cepas de las otras dos especies aisladas en Asturias.

Para establecer la especie o patovar al que pertenecían estas bacterias «atípicas» se procedió a la amplificación-secuenciación del ADN ribosomal 16S de cuatro aislamientos, utilizando como controles las cepas *P. s. pv. syringae* CECT4429 y *P. viridiflava* CECT458. Los resultados confirmaron que los aislamientos atípicos y la cepa CECT458, presentaban una homología del 99% con las secuencias registradas para *P. viridiflava* (acceso AF364097). Señalar que la cepa CECT458 era claramente negativa para la producción de levano y tenía una fuerte actividad pectinolítica en patata.

Como marcador genético para el seguimiento del grupo fluorescente se aplicó la ribotipificación mediante restricción con *SalI* e hibridación con un operón *rnn* (González *et al*, 2000). Los resultados mostraron que los ocho aislamientos «atípicos» de *P. viridiflava* analizados (4 de judía y 4 de kiwi) y la cepa CECT 458 generaban un mismo ribotipo definido por sólo tres fragmentos, mientras que aislamientos de las otras especies generaban otros ribotipos.

Estos resultados confirman la emergencia en Asturias de un linaje de *P. viridiflava* con elevado poder patogénico, perfil LOPAT atípico y un amplio rango de huésped.

González, A.J., Landeras, E., Mendoza, M.C. 2000. Appl. Environ. Microbiol. 66:850-854

O-18

## IDENTIFICACIÓN DE HONGOS ASOCIADOS A ENFERMEDADES DE MADERA EN VID EN ESPAÑA Y SÍNDROMES QUE PROVOCAN

GARCÍA-JIMÉNEZ, J.<sup>1</sup>, VICENT, A.<sup>1</sup>, BELTRÁN, R.<sup>1</sup>, ARMENGOL, J.<sup>1</sup>, TORNÉ, L.<sup>2</sup>, MONTÓN, C.<sup>2</sup> Y GARCÍA-FIGUERES, F.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>*Instituto Agroforestal Mediterráneo. Universidad Politécnica de Valencia.*

Camino de Vera s/n, 46022-Valencia.

<sup>2</sup>*Laboratorio de Sanidad Vegetal, DARP, Generalitat de Catalunya,*

Vía Circulación Norte, Tramo VI, 08040-Barcelona.

Desde el año 1999 el Laboratorio Nacional de Referencia para Hongos Fitopatógenos (Instituto Agroforestal Mediterráneo) y el Laboratorio de Sanidad Vegetal de Cataluña han venido realizando un análisis detallado de muestras de vid para el diagnóstico de hongos fitopatógenos asociados a enfermedades de madera.

En este trabajo se presenta un resumen de los resultados obtenidos en el estudio de 197 muestras procedentes de diferentes zonas productoras de España entre los años 1999-2001.

Los principales agentes fúngicos detectados han sido: *Botryosphaeria obtusa* presente en un 51,3% de las muestras estudiadas, *Phaeoacremonium aleophilum* (28,4%), *Phaeomoniella chlamydospora* (22,8%) y *Cylindrocarpon* spp. (21,8%). En menor medida se han detectado *Fomitiporia punctata* aislado en un 12,2% de las muestras estudiadas y *B. dothidea* (11,2%), mientras que *Eutypa lata* y *Stereum hirsutum* fueron especies de aparición esporádica detectándose en un 4,1% y 1,0% de las muestras estudiadas respectivamente.

Se discute la importancia creciente de este tipo de enfermedades incidiendo en la problemática de decaimiento y muerte de vides jóvenes (enfermedad de Petri) y su relación con los síndromes tradicionalmente descritos en planta adulta.

O-20

## OBSERVACIONES SOBRE EL HETEROTALISMO DE *P. cinnamomi*

LAPEÑA, I., TUSET, J.J., HINAREJOS, C. Y MIRA, J.L.

*Departamento de Protección Vegetal y Biotecnología. Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias. Ctra. Moncada-Náquera, Km 4.5, 46113 Moncada (Valencia)*

Las especies heterotálicas de *Phytophthora* spp. forman oosporas cuando crecen juntos los micelios de aislados con tipos de apareamiento (mating types) A1 y A2. Las oosporas también pueden formarse por la producción de feromonas o sustancias parecidas a hormonas segregadas por aislados con mating types opuestos. Debido al heterotalismo de *P. cinnamomi*, para obtener oosporas se realizan, en diferentes medios de cultivo (agar + vegetales, PDA, OMA y CMA), confrontaciones, tanto interespecíficas (*P. cinnamomi* x *P. capsici*, *P. cinnamomi* x *P. parasitica* y *P. cinnamomi* x *P. citrophthora*) como intraespecíficas (*P. cinnamomi* x *P. cinnamomi* y *P. capsici* x *P. capsici*). Para conocer si en la producción de este tipo de órganos sexuales es necesario el contacto directo entre los micelios o intervienen sustancias como hormonas, exudados u otras, las confrontaciones se realizan colocando una barrera central de diferente naturaleza o sin barrera central. Además se estudia si estas posibles sustancias que pueden intervenir son transmisibles o no a través del medio de cultivo. Sólo se obtuvo producción de oosporas en la confrontación *P. cinnamomi* x *P. capsici*. En el medio agar + vegetales la producción fue abundante, disminuyendo la cantidad producida en los medios CMA y OMA y siendo nula en PDA. El contacto directo de los micelios produjo una baja cantidad de estos órganos y tan sólo la membrana de policarbonato no dejó atravesar el micelio de los hongos. En este caso, a ambos lados de ésta, se contabilizaron gran cantidad de oosporas, tanto en la colonia de *P. cinnamomi* como en la de *P. capsici*. Se comprobó que intervienen en la formación de oosporas sustancias parecidas a hormonas segregadas por los aislados con mating types opuestos y que éstas además son volátiles y no transmisibles a través del medio. *P. cinnamomi* actúa con un mating type A2 y *P. capsici* con mating type A1.

O-22

## CARACTERIZACIÓN DE AISLADOS ESPAÑOLES DEL NANOVIRUS AMARILLAMIENTO NECRÓTICO DEL HABA (FBNYV)

NAVARRO, E.<sup>1</sup>, ORTÍZ, V.<sup>1</sup>, VETTEN, J.<sup>2</sup> Y ROMERO, J.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Protección Vegetal. INIA. Carretera de La Coruña Km. 7,0. 28040- Madrid.

<sup>2</sup>Institut f. Pflanzenvirologie, Mikrobiologie und biologische Sicherheit, BBA, Messeweg 11-12, Alemania.

Recientemente se ha detectado en la región de Murcia la presencia del virus del amarillamiento necrótico del haba ( *Faba bean necrotic yellow Nanovirus*, FBNYV) (Babin *et al.*, 2000), virus cuyo genoma está compuesto de varios círculos de 1 Kb. de DNA monocatenarios, que se transmite de forma persistente por pulgones (*Acyrtosiphom pisum* y *Aphis craccivora* ) y constituye el principal patógeno de los cultivos de haba en el norte de África y en Asia Menor, siendo responsable de una epidemia que destruyó el 80 % de los cultivos de esta leguminosa en Egipto en el año 1992. Perteneció al Género Nanovirus y parece que los miembros de este género tienen una gran diversidad genética, existiendo aislados de diversos países con grandes diferencias entre sí. En este estudio hemos realizado una caracterización serológica y molecular de algunos aislados presentes en los campos de haba del campo de Cartagena.

Plantas de haba con síntomas de amarillamiento y necrosis fueron recolectadas en campos de haba de las localidades Los Martínez del Puerto y Roldan de la Región de Murcia y el FBNYV fue identificado mediante serología, transmisión por pulgones y PCR. 7 muestras identificadas como FBNYV por ELISA indirecto con una mezcla de anticuerpos monoclonales contra FBNYV, fueron analizadas con una batería de anticuerpos monoclonales en experimentos de ELISA TAS. Los anticuerpos monoclonales fueron obtenidos frente a aislados de diversos países de África y Asia Menor, comportándose algunos de ellos como específicos de aislados de un determinado país. (Egipto, Etiopía). Cuatro aislados dieron positivos con alguno de estos monoclonales, Mu-1 se comportaba como un aislado perteneciente al aislado Egipcio, no reaccionando con el monoclonal del aislado Etiope. Mu-11, Mu24 y Mu25, reaccionaban con el Ac. Mo. á-FBNYV 3-4A5, obtenido de un aislado de Argelia 107, que tiene un comportamiento especial ya que no reconoce a los aislados Egipcio o Etiope y solo reacciona con su aislado del cual fue obtenido. Estos aislados españoles fueron amplificados por PCR utilizando los cebadores: P3 5'-ATATGCTGGTGGCTTTACA-3' y 20 5'-AATTACAATCCTATCCTATCCTCACT-3' que amplifican el DNA C2 que codifica para la replicasa viral. El DNA amplificado fue clonado en el plásmido recombinante pGem T-Easy Vector, (Promega®) y secuenciado. Las secuencias obtenidas fueron comparadas con las secuencias presentes en los bancos de genes con la finalidad de obtener árboles filogenéticos que nos den una mayor información de los aislados presentes en España del FBNYV.

## DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE *Verticillium dahliae* EN MUESTRAS DE SUELO MEDIANTE PCR SECUENCIAL ('NESTED')

PÉREZ-ARTÉS, E., Y RUZ CARRILLO, A.

*Instituto de Agricultura Sostenible, CSIC, Apartado 4084, 14080 Córdoba*

Las Verticilosis causadas por *Verticillium dahliae* afectan a una amplia gama de cultivos herbáceos extensivos y hortícolas, así como a cultivos leñosos. Esta enfermedad constituye actualmente uno de los problemas más importantes para el cultivo del olivar. Según la virulencia que manifiestan sobre algodón y olivo, los aislados de *V. dahliae* pueden ser clasificados como defoliantes (D) y altamente virulentos, o no defoliantes (ND) y moderadamente virulentos.

*V. dahliae* puede subsistir en el suelo durante años en forma de microesclerocios libres o inmersos en tejidos infectados. Los suelos infestados constituyen, por tanto, la fuente primaria de inóculo para el desarrollo de la enfermedad, y la severidad de los síntomas depende del patotipo prevalente en ellos. Así pues, la detección específica de los patotipos de *V. dahliae* presentes en el suelo es esencial para la puesta en práctica de estrategias de control integrado de la enfermedad. Recientemente, hemos diseñado iniciadores específicos para la caracterización de los patotipos D y ND de *V. dahliae* y puesto a punto un método, basado en una PCR secuencial, que utiliza estos iniciadores específicos en combinación con otros internos a ellos para la detección de los patotipos en raíces y tallos de olivos infectados. En este trabajo hemos desarrollado un procedimiento para la detección de los patotipos D y ND de *V. dahliae* en muestras de suelo. Este procedimiento incluye: a) un método para la extracción eficiente de ADN de *V. dahliae* de calidad PCR a partir de muestras de una variedad de suelos; y b) un protocolo de PCR secuencial para la detección específica de los patotipos de *V. dahliae* presentes en el suelo.

El método de extracción de ADN requiere de la adición de arena al suelo para favorecer la rotura de las estructuras fúngicas, así como de leche en polvo descremada para impedir la pérdida de ADN por degradación o adsorción a las partículas de suelo y reducir la copurificación de inhibidores de la PCR. Para la detección eficiente de pequeñas cantidades de ADN extraídas de suelo fue necesario hacer uso de una PCR secuencial con los iniciadores externos e internos específicos para cada patotipo. Los iniciadores y condiciones para la PCR secuencial son similares a los utilizados para la detección *in planta*. La validez del procedimiento diagnóstico ha sido constatada utilizando una variedad de suelos, artificial o naturalmente infestados con un rango de densidad de microesclerocios de *V. dahliae*. Los resultados han puesto de manifiesto el carácter estrictamente cualitativo del método diagnóstico.

O-24

## DETECCIÓN DE LA INFECCIÓN DOBLE DE OLIVO POR LOS PATOTIPOS DEFOLIANTE Y NO DEFOLIANTE DE *Verticillium dahliae* MEDIANTE DÚPLEX-“NESTED” PCR

MERCADO BLANCO, J., PARRILLA ARAUJO, S., VALVERDE CORREDOR, A., Y TRAPERO CASAS, J.L.

Instituto de Agricultura Sostenible, C.S.I.C., Apartado 4084, Córdoba

La Verticilosis del olivo, causada por los patotipos defoliante (D) y no-defoliante (ND) de *Verticillium dahliae*, es una de las enfermedades más amenazadora para el olivar por su creciente expansión en zonas olivareras y la dificultad que presenta su control eficiente. El éxito en el control de esta enfermedad requiere la aplicación de ciertas medidas clave, como son la utilización de material de plantación certificado libre del patógeno y la correcta identificación de los patotipos de *V. dahliae* que infectan olivo, que muestran virulencia diferencial tanto en olivo como en algodón. Recientemente, nuestro grupo de investigación ha puesto a punto un procedimiento basado en técnicas de diagnóstico molecular, que permite la detección de los patotipos de *V. dahliae* presentes en plantas de olivo infectadas sintomáticas o asintomáticas producidas en vivero. Dicho procedimiento se ha demostrado eficaz en plantas de diferentes edades y cultivares. Además, hemos comprobado la efectividad de la detección tanto en tallos como en raíces de plantas artificialmente infectadas. Sin embargo, la detección *in planta* de los patotipos D y ND mediante dicho proceso de diagnóstico molecular implica la ejecución por separado de una doble batería de reacciones “nested”-PCR. Por otra parte, en determinadas circunstancias el marcador asociado al patotipo D puede ser amplificado heterológamente en plantas infectadas con aislados del patotipo ND. En este trabajo presentamos las mejoras que hemos introducido en el procedimiento de detección molecular para la consecución de una mayor especificidad y efectividad del mismo. A tal fin, hemos diseñado nuevos cebadores específicos del patotipo D que eliminan las amplificaciones heterólogas anteriormente señaladas. Además, se ha diseñado un protocolo dúplex-“nested” PCR que, comparado con el procedimiento anterior, permite identificar en menos tiempo el patotipo presente en una planta infectada. Asimismo, dicho protocolo se ha validado en plantas de diferentes cultivares de olivo naturalmente infectadas y procedentes de diversas localizaciones geográficas; y ha servido para demostrar que los patotipos D y ND pueden co-infectar una misma planta de olivo natural o artificialmente infectada.

Subvencionado por el proyecto QLK5-CT1999-01523 de la UE.

## EVOLUCIÓN DE LA CONCENTRACIÓN AMBIENTAL DE CONIDIOS DE *Alternaria alternata* pv. *citri* Y *Alternaria* spp. EN PARCELAS DE MANDARINO FORTUNE AFECTADAS POR MANCHA MARRÓN

VICENT, A., SANZ, N., GARCÍA-RELLÁN, D., BADAL, J., ARMENGOL, J. Y

GARCÍA-JIMÉNEZ, J.

*Instituto Agroforestal Mediterráneo. Universidad Politécnica de Valencia.*

Camino de Vera s/n 46022 Valencia

El establecimiento de la mancha marrón de los cítricos causada por *Alternaria alternata* pv. *citri*, en una parcela con caracteres de gravedad, viene determinada principalmente por la acumulación de inóculo año tras año. En estudios previos se evaluó la concentración de conidios de *Alternaria* spp. en el ambiente mediante un capturador Burkard instalado en una parcela con alta incidencia de la enfermedad. Sin embargo, esta técnica no permite distinguir las cepas saprofitas y patógenas de *Alternaria*.

Para soslayar esta cuestión, se realizaron exposiciones ambientales con placas de medio de cultivo ARSA modificado (Timmer *et al.* 1998), altamente selectivo para *Alternaria* spp. Todas las colonias identificadas como *Alternaria* se inocularon sobre hojas inmaduras de mandarino Fortune (Kohmoto *et al.*, 1991), a fin de comprobar su patogenicidad. En un primer ensayo se evaluó la evolución de los conidios de *A. alternata* pv. *citri* a lo largo de la campaña en una parcela afectada situada en Ribarroja (Valencia), estableciendo exposiciones quincenales de una hora entre el 8 de mayo del 2001 y el 26 de febrero del 2002. En otro ensayo se evaluó la evolución diaria en días concretos que representaban condiciones de sequedad o humedad. El 10 de abril y 25 de septiembre de 2001, días tipo seco, se efectuaron exposiciones en la parcela de Ribarroja entre las 9 h y las 17 h a intervalos de dos horas. El día 23 se realizaron exposiciones con la misma cadencia en un día tipo húmedo en Montesa (Valencia).

En el período de estudio el nivel con que se detectó *A. alternata* pv. *citri* fue prácticamente constante lo que contrastaba con la gran fluctuación de las cepas de *Alternaria* saprofitas.

O-26

## PRESENCIA DE *Phytophthora* spp. EN LAS AGUAS DE RIEGO DE LA VEGA DE MOTRIL

ÁLVAREZ, A. <sup>1</sup>, GUIRADO, M.L. <sup>1</sup>, AGUILAR, M.I. <sup>1</sup>, BERENGUER, J.J. <sup>2</sup>, GÓMEZ, J. <sup>1</sup>

<sup>1</sup> Sección de Micología. Centro de Investigación y Formación Agraria de Almería (C.I.F.A.). Apdo 91, 04700 El Ejido (Almería).

<sup>2</sup> E. E. La Nacla. Caja Rural Granada 18600 Motril (Granada).

*Phytophthora* spp. es agente causal de la Podredumbre de cuello del tomate y pepino en la zona de Motril y Carchuna (Granada). El agua utilizada para el riego de los cultivos de ambas zonas procede en su mayoría del río Guadalfeo, cuyas aguas se forman por las precipitaciones y el deshielo de Sierra Nevada. Aguas abajo, en el Azud de Vélez, este agua junto con un suministro discontinuo procedente del pantano de Béznar, es regulada y distribuida por una serie de canales, en ocasiones descubiertos, hasta los embalses de riego de la zona de cultivos.

El objetivo del trabajo fue determinar si el agua empleada para el riego podía constituir una fuente de propágulos de *Phytophthora* spp.

Para ello se analizó el agua de once embalses utilizados para el riego de explotaciones en las que se detectó la enfermedad en un elevado porcentaje de plantas. Se realizaron cinco muestreos durante el período comprendido entre Octubre de 1998 y de 1999. Los análisis del agua se realizaron sumergiendo, durante 48 horas, diez trampas vegetales con pétalos inmaduros de clavel en cada uno de los embalses. Después, los pétalos de cada trampa se colocaron en una placa de Petri con agua estéril y se incubaron a 25°C.

Se detectaron hongos pertenecientes a las Pythiáceas y al género *Pythium* en todos los embalses y muestreos. *Phytophthora* spp. se detectó en cinco embalses.

Los 109 aislados obtenidos de los tres primeros muestreos se inocularon sobre plántulas de tomate y pepino. Solo resultó patógeno el único aislado de *Phytophthora* spp. que se consiguió aislar y purificar. Este aislado al inocularlo sobre plantas adultas de tomate y pepino reprodujo los síntomas de las enfermedades observadas en el campo. El Azud de Vélez se muestreó también en cinco ocasiones, detectándose siempre la presencia de Pythiaceas. *Pythium* spp. y *Phytophthora* spp. se detectaron en el 12,5% y 22.5 % de las trampas utilizadas, respectivamente. En la inoculación realizada con los aislados obtenidos, resultaron patógenos los siete aislados de *Phytophthora* spp. Seis de ellos sobre plántulas de tomate y pepino, y uno de ellos sobre plántulas de tomate. El pantano de Béznar se muestreó de forma puntual en dos ocasiones y en ambas se detectó la presencia de Pythiáceas y de especies pertenecientes a *Pythium* spp., pero ninguno de los aislados inoculados fue patógeno sobre plántulas de tomate o pepino.

Los resultados obtenidos parecen demostrar que el agua de riego es una fuente de contaminación de *Phytophthora* spp., agente causal de la Podredumbre de cuello del tomate y pepino, en las vegas de Motril y Carchuna.



## EVOLUCIÓN DE LA POBLACIÓN DE *Ralstonia solanacearum* EN AGUAS SUPERFICIALES CONTAMINADAS. INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA Y DE LA PRESENCIA DE *Solanum dulcamara*.

PALOMO, J.L., GARCÍA-BENAVIDES, P.

Centro Regional de Diagnóstico. Junta de Castilla y León. Ap. 61, 37080 Salamanca

*Ralstonia solanacearum* es una bacteria de cuarentena incluida en la lista A2 de la Unión Europea (Directiva 2000/29/CE), que causa la podredumbre parda del cultivo de la patata. En los últimos años se han detectado algunos focos de esta enfermedad en cultivos de patata, tanto en España como en otros países europeos. 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 debe detectar la posible presencia de la bacteria en las aguas superficiales de la zona, y de ser así, tomar medidas para evitar su diseminación a través del agua de riego.

En 1999 se detectó un foco de la enfermedad en la localidad de Calvarrasa de Abajo (Salamanca), en las proximidades del río Tormes. Los análisis realizados en el agua del río, dieron resultado positivo en distintos puntos situados aguas abajo y aguas arriba del foco. Se estableció un programa de muestreos mensuales en distintos tramos del río Tormes para determinar el alcance de la contaminación.

Las muestras se tomaron por duplicado en frascos estériles, a 20 cm de profundidad. Los análisis se realizaron mediante siembra directa en medio semiselectivo (SMSA) y elección de colonias con morfología típica, confirmándose mediante inmunofluorescencia y comprobación de presencia de gránulos de PHB. Asimismo se analizaron mediante inmunofluorescencia muestras de *Solanum dulcamara*, planta silvestre presente en las riberas del río, descrita como huésped de la enfermedad, y que puede jugar un papel importante en su diseminación.

En el periodo comprendido entre diciembre de 1999 y mayo de 2000, con temperaturas del agua entre 4 y 18°C no fue posible detectar la bacteria con la metodología empleada. En junio (16-21°C), se detectó en varios puntos situados entre el Azud de Villagonzalo y la ciudad de Salamanca. El número de muestras positivas, así como su concentración, crecieron progresivamente hasta el mes de septiembre (14-24°C), momento en que se inició un descenso hasta diciembre (7-10°C), no siendo detectable a partir de entonces. Estos resultados se repitieron en el año 2001, lo que indica que la temperatura del agua juega un papel fundamental en la evolución de la población de *Ralstonia solanacearum* en aguas superficiales.

En los análisis de *S. dulcamara*, se detectó la presencia de la bacteria entre el 29-17% de las muestras, en los años 2000 y 2001 respectivamente. Asimismo se comprobó que las muestras de agua en las que la concentración bacteriana fue mayor se habían tomado en las proximidades de masas de *S. dulcamara*, lo que confirma la importancia de esta planta en la diseminación de la bacteria.

O-28

## SUPERVIVENCIA DE *R. solanacearum* biovar 2 EN AGUA: INDUCCIÓN DEL ESTADO VIABLE NO CULTIVABLE (VBNC) A BAJAS TEMPERATURAS

BIOSCA, E.G., CARUSO, P., ÁLVAREZ, B., MARCO-NOALES, E. Y LÓPEZ, M.M.

*Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA)*,

Apartado Oficial, 46113, Moncada, Valencia.

*Ralstonia solanacearum* biovar 2, agente causal de la marchitez y podredumbre parda de la patata, es una bacteria de cuarentena en Europa, siendo el agua de riego una de las principales fuentes de inóculo y rutas de transmisión de este patógeno. Esta bacteria puede aislarse de agua en el medio selectivo SMSA durante los meses cálidos del año. Durante los meses fríos de invierno no suele aislarse, y coincidiendo con un aumento de las temperaturas, reaparece, manteniendo su poder patógeno. El descenso en la cultivabilidad de la bacteria podría deberse a la entrada de las células en el estado viable pero no cultivable (VBNC), descrito hace años en bacterias autóctonas de ecosistemas acuáticos y más recientemente, en algunas bacterias fitopatógenas. El estado VBNC puede representar una estrategia de supervivencia de las bacterias expuestas a condiciones ambientales adversas y, en este sentido, se ha demostrado que las células de *R. solanacearum* biovar 2 adoptan este estado a bajas temperaturas.

El objetivo de este estudio ha sido examinar el efecto de la limitación de nutrientes, propio de los ambientes acuáticos, sobre la supervivencia de una cepa española de *R. solanacearum* biovar 2 en microcosmos experimentales de agua del río Tormes, esterilizada e inoculada con  $10^7$  ufc/ml de la cepa. Se ha evaluado también el efecto de las bajas temperaturas en la inducción del estado VBNC, así como el modo en que dicho estado puede afectar a su detección. Para ello, los microcosmos experimentales se han mantenido a 25 y 4°C durante al menos 2 meses, cuantificando periódicamente el número de células totales, viables (DVC, según el método de determinación de la actividad metabólica de Kogure) y cultivables en medio sólido. *R. solanacearum* biovar 2 ha sobrevivido en agua en condiciones de limitación de nutrientes durante todo el período de experimentación, habiéndose ensayado su capacidad infectiva. Además, este patógeno muestra una pérdida de cultivabilidad en medio sólido, cuando se incuba a bajas temperaturas, entrando en el estado VBNC pero manteniendo su viabilidad según el DVC. Las células VBNC responden al aporte de nutrientes en un medio líquido, como en el de Kogure, durante un período más largo que en un medio sólido. Por otra parte, el método del número más probable (MPN) constituye una alternativa para cuantificar la viabilidad utilizando un medio de cultivo líquido y puede facilitar la detección cuando el patógeno está presente en bajos números y/o en un estado fisiológico alterado.

## EPIDEMIOLOGÍA DE LAS ENFERMEDADES PRODUCIDAS POR LOS HONGOS DE MADERA DE VID (*Vitis vinifera* L.) EN ALGUNOS VIÑEDOS DE MADRID

REDONDO, C.<sup>1</sup>, TELLO, M.L.<sup>1</sup> Y MATEO-SAGASTA, E.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> *Departamento de Investigación Agraria, Instituto Madrileño de Investigación Agraria y Alimentaria. Autovía de Aragón, Km. 38.200. Apdo. 127. 28800 Alcalá de Henares. Madrid.*

<sup>2</sup> *Cátedra de Patología Vegetal. Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos. Universidad Politécnica de Madrid. Avd. Ciudad Universitaria s/n. 28040 Madrid.*

La yesca es en la actualidad una de las enfermedades más importantes en el cultivo de la vid (*Vitis vinifera* L.). El aumento en la incidencia en los últimos años, calculado por la incidencia acumulada en los años de muestreo, unido a la dificultad de su tratamiento hace necesario ampliar el conocimiento de la misma. La distribución errática, tanto en el tiempo como en el espacio de la expresión de síntomas en las plantas afectadas por yesca dificulta el estudio de la enfermedad. Sólo desde el estudio continuado en varios años se puede estimar la distribución que en una determinada parcela puede tener.

Desde 1998 a 2002 se han elaborado los planos de distribución de los pies de vid afectados por yesca en tres parcelas de la Comunidad de Madrid, correspondientes a cada una de las subzonas de la Denominación de Origen "Vinos de Madrid" y a diferentes cultivares (Tinto Fino, Airen y Garnacha). Los síntomas externos de las plantas sintomáticas han sido los parámetros para clasificar cada cepa como enferma (sintomática) o sana (asintomática). Con estos planos de distribución se estudian los distintos métodos de análisis espacial y espacio-temporal de los viñedos seleccionados. De los resultados obtenidos se podrá estimar el modo de dispersión de las diferentes especies fúngicas que están involucradas en el síndrome de la yesca.

## TRANSMISIÓN EXPERIMENTAL POR MOSCA BLANCA DE UN AISLADO ESPAÑOL DEL VIRUS DEL AMARILLO DE LAS VENAS DEL PEPINO (CVYV)

MARTÍNEZ-GARCÍA, B.<sup>1</sup>, DÍAZ-RUIZ, J.R.<sup>1</sup>, LÓPEZ ABELLA, D.<sup>1</sup>, PASCUAL, S.<sup>2</sup>, MARCO, C.F.<sup>3</sup>, Y LÓPEZ-MOYA, J.J.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Centro de Investigaciones Biológicas (CIB, CSIC), Velázquez 144, 28006 Madrid,

<sup>2</sup> Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA), Carretera de la Coruña km. 7.5, 28040 Madrid, y <sup>3</sup> Estación Experimental «La Mayora» (EELM, CSIC) 29750 Algarrobo-Costa, Málaga.

El virus del amarillo de las venas del pepino (Cucumber Vein Yellowing Virus, CVYV) es un ipomovirus (familia *Potyviridae*) que causa una grave enfermedad en cucurbitáceas (1). Originalmente presente en el Mediterráneo Oriental, su llegada a España en el año 2000 lo ha convertido en una seria amenaza para la producción de cultivos de gran importancia económica (2). El virus únicamente infecta cucurbitáceas, y se transmite de forma semipersistente por mosca blanca (*Bemisia tabaci*). No se dispone de variedades tolerantes, y la gravedad de la situación aumenta por las dificultades de ejercer un control adecuado sobre su insecto vector.

Para identificar posibles medios de interferir en el proceso de transmisión de CVYV, se ha comenzado por profundizar en el conocimiento de las características del proceso, realizando transmisiones experimentales entre plantas huéspedes con un aislado español del virus. En las condiciones empleadas, la eficiencia de la transmisión aumenta al incrementar el número de vectores, necesitándose alrededor de 20 insectos por planta, con períodos de adquisición e inoculación de 24 horas, para conseguir una transmisión superior al 50% de las plantas ensayadas. La reducción de los tiempos de adquisición o de inoculación disminuyen en ambos casos el porcentaje de transmisión.

Debido a la situación taxonómica de CVYV dentro de la familia *Potyviridae*, es posible que el mecanismo de transmisión sea similar al de los potyvirus transmitidos por pulgón, en el que intervienen la proteína de la cápsida (CP) y un factor ayudante (HC). No se dispone de información sobre la región correspondiente al HC en el genoma de CVYV. En el caso de la CP, se ha clonado la secuencia correspondiente del aislado español, y se está expresando la proteína en bacteria para facilitar su estudio.

(1) Lecoq et al. (2000) J Gen Virol 81, 2289-93.

(2) Cuadrado et al. (2001) Plant Dis 85, 336.

## EPIDEMIOLOGIA DEL TOMATO SPOTTED WILT VIRUS EN CULTIVOS DE PIMIENTO DE INVERNADERO. RELACIÓN ENTRE LA INCIDENCIA DE LA VIROSIS Y LA PROPORCIÓN DE ADULTOS DE *Frankliniella occidentalis* PORTADORES DEL VIRUS

ALCÁZAR, A.<sup>1</sup>, MIGUEL, M.<sup>1</sup>, LACASA, A.<sup>1</sup>, ONCINA, M.<sup>1</sup>, FERNÁNDEZ, P.<sup>1</sup> Y SÁNCHEZ, J.A.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Centro de Investigación y Desarrollo Agroalimentario. Consejería de Agricultura, Agua y Medio Ambiente. C/ Mayor s/n, 30.150 La Alberca (Murcia).

<sup>2</sup> Programa de Colaboración FECOAM-Consejería de Agricultura, Agua y Medio Ambiente, c/ Caballero, 13, 30.003 Murcia.

Los cultivos de pimiento en invernadero en el Campo de Cartagena se ubican en un agroecosistema de gran influencia en el desarrollo posterior de cualquier epidemiología. Hasta la fecha únicamente se había procedido al conocimiento de la evolución del Tomato Spotted Wilt Virus en relación a la proporción de individuos infectivos en una población de trips presente en el cultivo, constituyendo la base principal para el establecimiento de modelos que permitan predecir la evolución de esta importante virosis, en función de la densidad de trips y de las condiciones ambientales.

Se eligieron ocho invernaderos situados en el Campo de Cartagena, de los cuales, cinco eran conducidos bajo control integrado, y los tres restantes en control químico. Semanalmente se procedía a la toma de muestras de adultos de *Frankliniella occidentalis* del interior de cada uno de los invernaderos, tomándose a su vez muestras de adultos de trips del exterior, normalmente recogidas en un radio de 500 m alrededor del invernadero.

Los resultados obtenidos indican una buena correlación ( $r_2= 0.81$ ) entre la proporción de trips infectivos presentes dentro y fuera del invernadero, pudiéndose apreciar tres fases en el proceso evolutivo. Con la elaboración de los modelos que relacionan los adultos de trips infectivos del exterior y del interior del invernadero, junto con los que relacionan la proporción de trips infectivos del interior del invernadero y la evolución del TSWV, se obtiene un conocimiento mas preciso de la epidemiología de esta virosis, facilitándose a su vez la toma de decisiones en relación al control de la enfermedad a lo largo de todo el ciclo de cultivo, sea cual sea el sistema de control a emplear.

O-32

## BASES PARA EL ESTABLECIMIENTO DE UN SISTEMA PREDICTIVO DE LA VERTICILOSIS DEL OLIVO

LÓPEZ-ESCUADERO, F.J., MARTOS-MORENO, C. Y BLANCO-LÓPEZ, M.A.

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

Los sistemas predictivos de enfermedades causadas por patógenos monocíclicos como *Verticillium dahliae*, están basados en la densidad y eficacia del inóculo inicial. Para ello, es necesario disponer de técnicas de aislamiento del suelo del patógeno, para caracterizar su virulencia y de cuantificación, para determinar su población en el suelo. Aunque ambas tecnologías han sido desarrolladas, es necesario además, conocer la relación del potencial de inóculo del patógeno sobre la enfermedad.

Con este fin, se ha establecido un experimento en microparcels para determinar el efecto de la densidad de inóculo (DI) de los aislados defoliante y no defoliante de *V. dahliae* sobre la Verticilosis del Olivo. La parcela experimental, construida en el año 2000, consistió en 2 líneas de 28 microparcels de hormigón cada una (1x1x0,5 m). Cada línea de microparcels fue infestada (Noviembre 2000) con microesclerocios (ME) del agente producidos artificialmente en PDA-celofán con diferentes dosis de DI (0, 0.04, 0.12, 0.37, 1.11, 3.33 y 10 ME por gramo de suelo; 4 repeticiones). Fue necesario un total de 25x10<sup>6</sup> ME por aislado para infestar 28 microparcels (500 kg de suelo cada una), proceso que se realizó como sigue: 1) mezclado y homogeneizado del suelo natural; 2) cada microparcels se rellenó con 5 capas de suelo (100 kg por capa), las capas inferior y superior sin infestar y las 3 capas internas infestadas con la DI y patotipo correspondientes; 3) las capas infestadas se prepararon mezclando el inóculo con el suelo mediante una hormigonera y se vertieron en las microparcels usando una carretilla de mano. En Diciembre de 2000 se trasplantaron estaquillas de olivo de 9 meses de edad del cultivar Picual, susceptible a la Verticilosis (9 plantas por microparcels).

La DI de las parcelas infestadas fue cuantificada a 30 cm de profundidad en Mayo 2001 y 2002, con una recuperación media del 30 y 50% respectivamente de la DI inicial. Las plantas se evaluaron periódicamente para determinar el progreso y la severidad de síntomas (escala 0-4). Los aislamientos a partir de tejidos vegetales confirmaron la presencia de *V. dahliae*.

A los 7 meses de la plantación comenzaron los primeros síntomas de defoliación, clorosis, apoplejía parcial en las plantas en las microparcels infestadas con las DI más altas del aislado defoliante. En Junio de 2002, el 18% de las plantas de las microparcels infestadas con el aislado defoliante mostraban síntomas, con una incidencia proporcional a la DI. Por su parte, el aislado no defoliante ha expresado su menor virulencia por la ausencia de enfermedad hasta el momento. Los resultados obtenidos muestran que la investigación realizada es un método apropiado para establecer niveles de riesgo de la Verticilosis del olivo en función de la DI y virulencia del patógeno en el suelo.

## INFECTIVIDAD Y GENERACIÓN DE VARIABILIDAD EN EL VIROIDE DE LA EXOCORTIS DE LOS CÍTRICOS (CEVd)

GANDÍA, M. Y DURÁN-VILA, N.

*Departamento de Protección Vegetal y Biotecnología.*

*Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias.*

Apartado Oficial. 46113 Moncada (Valencia).

La caracterización molecular de un aislado típico de CEVd mostró que estaba compuesto de una población de variantes de secuencia. De las 45 variantes obtenidas, se seleccionaron nueve que se hallaban representadas por más de un clon, para realizar estudios de infectividad y determinar sus propiedades biológicas. Los ensayos de infectividad se realizaron utilizando como inóculo construcciones dimericas en tándem y transcritos de polaridad positiva obtenidos a partir de estas construcciones.

A los tres meses de efectuada la inoculación con la variante dominante (V1), los cítricos mostraron síntomas de enanismo y epinastia característicos del aislado original. Se demostró que la variante inoculada representaba el 53% de la población, frecuencia que, como consecuencia de la generación nuevas variantes, disminuyó hasta el 26% y el 37% a los 6 y 9 meses de la inoculación. La heterogeneidad de la población se estimó mediante la fórmula de Nei, obteniéndose siempre valores superiores a 0.5 que se estabilizaron a los 6-9 meses de efectuada la inoculación. La composición de la población final resultó ser similar a la del aislado de partida.

De las restantes variantes incluidas en este ensayo, solo una de las variantes (V6) que contenía con una única transversión (U®A en el residuo 309) con respecto a V1, resultó infecciosa pero las plantas inoculadas no mostraron síntomas hasta 9 meses después de la inoculación. En la planta infectada no se detectó la variante inoculada mientras que la variante V1 constituía in 46.6% de la población cuya composición era también similar a la del aislado de partida.

Estos resultados confirman la estructura de cuasiespecies de los aislados de CEVd y el papel preponderante de la variante mayoritaria en la infectividad y manifestación de síntomas.

## RELACIÓN ENTRE LAS CARACTERÍSTICAS ANATÓMICAS DE LA MADERA TEMPRANA DE *Ulmus minor* Y LA SUSCEPTIBILIDAD A *Ophiostoma novo-ulmi*, CON LA EDAD

MARTÍN, J.A., SOLLA, A., RUIZ-VILLAR, M., Y GIL, L.

Unidad de Anatomía, Fisiología y Mejora Genética. ETSI de Montes. Universidad Politécnica de Madrid. Paseo de las Moreras s/n. 28040. Madrid.

Las dimensiones de los elementos vasculares del xilema se han relacionado en ocasiones con la susceptibilidad de *Ulmus* sp. frente a la grafiosis. Olmos con vasos de gran diámetros son más susceptibles que olmos con vasos de menor diámetro, se piensa debido a que posibilitan una mayor difusión de la enfermedad en el interior de la planta, son más difíciles de compartimentar y cavitan con mayor facilidad. Se plantea la hipótesis de que la anatomía vascular juegue un papel importante en la variación de la susceptibilidad con la edad.

Réplicas de cuatro genotipos de *Ulmus minor*, y de un genotipo de *U. minor* ' *U. pumila*, con edades comprendidas entre los dos y los siete años ( $n \leq 6$ ), fueron inoculadas artificialmente con *O. novo-ulmi*. Las inoculaciones se practicaron el 17 de mayo de 2000. Los marchitamientos foliares manifestados se evaluaron durante un periodo de 120 días tras la inoculación. Al año siguiente se procedió a un estudio histológico, consistente en medir, sobre secciones transversales practicadas a los tallos principales de las plantas, los diámetros medios de los vasos del xilema y una serie de parámetros útiles para evaluar la capacidad conductora de la savia.

A los 120 días de inocular, las plantas de dos años mostraron un marchitamiento medio de  $6 \pm 1$  % (ES), significativamente menor al mostrado por las plantas de 3 años ( $32 \pm 7$  %) ( $P \leq 0,01$ ). Las réplicas de 4, 5, 6 y 7 años manifestaron un marchitamiento próximo a 50 %, luego la resistencia juvenil observada coincide con la descrita anteriormente para *U. x hollandica* y *U. americana*. Se observó una relación directa y significativa entre la variación de la susceptibilidad con la edad y la variación del diámetro medio de los vasos del xilema. El aumento de la conductancia hidráulica teórica relativa, con la edad, posibilitó probablemente una mayor difusión de las esporas del hongo y de sus toxinas en el interior de la planta. El porcentaje de vasos de diámetros superiores a las 100  $\mu$ m, mayor en plantas a partir de los cuatro años ( $P \leq 0,05$ ), pudo implicar una mayor cavitación vascular y una mayor pérdida en la capacidad conductora de la planta, lo que se tradujo en una mayor expresión de síntomas foliares.



## LA SENSIBILIDAD A LOS PÉPTIDOS ANTIFÚNGICOS PAF19 Y PAF26 SE RELACIONA CON LA VIRULENCIA Y ESPECIFICIDAD DE HUESPED EN HONGOS PATÓGENOS DE POSTCOSECHA DEL GÉNERO *Penicillium*

LÓPEZ-GARCÍA, B.<sup>1</sup>, VEYRAT, A.<sup>1</sup>, PÉREZ-PAYÁ, E.<sup>2</sup>, GONZÁLEZ-CANDELAS, L.<sup>1</sup> Y MARCOS, J.F.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Dpto. Ciencia de Alimentos. Inst. Agroquímica y Tecnología de Alimentos - CSIC.

Apartado de Correos 73. Burjassot. 46100 Valencia.

<sup>2</sup>Dept. Bioquímica i Biología Molecular. Universitat de València.

Dr. Moliner 50. Burjassot. 46100 Valencia.

El conocimiento de los mecanismos moleculares que regulan la virulencia y selección de huésped en hongos fitopatógenos será importante en el diseño de futuras estrategias de protección. En nuestro laboratorio investigamos alternativas dirigidas al control de las podredumbres postcosecha de frutos. Mediante química combinatoria hemos identificado una serie de hexapéptidos, llamados PAFs y sintetizados con D-aminoácidos, que presentan actividad antimicrobiana específica *in vitro* frente a *Penicillium digitatum*, *P. italicum*, *P. expansum*, y *Botrytis cinerea*. Péptidos diferenciados en uno o dos aminoácidos tienen distintos grados y patrones de actividad frente a distintos microorganismos, lo que implica a un componente de especificidad en su mecanismo de acción. Este mecanismo está mediado por una interacción electrostática con el hongo e induce una permeabilización de sus membranas. Estos péptidos retardan las podredumbres de *Penicillium* en cítricos y *Botrytis* en tomates.

Se comparó la sensibilidad de distintos aislados fúngicos frente a PAF19 y PAF26, con la sensibilidad frente a los fungicidas tiabendazol (TBZ) e imazalil (IMZ). Los PAFs inhiben el crecimiento *in vitro* y retardan la infección de aislados de *P. digitatum* ó *P. italicum* resistentes a fungicidas, e inhiben el crecimiento *in vitro* de hongos frente a los cuales estos fungicidas son ineficaces (*Alternaria* sp.). Se encontraron aislados de *Penicillium* con resistencia simultánea a TBZ e IMZ, probablemente mediada por un mecanismo de resistencia a compuestos múltiples (MDR), pero sensibles a los PAFs. Esto sugiere que los mecanismos de extrusión celular típicos de MDR no son efectivos frente a los PAFs.

El análisis de 21 aislados de *Penicillium* (pertenecientes al menos a cuatro especies), reveló en todos ellos una correlación entre una menor sensibilidad a los PAFs y una menor virulencia sobre cítricos. La identificación y el análisis filogenético mediante la secuenciación de la región ITS de genes de DNA ribosómico confirmó que *P. italicum* y *P. expansum* son dos especies muy próximas entre sí, que se habrían especializado en la infección de dos huéspedes distintos (cítricos y frutos de pepita, respectivamente) y que la sensibilidad a PAFs podría ser, sorprendentemente, un marcador molecular de dicha especialización.

## INDUCCIÓN DE RESISTENCIA EN OLIVO CON AISLADOS DE *Verticillium dahliae* FRENTE AL PATOTIPO DEFOLIANTE

MARTOS-MORENO, C., LÓPEZ-ESCUADERO, F.J., Y BLANCO-LÓPEZ, M.A.

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

La utilización de variedades resistentes en el control de la Verticilosis del olivo es una de las medidas de lucha más eficaces para el control de esta enfermedad. La presencia del patotipo más virulento (defoliante) de *Verticillium dahliae* en olivares comerciales en España representa una amenaza grave para el cultivo. En condiciones de campo, la resistencia de los cultivares puede ser superada por este aislado lo que implica la necesidad de estudiar nuevas formas de resistencia. Por ello, se ha investigado la capacidad de desarrollar protección o resistencia inducida en plántones de olivo mediante la aplicación de aislados menos virulentos (no defoliantes) de *V. dahliae*.

En un primer experimento se utilizaron plántones de olivo de los cultivares Arbequina, Changlot Real, Empeltre, Frantoio, Manzanilla, Oblonga y Picual de 2 años de edad. Estas plantas fueron inoculadas con el aislado defoliante 10 meses después de la inoculación con el aislado no defoliante. En el segundo experimento, se utilizaron plantas del cultivar Picual de 9 meses de edad. A diferentes intervalos de tiempo, 10 días, 1, 2, 4 ó 6 meses, desde la primera inoculación con el aislado no defoliante, se inocularon con el aislado defoliante de *V. dahliae*. En ambos experimentos, las inoculaciones se realizaron mediante inmersión del sistema radical completo en una suspensión conidial ajustada a una concentración de  $10^7$  con/ml. La severidad de los síntomas en la parte aérea se evaluó según una escala de 0 a 4 (0= planta sin síntomas; 4= planta muerta). Los parámetros evaluados para determinar la cantidad de enfermedad fueron: el área bajo la curva de progreso de enfermedad porcentual (ABCPEP), la severidad final de las reacciones y el porcentaje de plantas muertas al final del período de evaluación.

En el primer experimento, el efecto protector de la infección previa con el aislado no defoliante fue más marcado en los cvs susceptibles Arbequina, Manzanilla y Picual. Este efecto se expresó en una reducción en los parámetros evaluados frente a los tratamientos inoculados sólo con el aislado defoliante. En el segundo experimento, se observaron diferencias significativas en la severidad final de síntomas para los intervalos de 2, 4 ó 6 meses entre ambas inoculaciones. Además se produjo una reducción significativa en el ABCPEP frente a los tratamientos no protegidos para los intervalos de 4 y 6 meses. El porcentaje de plantas muertas, para estos mismos intervalos, se redujo hasta el 0% en el tratamiento protegido frente a más del 75% del no protegido.

Los resultados obtenidos reflejan que la inoculación previa con el aislado no defoliante reduce la severidad de la infección posterior por el aislado defoliante de *V. dahliae*.

## RESPUESTA FRENTE AL *Plum pox virus* DE PATRONES DE FRUTALES, POSIBLES IMPLICACIONES EN LA DISPERSIÓN DE LA ENFERMEDAD

MARTÍNEZ-GÓMEZ, P.<sup>1</sup>, RUBIO, M.<sup>1</sup>, PINOCHET, J.<sup>2</sup> Y DICENTA, F.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Dpto. de Mejora y Patología Vegetal. Centro de Edafología y Biología Aplicada del Segura (CSIC). Campus Universitario de Espinardo. Apartado 4195. CP: 30100. Murcia.

<sup>2</sup> *Agromillora Catalana*. El revato s/n. 08739 Suvirats. Barcelona.

La sharka, enfermedad causada por el *Plum pox virus* (PPV), afecta principalmente a especies frutales del género *Prunus* como albaricoquero, melocotonero y ciruelo, y en menor medida a cerezo y guindo. En estos momentos esta enfermedad es uno de los mayores factores limitantes del cultivo de frutales en las zonas afectadas. En este trabajo hemos evaluado, en condiciones controladas en invernadero, la resistencia a un aislado tipo Dideron de PPV (RB3.30) de 14 patrones representativos de la amplia variedad de material vegetal utilizado como portainjertos en el cultivo de frutales. Los estudios de evaluación de la resistencia se realizaron en invernadero sellado con malla antipulgón aplicándoles a las plantas periodos de letargo artificial mediante tratamientos en cámara fría a 7°C. Durante dos ciclos de estudio se procedió a la observación de síntomas y la realización de la prueba ELISA-DASI en los patrones que habían sido previamente inoculados mediante injerto de corteza proveniente de plantas de melocotón GF305 que mostraban cuantiosos síntomas de sharka. Después de los dos ciclos de estudio se ha comprobado la elevada susceptibilidad al PPV, con cuantiosa presencia de síntomas y ELISA positivo, de los melocotoneros 'GF305', 'Montclar', 'Nemaguard' y 'Nemared', el albaricoquero 'Real Fino', el ciruelo tipo 'Pollizo' (*P. insitii*), y el híbrido ciruelo x albaricoquero 'AC992107'. Por otro lado, el ciruelo 'Marianna 2624' (*P. cerasifera* x *P. munsoniana*), el ciruelo 'Torinel', y el híbrido 'Evrice' (*P. salicina* x *P. besseyi*) mostraron una moderada susceptibilidad al aislado de PPV ensayado, con síntomas menos intensos y valores ELISA también menores. Finalmente se comportaron como resistentes, con ausencia de síntomas y ELISA negativo, el híbrido melocotonero x almendro 'GF677', el almendro 'Garrigues', el ciruelo 'Mirobolano 29C' (*P. cerasifera*), y la selección de cerezo 'L2' (*P. lanésiana*). Las posibles implicaciones de estos resultados en la dispersión de la enfermedad también se discuten en este trabajo.

## EVALUACIÓN DE LA RESISTENCIA Y TOLERANCIA DE VARIEDADES DE TOMATE A POBLACIONES NATURALES DEL VIRUS DEL RIZADO AMARILLO DEL TOMATE

RUBIO, L.<sup>1</sup>, HERRERO, J.R.<sup>2</sup>, SARRIÓ, J.<sup>2</sup>, MORENO, P.<sup>1</sup> Y GUERRI, J.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA), Ctra. Moncada-Náquera Km. 4.5, 46113-Moncada, Valencia

<sup>2</sup>Cooperativa Valenciana Unión Protectora de El Perelló, 46420 El Perelló, Valencia

El rizado amarillo es una enfermedad que ocasiona graves daños en cultivos de tomate en muchos países, incluyendo España. Esta enfermedad esta causada por varias especies virales pertenecientes al género *Begomovirus* de la familia *Geminiviridae*, que se transmiten persistentemente por la mosca blanca *Bemisia tabaci*. Estos virus tienen partículas virales geminadas y un genoma de DNA circular monocatenario. En España se han encontrado dos especies: *Tomate yellow leaf curl virus* (TYLCV) y *Tomato yellow leaf curl Sardinia virus* (TYLCSV). La estrategia más prometidora para el control de la enfermedad es el uso de plantas resistentes o tolerantes obtenidas por cruce de tomate cultivado (*Lycopersicon esculentum*) con especies silvestres del género *Lycopersicon*. Una de las limitaciones de los programas de mejora genética es la ausencia de métodos de evaluación rápidos y fiables.

En este trabajo se ha desarrollado un método para la evaluación de la resistencia y tolerancia a los virus del rizado amarillo del tomate en condiciones de infección natural. Para ello se desarrollaron unas fórmulas basadas en la tasa de infección, intensidad de los síntomas (estimada visualmente) y el título viral (estimado por la intensidad de hibridación con improntas de tejido vegetal infectado). Estas fórmulas se aplicaron a cinco variedades de tomate (Royesta Ulises, Birloque, Tovigreen y Amaretto) en un campo de Valencia infectado por TYLCV. Se encontró una alta correlación entre el título viral y la manifestación de síntomas. Este análisis mostró que las variedades Ulises, Birloque y Tovigreen tenían un nivel de resistencia moderado y que Ulises presentaba una tolerancia relativamente alta. Como la infección viral y la manifestación de síntomas están determinadas en parte por la interacción patógeno-huésped, es necesario también la caracterización genética de la población viral. Para analizar la población viral presente en las variedades de tomate ensayadas, se amplificó mediante PCR la zona intergénica de TYLCV y TYLCSV usando iniciadores específicos y se comparó la secuencia nucleotídica de los fragmentos amplificados. Este análisis mostró que la población viral estaba compuesta exclusivamente de aislados de TYLCV con una variación genética muy baja y similares a otros aislados españoles.

## RELACIÓN ENTRE LA SUPRESIVIDAD FRENTE A LA FUSARIOSIS VASCULAR DEL TOMATE DE SUSTRATOS ORGÁNICOS Y SU COMUNIDAD MICROBIANA CARACTERIZADA POR BIOLOG®

BORRERO, C., MAURI, M.C., ORDOVÁS, J. Y AVILÉS, M.

Dpto. de Ciencias Agroforestales. Universidad de Sevilla. E.U.I.T.A.

Ctra. Utrera Km 1, s/n. 41013. Sevilla.

*Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* (Fol) es un patógeno de suelo del tomate que también muestra su patogenicidad en cultivos hidropónicos que utilizan turba como sustrato. El objetivo de este trabajo es evaluar y caracterizar la supresividad de dos sustratos orgánicos a esta enfermedad frente a turba enmendada. Estos sustratos son composts de residuo de corcho y de orujo agotado de vid, estos materiales podrían suponer una alternativa al uso de la turba. La técnica Biolog® se emplea para conocer los perfiles metabólicos del carbono de comunidades microbianas, en este estudio se pretende ver si hay algún patrón de consumo de C en las comunidades de estos sustratos que se relacione con la supresividad a la fusariosis.

Se realizó un ensayo de supresividad con la raza 0 de Fol y la variedad de tomate Marmande. Se aplicaron dosis de un inóculo de  $0,10^4$  y  $10^5$  microconidias / ml en cada sustrato. La severidad de la enfermedad se midió a los 25 días del trasplante con una escala basada en el porcentaje de hojas afectadas, las hojas consideradas afectadas presentaron síntomas de marchitez y necrosis vasculares (0 = planta sana, 1  $\leq$  50%, 2 > 50% y 3 = 100%). Para conocer la naturaleza biológica o no de la supresividad de estos sustratos se incluyeron en el ensayo también corcho y orujo de vid compostados vaciados biológicamente (60° C, 6 días). Para caracterizar la comunidad microbiana de estos sustratos se sembró un extracto de ellos en Eco-placas de Biolog®, las cuales contienen 31 fuentes de C distintas, por lo que se observó por tanto qué tipo de fuentes de C usan las microfloras de cada sustrato.

Los dos composts mostraron supresividad frente a la fusariosis vascular del tomate, con respecto a la turba. El compost de orujo de vid fue el que registró menos enfermedad. El compost de corcho vaciado biológicamente perdió su supresividad y el orujo de vid vaciado la mantuvo aunque reducida. Ambos resultados indican un importante papel de la microbiota en el fenómeno supresivo.

Los perfiles del metabolismo del carbono indentificados por Biolog® se mostraron claramente distintos en la turba y en los composts. Así, la comunidad microbiana de la turba (sustrato conductivo) consume más fácilmente azúcares simples mientras que las microfloras de los composts (ambos supresivos) usan en mayor proporción que la de la turba ácidos carboxílicos y polímeros. Estos patrones metabólicos de las distintas microfloras residentes están adaptados a las fuentes disponibles en cada sustrato y, por tanto, relacionados con su grado de descomposición. Esta relación podría ser una herramienta predictiva para conocer la supresividad natural de otros sustratos orgánicos a la fusariosis vascular del tomate.

## DESARROLLO DEL PATRÓN RESISTENTE A *Tylenchulus semipenetrans* FORNER-ALCAIDE Nº 5 EN REPLANTACIÓN

SORRIBAS, F.J.<sup>1</sup>, VERDEJO-LUCAS, S.<sup>2</sup>, GALEANO, M.<sup>2</sup> Y ORNAT, C.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Dpto. Ingeniería Agroalimentaria y Biotecnología. UPC. Comte d'Urgell, 187. 08036 Barcelona.

<sup>2</sup>Dpto. Protección Vegetal. IRTA. Crta Cabrils, s/n. 08348 Cabrils, Barcelona.

Se estudió el desarrollo del patrón híbrido de cítricos Forner-Alcaide nº5 (FAN5) (*Citrus reshni* x *Poncirus trifoliata*) catalogado como resistente a *T. semipenetrans* en ensayos de invernadero y microparcela. El estudio se realizó en una parcela naturalmente infestada por el biotipo mediterráneo del nematodo que fue replantada en primavera de 1998. Árboles de FAN5 y citrange Carrizo fueron injertados con el mandarino Orogrande. El diseño experimental fue factorial con seis repeticiones. Los factores fueron suelo tratado vs. no tratado y patrón resistente vs. susceptible. El tratamiento del suelo se realizó con 600 L/ha de dicloropropeno. En cada factor suelo se plantaron tres árboles de cada patrón. La densidad de nematodos en suelo y en raíz se determinaron en primavera y en otoño de cada año. El desarrollo de los árboles se determinó en el momento del trasplante y en primavera de cada año midiendo el diámetro del tronco de la variedad a 10 cm (1998-2000) ó 5cm (2001 y 2002) por encima del punto de injerto. La densidad de nematodos en pretrasplante fue de 2.300 nematodos/250 cm<sup>3</sup> suelo. En las parcelas fumigadas, la densidad de *T. semipenetrans* fue inferior a los niveles de detección durante los dos primeros años después del trasplante. La densidad de nematodos en suelo en las parcelas sin fumigar fue 16 veces inferior en FAN5 que en el citrange Carrizo en primavera del 2001. El número de hembras y huevos por gramo de raíz en FAN5 fue 16,6 y 293 veces inferior que en citrange Carrizo. El desarrollo de los árboles, según patrón, fue similar independientemente del tratamiento del suelo. Sin embargo, el desarrollo de árboles injertados sobre FAN5 en suelo infestado fue mayor que el de los injertados sobre citrange Carrizo en los años 2000 y 2001.

## REACCIÓN DE GENOTIPOS DE CEBOLLA A LA INFECCIÓN POR *Pyrenochaeta terrestris*, EL AGENTE DE LA RAÍZ ROSADA

MARANHÃO, EDUARDO H.A.<sup>1,2</sup> Y NAVAS CORTÉS, J.A.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Instituto de Agricultura Sostenible, CSIC, Apartado 4084, 14080 Córdoba. e-mail: [ag1nacoj@uco.es](mailto:ag1nacoj@uco.es).

<sup>2</sup>IPA – Instituto de Pesquisa Agropecuária, Brasil

La Raíz Rosada de la cebolla, causada por el hongo de suelo *Pyrenochaeta terrestris*, afecta extensamente a los cultivos en regiones de clima cálido y es devastadora en regiones tropicales y subtropicales. En Europa, esta enfermedad sólo se ha descrito como factor limitante del cultivo en la zona más meridional. La capacidad de *P. terrestris* de sobrevivir prolongadamente en el suelo o restos vegetales enterrados, y su amplia gama de plantas huésped, hace que la utilización de cultivares de cebolla resistentes sea la medida más eficaz para su control. Por ello, el objetivo de este trabajo ha sido evaluar la reacción de cultivares de cebolla de interés comercial a la infección por aislados de *P. terrestris* de diferente origen geográfico.

Se han estudiado ocho cultivares de cebolla de distinta procedencia: i) EE.UU.: Texas Grano -502, -502 PRR y Red Creole; ii) Brasil: IPA-10, IPA-11, IPA-3xTexas Grano 1015Y; y iii) España: Prebosa (Babosa temprana) y Grano de Oro (Valenciana tardía); así como aislados de *P. terrestris* procedentes de Valencia (Pt-9901), Texas, EE.UU. (ATCC-6403) y la región Nordeste de Brasil (Pt-9908). Las plantas se inocularon por el método de siembra en suelo infestado con el patógeno e incubaron durante 45 días en cámara de crecimiento de ambiente controlado.

El 100% de las plantas en todos los cultivares evaluados resultaron infectadas, aunque existieron importantes diferencias relacionadas con la virulencia de los aislados y susceptibilidad del cultivar. Globalmente, los aislados Pt-9908 (Brasil) y ATCC-6403 (EE.UU.) de *P. terrestris* fueron los más virulentos, y los cultivares Texas Grano 502 PRR e IPA 3xTexas Grano 1015Y los que presentaron menor nivel de la enfermedad. El porcentaje de raíces infectadas osciló entre el 28,2% y 53,0% para el aislado Pt-9901 y fue superior al 48% para los aislados Pt-9908 y ATCC-6403. La infección por *P. terrestris* originó una reducción en el peso seco de las plantas de al menos el 17,8 para el aislado Pt-9901 y del 88,7 y 94,8% para los aislados Pt-9908 y ATCC-6403, respectivamente. Es de destacar que el aislado Pt-9901 procedente de Valencia causó infecciones superiores al 50% del sistema radical en los cultivares Prebosa y Grano de Oro, que son ampliamente utilizados en España. Por ello, aunque la Raíz rosada no ha sido descrita como un factor limitante del cultivo de cebolla en España, una modificación del ciclo del cultivo hacia condiciones ambientales más favorables al desarrollo de la enfermedad podría resultar en epidemias severas.

## DESINFESTACIÓN DE SUSTRATOS UTILIZADOS EN VIVEROS DE OLIVO MEDIANTE SOLARIZACIÓN

NICO, A.I., Y CASTILLO, P.

*Instituto de Agricultura Sostenible (IAS-CSIC),*

Apartado 4084, 14080 Córdoba, Spain. E-mail: ag1cascp@uco.es.

Recientes prospecciones en viveros comerciales de olivo de Andalucía han demostrado que en la rizosfera y sistema radical de plantones de olivo se encuentran presentes numerosas especies de nematodos fitoparásitos, entre las que destacan los nematodos noduladores (*Meloidogyne* spp.) y lesionadores de raíces (*Pratylenchus* spp.). Asimismo, investigaciones posteriores han demostrado que dichos nematodos perjudican significativamente el crecimiento de plantones de olivo de los cvs. Arbequina y Picual. La fuente principal de entrada de nematodos fitoparásitos al sistema de propagación de olivo (constituido por la raíz y la rizosfera de los plantones) es a través del sustrato viverístico de crianza de los plantones. Por este motivo, el objetivo de este trabajo ha sido evaluar la eficacia de la solarización como estrategia para la desinfestación de sustratos de uso viverístico infestados por *Meloidogyne incognita*.

Para evaluar la eficacia de la solarización en la desinfestación de sustratos de uso viverístico infestados por *M. incognita* se llevaron a cabo dos experimentos durante 3 semanas en los meses de julio y agosto en 1999 y 2000. La solarización se realizó sobre pilas o montículos de sustratos de uso viverístico de 80 cm de altura, dispuestos de tal forma que simularan una práctica de fácil adopción por los viveros comerciales. El inóculo de *M. incognita*, compuesto por huevos libres o masas de huevos, se depositó en el interior de bolsitas de nylon de 5 mm de luz de malla, que se introdujeron a una profundidad de 20 y 40 cm en el montículo. Los montículos solarizados se humectaron y cubrieron en toda su superficie expuesta con una lámina de polietileno transparente de 50 µm de grosor.

La viabilidad del inóculo, expresada como porcentaje de eclosión de huevos o por la población final obtenida en bioensayo con plantas de tomate, se redujo significativamente en los montículos solarizados respecto de los no solarizados, independientemente de la naturaleza del inóculo utilizado, la situación de éste en el montículo, o la profundidad a la que se enterró el mismo. La solarización determinó una reducción de la viabilidad del inóculo superior al 95 % y supone una estrategia de control practicable para la desinfestación de dichos sustratos.

Investigación subvencionada por el proyecto CAO99-010-C3-01



## ESTRATEGIAS DE CONTROL QUÍMICO, FÍSICO Y BIOLÓGICO PARA LA REDUCCIÓN DE LA INCIDENCIA DE *Sclerotium cepivorum* EN EL AJO MORADO DE LAS PEDROÑERAS

RECIO D.<sup>1</sup>, MOLINERO, L.<sup>2</sup>, CORPAS, C.<sup>3</sup>, MELERO, J.M.<sup>2</sup>, BASALLOTE, M.J.<sup>3</sup>, PRADOS, A. M.<sup>4</sup>, SERRANO, M.<sup>1</sup>, VERDEJO, C.<sup>1</sup>. Y CABRERA, J.<sup>1</sup>.

<sup>1</sup> Dpto. Producción Vegetal y T. Agraria, EUITA, Universidad Castilla-La Mancha, Ronda de Calatrava s/n, 13071 Ciudad Real.

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

<sup>3</sup> CIFA "Las Torres-Tomejil", DGIFAP, Apdo. 41200, Alcalá del Río (Sevilla).

<sup>4</sup> CIFA "Alameda del Obispo", DGIFAP, Apdo. 3092, 14080 Córdoba.

Se ha estudiado la integración de diversos métodos físicos, químicos y biológicos en el control de la Podredumbre Blanca del ajo, en dos parcelas de la provincia de Cuenca naturalmente infestadas por *Sclerotium cepivorum*.

En un primer año se realizó en ambas parcelas un diseño en parcelas divididas donde el factor principal fue el tipo de abonado nitrogenado. Subordinadamente al abonado se incluyeron tres tratamientos: testigo, aporte de *Trichoderma harzianum* al surco de siembra e inmersión de los dientes de ajo en tebuconazol. El segundo año, siguiendo un diseño de bloques al azar, se comparó en la parcela con menor densidad de esclerocios viables la efectividad de los tres tratamientos con la solarización sola o en combinación con la aplicación de *T. harzianum* o con el tratamiento fungicida de los dientes de siembra. En la otra parcela, con una densidad diez veces mayor de inóculo, se comparó el testigo con: el aporte de *T. harzianum* al surco de siembra, la inmersión de los dientes de ajo en dos dosis diferentes de tebuconazol, la solarización del suelo y la solarización efectuada el año anterior. Con objeto de estudiar el progreso epidémico según tratamientos se determinó secuencialmente el porcentaje de plantas muertas a lo largo del ciclo del cultivo y, finalmente, se evaluaron los rendimientos cuantitativa y cualitativamente.

La solarización redujo las poblaciones de *S. cepivorum* en el suelo a niveles inapreciables, retrasó en 50 días el comienzo de la epidemia, redujo la incidencia de enfermedad hasta en un 34,1%, el ABCPE fue significativamente menor e incrementó la producción en un 48,6% respecto a las parcelas testigo. Asimismo, los resultados obtenidos indican la eficacia de la inmersión de los dientes de ajo en tebuconazol en el control de la Podredumbre Blanca, aunque su eficacia disminuye cuando el nivel de infestación del suelo es alto, existiendo diferencias significativas tanto en el progreso de la enfermedad como en la producción, respecto a las parcelas testigos y aquellas a las que se aportó *T. harzianum* en el surco de siembra. No se detectaron diferencias entre los abonados nitrogenados empleados.

## EFECTO DE LA INFECCIÓN POR HONGOS MICORRÍCICOS ARBUSCULARES SOBRE EL DESARROLLO DE VERTICILOSIS EN PLANTONES DE OLIVO

RODRÍGUEZ JURADO, D.<sup>1</sup>, AZCÓN-AGUILAR, C.<sup>2</sup>, GARCÍA, L.<sup>3</sup> Y BAREA, J.M.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Instituto de Agricultura Sostenible, C.S.I.C., Apdo. 4084, 14080 Córdoba.

<sup>2</sup> Estación Experimental del Zaidín, C.S.I.C., Apdo. 419, 18008 Granada.

<sup>3</sup> Comercial Técnica y Viveros, S.A., 46278 Valencia.

La Verticilosis, causada por los patotipos defoliante (D) y no-defoliante (ND) de *Verticillium dahliae*, es posiblemente la enfermedad más importante y más difícil de combatir del olivo en la actualidad. La naturaleza del patotipo de *V. dahliae* que infecta la planta es determinante de la severidad de los ataques de Verticilosis en olivo. El patotipo D es el de mayor virulencia, cuyas infecciones pueden causar la muerte rápida de plantones jóvenes en las nuevas plantaciones en regadío. De hecho, la extensión del patotipo D en Andalucía en los últimos años supone un grave riesgo para el olivar andaluz establecido y para el establecimiento de nuevas plantaciones. En el marco de una estrategia de control integrado de la enfermedad, planteamos la hipótesis de que el establecimiento de micorrizas arbusculares en el sistema radical del olivo durante la micropropagación de éste podría proteger a la planta joven contra infecciones primarias por *V. dahliae*. En este trabajo se ha determinado el efecto de la infección por diferentes hongos micorrícicos en plantones de olivo establecida durante la micropropagación, sobre el posterior crecimiento de la planta y su protección contra los patotipos D y ND de *V. dahliae*. Se han realizado experimentos en condiciones controladas, óptimas para el desarrollo de Verticilosis, con plantas de olivo "Picual" de 3-4 meses de edad infectadas por los hongos micorrícicos *Glomus intraradices* BEG-123 (ecotipo olivo), *G. mosseae* BEG-119, *G. viscosum* BEG-126 (ecotipo olivo), o por la mezcla de inóculo de *G. intraradices* y *G. fasciculatus*. En los experimentos se han considerado varias estrategias de infección por el patógeno (métodos de inoculación) y aislados de virulencia diferencial de los patotipos D y ND. La infección por *G. intraradices* BEG-123 promovió significativamente el crecimiento de la parte aérea y la raíz del cv. Picual en experimentos repetidos. El método de inoculación fue determinante en el desarrollo de enfermedad. El efecto de la micorrización sobre el desarrollo de Verticilosis varió con el inóculo micorrícico, el patotipo de *V. dahliae* y los experimentos. La mezcla de inóculo micorrícico redujo la cantidad de enfermedad inducida por el patotipo D en uno de dos experimentos realizados. Por el contrario, los restantes hongos micorrícicos estudiados incrementaron la enfermedad causada por el patotipo D y su efecto respecto del patotipo ND varió con la especie micorrícica y el experimento.

Subvencionado por el proyecto 1FD97-0763-C03-01

## SECUENCIA NUCLEOTÍDICA COMPLETA Y ORGANIZACIÓN GENÓMICA DEL VIRUS DE LA ROTURA DEL COLOR DE LA FLOR DEL PELARGONIUM

RICO, P. Y HERNÁNDEZ, C.

*Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas (UPV-CSIC), Universidad Politécnica de Valencia, 46022 Valencia.*

El carmovirus de la rotura del color de la flor del Pelargonium (*Pelargonium flower break virus*, PFBV) causa infecciones frecuentes en geranio afectando a la calidad de esta planta ornamental al inducir deformaciones en las inflorescencias y la aparición de estrías en los pétalos. A pesar de que la enfermedad inducida por este patógeno es bien conocida desde hace tiempo, existen pocos datos moleculares acerca del mismo. En este trabajo hemos determinado la secuencia nucleotídica completa del RNA genómico (gRNA) de un aislado del PFBV como primer paso para el estudio de las relaciones estructura-función en este virus. El gRNA del PFBV está constituido por 3924 nucleótidos (nt) y, como la mayoría de los carmovirus, presenta cinco marcos abiertos de lectura ("open reading frames", ORFs). El ORF más próximo al extremo 5', ORF1, codifica una proteína de 27 kDa (p27) y termina con un codón ámbar. La lectura a través ("readthrough") de dicho codón permite continuar la traducción hasta el codón de terminación de la ORF2 dando lugar a una proteína de 86 kDa (p86) que contiene los motivos conservados de las RNA polimerasas-RNA dependientes virales. Los productos potenciales de la traducción de los ORFs 3 y 4, situados en la parte central del genoma, son polipéptidos de 7 (p7) y 12 kDa (p12), respectivamente, y presentan homología con las proteínas de movimiento de otros carmovirus. El ORF5, cercano al extremo 3', codifica la proteína de cubierta (CP) con un tamaño de 37 kDa. El ORF4 está en la misma pauta de lectura que los ORFs 1 y 2 de modo que un proceso de doble lectura a través podría dar lugar a la síntesis de una proteína de 99 kDa (p99). Un análisis comparado de las secuencias aminoacídicas ha puesto de manifiesto que las proteínas no estructurales codificadas por las ORFs 1, 2, 3 y 4 del PFBV son más similares a los correspondientes productos génicos del virus del moteado del clavel (*Carnation mottle virus*, CarMV) que a los de otros carmovirus, mientras que la CP presenta mayor homología con la del virus del cactus saguaro (*Saguaro cactus virus*, SCV).

Con el fin de obtener datos acerca de los mecanismos de expresión génica del PFBV, se han analizado preparaciones de RNA total de plantas infectadas mediante hibridación tipo Northern. Utilizando sondas radioactivas específicas del virus, se han detectado el gRNA y dos RNAs subgenómicos, de alrededor de 1700 y 1500 nt, presumiblemente implicados en la traducción de los dos pequeños ORFs internos y del gen de la CP, respectivamente. Asimismo, se ha observado la presencia de un RNA viral adicional, con un tamaño aproximado de 3100 nt, cuya naturaleza está siendo investigada.

## CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DEL *Virus del amarilleo y enanismo de las cucurbitáceas* (CYSDV) Y ANÁLISIS DE SU INTERACCIÓN CON ENTRADAS DE CUCURBITÁCEAS RESISTENTES Y SUCEPTIBLES

AGUILAR, J.M.<sup>1</sup>, MARCO, C.F.<sup>1</sup>, FRANCO, M.<sup>1</sup>, BERDIALES, B.<sup>2</sup>, RODRÍGUEZ-CEREZO, E.<sup>2</sup>, GÓMEZ-GUILLAMÓN, M.L.<sup>1</sup> Y ARANDA, M.A.<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>Estación Experimental «La Mayora»-CSIC. 29750 Algarrobo-Costa, Málaga.

<sup>2</sup>Centro Nacional de Biotecnología-CSIC. Campus de la Universidad Autónoma. 28049 Cantoblanco, Madrid.

<sup>3</sup>Dirección actual: Centro de Edafología y Biología Aplicada del Segura (CEBAS)-CSIC. Campus Universitario de Espinardo. 30100, Murcia.

El *Virus del amarilleo y enanismo de las cucurbitáceas* (CYSDV) es causante de una enfermedad que afecta cultivos de cucurbitáceas de España y otras partes del mundo dando lugar a graves pérdidas económicas. CYSDV pertenece al género *Crinivirus* (familia *Closteroviridae*), es transmitido por la mosca blanca *Bemisia tabaci* y su genoma consiste en dos moléculas de RNA monocatenario de sentido mensajero (RNAs 1 y 2). Nuestro grupo ha determinado la secuencia de nucleótidos completa de los dos RNAs genómicos de CYSDV. El RNA 1 (9.123 nt) contiene cinco marcos de lectura abiertos (ORFs 1a, 1b, 2, 3 y 4). Los ORFs 1a y 1b tienen similitud significativa con los correspondientes ORFs de otros closterovirus, mientras que los ORFs 2, 3 y 4 no tienen similitud con ninguna secuencia incluida en bases de datos públicas. El RNA 2 (7.962 nt) contiene ocho ORFs (ORFs 5 a 12), incluyendo CP, CPM y HSP70h, característicos de la familia *Closteroviridae*. Por otra parte, hemos caracterizado el patrón de colonización por CYSDV de diversas cucurbitáceas susceptibles y también identificado desviaciones notables a ese patrón en una entrada de melón (C-105) y en dos de pepino (A1 y A2). En melón, pepino, calabaza y calabacín susceptibles, la acumulación de CYSDV alcanzó un máximo en las hojas 2<sup>a</sup> a 4<sup>a</sup> sobre la inoculada a tiempos tempranos post-inoculación. Posteriormente, la cantidad relativa de RNA viral / RNA total disminuyó notablemente. En la entrada de melón C-105 nunca se detectó CYSDV en tejido sistémico cuando la inoculación de las plantas se hizo usando *B.tabaci*. Cuando la inoculación se hizo mediante injerto sobre plantas de melón infectadas, sí se detectó CYSDV en tejido sistémico, pero en cantidades significativamente menores que en los correspondientes testigos. En las entradas de pepino A1 y A2 raramente se observaron síntomas de amarilleo en condiciones naturales de infección; sin embargo, en condiciones experimentales en las que la inoculación se hizo usando *B.tabaci* sí se observaron síntomas de amarilleo y acumulación de RNA viral, si bien la infección pareció progresar más lentamente en estas entradas que en testigos susceptibles. Aunque el control genético de los caracteres identificados no parece simple (nuestros resultados por publicar), estos materiales pudieran constituir fuentes interesantes de resistencia/tolerancia a CYSDV.

## EFFECTO DEL MOVIMIENTO SISTÉMICO EN LA ESTRUCTURA GENÉTICA DE LAS POBLACIONES DE VIRUS DE PLANTAS

SACRISTÁN, S.<sup>1</sup>, FRAILE, A.<sup>1</sup>, MALPICA, J.M.<sup>2</sup> Y GARCÍA-ARENAL, F.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> *Departamento de Biotecnología, E.T.S.I. Agrónomos, Universidad Politécnica de Madrid*

<sup>2</sup> *Departamento de Protección Vegetal, Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria, Madrid.*

La cantidad de virus presente en un huésped infectado o en una población de huéspedes susceptibles puede ser inmensa, asumiéndose frecuentemente que el alto potencial evolutivo de muchos virus está relacionado con el gran tamaño de sus poblaciones. No obstante, el parámetro evolutivo significativo es el tamaño efectivo de la población, más que el tamaño real o censo de esa población. Los pocos intentos de estimar el tamaño efectivo de poblaciones naturales de virus realizados principalmente con el Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH) indican que éste puede ser menor, en varios órdenes de magnitud, al censo poblacional. Una de las razones por las que el tamaño efectivo de una población sea menor que el censo, podría ser la existencia de cuellos de botella en la población durante el ciclo del virus. Los cuellos de botella podrían tener lugar, por ejemplo, en el momento de la infección de un nuevo huésped, o en la infección de nuevos tejidos u órganos ya dentro del huésped infectado.

En virus de plantas, se asume con frecuencia que, durante del movimiento sistémico, es decir, en la infección de nuevas hojas a partir de la infectada inicialmente, se producen cuellos de botella. No obstante, no hay evidencia de este hecho, ni mucho menos una estimación del tamaño de estos posibles cuellos de botella. Nosotros realizamos un análisis de este tipo basándonos en un modelo genético sencillo: el cambio en la frecuencia de alelos (variantes de un virus) en distintas generaciones (hojas secuencialmente infectadas) de una población, depende de su tamaño efectivo. Hemos utilizado como sistema experimental el Virus del Mosaico del Tabaco (TMV) en tabaco. Hemos inoculado distintas variantes genéticas de este virus en hojas de tabaco, determinando su frecuencia en la hoja inoculada y en las hojas superiores, infectadas sistémicamente, a distintos tiempos post-inoculación. De estos datos, se ha obtenido el tamaño efectivo de la población y, bajo un modelo de población sujeta a contracciones y expansiones demográficas, el tamaño del cuello de botella.

O-48

## SANEAMIENTO VIRAL DE 3 VARIEDADES DE *Phlox paniculata* y 2 VARIEDADES DE *Dianthus gratianopolitanus*

FRAGA, M., ALONSO, M. Y BORJA, M.

Dpto. de I+D+I. Fundación Promiva. Finca La Veguilla. M-511.

Km 10,1. Boadilla del Monte 28660-Madrid.

*Dianthus gratianopolitanus* y *Phlox paniculata* son dos especies ornamentales perennes que se multiplican por esquejes en primavera o verano. Plantas madre de las variedades 'Spotti' y 'Frosty Fire' de *D. gratianopolitanus* y de las variedades 'Orange Perfection', 'Blue Boy' y 'Starfire' de *P. paniculata* presentaban distintos síntomas de enfermedades virales: falta de vigor, manchas en las hojas, hojas amarillentas, necrosis en las hojas basales, crecimiento retardado y/o floración escasa. Todas las plantas se analizaron por ELISA para los siguientes virus que estaban descritos previamente en ornamentales: Tosspovirus (subgrupos I, II, y III), potyvirus, cucumovirus del mosaico del pepino (CMV), nepovirus de los anillos del tomate (ToRSV), nepovirus de los anillos del tabaco (TRSV), tobamovirus del mosaico del tabaco (TMV), dianthovirus latente del clavel (CLV) y carmovirus del moteado del clavel (CarMV). El resultado del test determinó la presencia de CLV, CarMV y potyvirus en las dos variedades de *D. gratianopolitanus* y de CLV y potyvirus en las tres variedades de *P. paniculata*. Se establecen en cultivo, a partir de meristemos y empleando MS sin reguladores de crecimiento. Después de tres meses, cuando la planta alcanza un desarrollo considerable, se realiza un segundo test ELISA, que determina la presencia únicamente de CLV y Potyvirus en todas las variedades. Tras someter a 200 plantas de cada variedad durante un período de cinco-seis semanas a una temperatura de 37°C, sobreviven el 86% del cultivar 'Spotti' y el 65% del cultivar 'Frosty Fire', el 62% del cultivar 'Blue Boy', el 45% del 'Starfire' y el 43% del 'Orange Perfection'. Del cultivo de los meristemos de estas plantas, se obtienen un 43% de brotes del cultivar 'Frosty Fire', un 31% del 'Spotti', un 71% del cultivar 'Blue Boy', un 40% del 'Starfire' y un 45% del 'Orange Perfection' libres de CLV, sin embargo los Potyvirus permanecen. Se realiza una segunda termoterapia a 39°C y, después de cinco-seis semanas sobreviven el 32% de las plantas del cultivar 'Spotti', el 38% del 'Frosty Fire' el 50% del cultivar 'Blue Boy', el 52% del 'Starfire' y el 40% del 'Orange Perfection'. Después de tres meses del cultivo de los meristemos de las plantas supervivientes, se realiza un test ELISA donde se determina la ausencia de Potyvirus en un 88% del cultivar 'Spotti', en un 92% del cultivar 'Frosty Fire', un 75% del cultivar 'Blue Boy', un 90% del 'Starfire' y un 95% del 'Orange Perfection'. Estas plantas libres de virus se enraizaron *ex vitro* en presencia de 0.05% de IBA y se aclimataron en el invernadero. Seis meses después todas las plantas permanecían aparentemente sanas (sin síntomas) y presentaban una floración mucho más abundante que las plantas originales.

## TÉCNICAS DE FORMULACIÓN DE AGENTES DE BIOCONTROL

DE CAL, A., LARENA, I., GUIJARRO, B., LIÑÁN, M. Y MELGAREJO, P.

*Departamento de Protección Vegetal. CIT-INIA. Carretera de La Coruña Km 7. 28040 Madrid*

En la búsqueda de métodos de control menos perjudiciales para el medio ambiente se ha desarrollado el uso de agentes de biocontrol que ejercen una acción directa o indirecta sobre la enfermedad provocando una reducción en la expresión de la misma. Uno de los principales problemas para el uso generalizado de los agentes de biocontrol es su producción y formulación industrial.

Por ello se ha desarrollado un método de producción de conidias mediante fermentación sólida de 3 agentes de biocontrol eficaces frente a la fusariosis vascular del tomate y el momificado de los frutos en frutales de hueso y pepita. Con este proceso se obtiene una producción de conidias del agente de biocontrol de  $10^{8-9}$  conidias/g en 5-10 días con una viabilidad superior al 80%.

Se está desarrollando la formulación sólida de los tres agentes de biocontrol para poder mantener una larga viabilidad y eficacia de los productos. Para ello se ha estudiado el proceso óptimo de secado de las conidias producidas en fermentación sólida, utilizando tres métodos de deshidratación: la liofilización, atomización y el lecho fluido. Se ha comprobado que las conidias de los tres agentes de biocontrol mantienen una viabilidad del 100% si se secan mediante liofilización o lecho fluido, mientras que pierden totalmente su viabilidad si se secan por atomización. Para mantener la viabilidad de las conidias durante la liofilización se ha de añadir leche desnatada a las conidias antes del proceso. Otros protectores como Tween 20, peptona, sacarosa, glucosa, almidón y peptona+almidón no mejoran la viabilidad obtenida con la leche desnatada sólo, incluso con glicerol pierden totalmente su viabilidad. Las conidias liofilizadas con leche desnatada de *P. frequentans* y *P. oxalicum* mantienen la viabilidad inicial durante 30 días a temperatura ambiente, mientras que las que han sido secadas mediante lecho fluido sin protectores lo hacen durante 90 días. Las conidias liofilizadas con leche desnatada de *E. nigrum* mantienen la viabilidad inicial durante 90 días a temperatura ambiente, mientras que las que han sido secadas mediante lecho fluido sin protectores lo hacen durante 120 días. Una vez acondicionadas las conidias en una formulación seca, se están estudiando aditivos que mejoren la eficacia y estabilidad de los formulados.

## ENSAYOS PILOTO DE CONTROL BIOLÓGICO DE PODREDUMBRES FÚNGICAS EN FRUTA DE PEPITA Y DE HUESO MEDIANTE UN NUEVO BIOFUNGICIDA

FRANCÉS, J.<sup>1</sup>, BONATERRA, A.<sup>1</sup>, AGIÑO, L.<sup>1</sup>, MARI, M.<sup>2</sup> Y MONTESINOS, E.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Instituto de Tecnologia Agroalimentària-CeRTA-CIDSAV. Universitat de Girona, Campus Montilivi 17071 Girona.

<sup>2</sup>CRIOF. University of Bologna, Via Filippo Re, 8, 40126 Bologna, Italia

El tratamiento de frutos de pepita (manzana y pera) y de frutos de hueso (albaricoque, melocotón y nectarina) en ensayos piloto en centrales frutícolas con el biofungicida EPS125 desarrollado en nuestro laboratorio reduce la incidencia y el diámetro de podredumbres causadas por *Penicillium expansum*, *Monilinia laxa* y *Rhizopus stolonifer*. Los niveles de biocontrol conseguidos son muy significativos y consistentes tanto en frutos inoculados con los patógenos en heridas como en frutos infectados de forma natural en el campo. La eficacia del biocontrol depende de la concentración del patógeno y es óptima a partir de  $10^7$  CFU ml<sup>-1</sup> bajo incidencias medias y altas de la enfermedad. Para determinar los mecanismos responsables de la protección contra las podredumbres en poscosecha se estudió la interacción entre la cepa EPS125, la superficie del fruto y *P. expansum*, *M. laxa* y *R. stolonifer*. La cepa coloniza, se multiplica y sobrevive en heridas de frutos tanto de hueso como de pepita. La cepa produce inhibición de la germinación de conidias y de crecimiento de micelio del patógeno sólo cuando se cocultivan con células del antagonista en zumo de fruta pero no se observa inhibición cuando antagonista y patógeno están separados físicamente por un filtro de membrana que permite intercambio de metabolitos y nutrientes. La cepa no produce antibiosis *in vitro*. Se propone como mecanismo de biocontrol la exclusión del patógeno por colonización de la herida y la interacción directa célula-a-célula sin estar implicados la producción de antibióticos ni la competición de nutrientes.

Los estudios toxicológicos de la cepa realizados por un laboratorio GPL son negativos. Asimismo se han establecido las condiciones óptimas para su fermentación a escala semiindustrial, acondicionamiento, formulación y conservación para su uso como biofungicida.



## BIOCONTROL DE LA PODREDUMBRE DE RAÍCES DE AGUACATE CAUSADA POR *Dematophora* MEDIANTE CEPAS ANTAGONISTAS DE PSEUDOMONAS

CAZORLA, F.M.<sup>1</sup>, PÉREZ-GARCÍA, A.<sup>1</sup>, BLOEMBERG, G.V.<sup>2</sup>, DE VICENTE, A.<sup>1</sup> Y LUGTENBERG, B.J.J.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Microbiología, Facultad de Ciencias, Universidad de Málaga.

Campus de Teatinos, s/n. 29071-Málaga

<sup>2</sup>Departamento de Microbiología, Instituto de Ciencias Moleculares de Plantas, Universidad de Leiden.

Wassenaarseweg 64, 2333 LA Leiden (Países Bajos).

*Dematophora necatrix* es el agente causal de la podredumbre radicular de raíces de aguacate por *Dematophora*. El control de esta enfermedad fúngica incluye varias estrategias: Solarización, fumigación del suelo o control biológico mediante el uso de cepas de *Trichoderma* sp., mostrando cada tratamiento diferente efectividad.

En este estudio se evaluará el uso de cepas de bacterias rizosféricas como agentes de biocontrol de esta enfermedad. Para este propósito, se analizaron 910 cepas bacterianas aisladas de rizosfera de aguacate, de las que se seleccionaron 12 cepas de los géneros *Pseudomonas* y *Bacillus* que presentaron una fuerte actividad antagonista "in vitro" frente a diferentes hongos de suelo.

Los ensayos de biocontrol usando un modelo aguacate-*Dematophora* sobre sustratos inertes o turba, así como también en el sistema tomate-*Fusarium*, mostraron que las cepas pertenecientes al género *Bacillus* no poseían actividad biocontrol, mientras que las cepas pertenecientes al género *Pseudomonas* presentaron actividad biocontrol generalizada en ambos sistemas modelo, destacando las cepas *P. chlororaphis* PCL1601 y *P. fluorescens* PCL1606.

Para profundizar en las bases moleculares del biocontrol de estas cepas, se procedió a la identificación de las sustancias antifúngicas que producían estas cepas de *Pseudomonas*, detectándose la presencia de compuestos antifúngicos en todas aquellas cepas con actividad biocontrol, incluyendo antibióticos, exoenzimas y otros compuestos tóxicos. La caracterización de dichos compuestos antifúngicos mostraron también la presencia de un compuesto no descrito anteriormente en una de las cepas con mejor protección frente a *D. necatrix*.

La construcción de mutantes Tn5 afectados en la producción de las sustancias antifúngicas, puso de manifiesto el papel de dichos compuestos en el biocontrol, ya que las cepas con la producción de antibióticos alterada mediante la inserción del transposón mostraron una pérdida de capacidad de biocontrol en relación con la cepa silvestre.

## CONTROL BIOLÓGICO “IN VITRO” DE DAMPING-OFF DE POSTEMERGENCIA CAUSADO POR *Fusarium oxysporum* Y *F. moniliforme* SOBRE *Pinus nigra* MEDIANTE LOS HONGOS ECTOMICORRÍCICOS *Rhizopogon roseolus* Y *Boletus edulis*

MARTÍN, P., PAJARES, J.A., FERNÁNDEZ, M. Y DIEZ, J.J.

Universidad de Valladolid. Unidad de Entomología y Patología Forestales. Departamento de Producción Vegetal y Silvopascicultura. Escuela Técnica Superior de Ingenierías Agrarias (E.T.S.II.AA.). Avl de Madrid 57. 34071. Palencia.

El género *Fusarium* engloba especies que causan importantes daños sobre plántulas de coníferas en los viveros forestales. En un detallado trabajo de inventariación de la micoflora asociada en la comunidad de Castilla y León, ha resultado frecuente la aparición de *F. oxysporum* y *F. moniliforme* asociados a plántulas sintomáticas.

La protección de la planta frente a la invasión por patógenos se favorece mediante la micorrización, ya que las micorizas utilizan carbohidratos y otros compuestos químicos que pueden atraer a los patógenos y/o proporcionar a la planta una barrera física en forma de un mantillo fúngico. Por otra parte, pueden segregar antibióticos que inhiben o matan al patógeno, servir de soporte a otros microorganismos beneficiosos de la rizosfera, y estimular la producción de inhibidores químicos en las células de la raíz durante la simbiosis.

El objeto de este trabajo fue determinar la posible influencia de hongos ectomicorrícicos comestibles en la protección frente a enfermedades causadas por cepas del género *Fusarium*. Para ello, se han utilizado 2 cepas de *Fusarium oxysporum* y 2 de *F. moniliforme* con patogenicidad contrastada. y dos hongos ectomicorrícicos *Boletus edulis* y *Rhizopogon roseolus*. La semilla se esterilizó, se pregerminó en PDA y se introdujo en tubos con turba inoculada con los hongos ectomicorrícicos, inoculándose 14 días después el patógeno.

La supervivencia de las plántulas de *Pinus* en los tratamientos control, superó el 90%, mientras que las inoculadas únicamente con cepas patógenas no superaron el 5% en la mayor parte de los casos. La supervivencia se incrementó en las muestras tratadas con *B. edulis* hasta el 65% y con *R. roseolus* hasta el 45%. El efecto protector de *R. roseolus* fue mayor sobre las plántulas inoculadas con *F. oxysporum*. Mientras que el efecto de *B. edulis* fue similar con ambos patógenos.

Se concluye por tanto, que los hongos ectomicorrícicos han ejercido una importante influencia en el desarrollo de plántulas inoculadas con cepas patógenas incrementando sensiblemente la supervivencia.

Este trabajo ha sido financiado por el Ministerio de Ciencia y Tecnología, y Fondos Europeos de Desarrollo Regional (FEDER) dentro del Programa del Plan Nacional de Investigación Científica, Desarrollo e Innovación Tecnológica 2000-2003 (Proyecto AGL2001-1771)

## INTERACCIONES MOLECULARES ENTRE *Olea europaea* (OLIVO) Y *Spilocaea oleagina* (AGENTE CAUSANTE DEL REPILO): EXPRESIÓN GÉNICA DIFERENCIAL Y PCR CUANTITATIVA EN TIEMPO REAL

BENÍTEZ, Y.<sup>1</sup>, TRAPERO, A.<sup>2</sup>, CABALLERO, J.L.<sup>1</sup>, MUÑOZ-BLANCO, J.<sup>1</sup> Y DORADO, G.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Dpto. Bioquímica y Biología Molecular, Campus Rabanales C6

<sup>2</sup> Dpto. Agronomía, ETSIAM, Campus Menéndez Pidal s/n Universidad de Córdoba, 14071 Córdoba (España)

Se han aplicado las técnicas de Expresión Diferencial (“Differential Display”; DDRT-PCR; DD) y PCR Cuantitativa en Tiempo Real (“Quantitative Real-Time PCR”; QRT-PCR; QRT) al estudio de las interacciones moleculares entre el olivo (*Olea europaea*) y el hongo parásito (*Spilocaea oleagina*) causante del repilo (‘leaf peacock spot’). Se purificó RNA total de hojas jóvenes del cultivar ‘Lechín de Sevilla’ (tolerante a la infección del hongo) tres semanas tras la inoculación, así como de hojas controles (no infectadas). Tras un rastreo del 40% de la población de mRNAs mediante DD, se aislaron y secuenciaron 200 fragmentos EST (“Expressed Sequence Tags”), incluyendo 50 sobre-expresados en las hojas infectadas. Se realizó un rastreo preliminar de los ESTs mediante metodologías de transferencia (“blot”). Los algoritmos FASTA y BLAST mostraron una elevada similitud de la mayoría de ellos con genes de plantas probablemente implicados en interacciones planta-patógeno. Los patrones de expresión de 18 de dichos ESTs fueron analizados mediante QRT a los cinco y 21 días tras la infección. Un total de 24 ESTs fueron asignados al genoma de *O. europaea* o al de *S. oleagina* mediante transferencia e hibridación (“Southern blot”) de los fragmentos amplificados. Además, algunos de los genes estudiados mostraron patrones de expresión diferente para los cultivares de olivo tolerantes respecto a los susceptibles al hongo parásito. También se llevaron a cabo estudios de expresión génica tras el tratamiento de hojas de olivo (‘Lechín de Sevilla’) con salicilato sódico (SA), benzotiadiazol (BTH), jasmonato de metilo (MJ), mezcla de SA + MJ, etefón, y finalmente, cloruro cúprico (CuCl<sub>2</sub>). Se discuten los resultados en relación a las implicaciones de la Respuesta Adquirida Sistémica (“Systemic Acquired Response”; SAR) respecto a los mecanismos de tolerancia o sensibilidad de la planta al hongo patógeno.

Financiado por CAO00-018-C7-3

## ANÁLISIS DEL MECANISMO DE RESISTENCIA AL *Virus de las manchas necróticas del melón* (MNSV) EN GENOTIPOS DE MELÓN PORTADORES DEL GEN RECESIVO *nsv*

DÍAZ, J.A.<sup>1</sup>, NIETO, C.<sup>1,2</sup>, Y ARANDA, M.A. <sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Estación Experimental «La Mayora»-CSIC. 29750 Algarrobo-Costa, Málaga.

<sup>2</sup> Dirección actual: Centro de Edafología y Biología Aplicada del Segura (CEBAS)-CSIC. Campus Universitario de Espinardo, 30100 Murcia.

El *Virus de las manchas necróticas del melón* (*Melon necrotic spot virus*, MNSV) es un *Carmovirus* (familia *Tombusviridae*) endémico en cultivos protegidos de cucurbitáceas. MNSV-264 es un aislado español capaz de superar la resistencia conferida por el gen recesivo *nsv* de melón. Esta resistencia es la única descrita hasta el momento a MNSV y los cultivares comerciales de melón que la portan están siendo ampliamente utilizados. Por otra parte, MNSV-Ma5 es otro aislado español que no supera la resistencia de genotipos *nsv/nsv*. Nosotros hemos determinado la secuencia de nucleótidos completa de los genomas de MNSV-264 y de MNSV-Ma5. Un análisis de estas secuencias y su comparación con otras secuencias de MNSV disponibles en bases de datos ha mostrado que MNSV-264 tiene una alta similitud con otros aislados de MNSV en todo el genoma excepto en la región 3' no codificante (3'-UTR). Los análisis filogenéticos que hemos llevado a cabo sugieren que esta región debe haberse adquirido evolutivamente por recombinación. Asimismo, hemos estudiado la posible implicación de esta región como determinante genético de la virulencia de MNSV-264 sobre genotipos *nsv/nsv*. Con este fin, hemos generado clones de cDNA al RNA genómico de MNSV-264 y de MNSV-Ma5. A partir de estos clones hemos sintetizado *in vitro* RNAs infectivos que reprodujeron las propiedades biológicas de los virus parentales. La generación y caracterización de mutantes quiméricos entre las dos cepas ha confirmado que la región 3'-UTR contiene el determinante genético de la virulencia de MNSV-264 sobre genotipos *nsv/nsv*. Para conocer la(s) función(es) viral(es) impedida(s) o bloqueada(s) en genotipos resistentes de melón, hemos llevado a cabo análisis histológicos y celulares de diferentes genotipos de melón infectados con MNSV-264, MNSV-Ma5 y los mutantes quiméricos derivados de ellos. Estos trabajos han mostrado que la resistencia se expresa a nivel unicelular. Puesto que la región 3'-UTR contiene el determinante de virulencia de MNSV-264 sobre melones resistentes, y esta región está implicada en la traducción y replicación de RNAs virales, la resistencia conferida por *nsv* debe actuar en la replicación y/o traducción del genoma viral. Actualmente, nuestra hipótesis de trabajo es que Nsv sea un factor celular requerido para la replicación y/o traducción del genoma de MNSV y, probablemente, interaccione directa o indirectamente con el 3'-UTR. Posiblemente, MNSV-264, con un 3'-UTR muy distinto, no requiera Nsv para su replicación y/o traducción.

## BASES CELULARES Y MOLECULARES DE LA INTERACCIÓN *Sphaerotheca fusca*-MELÓN

RIVERA, M.E., CAZORLA, F.M., CODINA, J.C., DE VICENTE, A. Y PÉREZ-GARCÍA, A.

Dpto. de Microbiología. Facultad de Ciencias. Universidad de Málaga. Campus Universitario de Teatinos s/n. 29071. Málaga.

*Sphaerotheca fusca* es el principal agente causal del oídio de las cucurbitáceas en el Sur de España. Hasta el momento, el control de la enfermedad está basado fundamentalmente en el uso de fungicidas, aunque en los últimos años se están desarrollando diversas estrategias alternativas, muchas de las cuales están basadas en la inducción de la expresión de la resistencia sistémica de la planta. Para poder llevar a cabo este tipo de estrategias en el control del oídio es necesario tener un conocimiento preciso acerca de los mecanismos implicados en la respuesta defensiva, por lo que en este trabajo se ha analizado el patrón de inducción de diferentes mecanismos de defensa durante la interacción melón-*S. fusca*, empleando para ello dos cultivares que mostraban una respuesta diferencial compatible e incompatible frente al patógeno.

En el cv. resistente (PMR-6) se ha observado que la rápida inducción de diversos mecanismos contribuye a la detención del crecimiento del hongo en estadios muy iniciales de la interacción, tras la formación del tubo germinativo y el primer haustorio. Así, mediante diferentes aproximaciones moleculares, se puso de manifiesto la inducción de la expresión de b-1,3-glucanasas a partir de las 12 h después de la inoculación, y el empleo de técnicas histoquímicas reveló la presencia de depósitos de calosa y lignina en las células directamente atacadas por el hongo y en las células adyacentes epidérmicas y del mesófilo, también a partir de las 12h. En el cv. susceptible (Rochet), por el contrario, el retraso en la inducción de estas respuestas no aporta protección frente al hongo. En lo referente a la PAL, no se ha observado ninguna inducción específica en respuesta a la inoculación con el hongo en los dos cultivares empleados.

Por otra parte, mediante técnicas de detección *in situ* de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se puso de manifiesto la generación de este radical en las células epidérmicas del cultivar resistente antes que *S. fusca* formara el tubo germinativo y el primer haustorio, lo que indica que la inducción de la respuesta defensiva en melón es anterior a la formación del haustorio y no post-haustorial, como había sido propuesto hasta el momento, aunque la manifestación de la resistencia y, por tanto, la detención del crecimiento del patógeno sí es posterior a la formación de dicho haustorio.

O-56

## INDUCCIÓN DE RESPUESTAS DE DEFENSA EN FRUTOS CÍTRICOS FRENTE AL ATAQUE POR *Penicillium digitatum*

BALLESTER, A.R., SÁNCHEZ-TORRES, P., MARCOS, J.F., LAFUENTE, M.T. Y GONZÁLEZ-CANDELAS, L.

Laboratorio de Postcosecha. Dpto. de Ciencia de los Alimentos. Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos (IATA-CSIC). Ap. Correos 73. Burjassot. 46100-Valencia.

*Penicillium digitatum* es el hongo responsable de la podredumbre verde de los frutos cítricos y constituye el principal patógeno durante la postcosecha de los mismos. A pesar de la enorme incidencia económica de las pérdidas producidas por *P. digitatum*, apenas existen estudios sobre la interacción entre este hongo y los frutos cítricos. El presente trabajo representa una primera aproximación bioquímica y molecular para caracterizar las respuestas de defensa del fruto que son inducidas en frutos de naranja durante la infección por este patógeno.

Desde el punto de vista bioquímico se han analizado distintas actividades enzimáticas relacionadas con el metabolismo de especies activas de oxígeno (superóxido dismutasa, catalasa, peroxidasa, glutathion reductasa), de fenilpropanoides (fenilalanina amonio liasa, PAL) y de proteínas relacionadas con la patogénesis ( $\beta$ -1,3-glucanasa y quitinasa) en distintas zonas de frutos infectados, desde tejido sano hasta tejido con abundante esporulación. En general, la mayoría de las actividades ensayadas mostraron una reducción con el avance del patógeno. Sin embargo, las actividades PAL, y peroxidasa insoluble aumentaron en la zona correspondiente al frente de avance del patógeno. También se ha estudiado la evolución temporal de las actividades PAL, peroxidasa,  $\beta$ -1,3-glucanasa y quitinasa en frutos de naranja infectados por *P. digitatum*.

Desde el punto de vista molecular hemos estudiado, mediante análisis Northern, la expresión de varios genes potencialmente implicados en la respuesta de defensa frente a patógenos, ya que codifican una proteína transportadora de lípidos (LTP), una PAL, una  $\beta$ -1,3-glucanasa y una hipotética aciltransferasa. Dado que el sistema en estudio consta de dos organismos diferentes, hemos empleado un fragmento del gen 28 S del DNA ribosómico, tanto de naranja como de *P. digitatum*, para normalizar los resultados de las hibridaciones. Del estudio de la expresión temporal y espacial de estos genes se deduce que hay un incremento notable en la acumulación del mRNA de los genes que codifican una PAL y una  $\beta$ -1,3-glucanasa en respuesta a la infección, que, sin embargo, no se correlacionan con la actividad enzimática detectada

## CARACTERIZACIÓN DE UNA CEPA DE *Erwinia amylovora*, CON PLENA VIRULENCIA, QUE NO POSEE EL PLÁSMIDO pEA29

LLOP, P.<sup>1</sup>, DONAT, V.<sup>1</sup>, RODRÍGUEZ, M.<sup>2</sup> Y LÓPEZ, M.M.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA),  
Apdo Oficial, 46113, Moncada, Valencia.

<sup>2</sup> Dpto Biología Celular, U. Simón Bolívar, Caracas, Venezuela.

Se ha realizado un estudio comparativo de las características fenotípicas y moleculares de cepas españolas de *Erwinia amylovora* procedentes de los distintos focos identificados en España desde 1995. Esto ha permitido detectar entre los aislados de un vivero de Segovia una cepa de *Erwinia amylovora* con una característica especial. La bacteria se aisló de una muestra de *Pyracantha* que fue positiva en enriquecimiento-ELISA, pero negativa en PCR empleando iniciadores basados en secuencias del plásmido pEA29. El estudio de los plásmidos que poseía esta cepa mostró que posee dos plásmidos pero ninguno de ellos presentaba homología con el pEA29, que es común a todas las cepas patógenas de esta especie. Esto se demostró mediante la comparación de los perfiles de restricción con los enzimas BamHI y SmaI e hibridando los plásmidos extraídos usando el plásmido pEA29 como sonda. Los análisis bioquímicos mediante API 20E, API 20NE y API 50CH no mostraron diferencias con otras cepas de *E. amylovora*, como tampoco hubo diferencias en el perfil de ácidos grasos o con PCR utilizando iniciadores cromosómicos. En medio mínimo no suplementado con tiamina la cepa estudiada presentó el mismo comportamiento que otras cepas de *E. amylovora* curadas del plásmido pEA29, es decir un menor crecimiento comparando con el mismo medio con la vitamina. La reacción de hipersensibilidad en tabaco fue positiva, y los resultados de las inoculaciones en níspero, manzano, peral y *Pyracantha* fueron los típicos de las cepas virulentas de *E. amylovora*, observándose la producción rápida de necrosis y exudados. Según la información disponible, es la primera vez que se observa que una cepa plenamente virulenta no posee el plásmido de 29 kb, característico de *E. amylovora*.

O-58

## PAPEL DE LA RESISTENCIA BACTERIANA A pH ÁCIDO DURANTE LA PATOGÉNESIS DE *Erwinia chrysanthemi*

LLAMA-PALACIOS, A., LÓPEZ-SOLANILLA, E., POZA-CARRIÓN, C., GUÍO, A. Y RODRÍGUEZ-PALENZUELA, P.

Dpto. de Biotecnología. E.T.S. Ingenieros Agrónomos-UPM Av. Complutense s/n 28040 Madrid.

La mayoría de las bacterias fitopatógenas se han especializado en colonizar el apoplasto vegetal. Este nicho particular se caracteriza por ser pobre en nutrientes y estar cargado de sustancias antimicrobianas. Además el apoplasto vegetal es ácido (5.0-6.5) (aunque algunos órganos tienen un pH menor) debido a la abundancia de ácidos orgánicos y a la extrusión de protones desde células adyacentes. Estos valores de pH constituyen una barrera significativa para el crecimiento bacteriano.

*Erwinia chrysanthemi* pertenece a la familia de las *Enterobacteriaceae* y es el agente causal de la “prodredumbre blanda de los vegetales”, que tiene importancia económica en un amplio conjunto de cultivos. El comportamiento patogénico de esta bacteria se caracteriza por una rápida necrosis de los tejidos parenquimáticos, causada fundamentalmente por las enzimas pectolíticas que degradan la pared celular primaria de las células vegetales. Se sabe que esta degradación provoca la lisis celular y esto, a su vez, resulta en un aumento del pH del espacio intercelular y el consecuente aumento de la actividad pectolítica, abriendo un proceso de retroalimentación que lleva a la maceración del tejido.

El objetivo de este trabajo ha sido el estudio del papel del pH ácido como una barrera para la colonización del apoplasto por *E. chrysanthemi*. Se ha analizado la respuesta de esta bacteria al pH ácido y a diversos ácidos orgánicos. Para ello se ha aislado un mutante Tn5 incapaz de crecer a pH 5.5. Este mutante resulta estar afectado en virulencia, en la producción de actividad poligalacturonasa y en la resistencia a péptidos antimicrobianos. Los genes inactivados mostraron similitud de secuencia con el sistema de regulación de dos componentes PhoP-PhoQ descrito en *Salmonella typhimurium* y que es un regulador clave en la virulencia de esta bacteria. Nuestros datos indican que este sistema juega un importante papel en las primeras etapas de la patogenicidad de *E. chrysanthemi* y en su supervivencia en tejidos vegetales.



## LAS VARIANTES DEL VIROIDE DEL MOSAICO LATENTE DEL MELOCOTONERO QUE INDUCEN UNA FORMA EXTREMA DE CLOROSIS (“PEACH CALICO”) CONTIENEN UNA INSERCIÓN CARACTERÍSTICA QUE ES EL DETERMINANTE DE ESTA SINTOMATOLOGÍA

MALFITANO, M.<sup>1</sup>, DI SERIO, F.<sup>2</sup>, COVELLI, L.<sup>1</sup>, RAGOZZINO, A.<sup>1</sup>, HERNÁNDEZ, C.<sup>3</sup> Y FLORES, R.<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Dipartimento di Arboricoltura, Botanica e Patologia Vegetale, Università di Napoli,  
80055 Portici, Italia,

<sup>2</sup>Dipartimento di Protezione delle Piante e Microbiologia Applicata, Università di Bari e Istituto di Virologia Vegetale del CNR, sezione di Bari, 70126 Bari, Italia,

<sup>3</sup>Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas (UPV-CSIC), Universidad Politécnica de Valencia,  
46022 Valencia

El viroide del mosaico latente del melocotonero (*Peach latent mosaic viroid*, PLMVd) es el causante de una enfermedad de este cultivo que se manifiesta en distintos órganos. En hojas, la mayoría de las infecciones naturales no inducen síntomas, pero ocasionalmente se observan síntomas de una clorosis extrema que cubren la casi totalidad de la superficie foliar (*peach calico*, PC). El objetivo de este trabajo ha sido establecer cuáles son los determinantes moleculares de esta sintomatología, cuestión sobre la que no se dispone de información alguna.

La secuenciación de 16 clones completos de cDNA de un aislado PC de Campania (Italia) reveló la existencia de dos grupos de variantes que difieren en tamaño. Nueve de las variantes mostraron un tamaño (336-338 nt) similar al de las variantes típicas previamente encontradas en aislados latentes o que inducen un mosaico característico. Sin embargo, el tamaño de las otras siete variantes fue de 348-351 nt, debido a una inserción de 12-13 nt localizada en el bucle que contiene las posiciones 1 y 337 de la secuencia de referencia. La inoculación mecánica de plantas de semilla del melocotonero indicador GF-305 con transcritos sintetizados *in vitro* a partir de plásmidos recombinantes conteniendo insertos diméricos correspondientes a dos variantes con la inserción de 12-13 nt indujeron síntomas de PC, mientras que el transcrito correspondiente a una variante sin la inserción produjo una infección latente. Además, el análisis molecular mostró que la inserción se mantuvo en las progenies de las plantas que presentaron la sintomatología PC. Este es un indicio muy firme, aunque no concluyente (porque las variantes, además de contener o no la inserción de 12-13 nt, presentan otras mutaciones puntuales), de que dicha inserción contiene el determinante de patogenicidad de la sintomatología PC. Para confirmar de forma directa una relación causa-efecto, se eliminó la inserción de una de las variantes patogénicas mediante mutagénesis dirigida. La inoculación mecánica de plantas de GF-305 con transcritos sintetizados *in vitro* correspondientes a esta variante mutada produjo una infección latente, lo que demuestra que la inserción es la responsable de la

## MONITORIZACIÓN TEMPORAL Y CUANTIFICACIÓN DE LA INFECCIÓN VASCULAR DE OLIVO POR *Verticillium dahliae* MEDIANTE PCR CUANTITATIVA EN TIEMPO REAL (RT-QPCR)

MERCADO BLANCO, J., COLLADO ROMERO, M., PARRILLA ARAUJO, S. Y RODRÍGUEZ JURADO, D.

*Instituto de Agricultura Sostenible, C.S.I.C., Apartado 4084, Córdoba*

La Verticilosis del olivo, causada por los patotipos defoliante (D) y no-defoliante (ND) de *Verticillium dahliae*, es uno de los problemas fitopatológicos más preocupantes para la industria olivarera en Andalucía, por la severidad de sus ataques en las nuevas plantaciones y la expansión de la enfermedad hacia zonas de cultivo libres de ella. Disponer de metodologías fiables para monitorizar los niveles de infección de la planta por los patotipos de *V. dahliae*, es de particular importancia para detectar infecciones latentes en plantas de vivero y en plantaciones establecidas que pueden coadyuvar a la distribución del patógeno, así como para cualificar el nivel de resistencia o tolerancia a éste del material de plantación. La técnica de PCR cuantitativa en tiempo real (RT-QPCR) permite estimar con precisión la cantidad de la secuencia específica de ADN sintetizada en la fase logarítmica de acumulación del producto de amplificación, cuando la reacción no es influida por pérdida de eficiencia o agotamiento de reactivos. En este trabajo, demostramos que la infección vascular de plantas de olivo por los patotipos D y ND de *V. dahliae* puede ser cuantificada mediante la técnica RT-QPCR, y discutimos la correlación entre la presencia y cantidad del hongo en la planta y el desarrollo y cantidad de enfermedad que se produce en ella. Plantas 'Acebuche-L', 'Picual' y 'Arbequina' de 3-7 meses de edad se inocularon por separado con aislados de los patotipos D y ND de *V. dahliae*, mediante inmersión del sistema radical desnudo en una suspensión de conidias del hongo. Los tallos y raíces de plantas inoculadas y no inoculadas se muestrearon por separado en un curso temporal de la infección desde el día de la inoculación hasta los 100 días después de la misma, y de dichas muestras se extrajo el ADN total. Este ADN se usó como molde en los experimentos RT-QPCR utilizando cebadores específicos de *V. dahliae*. Mediante análisis RT-QPCR fue posible monitorizar la colonización de *V. dahliae* en el tiempo, así como cuantificar el ADN del patógeno presente en muestras de tejido infectado. La cantidad de ADN de *V. dahliae* fluctuó en las plantas infectadas de los tres genotipos de olivo estudiados y fue máxima en determinados momentos de la patogénesis a lo largo de los bioensayos. Es de destacar que el patógeno pudo ser cuantificado en las plantas 'Acebuche-L', que no desarrollaron síntomas tras la infección, si bien dicha cantidad fue inferior a la determinada en plantas 'Picual' y 'Arbequina', que resultaron afectadas con síntomas moderados o severos de la Verticilosis.

Subvencionado por el proyecto QLK5-CT1999-01523 de la UE

## *Cucumber vein yellowing virus* EN EL SUR-ESTE DE ESPAÑA

JANSSEN, D., RUIZ, L., VELASCO, L., SEGUNDO, E., MARTÍN-BRETONES, G., CANO, M., BELMONTE, A., Y CUADRADO, I.M.

Unidad de Virología, Centro de Investigación y Formación Agraria, Apartado de Correos 91, 04700 El Ejido (Almería).

Actualmente, *cucumber vein yellowing virus* (CVYV) es considerado como un posible miembro del género *Ipomovirus* (familia *Potviridae*). Según se ha descrito, el virus únicamente infecta a un número de especies de *cucurbitaceae*, y su distribución geográfica se limita a la Cuenca Mediterránea Oriental. CVYV se descubrió por primera vez en cultivos de pepino en Israel (1) y posteriormente ha sido encontrado en Jordania, Turquía y Sudán. En plantas, CVYV causa síntomas de amarillamiento de las venas de las hojas apicales, y una reducción en el crecimiento y en la producción de frutos. El virus es transmitido mecánicamente y de forma semi-persistente por la mosca blanca, *Bemisia tabaci* Gennadius.

Durante el otoño del 2000 se encontró CVYV por primera vez en cultivos de pepino en España, causando amarillamiento de las venas seguido por clorosis en hojas y manchas cloróticas en frutos (2). A lo largo de la siguiente campaña del primavera del 2001, aparecieron infecciones por CVYV en plantas de sandía presentando síntomas de clorosis difusa en hojas y necrosis interna en los frutos. Durante el mismo año, se encontraron también infecciones en plantas de pepino y calabacín en la provincia de Granada y la Región de Murcia. Se realizó la identificación molecular del virus en España tras amplificación de una parte del genoma por RT-PCR mediante cebadores específicos. Las comparaciones de secuencias del virus con aquellas de aislados de Turquía e Israel demuestran un alto grado de homología (aprox. 95%). Se produjeron sondas RNA, marcadas con digoxigenina y homologas a secuencias genómicas de CVYV que permitieron detectar específicamente el virus en moscas blancas infectadas, y en plantas recogidas del invernadero. Ensayos de inoculación mecánica confirmaron que el rango de huéspedes experimentales está limitado a especies de *cucurbitaceae*. Sin embargo, en el campo se ha encontrado el virus en algunas especies de malas hierbas pertenecientes a otras familias como *Sonchus* sp. y *Malva* sp. (3). Estudios epidemiológicos realizados en invernaderos experimentales demostraron que el virus puede ser controlado mediante una protección física de los cultivos frente el vector, *Bemisia tabaci*.

1.Cohen, S.; Nitzany, F.E. (1960) *Phytopathologia Mediterranea*, 1(1), 44-46.

2.Cuadrado, I.M.; Janssen, D.; Velasco, L.; Ruiz, L.; Segundo, E. (2001) *Plant Disease*, 85(3), p 336.

3.Janssen D, Ruiz L, Velasco L, Segundo E, Cuadrado IM. *New Disease Reports*, vol. 5, Jan-Jul

## CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA DE ESPECIES DE *Botryosphaeria* ASOCIADAS CON CHANCROS DE RAMAS DE *Quercus* spp.

ROMERO, M.A., VENEGAS, J., SÁNCHEZ, M.E. Y TRAPERO, A.

*Patología Vegetal. Dpto. de Agronomía. ETSIAM. Universidad de Córdoba.*

Apdo 3048. 14080-Córdoba.

En las prospecciones sobre la Seca de encinas y alcornoques en Andalucía se observó la presencia de pies que presentaban ramas secas con hojas muertas prendidas durante un cierto tiempo o totalmente defoliadas. En los alcornoques, además, el tronco perdía su forma cilíndrica presentando caras planas separadas por abultamientos que coincidían con las heridas producidas durante el descorche. Para identificar el agente que causaba estos síntomas se tomaron muestras tanto de ramas como de corteza de alcornoque en diferentes provincias andaluzas: Cádiz, Córdoba, Huelva, Jaén y Sevilla.

Las muestras de ramas se procesaron en el laboratorio mediante cámaras húmedas y aislamientos en el medio PDA ácido (PDAA). De las diferentes muestras se obtuvieron tres especies fúngicas consistentemente asociadas a los chancros: *Diplodia sarmentorum* (teleomorfo *Otthia spiraeae*), *Fusicoccum aesculi* (teleomorfo *Botryosphaeria dothidea*) y una tercera especie con características intermedias entre *Diplodia mutila* (teleomorfo *Botryosphaeria stevensii*) y *Diplodia* sp. (teleomorfo *B. quercuum*), que provisionalmente se ha identificado como *D. mutila*.

En la corteza de alcornoque también se observaron pseudotecas con ascas y ascosporas que se identificaron como *Botryosphaeria* sp. (probablemente *B. quercuum* o *B. stevensii*). Para establecer la relación teleomorfo y anamorfo, se procedió a la descarga de ascosporas y obtención de cultivos monoascospóricos en el medio PDAA. Las colonias del anamorfo obtenido presentaron características intermedias entre los anamorfos de *B. stevensii* y *B. quercuum*, no difiriendo de las colonias obtenidas a partir del tejido cortical necrótico identificadas como *D. mutila*.

En el género *Botryosphaeria* existen numerosas dificultades en la identificación de los teleomorfos, anamorfos y en el establecimiento de correspondencia entre la forma sexual y asexual. Por ello, se están llevando a cabo diferentes experimentos de inoculación artificial con mezclas de aislados monoascospóricos sobre varios sustratos, con el fin de obtener ascomas que permitan la caracterización y correcta identificación de las especies de *Botryosphaeria* causantes de chancros en *Quercus* spp.

# DETECCIÓN EN CEREALES DE INVIERNO DE VIRUS TRANSMITIDOS POR *Polymixia graminis* Led

BARBERÁ, S.<sup>1</sup>, RATTI, C.<sup>2</sup>, RUBIES-AUTONELL, C.<sup>2</sup> Y ACHÓN, M.A.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Area de Protección de Cultivos. Centro UdL-IRTA, Alcalde Rovira Roure 191, 25198-Lleida;

<sup>2</sup>DiSTA, Via Filippo Re 8, 40126-Bologna, Italia

*Polymyxa graminis* Led, es vector de al menos diez virus que afectan a cereales de invierno pertenecientes a los géneros *Bymovirus* (Fam. *Potyviridae*) y *Furovirus*. En Europa, estos virus se están extendiendo peligrosamente en las últimas décadas ocasionando pérdidas entre el 50-70% en cultivares susceptibles. En España, probablemente debido a la dificultad de observar los síntomas inducidos por estos virus cuando las temperaturas primaverales aumentan, y la no-realización de prospecciones sistemáticas en cereales de invierno, han determinado la no-detección de estos virus hasta la primavera del presente año. Mediante DAS-ELISA se ha identificado la presencia en cebada del *Bymovirus* del mosaico amarillo de la cebada (*Barley yellow mosaic*, BaYMV) en siete de los diecisiete campos visitados y mediante RT-PCR del *Bymovirus* del mosaico suave de la cebada (*Barley mild mosaic virus*, BaMMV). No se descarta la posibilidad de la presencia en trigo del *Bymovirus* del mosaico estriado fusiforme del trigo (*Wheat spindle streak mosaic virus*, WSSMV), y de los *Furovirus* que afectan a este cultivo dado el avanzado estadio fenológico en que se realizó la prospección en este cultivo. El tipo de transmisión de estos virus, persistencia en las zoosporas del vector, y por lo tanto en el suelo, durante más de 15 años hacen necesario un estudio más extenso tanto sobre la presencia de estos virus como en la caracterización de los aislados presentes en España para poder establecer las apropiadas medidas de control.

## DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL RÁPIDO MEDIANTE RT-PCR DE LOS PATOTIPOS P12 Y P123 DE *Pepper mild mottle virus*

VELASCO, L., SEGUNDO, E., JANSSEN, D., RUIZ-GARCÍA, L., MARTIN-BRETONES, G. Y CUADRADO, I.M.

Centro de Investigación y Formación Agraria (CIFA). Apdo. de correos, 91. 04700 El Ejido (Almería)

La resistencia a los tobamovirus en pimiento se debe a la presencia de los alelos L1 a L4 (1). La resistencia al patotipo P0 que corresponde a ToMV la confiere el alelo L1; L2 confiere resistencia al anterior y a PaMMV; L3 confiere resistencia los anteriores más el patotipo P12 de *Pepper mild mottle virus* (PMMoV) y L4, por último, aporta resistencia al patotipo P123 de éste último virus (2).

Actualmente en los cultivos protegidos de pimiento se ha extendido el uso de variedades resistentes como método de lucha contra las virosis. También las diferentes compañías productoras de semillas están en continuo desarrollo de estas variedades.

El diagnóstico de estas virosis se realiza de forma rutinaria en los Servicios de Sanidad Vegetal mediante métodos de ELISA o el empleo de plantas indicadoras. Sin embargo, no existen tests ELISA que puedan distinguir entre los dos patotipos de PMMoV debido a la similitud de su secuencia de aminoácidos y el empleo de indicadoras es laborioso y lento. La secuenciación completa de un aislado de patotipo P123 (3) en Almería ha permitido diseñar un método de diagnóstico basado en la reacción de RT-PCR seguida de digestión enzimática. Para ello, se diseñaron cebadores que amplificaran de forma eficiente el cDNA de ambos patotipos: 5'ACAGCGTTTGGATCTTAGTAT3' (P12/3) y 5'GTGCGGTCTTAATAACCTCA3' (P12/3A); por otro lado, se ha identificado un sitio *EcoRI*, único, ausente en la secuencia de P12 y que permite mediante digestión enzimática diferenciar ambos cDNAs. Este método se emplea de forma rutinaria en nuestro laboratorio y se ha corroborado mediante inoculación en plantas indicadoras.

También ha sido posible diseñar cebadores específicos para uno y otro patotipo. Asimismo, es posible emplear otras enzimas de restricción para distinguirlos. No obstante, dada la simplicidad de la técnica que permite el diagnóstico simultáneo de muchas muestras y de lo asequible y eficiente que es *EcoRI*, recomendamos el empleo de éste método.

1. Boukema, I.W., 1984. Resistance to TMV in *Capsicum chacoense* Huz. is governed by an allele of the L-locus. *Capsicum News Lett.* 3, 47-48.
2. Berzal-Herranz, A., de la Cruz, A., Tenllado, F., Diaz-Ruiz, J.R., Lopez, L., Sanz, A.I., Vaquero, C., Serra, M.T., Garcia-Luque, I., 1995. The Capsicum L3 gene-mediated resistance against the tobamoviruses is elicited by the coat protein. *Virology* 20, 498-505.
3. No. Ac. GeneBank: AJ308228.

## PRIMERA DETECCIÓN EN ESPAÑA DE UN ILARVIRUS EN TOMATE RELACIONADO CON PARIETARIA MOTTLE VIRUS (PMoV)

ARAMBURU, J. Y ARIÑO, J.

IRTA. *Departamento De protección Vegetal*. Crta. de Cabrils s/n. 08348 Cabrils. Barcelona.

Durante la primavera del año del año 2001 se observaron síntomas de aparente etiología viral en diversas plantaciones de tomate al aire libre situadas en la Comarca del Maresme (Barcelona). Estos síntomas se caracterizaban por la presencia de lesiones necróticas de color marrón claro en las hojas apicales, acompañadas de raquitismo y una ligera coloración amarilla en la parte basal de las hojas. Estos síntomas, en un estado mas avanzado, evolucionan hacia una necrosis del tallo que llega a causar la muerte del brote apical lo que con el tiempo desencadena una nueva brotación sin aparentes síntomas de infección. Los frutos de la planta se deforman por la aparición de protuberancias separadas entre sí por lesiones de sutura de color marrón oscuro.

Los ensayos biológicos de transmisión sobre una gama de huéspedes herbáceos indicaban que podría tratarse de una raza del virus del moteado de la parietaria (PMoV) que infecta tomate. Ensayos serológicos realizados mediante la técnica ELISA dieron como resultado una reacción positiva frente a un antisuero policlonal cedido por P. Roggero obtenido frente a esta raza denominada tomato ilarvirus 1 (TI1) y que esta relacionada serológicamente con PMoV. Ensayos idénticos realizados utilizando antisueros de tomato spotted wilt virus (TSWV), potato virus Y (PVY), cucumis mosaic virus (CMV), tomato mosaic virus (TMV), tomato bushy stunt virus (TBSV), tobacco etch virus (TEV), pelargonium zonate spot virus (PZSV) y tobacco streak virus, dieron resultados negativos.

El mecanismo de transmisión es desconocido aunque se sospecha que podría estar implicada, de una forma indirecta, alguna especie de trips que serviría como mero vehículo de transporte de polen desde una planta infectada a otra sana. El argumento de esta teoría se basa por una parte en que los virus pertenecientes al grupo ILAR generalmente son transmitidos a través del polen y por otra en que el PZSV, un virus con características similares a los ilarvirus, es transmitido a tomate por el *Melanothrips fuscus* desde un huésped espontáneo, *Diplotaxis erucoides*.

Actualmente se están realizando ensayos para determinar la incidencia de este virus, el grado de difusión de la enfermedad y el posible mecanismo de transmisión; no obstante, observaciones preliminares parecen demostrar que es mucho más eficiente la transmisión natural de esta raza del virus de la parietaria que el PZSV, ya que la incidencia y el grado de difusión son claramente superiores respecto a las obtenidas con el PZSV, cuya presencia suele ser más bien anecdótica.

## P-4

# ESTADO SANITARIO DE PLANTAS MADRE DE OLIVO EN ESPAÑA. MÉTODOS DE DETECCIÓN DE VIRUS Y BACTERIAS VALIDADOS PARA CERTIFICACIÓN DE MATERIAL VEGETAL

BERTOLINI, E., OLMOS, A., GORRIS, M.T., MARTÍNEZ, M.C., GARCÍA DE OTEYZA, J., PEÑALVER, R., LÓPEZ, M.M. Y CAMBRA, M.

Dpto. de Protección Vegetal y Biotecnología. Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA). Carretera Moncada-Náquera km 4.5, 46113 Moncada, Valencia.

El cultivo del olivo, tradicionalmente restringido a la zona del Mediterráneo, está teniendo un creciente interés en varias regiones del mundo, principalmente en América del Sur y en Australia. Esta situación ha contribuido a una gran demanda de material vegetal de calidad para un mercado en expansión aunque cada vez más exigente. Para la obtención de este material de calidad se han establecido programas de certificación en Italia, Portugal, Israel, Argentina y España. El programa de certificación adoptado en España, según dicta el Real Decreto 1678/1999 del 29 de octubre, establece que el material vegetal de olivo para propagación debe estar libre de *Verticillium dahliae*, *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*, *Cucumber mosaic virus*, *Cherry leaf roll virus*, *strawberry latent ringspot virus* y *Arabid mosaic virus*.

Los métodos serológicos (ELISA) empleados tradicionalmente en la detección de patógenos vegetales, presentan limitaciones con material vegetal de olivo (falsos positivos y problemas de sensibilidad). Por tanto, se han desarrollado y comparado, métodos moleculares para: i) detección individual de la bacteria causante de la tuberculosis del olivo (nested-PCR en un solo tubo cerrado); ii) detección simultánea de los 6 principales virus del olivo (multiplex RT-PCR) y iii) detección simultánea de los 4 virus y la bacteria recogidos en el programa de certificación español (multiplex nested RT-PCR). Para ello, se escogieron árboles de plantas madre de olivo de diferentes selecciones y variedades, procedentes de distintas regiones de España. El análisis reveló infección bacteriana en un 28.5%, tanto con nested-PCR como con multiplex nested RT-PCR, e infección viral en un 1.5% mediante multiplex-PCR, que fue de un 8% cuando se empleó multiplex nested RT-PCR. Para confirmar las muestras positivas obtenidas con los métodos de amplificación, se realizaron extracciones de dsRNA e inoculaciones en huéspedes herbáceos para los virus y aislamiento para la bacteria. El estado sanitario general de las plantas madre de olivo en España parece aceptable y mejor que el de otros países mediterráneos.

La técnica multiplex nested RT-PCR ha sido recomendada por el Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación para la certificación de material vegetal de olivo en España. El sistema empleado para la detección de estos patógenos, permite la detección simultánea de los 4 virus y de la bacteria en una única reacción y su posterior revelado colorimétrico en membranas de forma sencilla y muy sensible.



## DIAGNÓSTICO RÁPIDO DEL VIRUS DE LAS VENAS AMARILLAS DEL PEPINO (CVYV) MEDIANTE HIBRIDACIÓN CON IMPRONTAS DE TEJIDO INFECTADO

RUBIO, L. <sup>1</sup>, JANSSEN, D. <sup>2</sup>, CUADRADO, I.M. <sup>2</sup>, VELASCO, L. <sup>2</sup>, RUIZ, L. <sup>2</sup>, SEGUNDO, E. <sup>2</sup>, MARTÍN, G. <sup>2</sup>, GUERRI, J. <sup>1</sup> Y MORENO, P. <sup>1</sup>

<sup>1</sup>Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA), Ctra. Moncada-Náquera Km. 4.5, 46113-Moncada, Valencia

<sup>2</sup>Centro de Investigación y Formación Agraria, Unidad Virología, 04700 El Ejido, Almería.

El virus de las venas amarillas del pepino (CVYV= *Cucumber vein yellowing virus*, género *Ipomovirus*, familia *Potyviridae*) provoca graves daños en cucurbitáceas y se transmite semipersistentemente por la mosca blanca *Bemisia tabaci*. Los viriones de CVYV son partículas virales filamentosas y su genoma está formado por una molécula de RNA monocatenario. CVYV está extendido en Oriente Próximo y recientemente se ha detectado mediante RT-PCR en Almería. Sin embargo, para estudiar la incidencia y epidemiología de este virus y poder evaluar distintas estrategias de control del mismo, es preciso disponer de un método rápido de diagnóstico que permita procesar simultáneamente muchas muestras.

En este trabajo se puso a punto la detección de CVYV mediante hibridación de improntas de tejido vegetal infectado con sondas no radiactivas. Para ello se imprimieron en membranas de nitrocelulosa cortes transversales de distintos órganos (hojas, tallos, frutos y zarcillos) de varios huéspedes (pepino, calabacín, sandía y melón). Se ensayaron varias condiciones de hibridación y lavado, variando la temperatura y la composición de los tampones. Las condiciones que permitieron un mejor diagnóstico de CVYV fueron: incubación a 60-65°C en tampón de hibridación sin formamida y lavado en condiciones astringentes (dos lavados de 15 min a 65°C con 0.1xSSC+0.1%SDS). En estas condiciones el virus se detectó en hojas, tallo, frutos y zarcillos de los cuatro huéspedes ensayados, pero su distribución dentro de la planta era errática, por lo que se requiere preparar al menos cuatro improntas por planta para un diagnóstico fiable.

## NEPOVIRUS EN FRAMBUESO Y VID EN LA PROVINCIA DE LUGO

CABALEIRO, C., PIÑEIRO, A., ROSENDE, O. Y CARCELÉN, E.

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

Muchos de los nepovirus que atacan a pequeños frutos (especies de *Rubus* y *Ribes*) son también patógenos de importancia en viñedo (ArMV, RRV, ToRSV), especialmente en Centroeuropa. Solís citó en 1996 la presencia de RRV, ArMV y ToRSV en frambueso en Huelva, donde desde los años 90 ha habido una notable expansión del cultivo. En España el único nepovirus citado en vid es el Grapevine Fanleaf Virus (GFLV).

Desde 1999 hemos hecho una serie de prospecciones para determinar la presencia de nepovirus en parcelas de pequeños frutos de 4 años de edad situadas a lo largo del Camino de Santiago en la Provincia de Lugo y también en viñedos de la Ribeira Sacra lucense en los que en los últimos años ha entrado material vegetal de viveros extranjeros en los que ya habíamos detectado presencia de virus asociados al enrollado de la vid (concretamente, GLRaV-3) menos comunes hasta entonces en la zona que otros tipos (GLRVaV-1). En frambueso nunca observamos síntomas claros de virosis en campo y en los muestreos realizados en distintas fechas se obtuvieron resultados muy dispares. Los muestreos de primavera de 2001 fueron los mas repetibles e indican que ArMV y ToRSV están presentes en las plantaciones de frambueso y se detectó en casos aislados RRV y SLRV. ArMV y ToRSV se han detectado en cepas jóvenes de vid en la Ribeira Sacra de distintas procedencias. La presencia en pequeños frutos de nepovirus que se transmiten también por semilla, podría dar lugar a que los virus lleguen con facilidad a los viñedos de zonas próximas y se extiendan si están presentes nematodos vectores.

## DETERMINACIÓN DEL ESTADO SANITARIO DEL CULTIVO DEL BONIATO (*Ipomea batata* L.) Y OBTENCIÓN DE PLANTAS MADRE LIBRES DE VIRUS

GORRIS, M.T., JUÁREZ, J., MARTÍNEZ, M.C., BALLESTER-OLMOS, J.F., ALEZA, P., SERRA, J., BERTOLINI, E., PÉREZ, F., MARZAL, J.I., DE MIGUEL, A., NAVARRO, L. Y CAMBRA, M.

*Dpto. de Protección Vegetal y Biotecnología. Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA). Carretera Moncada-Náquera km 4.5, 46113 Moncada, Valencia.*

El boniato, camote, batata o patata dulce posee importancia económica en España por su utilización en pastelería artesanal. No obstante, la rentabilidad del cultivo ha disminuido drásticamente en los últimos años debido a la imposibilidad de obtener rendimientos normales. Esta situación es debida a la “degeneración” por virus de los diversos clones tradicionalmente cultivados.

Para paliar este problema, se inició en el IVIA, un programa de saneamiento con el objetivo de obtener plantas madre libres de virus y entregarlas al sector. Para ello, se seleccionaron 8 cultivares por su interés en la Comunidad Valenciana y se determinó su estado sanitario mediante “dot-blot” e inmunoimpresión-ELISA utilizando antisueros del Centro Internacional de la Papa (CIP-Perú) frente a 4 potyvirus: Sweet potato feathery mottle virus (SPFMV), Sweet potato latent virus (SPLV), Sweet potato mild speckling virus (SPMSV) y Sweet potato mild mottle virus (SPMMV); a 1 cucumovirus: Cucumber mosaic virus (CMV); a 1 crinivirus: Sweet potato chlorotic stunt virus (SPCSV); al Sweet potato chlorotic fleck virus (SPCFV) y al virus del clon 6 del CIP. Todos los cultivares seleccionados resultaron infectados por complejos virales de 2 a 8 virus distintos. Los virus más frecuentemente detectados fueron CMV y SPFMV. Los cultivares en los que se detectaron menos virus fueron Italiano blanco y Blanco aullat. Los infectados con más virus fueron Piel roja y pulpa blanca, Rojo de Alejandría y Blanco rastrero. El saneamiento se realizó mediante cultivo *in vitro* de ápices caulinares (de unos 0.2 mm) en un medio con 0.5 mg/l de bencil adenina y 0.1 mg/l de ácido indol butírico. El porcentaje de regeneración varió entre 23 y 95 % para los distintos genotipos. Las plantas regeneradas se injertaron en *I. setosa* (planta indicadora) y se analizaron por inmunoimpresión-ELISA. Se consideraron libres de los virus analizados aquellos clones que dieron reacción negativa en ambos métodos.

Se han obtenido plantas libres de los 8 virus analizados que están plantadas en bloques demostrativos para su evaluación agronómica antes de su distribución a los agricultores a través de un sistema de certificación. Paralelamente, los distintos clones saneados se mantienen en cultivo bajo túnel de malla anti trips. Las plantas madre conservadas, han sido además analizadas por PCR (tras purificación de RNA) para el diagnóstico de CMV y de los 4 potyvirus anteriormente citados, antes y después de ser injertadas en *I. setosa*.

## INCIDENCIA DEL VIRUS DEL MOSAICO COMÚN (BCMV) EN EL CULTIVO DE JUDÍA GRANO (*Phaseolus vulgaris* L.) EN LA PROVINCIA DE LEÓN

CAMPELO RODRÍGUEZ, M.P., LORENZANA DE LA VARGA, A., GÓMEZ-BERNARDO VILLAR, E. Y BUITRAGO COBO, D.

*Laboratorio de Diagnóstico de Plagas y Enfermedades Vegetales. Fundación Chicarro-Canseco-Banciella. Escuela Superior y Técnica de Ingeniería Agraria. Universidad de León. Avda. de Portugal, 41 – 24071. León.*

El cultivo de la judía grano se ve afectado por diversas virosis transmitidas por semilla y dispersadas en el cultivo a través de áfidos vectores. La incidencia del virus BCMV en cultivares tradicionales de la provincia de León ha sido estudiada por diversos autores, citándose pérdidas productivas debidas a esta enfermedad que pueden alcanzar hasta el 45%.

Se valora la incidencia del virus del mosaico común (Bean Common Mosaic Virus) mediante un muestreo de plantas de las variedades de cultivo tradicional, Riñón menudo, Canela y Pinta redonda, en parcelas de toda la provincia de León. La semilla sembrada en estos campos procede de plantas sometidas a una somera selección visual en la cual fueron eliminadas aquellas que se consideraron degeneradas por no corresponder con el estándar varietal, así como también las que mostraban síntomas de enfermedades de diverso origen. A falta de una selección sanitaria rigurosa se considera que ésta es la mejor semilla de la que se dispone en la actualidad.

Las muestras recogidas para el posterior análisis corresponden a plantas tomadas al azar en las parcelas de cultivo, anotando cuáles de ellas presentan síntomas de virosis y cuales son asintomáticas. La infección viral se evalúa mediante la técnica serológica ELISA - Indirecto.

El estudio realizado abarca un total de 90 ha, superficie de cultivo actual bajo control de la Promotora pro-Denominación de Origen de la Alubia de León.

## EXTENSIÓN DE LAS ÚLTIMAS PATOLOGÍAS DE ETIOLOGÍA VIRAL EN LOS CULTIVOS DE TOMATE ESPAÑOLES

CÓRDOBA, M.C.<sup>1</sup>, JORDÁ, C.<sup>1</sup>, FONT, I.<sup>1</sup> Y JUÁREZ, M.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Instituto Agroforestal del Mediterráneo. Patología Vegetal. Dpto. Ecosistemas Agroforestales. Universidad Politécnica de Valencia. Camino de Vera s/n 46022. Valencia.

<sup>2</sup> Producción Vegetal. Universidad Miguel Hernández. Orihuela (Alicante).

En estos últimos años se han detectado nuevas e importantes enfermedades de etiología viral que se han ido extendiendo ocasionando importantes pérdidas.

El virus de la hoja cuchara, Tomato yellow leaf curl virus (TYLCV), apareció en España en 1992 detectándose únicamente la especie Cerdeña. En 1997 se introduce la especie Israel y actualmente se detecta la presencia de la especie recombinante. Esta virosis se localiza en Barcelona, Castellón, Valencia, Alicante, Murcia, Almería, Granada, Málaga, Islas Baleares y Canarias.

El virus del Mosaico del Pepino dulce, Pepino mosaic virus (PepMV), se diagnostica en Murcia en 1999 y a partir de esta fecha se ha extendido con gran rapidez a otras zonas. En estos momentos se ha detectado esta virosis en distintas zonas de Alicante, Almería, Murcia, Islas Canarias y Valencia.

En la misma fecha y coincidiendo con la presencia del PepMV aparece un síndrome caracterizado por un marchitamiento que puede llegar a la muerte de la planta, es el denominado colapso o muerte súbita del tomate.

Recientemente y realizando estudios para el diagnóstico del virus del Tomato chlorosis virus (ToCV) se detecta la presencia de un nuevo crinivirus en Castellón, el Tomato infectious chlorosis virus (TICV).

El presente trabajo expone la localización y extensión de las distintas enfermedades reseñadas.

## USO DE LA INMUNOIMPRESIÓN DIRECTA ELISA PARA REALIZAR CONTROLES DE CALIDAD DE PATATA DE SIEMBRA

CHAO, J.A. ROSENDE, O. Y CABAILEIRO, C.

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

Los análisis para determinar la presencia de virosis en patata de siembra certificada se hacen en tubérculo forzado utilizando de forma rutinaria ELISA-DAS. La detección del PVY en tubérculo sigue siendo problemática y es el virus que está causando mas problemas en todas las zonas productoras de patata de siembra en las últimas décadas. La irregularidad en la distribución del virus en la planta y en los tubérculos de cada planta es notable y la concentración del virus en los brotes aumenta a medida que pasa el tiempo tras la cosecha. Cuando se quieren realizar controles de calidad de patata de siembra o de re-emplazo en almacenes u otro tipo de instalaciones con poca infraestructura, la inmunoimpresión directa (IIP-D) puede ser una alternativa al ELISA desde el punto de vista práctico y económico. Aunque se utilizó a principios de los 90 (Cambra y colaboradores, 1992) no se ha extendido su uso y sí han aparecido distintas alternativas de análisis con resultados casi inmediatos pero con un coste muy elevado por muestra.

Durante el verano de 2001 se realizó la puesta a punto de la técnica para PVY y PLRV utilizando distintos tampones, dosis de anticuerpos, marcas comerciales, membranas, tiempos de incubación y material vegetal. Los análisis se realizaron en planta y tubérculo brotado. Al igual que con ELISA-DAS la detección es buena en planta procedente de tubérculo infectado pero en plantas con infecciones secundarias los resultados son irregulares por ambos métodos. Durante Otoño-invierno-primavera se realizó el seguimiento de la cosecha de patata de 2000 comparando con el ELISA-DAS desde inicio de brotación de tubérculos hasta planta en maceta procedente de los mismos tubérculos.

Utilizando IIP-D-ELISA se analizaron lotes de patata para siembra certificada de distintas categorías, variedades, país de procedencia y empresas distribuidoras. La mayoría de los lotes analizados en primavera de 2001 resultaron estar dentro de los límites que marca la normativa pero ocasionalmente se detectaron lotes con niveles superiores a los autorizados.

La IIP-D-ELISA para detección de virus en patata es un método más rápido, económico y fácil de realizar que el ELISA-DAS; la correspondencia de resultados es muy buena para PLRV y también para PVY aunque con este virus hay problemas de irregularidad de resultados dependiendo de la muestra, similares a los del ELISA-DAS. El seguimiento de patatas a lo largo del invierno hasta brotación completa indica que en los tubérculos que se analizan poco después de cosecha después de ser sometidos a forzado hay una subestimación importante del nivel de virosis.

## PRESENCIA DE *Pepino dulce mosaic virus* EN ALMERÍA: VARIABILIDAD Y DIAGNÓSTICO MEDIANTE SONDAS RNA

MARTÍN-BRETONES, G., VELASCO, L., SEGUNDO, E., JANSSEN, D., RUIZ-GARCÍA, L., CANO, M., BELMONTE, A. Y CUADRADO, I.M.

*Centro de Investigación y Formación Agraria (CIFA). Apdo. de correos, 91. 04700 El Ejido (Almería)*

Tras la aparición en la campaña de 2001 del virus del mosaico del pepino dulce (PepMV) en la provincia de Almería surgió la necesidad de desarrollar y poner a punto técnicas de diagnóstico adecuadas para su rápida y fiable detección en las plantas de interés agronómico propias de la zona, tales como tomate y berenjena, debido a la alta tasa de propagación característica de este tipo de virus. En este sentido, el análisis mediante RT-PCR se reveló como el método de diagnóstico más sensible y eficaz. Para ello, se diseñó en base de secuencias víricas publicadas, los siguientes cebadores específicos PEP<sub>up</sub> 5'-AACTTACGAGAATTTGTGCTA-3' y PEP<sub>low</sub> 5'-ATGGCTCCGTCTTGTGAT-3', que amplificaron una secuencia de 500 pares de bases, correspondiente a una zona interna de la RNA polimerasa RNA dependiente (RdRp) vírica y situada en el flanco 5' del genoma viral. Mediante RT-PCR y secuenciación se obtuvieron secuencias de diversos aislados del PepMV obtenidos en distintos puntos del sureste español, mostrando un rango de identidades nucleotídicas y aminoacídicas cercanas al 100%.

No obstante, la realización de un estudio epidemiológico en una región amplia requiere el procesamiento simultáneo de un elevado número de muestras vegetales, y su análisis mediante RT-PCR resulta muy tedioso y caro. Debido a ello, para estos casos, técnicas serológicas (ELISA) o aquellas basadas en hibridación con sondas genéticas específicas sobre membranas de nylon, resultan más versátiles y adecuadas pero con una posible pérdida de sensibilidad.

Valorando el límite de detección mediante ELISA, se llegó a detectar el virus en diluciones de extractos de plantas infectadas hasta 1/2500 y 1/5000 para berenjena y tomate respectivamente. Por otra parte, la sensibilidad mediante el método de hibridación molecular utilizando sondas DNA fue menor que con sondas RNA, el cual permitió detectar el virus en extractos de tomate y berenjena diluidos hasta 1/10000. Asimismo, se realizaron estudios de detección en membranas mediante distintas técnicas de extracción, por improntas obtenidas de los distintos órganos de la planta y aplicando directamente sobre la membrana el jugo del fruto de tomate. De todos ellos, este último destacó por su gran practicabilidad y sensibilidad.

## DETECCIÓN DE UN NUEVO RECOMBINANTE NATURAL ENTRE ESPECIES DE GEMINIVIRUS DEL COMPLEJO DEL RIZADO AMARILLO DEL TOMATE

GARCÍA-ANDRÉS, S., MONCI, F., SÁNCHEZ-CAMPOS, S., Y MORIONES, E.

*Estación Experimental «La Mayora», CSIC. 29750 Algarrobo-Costa, Málaga*

El complejo del rizado amarillo del tomate (TYLCD) está causando cuantiosas pérdidas económicas en los cultivos de tomate del sur y sudeste peninsular español desde que en 1992 se identificara la cepa ES de *Tomato yellow leaf curl Sardinia virus* (TYLCSV-ES de ahora en adelante TYLCSV) como agente causal. Este virus perteneciente a la familia *Geminiviridae* se transmite a través de la mosca blanca *Bemisia tabaci* (Gennadius). En 1997 se detectó que otro geminivirus, la cepa Mld de *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV-Mld de ahora en adelante TYLCV), también estaba implicada en las epidemias de TYLCD en tomate. *Solanum nigrum* es un huésped natural del TYLCSV, y aparece como un reservorio en las epidemias españolas. Según estudios de nuestro laboratorio TYLCV es incapaz de infectar sistémicamente a *S. nigrum*. En prospecciones de plantas silvestres realizadas durante el año 2000, se detectaron plantas de *S. nigrum* que al ser analizadas por hibridación molecular hibridaban con sondas específicas tanto de TYLCV como de TYLCSV. Una de estas muestras se estudió en detalle obteniendo un clon del genoma del geminivirus que la infectaba. El análisis de la secuencia nucleotídica indica que el genoma de dicho virus es el resultado de una recombinación natural entre TYLCSV y la cepa de TYLCV distinta a la Mld. En la actualidad se está obteniendo un clon infectivo del mismo para estudiar las propiedades biológicas de este nuevo recombinante.



## DETECCIÓN SIMULTÁNEA DE LOS PRINCIPALES VIRUS QUE AFECTAN A LOS FRUTALES DE HUESO MEDIANTE HIBRIDACIÓN MOLECULAR NO RADIATIVA Y MULTIPLEX RT-PCR

APARICIO, F., HERRANZ, M.C. y PALLÁS, V.

*Instituto de Biología Molecular y Celular de plantas, Universidad Politécnica de Valencia-CSIC, Avenida de los naranjos s/n, 46022 Valencia, España.*

La producción de frutos de hueso en España juega un importante papel en el ámbito económico, pero existen diferentes enfermedades virales que pueden ocasionar importantes pérdidas en el sector. Los síntomas que presentan los frutales infectados son muy variados y van desde una ausencia total de éstos hasta bordeamientos y anillos cloróticos, anillos necróticos y mosaicos en las hojas, acortamiento y distorsión de flores, retraso en la maduración y deformación de frutos así como retrasos en el crecimiento.

A diferencia de las infecciones provocadas por otro tipo de patógenos como hongos o bacterias no existen métodos directos para el control de las enfermedades virales por lo que es importante su detección temprana para evitar su posterior propagación. Con este fin, los esfuerzos en los últimos años han ido encaminados al desarrollo de técnicas de diagnóstico lo suficientemente fiables y sensibles tales como la hibridación molecular y la RT-PCR.

La tendencia actual es la de intentar economizar en estos métodos de diagnóstico. Una aproximación reciente ha sido la hibridación molecular múltiple usando una mezcla de sondas para la detección simultánea de los tres Ilarvirus más importantes en cultivos frutales (ApMV, PDV y PNRSV) (Saade y col. 2000; *Phytopathology* 90: 1330-1336) y de cinco virus que afectan al clavel (Sánchez-Navarro y col., 1999; *J. Virol. Methods* 82: 167-175). Asimismo, se han desarrollado estrategias de RT-PCR múltiple consistentes en el uso de mezclas de cebadores que permiten la detección e identificación mediante una única reacción, como es el caso de los tres principales Ilarvirus que afectan a frutales de hueso (Saade y col. 2000; *Phytopathology* 90:1330-1336) o de los seis principales virus que afectan al olivo (Bertolini y col. 2001; *J. Virol. Methods* 96: 33-41).

En el presente trabajo y con el fin de contribuir al desarrollo de técnicas más económicas se ha extendido la detección múltiple mediante hibridación molecular y RT-PCR hasta los ocho virus más importantes que afectan a los frutales de hueso. Además, en el caso de la hibridación molecular simultánea se ha introducido una nueva variante: el uso de polisondas, que pueden economizar más si cabe este método de diagnóstico.

Trabajo financiado con el proyecto BIO 99-0854 (DIGICYT, MCyT).

## DESARROLLO DE MÉTODOS MOLECULARES DE DIAGNÓSTICO PARA EL VIRUS DE LA ROTURA DEL COLOR DE LA FLOR DEL PELARGONIUM Y EL VIRUS DEL ARABESCO DEL PELARGONIUM

IVARS, P.<sup>1</sup>, ALONSO, M.<sup>2</sup>, BORJA, M.<sup>2</sup> Y HERNÁNDEZ, C.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas (UPV-CSIC), Universidad Politécnica de Valencia, 46022 Valencia.

<sup>2</sup>Dpto. I+D. Fundación PROMIVA. Finca La Veguilla M-511, Km 10,100. 28660-Madrid.

El geranio (*Pelargonium* spp.) es susceptible a numerosos patógenos de tipo viral que repercuten de forma notable en la producción y en la calidad de esta planta ornamental. En los últimos años se ha observado un aumento progresivo de las infecciones virales del geranio destacando las causadas por los virus de la rotura del color de la flor del Pelargonium (*Pelargonium flower break virus*, PFBV) y del arabesco del Pelargonium (*Pelargonium line pattern virus*, PLPV), que llegan a alcanzar porcentajes de incidencia del 80-90% en algunas áreas de nuestro país. La habitual multiplicación del material por propagación vegetativa debe haber favorecido la dispersión de estos virus subrayando la necesidad de llevar a cabo un control fitosanitario adecuado. La disponibilidad de buenos métodos de diagnóstico resulta esencial para este propósito. Los sistemas de detección del PFBV y del PLPV en los viveros dedicados a la producción de esquejes de geranio, consisten en técnicas inmunológicas del tipo ELISA que están ampliamente implantadas y estandarizadas. Sin embargo, los resultados son a menudo erráticos debido, en gran parte, a la distribución irregular de los patógenos en la planta y a la presencia de sustancias inhibitoras o interferentes en los extractos vegetales. En este trabajo hemos puesto a punto métodos de detección alternativos para el PFBV y el PLPV basados en la hibridación molecular con sondas no radioactivas. Con el fin de optimizar los resultados, se ha estudiado la distribución del PFBV y del PLPV en las distintas partes de la planta para tratar de averiguar cuales son más apropiadas para un ensayo de diagnóstico por su mayor contenido viral. Asimismo, se ha llevado a cabo la detección simultánea de ambos virus combinando sondas derivadas de cada uno de ellos, no observándose reducción en los límites de sensibilidad respecto a los ensayos de detección individual ni problemas de hibridación cruzada. La eficacia y viabilidad de los métodos desarrollados serán comparadas con las del ELISA.

## ANTÍGENOS CLONADOS: CONTROLES POSITIVOS NORMALIZADOS Y SIN RIESGO FITOSANITARIO PARA ELISA

LEGORBURU, F.J.<sup>1</sup>, FONT, I.<sup>2</sup>, JORDA, M.C.<sup>2</sup>, KELLER, H.<sup>3</sup>, SCHOTS, A.<sup>3</sup>, HARPER, K.<sup>4</sup>, LINEY, M.<sup>4</sup> Y MAYO, M.A.<sup>4</sup>

<sup>1</sup>NEIKER-Instituto Vasco de Investigación y Desarrollo Agrario. Granja Modelo de Arkaute, Apartado 46, 01080 VITORIA/GASTEIZ

<sup>2</sup>E.T.S.I. Agrónomos, Universidad Politécnica de Valencia. Camino de Vera 14, 46022 VALENCIA

<sup>3</sup>Laboratory of Monoclonal Antibodies, Wageningen Agricultural University, Binnehaven 10, WAGENINGEN 6700 ES, Países Bajos.

<sup>4</sup>Scottish Crop Research Institute, DUNDEE DD2 5DA, Escocia.

La prueba ELISA tiene la mejor relación coste/beneficio en el análisis sanitario a gran escala de virus vegetales. Al estar basada en reactivos biológicos, es difícil de normalizar. Los controles positivos se fabrican normalmente a partir de material vegetal fresco o liofilizado, con lo que su título varía de un lote a otro. Además implican riesgos fitosanitarios, especialmente cuando se trata de patógenos de cuarentena. Los antígenos clonados en bacterias solucionarían ambos problemas.

Se utilizaron como modelos virus de diferentes familias e importancia económica: el enrollado de la patata (PLRV), el y de la patata (PVY) y la hoja en cuchara del tomate (TYLCV). Se seleccionaron péptidos reactivos a los anticuerpos monoclonales de partida a partir de una genoteca aleatoria en fagos. En el caso de PLRV y TYLCV los fagos se usaron directamente como antígenos. En el de PVY, tres epitopos lineales diferentes fueron combinados en un único constructo con la proteína tiorredoxina. Estos antígenos fueron ensayados en condiciones de usuario final, en laboratorios independientes de los de clonaje.

Al ser monovalentes, los antígenos de PLRV y TYLCV funcionaron como controles positivos para el conjugado, una vez fijados directamente a la microplaca, pero no cuando fueron atrapados por un tapizado de inmunoglobulina. El antígeno clonado de PVY funcionó como control positivo para sus AMs homólogos, tapizado y conjugado simultáneamente, en el formato ELISA-DAS habitual. Todos estos antígenos clonados tuvieron un comportamiento "monoclonal", en el sentido de que reaccionaron únicamente frente a sus anticuerpos homólogos, pero no frente a policlonales.

Financiado por el proyecto SMT4 CT98 2246 de la Comisión Europea.

## PRESENCIA DEL POTYVIRUS *Turnip mosaic virus* EN GUISANTE EN ESPAÑA

SEGUNDO, E., MARTÍN-BRETONES, G., JANSSEN, D., VELASCO, L., RUIZ, L., CANO, M, BELMONTE, A., AGUILERA, A. Y CUADRADO, I.M.

Centro de Investigación y Formación Agraria (CIFA «La Mojonera»). Apdo. de correos 91. E-04700 El Ejido (Almería)

El cultivo del guisante es tradicional en Berja y Dalías (Almería). En la campaña de otoño del 2000, alertados por los técnicos agrícolas de la zona, se visitaron en Berja dos parcelas al aire libre con guisantes afectados por una nueva enfermedad donde se observaron los síntomas de forma agregada; también se detectaron pulgones. Las plantas presentaban venas amarillas, moteado clorótico y deformación de hojas, aborto de flores, deformación y moteado necrótico en vainas, enanismo de la planta en algunos casos llegando a marchitamiento. En campaña de otoño de 2001 se detectó, en la misma zona, con un aumento de la enfermedad a tres parcelas al aire libre.

Ensayos de inoculación mecánica confirmaron la presencia de virus. Análisis moleculares por RT-PCR, clonación y secuenciación de un amplificado de 695 nucleótidos (1) mostraron una identidad nucleotídica del 80% (95% aminoacídica) con la poliproteína de diversos aislados de *Turnip mosaic potyvirus* (TuMV), valores de diversidad de población previamente descritos para esta especie (2,3).

Esta es la primera descripción en España de este virus que aunque se estima que está ampliamente distribuido por el mundo se han encontrado pocas descripciones en guisante. Es adecuado realizar estudios y tomar medidas encaminadas a evitar la propagación de este virus aparentemente de reciente introducción.

1. No. Ac. GeneBank: AJ489259.

2. Tomlinson, J.A. (1970). *CMI/AAB Descr. Pl. Viruses* No. 8, 4 pp.

3. Lehmann, P., Petrzik, K., Jenner, C., Greenland, A., Spak, J., Kozubek, E., Walsh, JA. 1997. Nucleotide and amino acid variation in the coat protein coding region of turnip mosaic virus isolates and possible involvement in the interaction with the brassica resistance gene TuRBO1. *Physiol Mol Plant Pathol* 51, 195-208.

## ETIOLOGÍA DE LAS VIROSIS EN CULTIVOS AL AIRE LIBRE DE PIMIENTO DURANTE 2001

LUIS ARTEAGA, M.<sup>1</sup>, CAMBRA, M.A. <sup>2</sup> ARNEADO, M.S. <sup>1</sup>, MALLOR, C. <sup>1</sup>, SAGRARIO, J. <sup>1</sup> Y GIL ORTEGA, R. <sup>1</sup>

<sup>1</sup> Servicio de Investigación Agroalimentaria, Apartado 727, 50080-Zaragoza

<sup>2</sup> Centro de Protección Vegetal, Apartado 727, 50080-Zaragoza

Durante el año 2001 se realizaron prospecciones en cultivos comerciales al aire libre de pimiento, con el fin de conocer y actualizar la etiología de las virosis existentes. Se tomaron muestras de plantas con sintomatología característica y/o sospechosa de virosis y se realizaron análisis serológicos, por ELISA-DAS, y transmisiones a especies indicadoras, por inoculación mecánica. Se utilizaron antisueros comerciales de los siguientes virus: mosaico del pepino (CMV) (Agdia y Loewe), mosaico de la alfalfa (AMV) (Loewe), marchitamiento del haba-1 (BBWV-1) (Loewe), virus Y de la patata (PVY) (INGENASA) y manchas bronceadas del tomate (TSWV) (Loewe) y las especies indicadoras siguientes: *Gomphrena globosa*, *Cataranthus roseus*, *Lactuca sativa*, *Cucurbita pepo*, *Cucumis sativus*, *Chenopodium amaranticolor*, *C. quinoa*, *Ocimum basilicum*, *Vigna unguiculata*, *Capsicum annuum*, *Datura stramonium*, *Nicotiana benthamiana*, *N. clevelandii*, *N. glutinosa*, *N. megalosiphon*, *N. sylvestris*, *N. tabacum* 'Paraguay', 'Samsun' y 'Xanthi nc', *Petunia hybrida*, *Physalis floridana* y *Solanum melongena*.

Se analizaron un total de 61 muestras procedentes del Valle del Ebro: Andosilla, Lerín y Mendavia, en Navarra (14 muestras), y Biota, Ejea, Mallén y Montañana, en Zaragoza (14 muestras); de la provincia de León: Ponferrada (8 muestras) y Fresno de la Vega (22 muestras), y de Benicarló (Castellón) (3 muestras). La mayoría de las muestras fueron recogidas durante el mes de septiembre, excepto en Fresno de la Vega (León) donde se recogieron también en julio. Los virus encontrados, y su frecuencia, fueron los siguientes: AMV (2 muestras), BBWV (2), CMV (29), PVY (4), CMV+AMV (2), CMV+BBWV-1 (7), CMV+PVY (8), BBWV+PVY (1) y rhabdovirus (2). En tres muestras, con sintomatología dudosa, no se encontró ninguno de los virus citados. La distribución geográfica de los virus fue la siguiente: AMV en Fresno de la Vega y Mendavia; BBWV-1 en Benicarló, Ponferrada, Andosilla, Ejea y Mallén; CMV en todas las zonas del interior, en infección simple o doble con cada uno de los otros cuatro virus; PVY en Fresno de la Vega, Ponferrada, Benicarló y Andosilla, y TSWV en Ponferrada. Mediante especies indicadoras se detectó un rhabdovirus, que ya había sido encontrado en 1995 y 1997 en Fresno de la Vega. El 64,5 % de las muestras analizadas presentó infección simple y el 30,64 % infección mixta por dos virus. Los aislados obtenidos están siendo caracterizados biológicamente. Aunque no se realizaron estimaciones del nivel de infección, se observó que la incidencia de virosis durante el año 2001 fue muy elevada, superior a la de años anteriores, probablemente a consecuencia de las temperaturas anormalmente suaves del invierno precedente.

## DIAGNÓSTICO DEL VIRUS DEL ESTRIADO AMARILLO DEL PUERRO (LYSV) Y DEL VIRUS DEL ENANISMO AMARILLO DE LA CEBOLLA (OYDV) POR DAS-ELISA-RT-NESTED-PCR

LUNELLO, P., CONCI, V.C., BURASCHI, D. Y DUCASSE, D.

*Instituto de Fitopatología y Fisiología Vegetal, Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (IFFIVE-INTA) Camino 60 cuadras km. 5 (5119) Córdoba. Argentina.*

Las aliáceas son afectadas por numerosos virus que causan grandes pérdidas en el rendimiento. Entre ellos los *Potyvirus* son los principales responsables. En la producción de plantas libres de virus resulta imprescindible un sistema de indexing de mayor sensibilidad que el double-antibody sandwich-enzyme-linked immunosorbent assay (DAS-ELISA). Las concentraciones virales en las plantas *in vitro*, provenientes de cultivo de meristemas, son muy bajas por lo que se requiere un sistema de mayor sensibilidad. En este trabajo se desarrolló un RT-NESTED-PCR partiendo de una placa de ELISA después de su revelado. El límite de detección del DAS-ELISA fue 3,4 ng de virus. Después de lavada esta placa y continuada como un RT-Nested-PCR se pudo detectar banda hasta la dilución equivalentes 0,17 ng. En paralelo se realizó una IC-RT-Nested-PCR desarrollado íntegramente en tubo de microcentrífuga que resultó notablemente más sensible. Se pudo detectar bandas hasta una concentración viral estimada de 1,4 pg. El DAS-ELISA-RT-NESTED-PCR estaría brindando la posibilidad de realizar un primer screening del material por DAS-ELISA eliminando de esta manera un alto porcentaje de plantas positivas y posteriormente detectar las plantas con valores dudosos por la técnica descripta.

Por otro lado se diseñaron cebadores degenerados y se desarrolló un protocolo de IC-RT-PCR en un solo paso. Esto permitió la detección simultánea de LYSV y de OYDV en infecciones simples y en infecciones mixtas en *Allium sativum sativum* (ajo), *A. sativum* var. *ophioscorodom* (ajo castaño), *A. ampeloprasum* var. *porrum* (puerro), *A. ampeloprasum* var. *ampeloprasum* (gigantajo) y *A. cepa* (cebolla).

El desarrollo de estas tecnologías podría utilizarse en modelos de producción de ajo libre de virus, para evitar la salida de plantas positivas (enfermas) con escasa concentración viral que escapan a los límites de detección de los métodos usados tradicionalmente.

## DETECCIÓN DE POTYVIRUS EN CULTIVOS DE AJO (*Allium sativum* L.) EN ESPAÑA

LUNELLO, P., MANSILLA, C., SÁNCHEZ, F., CONCI, V., FRESNO, J. Y PONZ, F.

Dpto de Biotecnología. INIA. Carretera Coruña Km 7<sup>1/2</sup>. 28040 Madrid

El cultivo de ajo se encuentra infectado por diferentes especies de virus. Estos forman un complejo viral en el que es posible detectar variaciones en su composición y en la concentración relativa de sus integrantes. Este complejo viral causa una enfermedad conocida como mosaico del ajo. La exclusiva propagación agámica de esta especie (apomixis estricta) favorece la infección crónica de patógenos sistémicos, que de esta manera pasan de una generación a la siguiente.

Este complejo está integrado por especies virales pertenecientes a los siguientes géneros: *Potyvirus*, *Carlavirus* y *Allexivirus*, aunque también han sido mencionados, con menor frecuencia, otros virus pertenecientes a géneros distintos. Las virosis de ajo causan importantes pérdidas en el rendimiento, que alcanzan en algunos casos más del 50 % de disminución en la producción. En este trabajo se presenta la detección de miembros del género *Potyvirus* en muestras provenientes de Palencia y de Castilla La Mancha. Se analizaron aproximadamente 400 muestras de ajo y se detectó la presencia del virus del enanismo amarillo de la cebolla (OYDV) y del virus del estriado amarillo del puerro (LYSV) mediante DAS-ELISA con anticuerpos específicos y sondas Taq man. Por otro lado, resulta llamativo que muestras positivas con antisuero monoclonal Anti-*Potyvirus* de Adgia, sean negativas en los análisis realizados con sueros específicos para LYSV y OYDV.

La identificación de cada especie viral que causa la enfermedad del mosaico del ajo permite elaborar estrategias de manejo del cultivo que contribuyen al éxito de programas de aumento de productividad, a través de la utilización de ajo "semilla" libre de virus.

P-20

## EL VIRUS DEL JASPEADO DE LA VID (GFKV) EN LOS VIÑEDOS ESPAÑOLES

CONDE, M., MANSILLA, C., TORRES, V., PONZ, F. Y FRESNO, J.

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

El virus del jaspeado de la vid (Grapevine fleck virus, GFKV), aislado por primera vez en 1991, es un virus ARN isométrico de 30 nm que no está clasificado dentro de ningún grupo de los clásicos de la taxonomía de los virus de plantas. Descrito como limitado a floema, no se transmite mecánicamente ni por semilla, ni es conocido su vector; su distribución se produce fundamentalmente por material vegetal de propagación contaminado.

La infección es latente en la mayoría de las variedades de vid (*Vitis vinifera*) y de los portainjertos utilizados, resultando generalmente asintomática, aunque 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.

La certificación y el control del material vegetal se realizan mediante análisis serológico por ELISA e injerto sobre el indicador *Vitis rupestris* de Lot cv. St. George. Con el fin de mejorar la sensibilidad de las técnicas de detección utilizadas y evitar la obtención de falsos negativos, en nuestro laboratorio hemos desarrollado técnicas moleculares (IC-RT-PCR).

Se presentarán y discutirán resultados sobre el fuerte nivel de incidencia encontrado para este virus en viñedos españoles de distintas regiones de la península y sobre la variabilidad de este virus.



## LA PSORIASIS DE LOS CÍTRICOS ESTÁ ASOCIADA A LA PRESENCIA DE *Citrus psorosis virus* (CPsV)

MARTÍN, S.<sup>1</sup>, MILNE, R.G.<sup>2</sup>, ALIOTO, D.<sup>3</sup>, MORENO, P.<sup>1</sup> Y GUERRI, J.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA), Ctra. Moncada-Náquera Km. 4.5, 46113-Moncada, Valencia

<sup>2</sup>Istituto di Fitovirolologia Applicata CNR, Strada delle Cacce 73, I-10135 Torino, Italia; <sup>3</sup>Istituto di Patologia Vegetale, Università di Napoli, 8005 Portici (Na), Italia

La psoriasis es la primera enfermedad de los cítricos a la que se le atribuyó una etiología viral, pero su etiología no ha sido aún demostrada. Su principal vía de dispersión en España es la propagación de yemas infectadas, lo que hace necesario el control sanitario de las mismas. Se han descrito dos síndromes: La psoriasis A cuyo síntoma más característico es la descamación del tronco y ramas principales de árboles de campo de más de diez años, y la psoriasis B, una forma más agresiva en la que la descamación se extiende hasta las ramas secundarias y las hojas viejas muestran pústulas y manchas cloróticas. En las hojas jóvenes de árboles afectados se observan a veces flecos, manchas y anillos cloróticos, pero estos síntomas son indistinguibles de los inducidos por otras enfermedades. El método más fiable para el diagnóstico de la enfermedad es el ensayo protección cruzada frente a psoriasis B. En este ensayo, las plantas infectadas con psoriasis A que se sobre-inoculan con psoriasis B, no muestran los síntomas característicos de esta última. Este procedimiento es lento y caro, por lo que es necesario desarrollar métodos de diagnóstico más rápidos y fiables.

En árboles infectados de varios países se ha detectado la presencia de *Citrus psorosis virus* (CPsV), miembro tipo del género *Ophiovirus*. CPsV tiene tres RNAs de cadena simple y polaridad negativa, encapsidados separadamente por una proteína de 46-48 KDa, formando filamentos muy rizados de dos tamaños distintos.

En este trabajo se comparó la detección de CPsV mediante ELISA, RT-PCR, hibridación molecular y microscopía electrónica y la presencia o ausencia de la enfermedad mediante la observación de síntomas y el ensayo de protección cruzada, en aislados de colección y de campo. La coincidencia total entre los resultados del ensayo de protección cruzada y los de detección de CPsV por los cuatro métodos, con independencia de los síntomas observados en campo, muestra que la psoriasis puede diagnosticarse de forma fiable mediante la detección de CPsV. En algunos árboles de campo con descamación o síntomas foliares no se detectó CPsV, y plantas inoculadas a partir de ellos no mostraron protección frente a psoriasis B, lo que indica que el diagnóstico de psoriasis basado en la observación de síntomas puede ser erróneo.

## PRESENCIA DEL SOBEMOVIRUS *Southern bean mosaic virus* EN ESPAÑA

SEGUNDO, E. <sup>1</sup>, VELASCO, L. <sup>1</sup>, JANSSEN, D. <sup>1</sup>, RUIZ GARCÍA, L. <sup>1</sup>, MARTÍN-BRETONES, G. <sup>1</sup>, CANO, M. <sup>1</sup>, BELMONTE, A. <sup>1</sup>, VERHOEVEN, JTHJ. <sup>2</sup>, ROENHORST, JW. <sup>2</sup>, LESEMANN, D-E. <sup>3</sup> Y CUADRADO, I.M.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Centro de Investigación y Formación Agraria (CIFA «La Mojonera»). Apdo. de correos 91. 04700 El Ejido (Almería), España;

<sup>2</sup>Plant Protection Service, PO Box 6706 HC Wageningen, the Netherlands;

<sup>3</sup>Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft (BBA), Institut für Pflanzenvirologie, Mikrobiologie und Biologische Sicherheit, Messeweg 11-12, D-38104 Braunschweig, Germany.

*Southern bean mosaic virus* es un virus RNA del género sobemovirus, que tiene como principal huésped natural a judía (*Phaseolus vulgaris*) y es transmitido por contacto, por suelo, por semilla y un escarabajo vector.

Desde 1998 aparecieron síntomas de enfermedad en judía cultivada en invernaderos del sudeste español conllevando una pérdida de la calidad para consumo en verde y produciendo importantes pérdidas económicas. Los síntomas eran diversos en las distintas variedades de judía cultivada aunque generalmente las vainas mostraban mosaico y deformación, las hojas presentaban un mosaico suave, ligera deformación y venas marcadas. En el invernadero los síntomas aparecían en plantas dispersas y se iban extendiendo hacia las plantas colindantes, especialmente durante la cosecha, y era común la aparición del síntoma en cultivo consecutivos en un mismo invernadero.

La evaluación del rango de huéspedes, morfología del virión y características serológicas y morfológicas indicaron que el virus aislado de plantas enfermas de judía era SBMV (antiguamente denominado SBMV-B). Las plantas de *P. vulgaris* cv. 'Pinto' inoculadas con los aislados de forma mecánica con carborundo, mostraron lesiones locales. *P. vulgaris* cv. 'Donna' reprodujeron los síntomas de las plantas enfermas, tanto al inocularlas mecánicamente como por contacto o cuando se cultivó esta variedad en suelo portador de raíces de planta enferma. El estudio de inmuno-microscopía electrónica de los extractos crudos de las hojas de judía infectada revelaron la presencia de partículas isométricas de 25-30 nm de diámetro que fueron atrapadas efectivamente contra el antisuero contra SBMV. La purificación de dsRNA de las plantas enfermas y su examen en electroforesis en gel de agarosa produjo una banda de 4.1 kbp que se correlaciona con el tamaño teórico de SBMV. Se diseñaron cebadores específicos de un fragmento del ORF2 de SBMV produjeron amplificadores por RT-PCR del tamaño esperado. Tras la secuenciación de dicho amplificado y la comparación de las secuencias con otros sobemovirus dio una identidad del 93-95% con SBMV que claramente se diferenciaba de *Southern cowpea mosaic virus* (SCPMV), antiguamente denominada cepa C de SBMV, con una identidad del 66%. La identificación de SBMV in judía supone la primera descripción de este virus en España.

## AVANCES EN EL ESTUDIO DEL COMPORTAMIENTO DEL *Pepino Mosaic Virus* (PepMV)

CÓRDOBA, M.C.<sup>1</sup>, MARTÍNEZ-PRIEGO, LL. <sup>1</sup>, JORDÁ, C.<sup>1</sup>, Y LACASA, A.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>*Instituto Agroforestal del Mediterráneo. Patología Vegetal. Dpto. Ecosistemas Agroforestales. Universidad Politécnica de Valencia. Camino de Vera s/n 46022. Valencia.*

<sup>2</sup>*Centro de Investigación y Desarrollo Agroalimentario (CIDA), 30150 La Alberca, Murcia.*

El virus del Mosaico del Pepino dulce, Pepino mosaic virus (PepMV), desde su entrada en 1999 ha ocasionado importantes pérdidas en el cultivo del tomate (*Lycopersicon esculentum* L.).

La sintomatología de la enfermedad es extraordinariamente variable, desde un característico mosaico amarillo casi dorado, no demasiado frecuente, siguiendo en mosaicos en tonos verdes más o menos intensos; mosaico con abullonado, mosaico amarillo claro, distorsión de hojas hasta filiformismo y apuntamiento de folíolos. Los frutos maduros aparecen manchados en distintos tonos de rojo o tienen una maduración irregular. En tallos, pecíolos de hojas y pedúnculos de los frutos aparecen estrías longitudinales de color verde claro. La intensidad de los síntomas varía en función de las condiciones climáticas, principalmente luz y temperatura, estando afectadas prácticamente la totalidad de las variedades de tomate.

Asociado a la presencia del PepMV y bajo determinadas condiciones ambientales, aparece un síndrome caracterizado por un marchitamiento recuperable o no, que puede terminar con la muerte de la planta, es el denominado colapso o muerte súbita del tomate.

La transmisión de esta virosis se lleva a cabo mecánicamente, por semilla y por insectos polinizadores.

Este abanico de síntomas y comportamientos planteó la hipótesis de una posible variabilidad de los aislados implicados.

El presente trabajo recoge los estudios llevados a cabo para el conocimiento del comportamiento de la entidad viral y de su posible variabilidad.

## DISEÑO DE UN MÉTODO DE DIAGNÓSTICO PARA POTYVIRUS

MARTINEZ-PRIEGO, LL. Y JORDÁ, C.

*Instituto Agroforestal del Mediterráneo. Dpto. de Ecosistemas Agroforestales-Unidad de Virología, Universidad Politécnica de Valencia, Camino de Vera s/n, 46022 Valencia, España.*

El género de los Potyvirus presenta un amplio espectro de distribución tanto geográfica como relativa a la disparidad y diferencia existente entre las plantas afectadas, siendo especialmente importantes como virosis de cultivos hortícolas de gran importancia económica en España.

El gran número de cultivos afectados por Potyvirus en la actualidad ha puesto de manifiesto la necesidad de poner a punto métodos de diagnóstico más rápidos y de mayor sensibilidad que los utilizados hasta el momento.

Para ello se compararon, gracias al programa DNAMAN, las secuencias de DNA de Potyvirus de interés como el *Lettuce mosaic virus* (LMV), *Leek yellow stripe virus* (LYSV), *Moroccan watermelon mosaic virus* (MWMV), *Onion yellow dwarf virus* (OYDV), *Papaya ring-spot virus* (PRSV), *Turnip mosaic virus* (TuMV), *Watermelon mosaic virus* (WMV), *Zucchini yellow fleck virus* (ZYFV), *Zucchini yellow mosaic virus* (ZYMV), *Potato virus Y* (PVY), y *Celery mosaic virus* (CeMV). A partir de la secuencia consenso se diseñaron una pareja de primers degenerados y se puso a punto un protocolo de RT-PCR para la detección de Potyvirus.

Las pruebas realizadas confirmaron que a partir de la pareja de primers diseñados se obtenía el amplificado esperado de 330pb. Además los oligos se revelaron capaces de reconocer todos los Potyvirus de partida.

Esta técnica de detección de Potyvirus por PCR es una herramienta rápida, eficaz y fiable de diagnóstico pudiendo ser utilizada de forma rutinaria y estandarizada, además de abrir camino a futuras investigaciones relacionadas con este género de virus vegetales.

## DESARROLLO DE MÉTODOS MOLECULARES PARA LA DETECCIÓN DE DOS VIRUS ASOCIADOS CON LA ENFERMEDAD DE LAS VENAS GRANDES DE LA LECHUGA Y SU APLICACIÓN A LA IDENTIFICACIÓN DE RESERVORIOS NATURALES

NAVARRO, J.A.<sup>1</sup>, BOTELLA, F.<sup>2</sup>, SASTRE, P.<sup>3</sup>, MARHUENDA, A.<sup>3</sup>, SÁNCHEZ-PINA, A.<sup>4</sup>, Y PALLÁS, V.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas. UPV-CSIC. Av. dels Tarongers, s/n. 46022. Valencia. <sup>2</sup> UMH, Elx (Alicante). <sup>3</sup> CEBAS-CSIC, Murcia. <sup>4</sup>PRIMAFLOR, Pulpi (Almería).

La enfermedad de las venas grandes de la lechuga constituye uno de los principales problemas económicos en la mayoría de las áreas donde se produce este cultivo. La aparición de los síntomas característicos de la infección, aclaramiento de las zonas adyacentes al tejido vascular y malformación de las hojas, reduce la producción e impide la posterior comercialización de las plantas afectadas. En la actualidad, la etiología de la enfermedad no ha sido determinada con exactitud debido a la presencia, en plantas sintomáticas, de dos tipos diferentes de partículas víricas: el virus de las venas grandes de la lechuga (LBVV, género varicosavirus) (Sasaya *et al.* 2000; *J. Gen. Virol.* 82, 1509-1515) y el virus "Mirafiori" de la lechuga (MiLV, género ofiovirus) (Roggero *et al.* 2000; *Arch. Virol.* 145: 2629-2642 y Campbell *et al.* 2002; *Phytopathology* 92, 288-293). Ambos virus son transmitidos por el hongo quitridiomycete *Ospidium brassicae*, un parásito obligado de las raíces.

El retraso en la caracterización del agente causal de la enfermedad ha imposibilitado durante muchos años su diagnóstico y control. Por ahora, las únicas estrategias de control de la enfermedad se centran en limitar la dispersión del vector y en la prevención eliminando los posibles reservorios naturales que puedan actuar como fuentes de inóculo. Para favorecer el desarrollo de estos métodos de control, hemos desarrollado dos técnicas de diagnóstico molecular rápidas, sensibles y económicas alternativas a la detección serológica de los dos virus, la única opción disponible hasta el momento. La primera se basa en la hibridación molecular con ribosondas específicas no radiactivas, mientras que la segunda consiste en la detección simultánea de los dos virus mediante RT-PCR múltiple, lo que permite disminuir el número de análisis. En este último caso, el uso de un RNA interno como control, permite minimizar el riesgo de obtención de falsos negativos. El diagnóstico con ambos métodos de diversas muestras crecidas en condiciones de campo y procedentes de diferentes regiones españolas es coincidente en prácticamente el 100% de las plantas analizadas. Además, hemos utilizado estas técnicas de detección para realizar un diagnóstico precoz de la enfermedad en un cultivo comercial y como medida preventiva, para la identificación de malas hierbas que puedan ser reservorios naturales de la enfermedad.

Trabajo financiado con el proyecto "Discover" de la UE.

## PRESENCIA DE *Cucumber leaf spot virus* EN CULTIVOS DE PEPINO EN ESPAÑA

VELASCO, L., SEGUNDO, E., JANSSEN, D., RUIZ-GARCÍA, L., MARTIN-BRETONES, G. Y CUADRADO, I.M.

*Centro de Investigación y Formación Agraria (CIFA). Apdo. de correos, 91. 04700 El Ejido (Almería)*

*Cucumber leaf spot virus* (CLSV), virus recientemente clasificado como perteneciente al género *Aureusvirus* (familia *Tombusviridae*), está formado por partículas isométricas con ssRNA como ácido nucleico de aproximadamente 4,4 Kb. Este virus es transmitido por el hongo *Ospidium bornovanus* y ha sido descrita su presencia en el Reino Unido, Grecia, Jordania y Arabia Saudí. Durante el otoño del año 2000 se observó la aparición de abundantes puntos cloróticos en hojas de plantas de pepino en cultivos protegidos de la provincia de Granada (1).

Empleando savia procedente de estas plantas para inocular mecánicamente plantas de pepino se reprodujeron los síntomas previamente observados. De acuerdo con las descripciones de la literatura esta sintomatología podía corresponder a CLSV. La secuencia descrita para CLSV (2) sirvió para diseñar cebadores específicos. La reversotranscripción del RNA, seguida de amplificación del cDNA y posterior secuenciación del producto obtenido permitió la comparación con las secuencias depositadas en las bases de datos. De acuerdo con estos resultados, la similitud de las secuencias nucleotídica y aminoacídica deducida de la anterior resultaron de un 94.5% y 99.1%, respectivamente, respecto a la secuencia previamente descrita para CLSV.

Se comprobó posteriormente mediante el cultivo de plantas de pepino en suelos suplementados con rizosfera de plantas afectadas que éstas resultaban a su vez infectadas y mostraban la sintomatología correspondiente, lo que no ocurría en plantas control que no se suplementaban con ese material. Además se realizaron los respectivos análisis con RT-PCR correspondiéndose con los resultados anteriores. El examen microscópico reveló la presencia del hongo *O. bornovanus* únicamente en las plantas infectadas.

(1) E. Segundo et al. *Plant Dis.* 85:1123, 2001.

(2) J. S. Miller et al. *Virus res.* 52 :51, 1997.

## PRIMEROS RESULTADOS DE UN PROGRAMA DE CERTIFICACIÓN SANITARIA DE FRUTALES DE HUESO EN LA COMUNIDAD VALENCIANA

ROMERO, C., MARTÍNEZ-CALVO, J. Y LLÁCER, G.

*Departamento de Citricultura y Otros Frutales. Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA). Ctra. Moncada-Náquera, Km 5,5. 46113 Moncada (Valencia)*

La constante renovación varietal en el sector frutícola español, donde la mayor parte de las variedades son extranjeras, y la preocupación por disponer de material vegetal con una adecuada calidad sanitaria impulsó a los viveristas de la Comunidad Valenciana a demandar la puesta en marcha de un programa de certificación.

El principal objetivo de este programa es establecer un procedimiento que permita obtener plantones con garantía varietal y sanitaria, con el fin de evitar la expansión de las enfermedades que afectan a los frutales en España y la introducción de otras muy graves todavía no presentes en nuestro país (*Sharka* Marcus, *Xanthomonas arboricola*, etc.). El sistema de certificación se basa en la secuencia general propuesta por el *European and Mediterranean Plant Protection Organization (EPPO) Panel on Certification of Fruit Crops* en 1992.

Para llevar a cabo este objetivo se establecerán en el IVIA los bloques de material inicial de reserva y de partida, a partir de los cuales los viveristas podrán producir, previa certificación del Servicio de Sanidad Vegetal de la Consellería de Agricultura, Pesca y Alimentación, plantas certificadas de frutales de hueso.

Hasta el momento, y desde el inicio de este programa en 2000, se han introducido 49 variedades para certificación (20 ciruelos, 20 melocotoneros, 8 albaricoqueros y 1 almendro) y 25 variedades de melocotonero para cuarentena. Se ha comprobado el estado sanitario de los árboles representativos de cada una de estas variedades (cabezas de clon) mediante los métodos de detección y diagnóstico recomendados por el *Working Group on Fruit Trees Viruses of the International Society for Horticultural Science (ISHS)*: bioensayos y ELISA-DAS para la detección de virus, hibridación molecular para la detección de viroides y Nested-PCR para la detección de fitoplasmas.

De los 74 árboles analizados hasta el momento, 6 presentaban PNRSV (*Prunus necrotic ring spot virus*), 6 ACLSV (*Apple chlorotic leaf spot virus*), 4 PDV (*Prune dwarf virus*), 11 PLMVd (*Peach latent mosaic viroid*) y 3 fitoplasmas. Por tanto, a falta de finalizar los bioensayos y los análisis de fitoplasmas del año 2002, más del 30% de los árboles analizados se han mostrado infectados por algún patógeno. Este resultado pone de manifiesto la necesidad de un programa de certificación sanitaria y más aún si tenemos en cuenta que dentro de este material infectado se encuentran tanto variedades autóctonas como variedades introducidas hace muchos años o recientemente.

## EL VIRUS DEL MARCHITAMIENTO DEL HABA (*Broad bean wilt virus-1*) EN CULTIVOS DE PIMIENTO EN ESPAÑA

RUBIO, L.<sup>1</sup>, LUIS-ARTEAGA, M.<sup>2</sup>, CAMBRA, M.A.<sup>3</sup>, MORENO, P.<sup>1</sup> Y GUERRI, J.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA)*, Ctra. Moncada-Náquera Km. 4.5, 46113 Moncada, Valencia

<sup>2</sup>*Unidad de Sanidad Vegetal, Servicio de Investigación Agroalimentaria*, Apdo. 727, 50080 Zaragoza

<sup>3</sup>*Centro de Protección Vegetal*, Apdo. 727, 50080 Zaragoza

El virus del marchitamiento del haba, (*Broad bean wilt virus*, BBWV, género *Fabavirus*, familia *Comoviridae*) afecta a una amplia gama de huéspedes, que incluye especies de interés agronómico como legumbres, alcachofa, lechuga, tomate, tabaco, pimiento, etc. Este virus, transmitido de manera no persistente por 20 especies de pulgones, tiene partículas virales isométricas y un genoma bipartito de RNA monocatenario. Actualmente, se han descrito dos especies de BBWV: BBWV-1 y BBWV-2. BBWV-2 se ha detectado en Australia, Argentina, Norteamérica y Extremo Oriente. BBWV-1 se ha encontrado en Australia, Norteamérica, Oriente Próximo y el norte de África. En Europa, se ha detectado BBWV, pero se desconoce la especie.

En este trabajo se presentan los resultados de diagnóstico y detección del BBWV en cultivos españoles de pimiento de distintas zonas, entre 1981 y 2001. El diagnóstico de BBWV se realizó mediante observación de síntomas en especies indicadoras por inoculación mecánica, en invernadero de ambiente controlado, con extractos obtenidos a partir de las muestras de campo y se confirmó por serología. BBWV-1 se encontró en cultivos de pimiento de las provincias de Murcia (1981, 82), Valencia (1992), Castellón (2001), Zaragoza (1981, 82, 89, 91, 93, 94, 97, 2001), Huesca (1996, 1998), Logroño (1981, 82, 91), Navarra (1995, 2001) y León (1992, 95, 2001). En muchos de los casos, BBWV-1 apareció en infección mixta con el virus del mosaico del pepino (CMV= *Cucumber mosaic virus*) o con el virus Y de la patata (PVY= *Potato virus Y*). A partir de un aislado de Castellón se secuenció un fragmento de unas 500 nt, correspondiente a los dos genes de la cápsida de BBWV. La secuencia nucleotídica de este fragmento mostró una identidad de un 80% con las homólogas de dos aislados de BBWV-1 de Estados Unidos (las únicas disponibles en las bases de datos). Cuando esta secuencia se tradujo a una secuencia aminoacídica se observó una identidad aproximada del 95% con los dos aislados estadounidenses de BBWV-1 y una identidad algo menor del 60% con aislados de BBWV-2.



## ESTUDIOS PRELIMINARES SOBRE EL AGENTE CAUSAL DEL MOSAICO DE LA HIGUERA

RAMON, J.<sup>1</sup>, BARBERÁ, S.<sup>1</sup>, LÓPEZ, M.<sup>2</sup>, JUÁREZ, M.<sup>3</sup>, LUIS-ARTEAGA, M.<sup>4</sup>, MEDINA, V.<sup>1</sup> Y ACHÓN, M.A.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Dpto. de Producción Vegetal y Ciencia Forestal ETSEA Rovira Roure, 191. 25198. Lleida

<sup>2</sup>SIADT. Apdo. 22, 06080 Badajoz

<sup>3</sup> Dpto. de Producción Vegetal ESP (UMH).03312 Orihuela; <sup>4</sup>SIA., Apdo., 727, 50080 Zaragoza

El cultivo de la higuera se localiza principalmente en la Cuenca Mediterránea y Oriente Medio, donde se obtiene más del 90% de la producción mundial. El mosaico de la higuera es la enfermedad más extendida de este cultivo, probablemente, está presente en todos los lugares donde se da este cultivo, se transmite por el ácaro *Aceria ficus* Cotte y por injerto, pero su etiología es incierta. Con el objetivo de avanzar en el conocimiento de esta enfermedad se están realizando diversos estudios para determinar su etiología. Los estudios realizados indican que el agente causal del mosaico de la higuera se transmite con dificultad mecánicamente a plantas herbáceas e induce la formación de unos agregados intracitoplasmáticos electrodensos con envoltura membranosa, los denominados "Double-membrane bodies" (DMB) en las células infectadas. También se ha observado la presencia de partículas filamentosas en preparaciones de purificaciones virales y en secciones ultrafinas de plantas herbáceas inoculadas mecánicamente.

## CARACTERIZACIÓN DE POTYVIRUS INFECTANDO MALVÁCEAS EN LA ZONA DEL DELTA DEL EBRO

LUNELLO, P., TOURIÑO, A., NUÑEZ, Y., PONZ, F. Y SÁNCHEZ, F.

INIA. Dpto. de Biotecnología. Autopista A-6, km 7. 28040 Madrid. España

En prospecciones realizadas en el Delta del Ebro se detectó la presencia de plantas de la familia *Malvaceae* con síntomas foliares compatibles con infección viral (mosaico, clareamiento de venas, punteado amarillo).

La presencia de potyvirus se confirmó por la reacción positiva en ELISA utilizando el anticuerpo monoclonal de Agdia para el grupo potyvirus.

Se amplificó, mediante IC-RT-PCR, utilizando los cebadores generales para la familia *Potyviridae* descritos por Chen y cols (1), un fragmento de aprox. 1,8 kb, correspondiente a la zona 3' del gen N1b, el gen CP completo y la región 3' UTR. La determinación de la secuencia de nucleótidos de dichos fragmentos permitió la caracterización molecular de los virus presentes en las muestras. Se presentará la posición taxonómica de los aislados caracterizados en el contexto del género potyvirus.

Las posibles incidencias de los virus presentes en estas malas hierbas en los cultivos de la zona se discutirán en base a la identificación molecular de dichos virus.

1.Chen, J., Chen, J. y Adams, M.J. 2001. A universal PCR primer to detect members of the *Potyviridae* and its use to examine the taxonomic status of several members of the family. Arch. Virol. 146: 757-766.

## DETECCIÓN E INCIDENCIA DE LOS VIROIDES DE LOS CÍTRICOS EN CAMPANIA

MALFITANO, M.<sup>1</sup>, ALIOTO, D.<sup>1</sup>, RAGOZZINO, A.<sup>1</sup> Y DURÁN-VILA, N.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>*Dipartimento di Arboricoltura, Botanica e di Patologia Vegetale, Università degli Studi di Napoli Federico II, Portici, Napoli.*

<sup>2</sup>*Departamento de Protección Vegetal y Biotecnología. Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias. Apartado Oficial. 46113 Moncada (Valencia).*

Se han descrito en cítricos cinco viroides, CEVd, CVd-I, CVd-II (variantes de HSVd identificadas en cítricos), CVd-III y CVd-IV. El CEVd y determinadas variantes de CVd-II son los agentes causantes de la exocortis y la cachexia, respectivamente, dos enfermedades de relevancia económica en especies sensibles. CVd-I, CVd-II y CVd-III pueden inducir enanismo en variedades comerciales cuando están injertadas sobre el patrón *Poncirus trifoliata*.

En este trabajo se ha investigado la presencia de estos viroides en Campania (Centro-Sur Italia), efectuando un muestreo sobre diferentes especies y variedades de cítricos de distinta edad y en áreas geográficas distintas. La detección de los viroides fue realizada mediante electroforesis secuencial en gel de 5% de poliacrilamida (sPAGE) e hibridación molecular con sondas de ADN, marcadas con digoxigenina y específicas para cada viroide. Se analizaron un total de 95 árboles y se comprobó que CEVd estaba presente en el 60% de los árboles, mientras que CVd-II, CVd-III y CVd-IV se detectaron en el 84.2%, 81.0% y 20.0 de los árboles, respectivamente. En ningún árbol se detectó la presencia de CVd-I. Independientemente de la edad, CEVd, CVd-II, CVd-III y CVd-IV se encontraban distribuidos en todas las área geográficas. Los porcentajes mas altos de infección con los cuatro viroides se encontraron en limonero. También se encontraron elevados porcentajes de infección con CVd-II y CVd-III en naranjo amargo y clementino, y en naranjo amargo y mandarina, respectivamente.

Los resultados disponibles hasta al momento, son preliminares y no permiten establecer ninguna asociación entre presencia de viroides y la sintomatología observada en campo.

## DESARROLLO DE UN SISTEMA DE DETECCIÓN DEL VIRUS DEL AMARILLO DE LAS VENAS DEL PEPINO (CVYV)

BERNAL MUÑOZ, J.J.<sup>2</sup>, MARCO, C.F.<sup>1</sup>, ARANDA, M.A.<sup>1</sup> Y RODRÍGUEZ FERNÁNDEZ-ALBA, J.R.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Estación Experimental "La Mayora", CSIC. 29750 Algarrobo-Costa, Málaga.

<sup>2</sup> Bionostra S.L. 28760 Tres Cantos, Madrid.

El *Virus del amarilleo de las venas del pepino* (CVYV) es un virus filamentoso causante de una enfermedad grave de pepino y otras cucurbitáceas cultivadas en la parte oriental de la cuenca mediterránea. Atendiendo a estudios citopatológicos, serológicos y moleculares se ha sugerido su inclusión dentro del género *Ipomovirus*, de la familia Potyviridae. En España, CVYV fue observado por primera vez en el otoño de 2000 en cultivos protegidos de pepino de Almería (Cuadrado y col., 2001). Desde entonces se ha extendido con gran rapidez, de forma que hoy causa serias pérdidas económicas en cultivos protegidos de cucurbitáceas de Almería, Granada y Málaga.

Los intentos realizados hasta la fecha para obtener preparaciones puras de este virus han resultado fallidos, debido probablemente a la naturaleza lábil de los viriones. Por esta razón resulta especialmente difícil la obtención de anticuerpos específicos para su detección. Con el objeto de obtener anticuerpos específicos contra proteínas relevantes de CVYV se ha utilizado un cDNA obtenido a partir de plantas infectadas que contiene el gen que codifica la proteína de la cápsida (CP). Dicho gen unido a una cola adicional de histidinas ha sido posteriormente subclonado en un vector derivado de baculovirus para su expresión en células de insecto. Este sistema ha permitido la expresión de la proteína CP en grandes cantidades, y su posterior purificación en columnas de afinidad Ni-NTA. Mediante este desarrollo experimental se pretenden desarrollar anticuerpos específicos anti-CP mediante la metodología phage-display como alternativa a los procedimientos clásicos de obtención de anticuerpos monoclonales. Se comentan algunos aspectos de la síntesis de una librería de anticuerpos phage-display y de la selección por afinidad de los anticuerpos específicos. Por otra parte, este sistema de expresión puede ser útil para la obtención de cantidades suficientes de CP purificada que permitan el abordaje de estudios estructurales.

1. Cuadrado, I.M., Janssen, D., Velasco, L., Ruiz, L. y Segundo E. (2001).

"First report of Cucumber vein yellowing virus in Spain". *Plant Dis.* 85:336

## INFLUENCIA DEL ENCHARCAMIENTO, COMPACTACIÓN Y FLORA DEL SUELO EN LA EXPRESIÓN DEL FALSO MAL DE PANAMÁ EN LA PLATANERA

SABADELL, S., Y HERNÁNDEZ HERNÁNDEZ, J.M.

*Instituto Canario de Investigaciones Agrarias (ICIA) Apdo. 60, 38200 La laguna, S/C Tenerife*

El Falso Mal de Panamá (FMP) es un desorden que se da en la platanera y cuyo agente causal no se conoce. Muchos de los casos estudiados tienen en común suelos con una fracción importante de arcillas que determina un mal drenaje y en consecuencia alteraciones como la compactación y la hipoxia o anoxia radical. De las plantas con síntomas se aíslan diferentes microorganismos, los más frecuentes pertenecen al género *Fusarium*. Con el objetivo de ver si éstos factores abióticos pueden provocar la expresión de los síntomas por sí mismos o bien es necesaria además la presencia de una determinada flora microbiológica en el suelo, se han realizado tres ensayos en los que se han evaluado: el nivel de tolerancia de la platanera al encharcamiento en condiciones de esterilidad y su interacción con la compactación en un suelo natural agrícola donde se había dado con gran incidencia el problema.

El primer ensayo se desarrolló durante 4 meses y consistió en 4 tratamientos de encharcamiento durante 2h, 4h, 6h y permanente en el substrato turba:picón (70:30) esterilizado. El segundo ensayo se planteó aumentando los tiempos de encharcamiento a 5 días, con intermitencia de 4 días sin riego, además del tratamiento permanente. Este ensayo se mantuvo durante 6 meses y se empleó el mismo tipo de substrato estéril. Por último, se realizó un tercer ensayo en el que se estudió la interacción del encharcamiento intermitente con dos densidades aparentes de 1 g/l y 1.2 g/l en un suelo agrícola rico en arcillas, tendente a la compactación, parte del cual se esterilizó.

En los dos primeros ensayos, realizados con substrato estéril, no se pudieron reproducir síntomas aunque en las plantas con encharcamiento permanente e intermitente se observó una disminución de todas las variables estudiadas: altura, ritmo de emisión de hojas, diámetro del pseudotallo y número de raíces. En el tercer ensayo, en que se estudiaron las diferentes interacciones, se reprodujeron los síntomas en una planta que se encontraba en suelo no estéril, no encharcado y con densidad aparente de 1 g/l. De la planta sintomática y de las asintomáticas sometidas al mismo tratamiento se obtuvieron aislamientos de *Fusarium spp.*

En las condiciones ensayadas parece que una densidad aparente similar a la de campo juega un papel en la expresión de síntomas asociados al FMP cuando las plantas se encuentran en suelos no estériles.

## DIFERENCIAS HISTOLÓGICAS ENTRE EL FALSO MAL DE PANAMÁ (FMP) Y EL MAL DE PANAMÁ (MP) EN LA PLATANERA

SABADELL S.<sup>1</sup>, BARCELÓ A.<sup>2</sup> Y HERNÁNDEZ HERNÁNDEZ, J.M.<sup>1</sup>

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

<sup>2</sup>Centro de Investigación y Formación Agraria (CIFA). Cortijo de la Cruz s/n. Churriana, Málaga.

El Falso Mal de Panamá (FMP) es un desorden cuya etiología se desconoce. Se manifiesta en la planta con una sintomatología similar a la producida en el Mal de Panamá (MP) - enfermedad vascular cuyo agente causal es *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (FOC) -, lo que dificulta un diagnóstico rápido y eficaz.

Con el objetivo de establecer criterios que permitan realizar un diagnóstico diferencial entre el FMP y el MP, se planteó un estudio histoquímico de 5 muestras de pseudotallo, 5 de rizoma y 5 de raíz, procedentes de 2 plantas sanas, 2 con síntomas de MP y 2 con síntomas de FMP. Las muestras fueron fijadas en formalina (5 ml), ac. acético glacial (5 ml), alcohol 70% (90 ml) y posteriormente incluidas en parafina. Se realizaron cortes de 10 mm que se estudiaron con las tinciones PAS, Azul Toluidina y Gerlach. También se realizaron cortes de material fresco que se tiñeron con Calcofluor y Auramina O.

En general, se observa que en plantas afectadas por FMP existe un desorden generalizado de las estructuras vasculares, tanto xilema como floema, en los tres tipos de tejidos estudiados: pseudotallo, rizoma y raíz. En el xilema del pseudotallo de plantas con MP, se observa la formación de posibles tílides y presencia de conidias fusiformes - posiblemente de FOC-, mientras que en plantas con FMP, solo se ha observado micelio sin ninguna estructura que permita su identificación. También se observan diferencias en las lagunas lisogénicas y aerenquima radicular que parecen ser mayores en tamaño y cantidad en las plantas que presentan sintomatología asociada al FMP. Respecto al rizoma, tanto en plantas afectadas por FMP como por MP, aumenta el número de células que están especializadas en la acumulación de sustancias relacionadas con respuestas a situaciones de estrés inespecíficas como son los taninos y existe una mayor lignificación de las paredes celulares.

Las observaciones realizadas con las diferentes tinciones contribuyen a un mejor conocimiento de lo que ocurre en la expresión de síntomas asociados al FMP y nos permiten diferenciarlos de los descritos para el MP. Los mecanismos celulares que intervienen son de carácter inespecífico, dado que se describen en la literatura para diferentes tipos de estrés. Este estudio aporta información complementaria a trabajos fitopatológicos realizados con anterioridad y en conjunto sugieren que el FMP pueda ser debido a la presencia de un agente biótico oportunista en determinadas condiciones de estrés para la planta.

## MORFOLOGÍA Y CRECIMIENTO DE AISLADOS DE *Phytophthora cinnamomi* CAUSANTES DE LA PODREDUMBRE RADICAL EN *Quercus* spp.

SÁNCHEZ, M.E., SÁNCHEZ, J.E. Y TRAPERO, A.

Departamento de Agronomía. E.T.S.I.A.M. Universidad de Córdoba. Avda. Menéndez Pidal, s/n. 14071-Córdoba.

La podredumbre radical causada por el oomiceto *Phytophthora cinnamomi* es el principal factor contribuyente asociado a la Seca de *Quercus*.

En este trabajo se ha caracterizado la morfología y el crecimiento de aislados procedentes de ocho fincas situadas en las cuatro provincias andaluzas más afectadas de Seca: Cádiz, Córdoba, Huelva y Sevilla. Los aislados fueron obtenidos en las tomas de muestras de raíces y de suelo de la rizosfera de encinas y alcornoques realizadas en otoño de 2000 y primavera de 2000 y 2001.

Las raíces se cortaron en trocitos y se colocaron en placas de Petri con medio selectivo PARPH. Para el aislamiento de suelo se colocaron cebos biológicos de filodio de eucalipto flotando en la superficie de una mezcla suelo-agua, y se dejaron incubando durante cuatro días a 22° C. Posteriormente, se colocaron en placas de Petri con medio selectivo PARPH. Los aislados obtenidos han presentado dos tipos de morfología en función del huésped. Todos los aislados procedentes de encina presentaron hinchazones hifales en forma de ramificaciones botriosas, mientras que los aislados procedentes de alcornoque mostraron hinchazones hifales grandes, esféricas, terminales e intercalares, simples y en racimo.

Para estimular la producción de esporangios los aislados se incubaron en extracto de suelo a 25° C. Los esporangios producidos fueron principalmente ovoides, aunque también aparecieron ovoides-obpiriformes, ovoides-elipsoides y elipsoides. Se midió la longitud, anchura y relación longitud/anchura de 30 esporangios para cada uno de los aislados. Se observaron diferencias significativas entre aislados en función de estas variables; pero no se pudieron establecer grupos homogéneos según su procedencia y huésped. También se ha observado un elevado porcentaje de esporangios de ápice truncado.

Se midió el crecimiento de los aislados en dos medios nutritivos Zanahoria-Agar (CA) y Harina de Maíz-Agar (CMA) a temperaturas desde 5 hasta 35° C en intervalos de 5° C. La tasa de crecimiento (mm/día) en función de la temperatura se ajustó a un modelo polinómico de tercer grado. Los aislados estudiados presentaron curvas de crecimiento muy parecidas, con elevadas tasas de crecimiento y temperaturas óptimas superiores a 25° C. Destacan tres aislados obtenidos en la primera toma de muestras y procedentes de la misma finca de Huelva, que presentan tasas de crecimiento menores que el resto. Las temperaturas mínimas de crecimiento fueron bastante elevadas para todos los aislados, siendo más altas para los tres aislados procedentes de Huelva.

## LA FUSARIOSIS VASCULAR DEL PEPINO EN ALMERÍA

MARTÍNEZ, R., AGUILAR, M.I., GUIRADO, M.L., ÁLVAREZ, A. Y GÓMEZ, J.

Sección de Micología. Centro de Investigación y Formación Agraria de Almería (C.I.F.A.). Apdo 91, 04700 El Ejido (Almería).

En el año 2000 se observó, en dos explotaciones hortícolas de Almería, una nueva enfermedad del pepino que afectó hasta el 20% de la superficie del cultivo en una de ellas.

Los síntomas consistieron en una necrosis en la base del tallo, una estría necrótica unilateral alcanzando a veces longitudes superiores a 1 m, el amarilleamiento de las hojas basales, la marchitez y muerte de las plantas. En ocasiones, la estría necrótica alcanzó los peciolo y pedúnculos. Sobre las estrías frecuentemente se observó una esporulación de color naranja-rosáceo y al realizar un corte transversal a los tallos se apreció la necrosis de una parte o todo el sistema vascular.

Las plantas enfermas se analizaron a partir de trozos de tallo, situados a una altura del suelo superior a 0,5 m, de los que se colocaron dos secciones transversales sobre medio de cultivo PDA. En todas las muestras analizadas se aisló un hongo a partir del sistema vascular de los tallos, que se identificó como *Fusarium oxysporum* en base a la morfología de las colonias, fiálidas, conidias y clamidosporas.

Se realizaron pruebas de patogenicidad a ocho aislados inoculándolos sobre plántulas de pepino en estado de cotiledones. Las inoculaciones se realizaron en un invernadero de ambiente semicontrolado por inmersión de las raíces de las plántulas, durante 30 minutos, en una suspensión de cada cepa.

El 87,5% de los aislados de *F. oxysporum* inoculados resultaron patogénicos, reprodujeron la enfermedad observada en campo en las plantas de pepino y el hongo se reaisló del sistema vascular de las plantas inoculadas.

Por otra parte, para comprobar una posible transmisión del patógeno por las semillas, se analizaron el pedúnculo y las semillas de 11 frutos de distintas plantas enfermas mediante la siembra sobre medio de cultivo PDA.

*F. oxysporum* se aisló del 45,5% de los pedúnculos de los frutos y el 40% de los cinco aislados inoculados resultaron patogénicos sobre pepino. También se aisló del 7,8% de las semillas, pertenecientes a dos frutos, resultando patógenos sobre pepino el 28,6% de estos aislados.



## HONGOS LIGNÍCOLAS IDENTIFICADOS EN VIÑEDOS PERTENECIENTES A LAS PRINCIPALES DENOMINACIONES DE ORIGEN GALLEGAS

PINTOS, C., MANSILLA, J.P., LOUREIRO, B. Y AGUÍN, O.

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

Las enfermedades de madera en viñedo, que en sus primeras manifestaciones son a veces difíciles de identificar provocan, a largo plazo, importantes daños estructurales los cuales pueden conllevar, en algunos casos, la muerte de la cepa.

Sus síntomas son a veces poco claros y sus agentes causales, en algunas de ellas, no están bien establecidos o forman parte de un complejo de hongos de difícil clasificación, lo cual, ha hecho que sean la parte más desconocida de la patología del viñedo. Por otro lado, el largo proceso evolutivo de las mismas, en algunos casos los primeros síntomas aparecen cinco años después de la infección, las ha hecho pasar desapercibidas en algunos casos, haciéndose evidentes cuando un tratamiento curativo sería inviable. En el momento actual existe bastante controversia en cuanto a las especies fúngicas implicadas en este complejo degradativo de la madera a sus vías de entrada y a su papel en el desarrollo evolutivo del mismo.

Ante esta problemática y en base a las numerosas muestras recibidas tanto de planta adulta como de viñas recién establecidas y de plantas de vivero que presentaban una sintomatología que podía asociarse con enfermedades degenerativas de madera, el laboratorio de la Estación Fitopatológica "Do Areeiro" ha realizado un exhaustivo muestreo en las denominaciones de origen vitícolas gallegas (Monterrei, Valdeorras, Ribeira Sacra, Rías Baixas y Ribeiro) analizándose posteriormente las muestras en el laboratorio realizando cortes transversales y longitudinales de las mismas y sembrándolas en medios agarizados, identificándose, hasta el momento presente, los siguientes hongos:

*Phytophthora cinnamomi*, *Cylindrocarpon* spp y *Fusarium oxysporum* hongos causantes de pudrición radicular fundamentalmente en planta joven. *Botryosphaeria obtusa* y su anamorfo *Sphaeropsis malorum*. *Phaeoacremonium alelophilum*, *Phaeoacremonium* sp y *Phaeomoniella chlamydospora* hongos aislados tanto en planta joven como en planta adulta.

*Botryosphaeria dothidea*, *Phomopsis viticola*, *Eutypa lata* y su anamorfo *Libertella blepharis*, *Verticillium* sp, *Stereum hirsutum* y *Fomitiporia punctata*.

## CARACTERIZACIÓN DE *Fusarium proliferatum* EN PALMERAS ORNAMENTALES

ARMENGOL, J.<sup>1</sup>, MORETTI, A.<sup>2</sup>, VICENT, A.<sup>1</sup> Y GARCÍA-JIMÉNEZ, J.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Instituto Agroforestal Mediterráneo, Universidad Politécnica de Valencia, Camino de Vera s/n, 46022 Valencia.

<sup>2</sup>Istituto Tossine e Micotossine da Parassiti Vegetali, C.N.R., Viale Einaudi, 51, 70125 Bari (Italy)

Durante los años 1998-2001 en la Comunidad Valenciana se realizó una prospección de palmeras ornamentales pertenecientes a los géneros *Chamaerops*, *Phoenix*, *Trachycarpus* y *Washingtonia* que presentaban síntomas de marchitez y muerte de plantas. Los aislamientos realizados de la zona basal de las hojas, cuello y raíces de las plantas afectadas condujo, en la mayoría de los casos, a la identificación de *Fusarium proliferatum* en plantas sintomáticas de las siguientes especies: *Ch. humilis*, *P. canariensis*, *P. dactylifera*, *P. reclinata*, *T. fortunei* y *W. filifera*.

El objetivo de este trabajo ha sido la caracterización de dichos aislados en relación a su sexualidad, producción de toxinas y patogenicidad a plantas de *P. canariensis* y *P. dactylifera* en condiciones de invernadero.

Todos los aislados estudiados pertenecían a la población de apareamiento D de *Gibberella fujikuroi* y, entre ellos, se obtuvieron los dos tipos de apareamiento (*MATD-1* y *MATD-2*). Ambos tipos de apareamiento se presentaron incluso en aislados obtenidos de la misma especie de palmera ornamental, mostrando un elevado potencial de recombinación genética.

La mayoría de los aislados eran capaces de producir fumonisina B<sub>1</sub>, beauvericina y fusaproliferina.

A los 8 meses de la inoculación las plantas de *P. canariensis* y *P. dactylifera* mostraban lesiones en la base de las hojas y el desarrollo de síntomas de marchitez similares a los que se observaron en las plantas afectadas. En todos los casos *F. proliferatum* fue reaislado de las plantas inoculadas confirmándose los postulados de Koch.

## VARIABILIDAD MORFOLÓGICA Y CULTURAL DE *PSEUDOCERCOSPORA CLADOSPORIOIDES*, AGENTE DEL EMPLOMADO DEL OLIVO

ÁVILA, A. Y TRAPERO, A.

Dpto. Agronomía, E.T.S.I.A.M., Universidad de Córdoba. Avda. Menéndez Pidal s/n, 14071 Córdoba.

El Emplomado o “cercosporiosis” causado por *Pseudocercospora cladosporioides* es una enfermedad específica del olivo que ocasiona la caída prematura de las hojas y con ello un debilitamiento general de los árboles afectados. Aunque está distribuida por todas las comarcas olivareras de la Región Mediterránea, apenas se conoce la biología del agente patógeno, por lo que el estudio de la etiología y epidemiología de esta enfermedad es de fundamental importancia para establecer medidas de control efectivas. En este trabajo se incluyen los resultados preliminares sobre la caracterización morfológica y cultural de una colección de aislados del hongo obtenida de diversas localizaciones y variedades de olivo.

Las conidias del hongo se obtuvieron mediante raspado de las manchas esporuladas que se forman en el envés de las hojas afectadas. La caracterización morfológica de los aislados se realizó en base a la forma, tamaño y septación de las conidias. Estas conidias sirvieron también para obtener cultivos puros del hongo en el medio PDA diluido (PDA al 16%). Este medio se utilizó además para determinar el efecto de la temperatura sobre el crecimiento de diferentes aislados de *Ps.cladosporioides*.

Los resultados muestran una alta variabilidad en el tamaño y número de septas entre los aislados analizados, no observándose ningún tipo de relación entre variedades y su localización. Los valores medios de la longitud de las conidias oscilaron en el intervalo de 59,1 a 37,1  $\mu$ m. En el caso de la anchura y del número de septas, los valores fueron relativamente más homogéneos. En general, las conidias del agente patógeno tuvieron de 5-3 septas transversales y una anchura media de 4,2  $\mu$ m a 3,7  $\mu$ m. Globalmente, las dimensiones de las conidias de los diferentes aislados de *Ps. cladosporioides* difirieron significativamente de las correspondientes a la especie morfológica *Ps.ceratoniae*. El crecimiento *in vitro* de 5 aislados fue evaluado periódicamente mediante la estimación del diámetro de las colonias. Al finalizar el ensayo se determinó la tasa de crecimiento óptima de los aislados mediante la curva de crecimiento obtenida por regresión lineal en el intervalo de temperatura de 5°-30° C. En general, la tasa máxima de crecimiento varió significativamente entre los distintos aislados y osciló entre 1,2-0,6 mm/día. La temperatura óptima de crecimiento para todos los aislados resultó ser aproximadamente de 22° C, lo cual parece indicar que el hongo se encuentra bien adaptado a los periodos húmedos de otoño y primavera, característicos del clima mediterráneo.

## COMPATIBILIDAD VEGETATIVA Y CARACTERIZACIÓN MOLECULAR EN AISLADOS DE *verticillium dahliae* QUE INFECTAN ALCACHOFA EN LA COMUNIDAD VALENCIANA

COLLADO ROMERO, M.<sup>1</sup>, OLIVARES GARCÍA, C.<sup>2</sup>, MERCADO BLANCO, J.<sup>1</sup>, GIMÉNEZ-JAIME, A.<sup>3</sup>, ARMENGOL, J.<sup>3</sup>, GARCÍA JIMÉNEZ, J.<sup>3</sup> Y JIMÉNEZ DÍAZ, R.M.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Instituto de Agricultura Sostenible, C.S.I.C., Apartado 4084 14080 Córdoba,

<sup>2</sup>Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos y de Montes, Universidad de Córdoba, Apartado 3048 14080 Córdoba,

<sup>3</sup>Instituto Agroforestal Mediterráneo, Universidad Politécnica de Valencia, Camino de Vera s/n., 46022 Valencia

Durante los últimos 6 años, los ataques de Verticilosis causados por *Verticillium dahliae* limitan significativamente el cultivo y la producción de alcachofa en la Comunidad Valenciana. En este estudio se ha analizado la diversidad genética en un conjunto de 57 aislados monoconídicos de *V. dahliae* obtenidos de alcachofa en las provincias de Alicante, Castellón y Valencia, puesto que dicha diversidad puede ser determinante para el control eficiente de la enfermedad. Dicho análisis ha incluido la asignación de los aislados a grupos de compatibilidad vegetativa (VCGs) y su caracterización molecular mediante PCR específica.

La asignación de los aislados a VCGs se realizó mediante mutantes no utilizadores de nitrato (*nit*) seleccionados en medio suplementado con ClO<sub>3</sub>K y testores estándar de los VCGs 1, 2A, 2B, 3, 4A y 4B de *V. dahliae*. La caracterización molecular se realizó mediante dúplex PCR, utilizando cebadores específicos (INTD2f/r e INTND2f/r) diseñados para identificar los patotipos D (defoliante) y ND (no defoliante) de *V. dahliae* de algodón y olivo. Además, se utilizaron los cebadores DB19 y DB22 que amplifican una banda diagnóstica de *V. dahliae*, en combinación con el cebador espDef01 que, junto con DB19, amplifica una banda de 334 pb en aislados del patotipo D de algodón y olivo.

De los 57 aislados de *V. dahliae* estudiados 61,4% pertenecen al VCG2B y 33,3% al VCG2A. Uno de los aislados se asignó al VCG1 y dos son autoincompatibles (HSI). Todos los aislados de la provincia de Castellón son del VCG2B, mientras que entre los procedentes de Alicante predomina el VCG2A y en los Valencia los del VCG2B. Los análisis PCR indican que los marcadores diagnósticos de los patotipos D y ND de algodón no permiten caracterizar a todos los aislados de alcachofa como D o ND, siendo de resaltar que los aislados en los que no se amplifican ninguna de las dos bandas marcadoras pertenecen al VCG2B. Además, el marcador de 334 pb se amplifica en algunos aislados de *V. dahliae* de alcachofa pertenecientes al VCG2B, en todos los del VCG1 y en todos los HSI. La relación entre asignación a VCG de los aislados y su virulencia sobre alcachofa será discutida.

Subvencionado por el proyecto AGL2000-1444

## IMPLICACIONES DE LOS HONGOS EN EL COLAPSO DEL TOMATE

CONTRERAS, J.<sup>1</sup>, BIELZA, P.<sup>1</sup>, MARTÍNEZ, J.A.<sup>1</sup>, LACASA, A.<sup>2</sup>, MORENO, D.<sup>1</sup>, FRANCÉS, D.<sup>1</sup> Y PÉREZ, C.M.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Dpto. Producción Agraria. ETSIA. Universidad Politécnica de Cartagena. Pº. Alfonso XIII, s/n. 30203 Cartagena.

<sup>2</sup>Departamento de Protección Vegetal. Centro de Investigación y Desarrollo Agrario. Consejería de Agricultura, Medio Ambiente y Agua. 30150 La Alberca (Murcia).

El colapso del tomate, provoca marchitamientos repentinos de las plantas en muchos casos irreversibles. Esta sintomatología de etiología desconocida, ha provocado importantes pérdidas en este cultivo de la Región de Murcia desde 1999.

Durante las campañas 2000/2001 y 2001/2002 se realizaron seguimientos quincenales en 12 y 8 invernaderos de tomate, respectivamente, con distintas condiciones de cultivo, climáticas y de prácticas de manejo. Se tomaron muestras de plantas con síntomas de colapso y sin síntomas. Con el material vegetal recolectado se procedió al análisis micológico del sistema vascular y de las lesiones y podredumbres en el cuello y en las raíces siguiendo los métodos de diagnóstico habituales.

Los hongos aislados de las raíces y los tallos de plantas de tomate, que mostraban colapso, fueron investigados como posibles agentes causantes de esta sintomatología.

En la mayor parte de los casos se identificó en las raíces el hongo *Olpidium brassicae*. En los tallos y las raíces se aislaron los hongos: *Acremonium*, *Cladosporium*, *Alternaria*, *Trichoderma* y *Fusarium*.

Alrededor de 180 aislados de *Fusarium* fueron inoculados sobre macetas con plántulas de tomate en condiciones controladas. En ningún caso aparecieron síntomas de colapso ni marchitamientos.

## HONGOS ASOCIADOS A PIES PUNTISECOS DEL CLON DE CHOPO EUROAMERICANO LUISA AVANZO

OSORNO, O.<sup>1</sup>, MOLOWNY, A.F.<sup>2</sup> Y DIEZ, J.J.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Universidad de Valladolid. Unidad de Entomología y Patología Forestales. Departamento de Producción Vegetal y Silvopascicultura. Escuela Técnica Superior de Ingenierías Agrarias (E.T.S.II.AA.). Avda. de Madrid 57. 34071. Palencia.

<sup>2</sup>Confederación Hidrográfica del Duero. Calle Muro nº5. 47004 Valladolid

El clon euroamericano Luisa Avanzo, de origen italiano, es uno de los cultivares de chopo que presenta mejores crecimientos, sobre todo en terrenos más fértiles, pero cuya plantación no acaba de consolidarse en Castilla y León y otras comunidades limítrofes. Además, de la carga que supone el tener patentada su comercialización, se está comprobando, que incluso en los terrenos más fértiles, corona pronto su crecimiento, viéndose superado por otros clones. Asimismo, el clon Luisa Avanzo es bastante sensible al estrés hídrico en los primeros años de plantación, y a hongos patógenos como *Cryptodiaporthe populea* y otros de debilidad asociados a condiciones de estrés.

En Huerta (Salamanca), en una plantación coetánea de cinco años de los clones I-214 y Luisa Avanzo, se observó en todos los clones del segundo clon un puntisecado de la guía terminal y de otras ramas cercanas de esta última, apareciendo además pies muertos. Mientras tanto, los pies del clon I-214 permanecían totalmente sanos, con mayores alturas y grosos. Sobre los pies afectados, aparecía una necrosis cortical, y un área de coloración oscura con un alto contenido de agua en el leño, que parecía extenderse del centro de la sección de corte hacia el exterior, alcanzando en algunos de los casos las zonas de la necrosis cortical.

Los análisis en el laboratorio confirmaron la presencia de 26 hongos asociados con el material sintomático, destacando la presencia de *Cytospora chrysosperma* y *Fusarium solani* en la corteza necrótica y en muestras de madera.

El hecho de que *Cytospora chrysosperma*, un parásito secundario del chopo, este causando daños en el genotipo Luisa Avanzo evidencia la debilidad del clon en la plantación estudiada. Este estado de debilidad parece estar condicionado por la mala calidad del suelo en la parcela (muy arenoso y con baja fertilidad), y un descenso en la capa freática, que habría provocado el puntisecado de los árboles y la posterior colonización de los tejidos por los patógenos.

Este estudio ha sido realizado para la Confederación Hidrográfica del Duero

## EVALUACIÓN DEL PODER PATOGENICO DE *Pestalotiopsis funerea* Desm. SOBRE DISTINTAS MATRICES FORESTALES

BAJO, J. Y DIEZ, J.J.

Universidad de Valladolid. Unidad de Entomología y Patología Forestales. Departamento de Producción Vegetal y Silvopascicultura. Escuela Técnica Superior de Ingenierías Agrarias (E.T.S.II.AA.). Avda. de Madrid, 57 34071. Palencia.

El hongo *Pestalotiopsis funerea* Desm. (también denominado *Pestalotia funerea* Desm.) aparece de manera habitual en coníferas, especialmente en especies del género *Cupressus*. Este micete es considerado un parásito de debilidad, aunque apenas existen estudios que evalúen su comportamiento biológico y su poder patogénico.

En este trabajo se han obtenido 8 aislamientos de *P. funerea* a partir de tres especies arbóreas (*Cupressus sempervirens*, *Cupressus arizonica* y *Quercus pyrenaica*) presentes en las provincias de Palencia, Valladolid y León, sobre los que se ha evaluado el crecimiento en diferentes medios de cultivo y a distintas temperaturas, así como su poder patogénico sobre distintas matrices forestales. Las inoculaciones del hongo se llevaron a cabo partiendo de micelio no fructificado, que se situó sobre heridas realizadas en el tejido vegetal: ramillos de *Cupressus arizonica* en laboratorio, acículas y tallos de plántulas de *Pinus pinea* en vivero, y ramillos y acículas de árboles adultos de *Cupressus arizonica* y *Pinus pinea* respectivamente.

El crecimiento de los aislamientos de *P. funerea* fue diferente según aislamientos, temperaturas y medio de cultivo empleado. *P. funerea* causó necrosis en ramillos y acículas de las dos especies forestales estudiadas (*Cupressus arizonica* y *Pinus pinea*). La infección fue especialmente virulenta sobre plántulas de pino en vivero. Se ha observado relación entre el crecimiento en medio de cultivo y la virulencia en los aislamientos obtenidos de *Q. pyrenaica*.

Este trabajo ha sido cofinanciado por la Consejería de Educación y Cultura de la Junta de Castilla y León y la Unión Europea, F S E (Proyecto: VA031/01)

## SUSCEPTIBILIDAD A *Phytophthora cinnamomi* Rands DE ESPECIES LEÑOSAS PRESENTES EN BOSQUES DE LAS ISLAS CANARIAS

DOMÍNGUEZ CORREA, P.<sup>1</sup>, SIVERIO DE LA ROSA, F.<sup>2</sup>, RODRÍGUEZ PÉREZ, A.<sup>1</sup> Y GALLO LLOBET, L.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Protección Vegetal del Instituto Canario de Investigaciones Agrarias (I.C.I.A.), Apdo. 60, 38202 La Laguna, Tenerife, Islas Canarias.

<sup>2</sup>Dirección Gral. de Desarrollo Agrícola de la Consejería de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentación del Gobierno de Canarias.

*Phytophthora cinnamomi* es el agente causal responsable de daños considerables en bosques europeos de castaños y encinas. La naturaleza y agresividad de este patógeno así como su amplia distribución en el archipiélago canario asociado a cultivos de aguacate, llevó a plantearnos la susceptibilidad de distintas especies leñosas que forman parte de dos ecosistemas naturales de relevancia en las islas, el pinar y la laurisilva. En la bibliografía están citadas como especies sensibles al patógeno, *Erica arborea*, *Persea indica* y *Pinus canariensis* integrantes estos ecosistemas.

Se ha estudiado la susceptibilidad a *P. cinnamomi*, mediante inoculación artificial, de trece especies leñosas representativas de la flora local obtenidas por semilla, con 24 plantas por especie. Se midió periódicamente la altura, diámetro, número de hojas e índice de intensidad de la enfermedad. Se evaluó la presencia de canchros, el peso fresco y seco aéreo y de raíz, la frecuencia de aislamiento del patógeno de las raíces y los propágulos de éste por gramo de suelo seco. Así mismo se determinó el contenido en hoja de macro y micronutrientes.

Se ha confirmado la patogeneicidad de *P. cinnamomi* en: *Erica arborea*, *Persea indica* y *Pinus canariensis*. Se cita por primera vez para las siguientes especies: *Apollonias barbujana*, *Arbutus canariensis*, *Erica scoparia* ssp. *platycodon*, *Ilex perado* ssp. *platiphylla*, *Myrica faya*, *Picconia excelsa*, *Prunus lusitánica* ssp. *hixa*, *Rhamnus glandulosa* y *Viburnum tinus* ssp. *rigidum*; en las que *P. cinnamomi* produce disminución del desarrollo, canchros y/o la muerte en un porcentaje variable de plantas, aislándose el patógeno de la rizosfera, raíces y canchros.

Las plantas inoculadas presentaron concentraciones significativamente mayores de sodio (Na<sup>+</sup>) y menores de manganeso (Mn<sup>++</sup>), zinc (Zn<sup>++</sup>) y hierro (Fe<sup>++</sup>), al compararlas con los controles. *Laurus azorica* fue la única especie inoculada que no presentó síntomas de la enfermedad.



## DETECCIÓN DE *Spongospora subterranea* f. *Sp. nasturtii* EN PLANTA DE BERRO (*Nasturtium officinale* R. Br.)

GARCÍA-BENAVIDES, P. Y CORTÉS BARBERO, J.

Centro Regional de Diagnóstico. Junta de Castilla y León. Apdo. 61, 37080 Salamanca

El género *Spongospora* es un miembro de la familia de los Plasmodioforomicetos, aunque recientemente ha sido reclasificado del reino de los Hongos e incluido en el de los Protozoos. *Spongospora subterranea* es un hongo que carece de micelio y se disemina mediante la emisión de zoosporas, su estado infectivo lo constituyen los plasmodios que se encuentran en la raíz del hospedador y sobrevive en el suelo como esporas de reposo.

Todos los miembros del género *Spongospora* son parásitos obligados y solo pueden ser cultivados en sus plantas hospedadoras. *Spongospora subterranea* f. *Sp. Nasturtii* es parásito del berro (*Nasturtium officinale* R. Br.).

La sintomatología de la planta afectada es muy específica caracterizándose por hinchamientos en las raíces que toman el aspecto de garfio afectando a las raíces que surgen de los nudos que se hinchan y curvan y en cuyo interior se pueden apreciar mediante preparación microscópica algunos estados del ciclo poco conocido del patógeno.

La identificación de este patógeno se ha realizado básicamente en función de la morfología y biometría de las estructuras observadas en las raíces de las plantas enfermas.

## ENFERMEDADES DIAGNOSTICADAS EN ESPECIES FORESTALES EN ANDALUCÍA

GUTIÉRREZ, F., ROMERO, M.A., SÁNCHEZ, J.E., NAVARRO, R., SÁNCHEZ, M.E. Y TRAPERO, A.

Dpto. de Agronomía, ETSIAM, Universidad de Córdoba. Avda Menéndez Pidal s/n, 14071 Córdoba.

Durante 1999-2001, se han analizado en el laboratorio de Patología Agroforestal más de 650 muestras enviadas por los técnicos de la Red Andaluza de Seguimientos de Daños en Ecosistemas Forestales, técnicos de la Consejería de Medio Ambiente de la Junta de Andalucía-Tragsatec, particulares y obtenidas por el propio laboratorio en prospecciones realizadas sobre la «seca» de los *Quercus* en Andalucía. Debido a la escasez de información sobre enfermedades de árboles forestales y en particular de especies mediterráneas, las investigaciones se han dirigido a establecer el diagnóstico y, en algunos casos, a caracterizar la etiología de la enfermedad.

Las muestras analizadas comprendieron un total de 35 especies forestales, si bien la mayoría de ellas se han concentrado en dos: alcornoque y encina, afectadas del síndrome conocido como Seca de los *Quercus*, que es probablemente el problema forestal de mayor envergadura en España. Los diagnósticos realizados han permitido identificar más de 30 especies fúngicas fitopatógenas, así como varias bacterias y fitófagos. Entre los patógenos asociados a la «seca» de los *Quercus* destacan el oomiceto *Phytophthora cinnamomi*, aislado de raicillas necróticas y de suelo, varias especies del género de loculoascomicetos *Botryosphaeria*, que estuvieron asociadas con chancros de ramillas y de tronco, el ascomiceto xilariáceo *Biscogniauxia mediterranea*, causante del chancro carbonoso, y la bacteria *Brenneria quercina*, responsable del chancro sangrante del tronco y ramas. En otras especies forestales se diagnosticaron diversos tipos de micosis, comprendiendo por orden de mayor a menor frecuencia: necrosis foliares (acebuche, algarrobo, castaño, fresno, madroño, nogal, morera, pinos, etc.), chancros (castaño, chopo, jara, lentisco, etc.), podredumbres radicales (cipreses y pinos), muerte de plántulas (algarrobo, pinos, *Quercus*), royas (chopo, cornicabra, espino albar, sabina), oídios (algarrobo, arce y castaño), y mildius (zarzamora).

Los diagnósticos realizados están sirviendo para establecer una base de datos de enfermedades de especies forestales en Andalucía, lo que resulta fundamental para cualquier actuación que se quiera realizar en relación con dichas enfermedades. Un aspecto adicional, que justifica por sí mismo la necesidad de continuar con esta línea de trabajo, es la creación de una micoteca de los patógenos forestales más importantes.

## CARACTERIZACIÓN DE LA FATIGA DEL SUELO DE INVERNADEROS DE PIMIENTO DEL SURESTE PENINSULAR

GUERRERO, M.M.<sup>1</sup>, MARTÍNEZ, M.A.<sup>1</sup>, LACASA, A.<sup>1</sup>, MARTÍNEZ, M.C.<sup>1</sup>, GUIRAO, P.<sup>2</sup>, BARCELÓ, N.<sup>1</sup>, ONCINA, M.<sup>1</sup> Y ROS, C.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Centro de Investigación y Desarrollo Agroalimentario. Consejería de Agricultura, Agua y Medio Ambiente. C/ Mayor s/n, 30150 La Alberca (Murcia).

<sup>2</sup> Programa de Colaboración FECOAM-Consejería de Agricultura, Agua y Medio Ambiente, C/ Caballero, 13, 30003 Murcia.

El pimiento es un monocultivo en más del 90% de las 1.800 ha de invernaderos de Murcia y del Sur de Alicante, reiterando la plantación en el mismo suelo desde hace 15 años como media. Desde hace 17 años todos los invernaderos son desinfectados con bromuro de metilo 98:2 a 60 g/m<sup>2</sup> y plástico de polietileno hasta 1998 y a 30 g/m<sup>2</sup> con plástico VIF (Virtually Impermeable Film) a partir de esa fecha. La desinfección está motivada por los patógenos (*Phytophthora capsici* y *Meloidogyne incognita*) y por la fatiga del suelo ocasionada por la reiteración del cultivo, que en tan sólo dos años provoca descensos de producción superiores al 20%. Con el objeto de establecer métodos alternativos de manejo del suelo cuando no están contaminados de patógenos se han realizado estudios encaminados a conocer las características de la fatiga o del afecto depresivo derivado de la reiteración ininterrumpida del cultivo. Suelos con diferentes antecedentes e historial de cultivo han sido estudiados en condiciones controladas. Una fracción de cada suelo se desinfectó con bromuro de metilo, otra se desinfectó en autoclave a 120°C y otro no recibió desinfección. En los bioensayos se han utilizado el pimiento y el apio como plantas indicadoras, midiendo la altura de las plantas, el peso fresco y el peso seco. Para los tres parámetros se han obtenido respuestas diferenciales significativas indicando que la fatiga tiene un componente general y otra específica para el pimiento, de forma que la desinfección drástica de los suelos mejora proporcionalmente más el desarrollo de las plantas de pimiento que las de apio. En los suelos donde el pimiento ha sido menos veces reiterado, al desinfectarlo no se obtiene aumentos del desarrollo de las plantas de apio. También se desprende de los ensayos que la fatiga tiene una componente biológica.

## AISLAMIENTO DIRECTO DE *Verticillium dahliae* DEL SUELO Y CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA DE SUS MICROESCLEROCIOS

LÓPEZ-ESCUADERO, F. J., MARTOS-MORENO, C. Y BLANCO-LÓPEZ M. A.

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

El aislamiento directo de *Verticillium dahliae* del suelo es necesario para conocer su estructura y distribución de virulencia y desarrollar métodos predictivos y estrategias de lucha contra las Verticilosis. De las numerosas técnicas desarrolladas para la determinación cuantitativa de *V. dahliae* del suelo, las colonias obtenidas en ellas, no han podido ser utilizadas con éxito para la obtención de aislados en cultivo puro del hongo. En aquellos casos que ha habido cierto éxito, los procesos descritos han sido laboriosos y la recuperación del agente muy baja, por la abundancia de hongos contaminantes. Este trabajo muestra una metodología eficaz para la obtención de aislados de *V. dahliae* de suelo y los resultados de su caracterización morfológica.

Las muestras de suelo son procesadas mediante tamizado húmedo de una suspensión de 25 gr de suelo en 100 ml de agua destilada a través de tamices de 150 y 35 mm en *tandem*. El residuo del tamiz de 35 mm se recupera en 100 ml de agua destilada y se siembran alícuotas de 1 ml sobre una lámina de papel de celofán estéril dispuesto sobre una placa de petri con Agar Polipectato Sódico Modificado (APSM). Las placas se incuban a 22°C en oscuridad y a partir de 6 días, sin lavar el suelo, se observa la formación de colonias de *V. dahliae*. Cuando una colonia es detectada, se corta con un escalpelo la cuadrícula de celofán que la contiene, recuperándola íntegra y sin agar. Cada cuadrícula con la colonia se suspende en 10 ml de agua destilada y se somete a un baño de ultrasonidos con agitación. Cuando el trozo de celofán queda limpio se retira y la suspensión obtenida se lava con 500 ml a través de un embudo quiitasato conectado a una bomba de vacío, reteniendo el residuo en un papel de filtro estéril. El residuo se recupera en agua estéril y se siembran 0,5 ml de la suspensión en placas de APSM, que se incuban a 22°C en oscuridad. A partir de los 6 días de incubación, se pueden detectar bajo lupa las típicas colonias de *V. dahliae*, que crecen independientes y libres de contaminantes, para la obtención de cultivos puros.

De cada muestra de suelo, se ha caracterizado la morfología esclerocial de *V. dahliae* de tres aislados obtenidos de una sola colonia en APSM-celofán. Para ello, se hicieron 4 montajes de cada aislado en fucsina ácida en lactofenol, y se determinó la longitud, anchura y relación longitud/anchura de un total de 200 ME por aislado mediante el programa analítico de imagen AnalySIS (Soft Imaging System) usando una video cámara (Kappa). Estos parámetros se compararon con los correspondientes a los aislados V117 (defoliante) y V4 (no defoliante) de *V. dahliae* de la micoteca del laboratorio de Patología Vegetal de la Universidad de Córdoba, resultando una amplia variabilidad morfológica estadísticamente significativa.

## ANÁLISIS FILOGENÉTICO DE *Acremonium cucurbitacearum* Y SU DETECCIÓN MEDIANTE PCR

MARTÍNEZ-CULEBRAS, P.V., ABAD-CAMPOS, P. Y GARCÍA-JIMÉNEZ, J.

*Instituto Agroforestal Mediterráneo. Universidad Politécnica de Valencia. Camino de Vera s/n, 46022-Valencia.*

*Acremonium cucurbitacearum* es uno de los patógenos fúngicos más importantes asociado al colapso del melón en España. En este estudio se ha llevado a cabo un análisis filogenético de una colección de aislados de *A. cucurbitacearum* mediante análisis de secuencias del ADN ribosómico. En el análisis se incluyeron aislados españoles y norteamericanos y se compararon con otras especies de *Acremonium* patógenos de vegetales (*A. crotocinigenum*, *A. charticola*, *A. strictum*, *A. sclerotigenum* y *A. kiliense*).

Los aislados de *A. cucurbitacearum* presentaron una gran homología en sus secuencias del ADN ribosómico, indicando que se trata de un grupo monofilético. Se encontró también gran homología con especies de los géneros *Plectosphaerella*, *Verticillium* y *Nectria*. Por el contrario, *A. cucurbitacearum* presentó poca homología con las otras especies del género *Acremonium* estudiadas. Esta divergencia genética sugiere que la taxonomía de esta especie debe ser revisada.

A partir de los datos de secuencia se diseñaron oligonucleótidos específicos para el diagnóstico de *A. cucurbitacearum* por PCR. El método de PCR desarrollado permite la detección del patógeno en raíces de melón artificialmente infectadas, acortando considerablemente el tiempo requerido para el diagnóstico. La evaluación del método en condiciones de campo está siendo estudiado en la actualidad.

## ESTUDIOS PRELIMINARES SOBRE LA COMPONENTE FÚNGICA DE LA FATIGA DE SUELOS DE INVERNADEROS DE PIMIENTO

MARTÍNEZ, M.A.<sup>1</sup>, GUERRERO, M.M.<sup>1</sup>, MARTÍNEZ, M.A.<sup>1</sup> LACASA, A.<sup>1</sup>, BARCELÓ, N.<sup>1</sup>, YÉLAMOS, J.<sup>2</sup> Y TELLO, J.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Centro de Investigación y Desarrollo Agroalimentario. Consejería de Agricultura, Agua y Medio Ambiente. C/ Mayor s/n, 30150 La Alberca (Murcia).

<sup>2</sup> Departamento de Producción Vegetal. Área de Producción Vegetal. Universidad de Almería. Edificio CITE-II.B. Carretera de Sacramento. La Cañada S. Urbano s/n. 04120 Almería.

La reiteración ininterrumpida del cultivo de pimiento en el mismo suelo ha sido la tónica en los invernaderos de Murcia y del Sur de Alicante desde el establecimiento del cultivo hace más de 20 años, siendo un monocultivo en más del 90% de las 1.800 ha de invernadero ocupadas por el pimiento. El descanso de la producción al reiterar el cultivo se acentúa a partir del segundo año en que puede ser ya del 20%. La desinfección del suelo con bromuro de metilo se ha venido realizando anualmente desde hace unos 17 años, para controlar los patógenos (*Phytophthora capsici* y *Meloidogyne incognita*) y para corregir los efectos de la fatiga del suelo. La búsqueda de alternativas viables económicamente y respetuosas del medio ambiente incluye métodos y técnicas de manejo de los suelos. Para ello resulta imprescindible conocer la naturaleza de la fatiga del suelo y los elementos que la componen. En el presente trabajo se exponen los resultados preliminares del estudio de la micoflora de los suelos cultivados de pimiento, con distintas estrategias de actuación sobre el suelo previas a la plantación. Se compara la micoflora total y fusárica entre suelos con distintos tipos de desinfección (química: bromuro de metilo, metam sodio; no químicas: biofumigación con solarización con diferentes grados de reiteración; biofumigación con solarización y aplicación de antagonistas) y suelos no desinfectados. Se han encontrado 4 especies de *Fusarium* (*F. oxysporum*, *F. solani*, *F. roseum* y *F. moniliforme*) y otros micromicetos de los géneros *Aspergillus*, *Penicillium*, *Rhizopus*, *Stemphylium*, *Alternaria*, *Cladosporium*, *Rhizoctonia*, *Trichoderma*. Tras la desinfección con biofumigación + solarización la disminución de la microbiota fúngica es similar a la de bromuro de metilo. A lo largo del cultivo las densidades poblacionales de *F. solani* y *Apergillus* aumentan en todos los tratamientos, las de *Rhizopus*, *Penicillium* y *Alternaria* aumentan o disminuyen según los tratamientos, mientras las de los otros hongos disminuyen en la rizosfera.

## PATOGENICIDAD Y CONTROL DE *Phytophthora cactorum* EN LOS FRUTOS DEL PERAL

TUSET, J.J., HINAREJOS, C. Y MIRA, J.L.

Dpto. de Protección Vegetal y Biotecnología. Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias. Ctra. Moncada-Náquera km 5. 46113 Moncada. Valencia.

Desde el año 1992 y afectando a los frutos del peral (*P. comunis*), tanto en el campo como en el almacén, se viene detectando esporádicamente al hongo *Phytophthora cactorum* en la Comunidad Valenciana. Las tormentas de final de verano y los riegos copiosos son los factores que favorecen la infección de los frutos por este hongo del suelo. Los cvs "Blanca de Aranjuez" y "Roma", han resultado ser los más afectados con daños, a veces considerables. Las peras son bastante sensibles a la inoculación con micelio y zoosporas y la "podredumbre marrón" producida es rápida, alcanzando todo el fruto en unos 6-9 días a 24-25°C. El control químico de este hongo con fungicidas endoterápicos sólo ha resultado eficaz con el metalaxil. Este fungicida impide poderosamente el crecimiento del micelio en la piel y capas externas del mesocarpo de la pera a partir de 800 ppm de producto activo, no dejando desarrollar la "podredumbre marrón".

## ENFERMEDADES DEL CASTAÑO EN ANDALUCÍA

SÁNCHEZ, J.E., SÁNCHEZ, M.E. Y TRAPERO, A.

Departamento de Agronomía. E.T.S.I.A.M. Universidad de Córdoba. Avda. Menéndez Pidal, s/n. 14071-Córdoba.

La evolución del castaño en España durante los dos últimos siglos y su decadencia ha estado asociada estrechamente con un empeoramiento general de su estado sanitario. Numerosos patógenos y fitófagos están ocasionando importantes pérdidas de producción de fruto y de madera, así como un deterioro general de las masas de castaños de España. En Andalucía, la información sobre el estado sanitario de los castaños es casi inexistente. Dicha información es imprescindible para poder diseñar cualquier plan de actuación dirigido a mejorar la sanidad de este cultivo forestal.

En este estudio se han llevado a cabo prospecciones con objeto de determinar las principales enfermedades que afectan a las masas de castaño en Andalucía. Durante 2001-2002, se han prospectado los castañares de las provincias andaluzas de Córdoba (Trassierra), Huelva (Sierra de Aracena) y Málaga (Valle del Genal).

Los síntomas más frecuentemente observados han sido: manchas foliares, podredumbre del fruto y de la madera, ramas y ramillas puntisecas, necrosis del sistema radical y lesiones en el tronco y ramas. En ocasiones se ha observado que las hojas son más pequeñas, amarillean progresivamente y caen prematuramente. También aparecen ramas muertas y aborto de los frutos.

Asociado a las lesiones foliares, se ha identificado a *Mycosphaerella maculiformis*, con sus estados anamórficos *Phyllosticta maculiformis* y *Cylindrosporium castaneicolum* en las tres provincias prospectadas. Debido a la elevada incidencia de esta enfermedad se están realizando estudios para caracterizar su ciclo de patogénesis en Andalucía. En las muestras de frutos podridos se han identificado varios hongos saprófitos, tales como especies de *Penicillium*, *Trichothecium* y *Mucor*. Este problema es particularmente importante en la variedad Pilonga que es muy sensible al rajado del fruto. En muestras de erizos necrosados procedentes de Huelva se identificó *Botrytis cinerea*. A partir de muestras de suelo y raíces necróticas se ha aislado e identificado al oomiceto *Phytophthora cinnamomi*, causante de la «Tinta del castaño». Este hongo está causando la muerte de árboles individuales y en pequeños rodales, especialmente en la provincia de Huelva, donde se han encontrado varios focos.

Esporádicamente se han observado brotes jóvenes muy afectados de oídio, causado por una especie del género *Microsphaera*. También se ha diagnosticado el chancro carbonoso causado por *Biscogniauxia mediterranea* (*Hypoxylon mediterraneum*), y chancros causados por *Cytospora* sp. en árboles que se encontraban ya muertos o moribundos.



## AISLAMIENTO EN CULTIVO PURO DE *Gremmeniella abietina* (Lagerb) Morelet. A PARTIR DE RAMAS AFECTADAS DE *Pinus halepensis* Mill.

SANTAMARÍA, O., PAJARES, J.A. Y DIEZ, J.J.

Universidad de Valladolid. Unidad de Entomología y Patología Forestales. Departamento de Producción Vegetal y Silvopascicultura. Escuela Técnica Superior de Ingenierías Agrarias (E.T.S.II.AA.). Avda. de Madrid 57. 34071. Palencia.

Las prospecciones realizadas en la provincia de Palencia durante los años 2000-2001 sobre *Pinus halepensis* Mill. han permitido constatar, por primera vez sobre el pino carrasco, la presencia de *Gremmeniella abietina* (Lagerb) Morelet en su fase anamórfica *Brunchorstia pinea* (Karst.) Höhn.

*Gremmeniella abietina* es un patógeno con un potencial de daño de enorme magnitud que en las últimas décadas ha provocado la destrucción de un gran número de masas de coníferas en las zonas donde aparece. La importancia de este hongo crea la necesidad de realizar diversos estudios que evalúen su potencial patogénico real en las condiciones climáticas de nuestro país y la susceptibilidad de las diferentes especies de coníferas ante su ataque. El aislamiento en cultivo puro de *Gremmeniella abietina* será, por tanto, un trabajo previo fundamental para efectuar posteriormente dichos estudios.

Para conseguir el aislamiento de *Gremmeniella abietina* se probaron diversas técnicas, pero con la que se obtuvo una mayor eficacia fue con la dilución y posterior desmenuzamiento de los cuerpos de fructificación (tipo picnidio) del hongo en agua destilada estéril para su posterior siembra del caldo resultante en medio de cultivo PDA. Se pudo observar a los pocos días la germinación de los conidios en el medio de cultivo para la formación de un nuevo micelio. Las colonias obtenidas se mantuvieron a 15 °C en condiciones de oscuridad.

Se ha conseguido aislar también al patógeno a partir de tiras de madera de los ramillos infestados previa esterilización con etanol y posterior transferencia a placas con medio de cultivo: extracto de malta agar y extracto de acículas de pino agar.

La colonia resultante desarrolló un micelio aéreo algodonoso de color blanco que adquirió rápidamente tonalidades amarillentas y verdosas y provocó una tinción verde oscuro en el medio de cultivo colindante. El hongo estaba formado por un micelio compacto que presentó en conjunto un color verde oscuro. Las hifas eran septadas, hialinas, de unas 5 micras de grosor, que se ramificaban en su mayor parte dicotómicamente. Hasta la fecha no se ha detectado la presencia de cuerpos de fructificación tipo picnidio en los aislamientos en cultivo puro.

Este trabajo ha sido cofinanciado por la Consejería de Educación y Cultura de la Junta de Castilla y León y la Unión Europea, F S E (Proyecto: VA031/01)

## EVALUACIÓN DE LA INFLUENCIA DE LOS FACTORES EDAFOClimáticos Y METODOLÓGICOS SOBRE LA APARICIÓN DE COMUNIDADES FÚNGICAS EN *Populus tremula* L

SANTAMARÍA, O. Y DIEZ, J.J.

Universidad de Valladolid. Unidad de Entomología y Patología Forestales. Departamento de Producción Vegetal y Silvopascicultura. Escuela Técnica Superior de Ingenierías Agrarias (E.T.S.II.AA.). Avda. de Madrid 57. 34071. Palencia.

En el presente estudio se han aislado e identificado las especies fúngicas presentes en rodales de *Populus tremula* de la provincia de Palencia, al norte de España. Se ha valorado la variación de las comunidades fúngicas en función de factores geográficos, del material vegetal estudiado y en función de los métodos de laboratorio empleados. Para ello, se recogieron muestras de hojas, ramillos y tronco (corteza) de árboles de 8 localizaciones diferentes que se dispusieron en cámaras húmedas y placas con medio de cultivo para su posterior análisis.

Exceptuando a *Trichotecium roseum* y *Rhizopus stolonifer* (típicos contaminantes de laboratorio), en total aparecieron 341 aislamientos de hongos asociados al “chopo temblón” distribuidos en 41 especies fúngicas de los 512 fragmentos de planta recogidos. Los hongos que aparecieron con una mayor frecuencia fueron *Cladosporium maculicola*, *Penicillium*, *Elsinoe veneta*, *Cytospora chrysosperma*, *Alternaria alternata*, *Aureobasidium pullulans*, *Pollacia radiosa*. Las frecuencias de aislamiento de las especies fúngicas encontradas fueron en la mayoría de los casos significativamente dependientes de los rodales muestreados. Sin embargo, no existieron diferencias significativas (excepto para un rodal) en la diversidad de especies, calculada para cada localización a través del índice de diversidad de Shannon. El análisis “cluster” de las frecuencias relativas de los aislamientos encontrados demostró que el tejido vegetal analizado fue el parámetro más influyente en la distribución de las comunidades fúngicas presentes. La metodología empleada para el aislamiento de los hongos afectó también a los patrones de distribución de la micoflora, mientras que los factores geográficos de la localización no tuvieron, prácticamente ninguna influencia. No obstante, cabe precisar que las diferencias climáticas y edáficas de los emplazamientos estudiados fueron también poco importantes en el ámbito de nuestro estudio. Las masas de *Populus tremula* en la provincia de Palencia no presentaron graves problemas fitosanitarios. No se encontraron, en ninguno de los muestreos realizados, ataques fuertes de hongos, y la mayoría de los micetes recogidos fueron saprofitos o parásitos muy secundarios. Los pocos hongos patógenos observados aparecieron en porcentajes bajos y de forma secundaria.

## ENFERMEDADES DE JUDÍA CAUSADAS POR HONGOS DE SUELO EN ALMERÍA

BARRERA, C.M., SERRANO, Y., AGUILAR, M.I., GUIRADO, M.L. Y GÓMEZ, J.

Sección de micología. Centro de Investigación y Formación Agraria de Almería (C.I.F.A.).

APDO 91, 04700 El Ejido (Almería).

Para conocer la etiología de las enfermedades causadas por hongos de suelo en los cultivos de judía de los términos municipales de Adra, Balanegra y El Ejido, se muestrearon ocho explotaciones comerciales y se recolectaron muestras de tallos, de hipocotilo y del sistema radicular.

La detección de los hongos asociados a las lesiones observadas se realizaron mediante la siembra de material enfermo en medios de cultivos, la realización de trampas vegetales y la observación de las muestras bajo la lupa.

Se inocularon 34 aislados de las especies presuntamente patógenas en plantas de judías. Cinco aislados de *Fusarium solani*, siete de *Fusarium oxysporum*, tres de *Thielaviopsis basicola*, cuatro de *Rhizoctonia solani* y quince de *Pythium* spp, se probaron en tres experimentos de inoculación sobre plántulas en dos sustratos, suelo y perlita y otros tres experimentos sobre plantas en perlita. Durante los mismos se realizaron observaciones semanales de los síntomas aparecidos y a fin del cultivo se valoró el aspecto sanitario del sistema radicular.

En algunos de los experimentos realizados, las plántulas inoculadas con *Thielaviopsis basicola* presentaron un claro ennegrecimiento del sistema radicular. Los síntomas de estría necrótica en la parte baja del tallo, marchitez y muerte mostrados en algunas de las plantas inoculadas con aislados de *Pythium* spp se manifestaron cuando ya podrían considerarse plantas adultas, y el resto de los aislados de *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani* y *Rhizoctonia solani* que fueron inoculados no mostraron síntomas de patogeneidad. En estos experimentos no se obtuvieron diferencias significativas en los síntomas observados en las plántulas cultivadas en perlita y las cultivadas en la mezcla de turba, arena y suelo.

En los experimentos sobre plantas adultas, las inoculadas con aislados de *Pythium* spp manifestaron síntomas de estrías necróticas, necrosis del sistema radicular, marchitez y muerte. *Thielaviopsis basicola*, causó sobre las plantas inoculadas síntomas generalizados consistentes en amarillamiento de las hojas basales, chancro en la parte baja del tallo, necrosis negruzcas importantes de las raíces, marchitez y la muerte de las plantas. Los síntomas reproducidos por *Pythium* spp y *Thielaviopsis basicola* fueron similares a los observados en campo. Las plantas inoculadas con los aislados de *Rhizoctonia solani* y *Fusarium* spp no mostraron síntomas.

## MICOFLORA ASOCIADA A LAS SEMILLAS DE *Betula alba*

VÁZQUEZ RUIZ-DE OCENDA, R.A., REY FEIJOO, S. Y HERRERA LÓPEZ, M.T.

Dpto. de Botánica. Escola Politécnica Superior. Universidad de Santiago de Compostela. Campus de Lugo. 27002. Lugo.

El abedul (*Betula alba* L.) es un árbol muy utilizado para la restauración del estrato arbóreo en los macizos del NO peninsular, donde contribuye a interrumpir las fases de matorral que representan estados secuenciales avanzados de regresión de robledades y hayedos. Asimismo, se está incrementando su uso en proyectos de restauración de riberas, muy afectadas por las actividades antrópicas. Esto ha llevado al desarrollo de programas para la producción de planta a gran escala para lo que, en un principio se partió de las semillas. Sin embargo, la elevada producción de semillas de esta especie no se corresponde con una buena viabilidad de las mismas, tanto en campo como *in vitro*.

Para determinar la calidad de las semillas recogidas en campo y las posibles causas de esta falta de viabilidad se ha llevado a cabo el análisis de unas 500 semillas de abedul. Se han realizado los test de germinación sobre papel de filtro y sobre medio de cultivo (AA al 1% y MS) así como el test de viabilidad del Trifeniltetrazolium (de acuerdo con las reglas del ISTA).

Los test mostraron una baja capacidad germinativa de las semillas, tanto sobre medio sólido (0.33%) como sobre papel de filtro (1.87 %). En el caso de los análisis sobre medio de cultivo, se observó una abundante contaminación fúngica (45.8 % de las semillas).

Los reaislamientos sobre medios de cultivo específicos (PDA y AM) permitieron determinar la presencia de hongos (25%) pertenecientes al grupo de los Deuteromycetes como *Aureobasidium pullulans*, *Alternaria* sp., *Bactrodesmium* sp., *Cladosporium* sp., *Ulocladium* sp., *Phoma* sp., *Microsphaeropsis* sp., *Coniothyrium* sp., *Pestalotiopsis* sp., *Epicoccum nigrum*, *Gilmaniella* sp., *Sclerotium* sp. y *Penicillium* spp. También se han aislado distintos micelios claros y oscuros no fructificados (21 %).

La importante flora fúngica detectada hizo sospechar que fuera, en parte, la causante de la baja germinación de las semillas. Sin embargo, los análisis realizados con el Trifeniltetrazolium indicaron que la viabilidad era ya muy baja en origen (4%) por lo que la flora fúngica podría ser causante sólo de una pequeña parte de este fracaso.

Los problemas derivados de la manipulación de semillas hacen recomendable otras formas de propagación (por estaquillas y mediante técnicas de microcultivo) de esta especie.

## RANGO DE VARIEDADES Y ESPECIES DE CÍTRICOS SUSCEPTIBLES A *Alternaria alternata* pv. *citri* "IN VITRO"

VICENT, A., ASENSI, M.J., BADAL, J., ARMENGOL, J. Y GARCÍA-JIMÉNEZ, J.

*Instituto Agroforestal Mediterráneo. Universidad Politécnica de Valencia. Camino de Vera s/n 46022 Valencia*

La enfermedad conocida como mancha marrón causada por *Alternaria alternata* pv. *citri* se ha detectado en España principalmente sobre mandarina Fortune y, en menor medida, en tangelo Minneola y mandarina Nova. Dada la importancia de los cítricos en nuestro país y la diversidad varietal que caracteriza nuestra producción, se planteó un estudio con el objetivo de determinar el rango de variedades y especies de cítricos susceptibles en inoculaciones *in vitro*. Para ello se utilizaron tres aislados fúngicos procedentes de Alcira y Ribarroja (Valencia) y Pilar de la Horadada (Alicante) con los que se inocularon hojas inmaduras (Kohmoto *et al.*, 1991) de 55 variedades y especies de cítricos diferentes que incluían mandarinas, satsumas, naranjas (grupo Navel y Sanguinas), diversos híbridos intra e interespecíficos, limas, limones y pomelos. Todas las variedades de pomelo y todos los cultivares que incluían entre sus parentales a la mandarina Dancy (mandarinas Fortune y Nova, y los tangelos Minneola y Orlando), se mostraron susceptibles. Algunas naranjas del grupo Navel y algunas limas presentaron una cierta susceptibilidad y todos los limones ensayados se mostraron resistentes.

DIVERSIDAD DE HONGOS ENDOFÍTICOS EN *Lolium perenne*

ZABALGOGEAZCOA, I., VÁZQUEZ DE ALDANA, B.R., ROMO VAQUERO, M., GARCÍA CIUDAD, A. Y GARCÍA CRIADO, B.

*Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología de Salamanca, CSIC*

Cordel de Merinas 40-52, 37008 Salamanca

Una de las consecuencias de la asociación entre hongos endofíticos del género asexual *Neotyphodium* y la gramínea *Lolium perenne*, es la toxicidad de las plantas infectadas, debida a alcaloides producidos por *Neotyphodium*. Esto ha dado lugar a problemas de gran importancia económica en ciertos sistemas ganaderos; sin embargo, las plantas infectadas se benefician de la protección contra herbívoros que proporcionan los alcaloides fúngicos. El género imperfecto *Neotyphodium* incluye especies asexuales del género ascomiceto *Epichloë* (fam. *Clavicipitaceae*).

El objetivo de este trabajo consistió en determinar la incidencia de la infección endofítica en plantas de *Lolium perenne* en pastos naturales semiáridos. En 14 poblaciones de plantas muestreadas en las provincias de Salamanca, Zamora y León se descubrió que una media del 51% de las plantas asintomáticas estaban colonizadas por micelio endofítico. También se detectó en muy baja frecuencia, la presencia del hongo patógeno *Epichloë typhina*, un ascomiceto filogenéticamente cercano a *Neotyphodium*, que es causante de la enfermedad del estrangulamiento de la espiga en *Lolium* y otras gramíneas.

En cultivos puros de hongos, obtenidos a partir de plantas asintomáticas infectadas, se diferenciaron tres tipos de hongos basándose en caracteres morfológicos tales como presencia o ausencia de conidios, morfología de las colonias en agar y tasa de crecimiento radial. Utilizando caracteres moleculares tales como la secuencia nucleotídica de la región ITS 1/5.8S rRNA/ITS 2, y del gen de b-tubulina, se obtuvo una correlación entre las características morfológicas y moleculares y se identificaron los tres grupos de hongos como pertenecientes al grupo taxonómico *Epichloë-Neotyphodium*. Adicionalmente, se ha analizado el contenido del alcaloide tóxico ergovalina en plantas infectadas por los tres tipos de endofitos clavicipitales.

Un aislado obtenido de *Lolium* fue identificado como *Epichloë festucae*, un endofito que infecta a la gramínea *Festuca rubra*; además en este aislado se detectó la presencia de los virus EfV-1 y EfV-2, que infectan a *E. festucae*. Estos resultados sugieren que *E. festucae*, presente en poblaciones simpátricas de *F. rubra*, puede saltar de esta especie hospedadora a *L. perenne*.

En resumen, los resultados obtenidos indican la existencia de cuatro especies de endofitos que coexisten en poblaciones de *Lolium perenne* en pastos semiáridos.

## IDENTIFICACIÓN DE *Epichloë baconii* EN *Agrostis castellana* AFECTADA POR LA ENFERMEDAD DEL ESTRANGULAMIENTO DE LA ESPIGA

ROMO VAQUERO, M., VÁZQUEZ DE ALDAN, B.R., GARCÍA CIUDAD, A., GARCÍA CRIADO, B. Y ZABALGOGEAZCOA, I.

*Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología de Salamanca, CSIC*

Cordel de Merinas 40-52, 37008 Salamanca

Las especies patógenas del género ascomiceto *Epichloë* (fam. *Clavicipitaceae*) son causantes de la enfermedad del estrangulamiento de la espiga en gramíneas. Las plantas infectadas por estos hongos no muestran síntomas durante la fase vegetativa de su ciclo de vida, sin embargo, al comienzo de la fase reproductiva de la planta, el hongo forma estromas en los tallos, impidiendo la emergencia de las espigas y esterilizando completamente a la planta.

*Agrostis castellana* es una gramínea muy común en los pastos de las dehesas salmantinas. En poblaciones naturales de esta especie se observaron plantas con espigas estranguladas por estromas típicos de *Epichloë*, siendo la incidencia de plantas enfermas inferior al 1%.

Para identificar al hongo causante de la enfermedad se han obtenido cultivos puros de plantas infectadas y en ellos se han estudiado características morfológicas tales como la forma y tamaño de conidióforos y conidios y la tasa de crecimiento radial. Además se ha realizado un estudio molecular, que ha implicado la obtención de secuencias nucleotídicas de la región ITS 1/5.8S rRNA/ITS 2 y del gen de b-tubulina. Las características morfológicas y moleculares han permitido identificar al hongo asociado a *A. castellana* como *Epichloë baconii*.

Los hongos endofíticos clavicipitales son productores de micotoxinas. Por este motivo se ha analizado en la planta la posible existencia de alcaloides sintetizados por el hongo, concretamente, la del alcaloide tóxico ergovalina, obteniéndose unos niveles no significativos, indicadores de una muy baja o nula producción de ergovalina.

Este es el primer informe en el que se hace referencia a la enfermedad del estrangulamiento, causada por *Epichloë baconii*, en la gramínea *Agrostis castellana*.

P-60

## PATOGENICIDAD DE *Fusarium* spp. SOBRE FRUTOS DE NOGAL

SÁNCHEZ RAMÍREZ, C., ARQUERO, O. Y TRAPERO, A.

Dpto. de Agronomía, ETSIAM, Universidad de Córdoba.

Avda. Menéndez Pidal, s/n. 14071 Córdoba.

Durante los últimos años se ha observado una enfermedad del nogal que se manifiesta por lesiones necróticas y podredumbres de los frutos, que conllevan la caída de los mismos. La elevada incidencia de este problema en algunos campos, junto al desconocimiento existente sobre esta patología en España, nos han llevado a realizar este estudio, cuyo objetivo general fue determinar la etiología de este grave problema del nogal.

El seguimiento de la enfermedad se ha realizado en dos plantaciones de nogal, una en Córdoba y otra en Badajoz, durante los tres últimos años (2000-2002). Periódicamente, se ha evaluado el progreso de la enfermedad en frutos seleccionados de doce árboles de dos variedades, una muy susceptible ('Chico') y otra moderadamente susceptible ('Chandler'). En varios momentos, se tomaron muestras de frutos sanos y afectados, las cuales se han procesado en el laboratorio para determinar los organismos consistentemente asociados. La patogenicidad de estos agentes se ha comprobado mediante inoculaciones de frutos sanos de la variedad 'Chico', separados del árbol, en condiciones controladas.

Los organismos más consistentemente asociados con las lesiones necróticas de las nueces fueron la bacteria *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis*, agente de la mancha negra del nogal, el hongo *Marssoniella juglandis*, responsable de la antracnosis, y varias especies del género *Fusarium*. Otros organismos aislados con menor frecuencia fueron especies fúngicas de los géneros *Alternaria*, *Phoma* y *Phomopsis*. La incidencia de estos agentes varió marcadamente entre años y entre campos y no se pudo establecer una relación clara entre el tipo de lesión necrótica en el fruto y el organismo aislado más consistentemente. No obstante, la bacteria *X. Juglandis* se aisló más frecuentemente en los primeros estados de desarrollo del fruto, mientras que las especies de *Fusarium* se obtuvieron principalmente en las últimas fases, asociadas con podredumbres extensas de las nueces. Las inoculaciones artificiales han demostrado la patogenicidad de varias especies de *Fusarium*, principalmente *F. avenaceum*, *F. semitectum* y *F. subglutinans*, por lo que estos hongos podrían actuar como patógenos primarios o secundarios originando podredumbres de las nueces en las últimas etapas de su desarrollo. Otras especies fúngicas evaluadas, como *Alternaria* sp., *F. equiseti*, *F. oxysporum* y *F. proliferatum*, resultaron escasamente o no patogénicas en estos ensayos.



## ESTUDIO DE LA PRESENCIA DE BACTERIAS FITOPATÓGENAS EN PATATA DE SIEMBRA EMPLEADA EN LA COMARCA DE A LIMIA (OURENSE)

LASTRA, B.<sup>1</sup>, GARCÍA CALVO, L.<sup>2</sup> Y CABALEIRO, C.<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Lab. Biotecnología Vegetal. Dpto. Biología Vegetal y Ciencias del Suelo. Univ. Vigo.

<sup>2</sup>Instituto do Campo, INORDE, Ourense.

<sup>3</sup>Dpto. Producción Vegetal. EPS Universidad de Santiago de Compostela. Campus Universitario s/n 27002 Lugo.

El Instituto do Campo (INORDE) realiza, desde su creación en la comarca de A Limia, una campaña para el fomento del uso de patata de siembra certificada entre los agricultores de la zona como método preventivo para evitar la introducción y extensión de patógenos en el área. El elevado precio de la patata certificada junto con el mal aspecto de muchas partidas hace que muchos agricultores decidan utilizar patata de re-empelo de sus propias fincas. Por ello, dentro de un proyecto financiado con fondos FEDER-CICYT (1FD1997-1209) se procedió al estudio del material de siembra con el fin de descartar la presencia de diferentes bacterias fitopatógenas: *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*, *E. carotovora* subsp. *atroseptica*, *E. chrysanthemi*, *Ralstonia solanacearum*, *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* y *Streptomyces scabies*.

Se estudiaron patatas de siembra guardadas en almacenes de la zona que procedían de diferentes países de la U. E. (Dinamarca, Alemania, Reino Unido, Irlanda y Holanda) así como de zonas productoras españolas (Vitoria, Burgos). Tras la observación visual de síntomas, se procedió al análisis de las muestras mediante aislamiento en medios generales y selectivos, ELISA-DASI y amplificación mediante PCR. También se utilizó el procedimiento de enriquecimiento en medios selectivos tanto para el aislamiento como para las técnicas inmunológicas y moleculares.

Los resultados obtenidos indican que el material de siembra certificado que se está ofertando en la actualidad a los agricultores de A Limia no siempre está libre de bacteriosis y aunque no se puede responsabilizar a los proveedores de la presencia, por ejemplo, de focos de pie negro aparecidos en la zona, indudablemente el material que suministran contribuye a elevar el nivel de inóculo de algunas bacteriosis. El uso de cosechadoras mecánicas ha incrementado el número de tubérculos que quedan en el suelo de una campaña a otra y que son inmejorable reservorio para nuevas infecciones por lo que el uso de material sano es imprescindible para no aumentar la extensión de los patógenos.

## CARACTERIZACIÓN E IDENTIFICACIÓN DE FITOPLASMAS QUE INFECTAN DIVERSOS CULTIVOS EN AMÉRICA CENTRAL

CASTRO, S.<sup>1</sup>, RIVERA, C.<sup>2</sup>, JACO, R.<sup>3</sup>, SERRANO, R.F.<sup>3</sup>, CARAZO, G.<sup>1</sup>, Y ROMERO, J.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> *Departamento de Protección Vegetal. INIA. Carretera de La Coruña Km. 7,0. 28040 Madrid.*

<sup>2</sup> *Centro de Investigación en Biología Celular y Molecular (SICBM), Universidad de Costa Rica, San José, Costa Rica.*

<sup>3</sup> *Laboratorio de Parasitología Vegetal, Centro Nacional de Tecnología Agropecuaria y Forestal (CENTA), El Salvador.*

América Central es uno de los lugares del planeta en donde se conserva una gran diversidad genética en plantas y animales, por lo que, en los últimos años se han realizado enormes esfuerzos para su mantenimiento y estudio. Dentro de esta diversidad genética habría que contar igualmente con los patógenos de las plantas que constituyen parte del sistema natural y por lo tanto miembros de esa diversidad genética. Los fitoplasmas son patógenos intracelulares que colonizan infinidad de plantas cultivadas o silvestres mostrando síntomas que muchas veces pueden ser enfermedades importantes de los cultivos. En los últimos años debido a colaboraciones de investigación entre instituciones de Costa Rica y El Salvador con nuestro laboratorio hemos tenido la oportunidad de examinar y estudiar fitoplasmas infectando diversos cultivos de esta región.

Muestras de maíz (*Zea mays*), judía (*Phaseolus vulgaris*), Jacote (*Anacardium occidentale* L.) y papa (*Solanum tuberosum*) con síntomas de posibles fitoplasmosis provenientes de diversas zonas de Costa Rica y El Salvador, fueron analizadas con la finalidad de determinar la presencia de fitoplasmas, por PCR utilizando cebadores universales P1/ Tint y fU5/rU3 tanto en PCR directas o Nested-PCR, así como cebadores específicos de grupo. Los fragmentos amplificados de algunos de los fitoplasmas fueron clonados en plásmidos recombinantes (p Gem T-Easy Vector (Promega®) y secuenciados. Las secuencias obtenidas fueron usadas para su comparación con las secuencias de los fitoplasmas depositadas en los bancos de genes con la finalidad de identificar el grupo taxonómico al cual pertenece el fitoplasma en estudio. Con esta metodología hemos podido identificar fitoplasmas de los grupos 16Sr I y 16Sr III en las muestras analizadas de estos países.

## DIAGNÓSTICO POR PCR DE LA SARNA COMÚN DE LAS PATATAS (*Streptomyces* spp.)

FLORES, R., ORTEGA, M.G. Y MONTES, F.

*Laboratorio de Sanidad Vegetal de Sevilla. Carretera de Utrera, 9. AC 41089. Montequinto. Sevilla.*

La sarna común de las patatas es una enfermedad muy frecuente y, sin embargo, poco conocida. Sus síntomas pueden ser muy variables, y las bacterias que los provocan (varias especies del género *Streptomyces*) son difíciles de aislar y caracterizar. Todo ello ha dificultado hasta ahora el diagnóstico y, por tanto, el conocimiento de esta enfermedad.

Nosotros hemos diseñado un método para la detección por PCR de las principales especies patogénicas de *Streptomyces*. Se basa en la amplificación específica de un fragmento del ADN que determina la patogenia en estas especies. Hemos aplicado este método de diagnóstico en un muestreo de patatas con diversos síntomas de sarna común y hemos caracterizado las especies de *Streptomyces* detectadas.

## CREACIÓN DE UNA LIBRERÍA GENÉTICA PARA EL ANÁLISIS DE LA DIVERSIDAD GENÉTICA DEL FITOPLASMA CAUSANTE DEL DECAIMIENTO DEL PERAL O PEAR DECLINE

GARCÍA, M.<sup>1</sup>, FIRRAO, G.<sup>2</sup>, Y BATLLE, A.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentàries (IRTA). Dpto. Protecció Vegetal. Ctra Cabrils s/n. CABRILS. 08348 Cabrils. Barcelona.*

<sup>2</sup>*Dipartimento di Biologia applicata alla Difesa delle Piante. Universita di Udine. Udine (Italia).*

Hasta el momento la diferenciación de diferentes aislados fitoplasmáticos se ha realizado básicamente mediante la técnica de hibridación por Southern blot con sondas específicas o mediante RFLP a partir del producto de amplificación de determinados genes.

Con el objetivo de intentar obtener una mayor información acerca de la posible diversidad dentro de un mismo fitoplasma, así como la relación entre una determinada identidad genómica y variaciones fenotípicas entre diferentes aislados (como la severidad en la sintomatología o eficiencia de transmisión) se está intentando desarrollar una librería con un futuro uso en macro-arrays.

Para ello, se ha hecho una extracción de ADN partiendo de plantas e insectos infectados con el fitoplasma de PD de un determinado aislado. Estos ácidos nucleicos han sido purificados mediante la técnica de gradiente de densidad por Cl/Bisbenzamida. El ADN purificado se ha digerido completamente con AseI (ATTAAT), para luego ligarse a unos adaptadores. Después de una amplificación por PCR, el DNA se ha ligado a pGem-T vector y seguidamente clonado. Se han obtenido alrededor de 400 clones recombinados, con insertos de tamaños entre 300-700 bp. Algunos de estos clones han sido secuenciados para confirmar la identidad fitoplasmática de la librería.

En la actualidad se está realizando con cada uno de los insectos, una amplificación por PCR, fijación en membrana de nylon, e hibridación con ADN de planta sana y de planta infectada por el fitoplasma, para seleccionar clones específicos. Se plantea como objetivo seleccionar 96 clones específicos para el fitoplasma para poder producir finalmente los macro-arrays, que cubriría un 5-10 % del genoma del fitoplasma de PD. Una vez que los arrays estén preparados, ácidos nucleicos de diferentes aislados serán digeridos con AseI, ligados a los adaptadores y amplificados por PCR para poder iniciar una hibridación con los arrays.

## ETIOLOGÍA DEL CHANCRO BACTERIANO DEL CHOPO EN ARAGÓN

BIOSCA, E.G.<sup>1</sup>, MARTÍN, S.<sup>1</sup>, ZURIAGA, P.<sup>2</sup>, MONTÓN, C.<sup>3</sup>, LÓPEZ, L.<sup>4</sup> Y LÓPEZ, M.M.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA), Apartado Oficial, 46113 Moncada, Valencia.

<sup>2</sup> Departamento de Sanidad Vegetal, Diputación General de Aragón, 44001, Teruel. <sup>3</sup>Laboratori de Sanitat Vegetal, DARP, 08040 Barcelona. <sup>4</sup>Colección Española de Cultivos Tipo (CECT), Burjassot, 46100 Valencia.

A finales de los noventa se observaron en plantaciones de chopo de Aragón, chancros en el tronco que exudaban un fluido acuoso de color marrón. Dependiendo del grado de afectación, otros síntomas asociados eran clorosis, defoliación, debilitamiento progresivo, y en algunos casos, la muerte de los árboles. Dada la importancia económica del cultivo en Aragón, se realizaron prospecciones para determinar el agente causal, muestreando parcelas afectadas de Teruel y Zaragoza. Como resultado de las prospecciones y el análisis bacteriológico de las muestras se aisló una bacteria cuya morfología colonial era similar a la de ciertas especies del género *Brenneria*, que producen síntomas similares en otras leñosas.

La caracterización bioquímica y fisiológica de los aislados de chopo mediante pruebas convencionales y los sistemas miniaturizados API 20 E, API 20 NE, API 50 CH, API ZYM y el sistema Biolog, ha revelado una alta homogeneidad morfológica, bioquímica y fisiológica de los mismos y ha confirmado la identificación de la bacteria aislada como perteneciente al género *Brenneria*. Estos resultados se confirmaron mediante un análisis de los metil-ésteres de los ácidos grasos celulares (MEAG) de los aislados de *Brenneria* sp. El estudio comparativo de las cepas de chopo con cepas de referencia de las seis especies descritas del género *Brenneria*, reveló diferencias fenotípicas que sugieren que las cepas de *Brenneria* sp. podrían constituir una nueva especie, subespecie o patovar. Los ensayos de patogenicidad de los aislados de chopo se realizaron ensayando distintos métodos de inoculación sobre hojas de chopo y en el tronco de árboles jóvenes. Los resultados de las inoculaciones en tronco confirmaron la dificultad de reproducir, en poco tiempo, los chancros con exudados en árboles inoculados. No obstante, las inoculaciones en hojas de chopo revelaron la utilidad del método para ensayos rápidos de patogenicidad, observándose la producción de necrosis y exudados en una semana.

## ANÁLISIS COMPARATIVO DE MUESTRAS DE SEMILLA DE JUDÍA PARA PRESENCIA DE *Pseudomonas savastanoi* pv. *phaseolicola* MEDIANTE BIO-PCR FRENTE A UN MÉTODO DE REMOJO Y AISLAMIENTO

GONZÁLEZ, A.J. Y FERREIRA, J.J.

S.E.R.I.D.A., carretera de Oviedo s/n, 33300 Villaviciosa. Asturias.

En el presente trabajo se realizó un análisis comparativo de dos métodos de detección de *Pseudomonas savastanoi* pv. *phaseolicola* en lotes de semilla de judía común: un método convencional de remojo y aislamiento (Jansing y Rudolph, 1990, González, 2000) en medios King B (KB) y MSP (Mohan y Schaad, 1987) y otro de nueva propuesta basado en crecimiento bacteriano en medio general a partir del líquido de remojo y posterior detección genética que ha sido denominado "BIO-PCR" (Schaad *et al*, 1995).

Se analizaron 20 muestras (de 225 g. cada una) de judía granja asturiana. Cuatro lotes correspondían a semilla de destrío, 13 a semilla seleccionada (ambas procedentes de parcelas en las que se había diagnosticado "grasa" en el cultivo mediante análisis microbiológico y/o de *visu*) y tres lotes control (semilla seleccionada en una cooperativa y categorizada como sana para su utilización como simiente).

Los resultados mostraron que el medio MSP fue más eficaz para aislar *P. savastanoi* pv. *phaseolicola* que el medio KB, puesto que a partir de dos de las muestras se pudo aislar la bacteria en el primero y no en el segundo. En cuanto a la sensibilidad y especificidad del método BIO-PCR se encontró: a) En semilla de destrío, fue capaz de clasificar correctamente las cuatro muestras ensayadas, siendo tres de ellas positivas y una negativa, en la que se verificó la presencia de *P. syringae* pv. *syringae*. b) En semilla seleccionada, clasificó correctamente como negativas tres de las 13 muestras y como positivas, siete de las 13, dando falsos negativos en tres ocasiones. c) De ninguna de las tres muestras control se pudo aislar la bacteria, aunque en una de ellas se obtuvieron resultados positivos en BIO-PCR, considerándose como un falso positivo.

De las 20 muestras analizadas, en total, el método BIO-PCR dio falsos negativos en tres ocasiones (15%), mientras que sólo detectó un falso positivo (5%), y clasificó correctamente el resto de las muestras (80%).

Como conclusión se apunta que el método BIO-PCR no puede ser propuesto como método de elección para el diagnóstico de "grasa" en lotes de semilla, aunque podría ser un buen apoyo o complemento a los métodos clásicos.

González, A.J. 2000. Tesis Doctoral. Facultad de Biología. Universidad de Oviedo.

Jansing, H., Rudolph, K. 1990. PflKrankh. 97: 42-55

Mohan, S.K., Schaad, N.W. 1987. Phytopathology 77: 1390-1395.

Schaad, N.W., Cheong, S.S. Tamaki, S., Hatziloukas, E., Panopoulos, N.J., 1995. Phytopathology 85: 243-248

## IDENTIFICACIÓN DE *P. syringae* pv. *syringae* Y *P. syringae* pv. *phaseolicola* EN JUDÍAS CON SÍNTOMAS DE BACTERIOSIS EN CASTILLA Y LEÓN

RICO, A.<sup>1</sup>, LÓPEZ, R.<sup>2</sup>, AIZPÚN, M.T.<sup>1</sup>, ASENSIO, C.<sup>2</sup> Y MURILLO, J.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Dpto. Producción Agraria, Univ. Pública de Navarra, 31006 Pamplona

<sup>2</sup> Servicio de Investigación y Tecnología Agraria, Junta de Castilla y León, Apdo. 172, 47080 Valladolid

En las zonas templadas de Europa, las bacteriosis de judía (*Phaseolus vulgaris* L.), causadas principalmente por *P. syringae* pv. *phaseolicola* (Pph) y *P. syringae* pv. *syringae* (Pss), suelen tener alta importancia económica. El control es difícil, y se basa fundamentalmente en la utilización de semilla sana y variedades resistentes. En judía se ha descrito la existencia de resistencia vertical y resistencia no específica contra Pph, y pueden distinguirse nueve razas del patógeno. Castilla y León posee la mayor superficie dedicada al cultivo de la judía de España, ocupada en su mayor parte por variedades locales de alto valor culinario. Estas variedades muestran una alta susceptibilidad a bacteriosis, cuya frecuente ocurrencia hace a menudo inviable el cultivo de la judía. El SITA de Valladolid trabaja desde hace años en un programa de mejora genética integrada, con el objetivo de obtener variedades de judías de calidad con resistencia a bacteriosis. En este trabajo hemos abordado la identificación y caracterización de *Pseudomonas* aisladas de judía, con el fin de apoyar el programa de mejora y desarrollar mejores herramientas moleculares de análisis del patógeno. Para ello, se ha seleccionado una muestra representativa de 152 aislados obtenidos desde 1993 a partir de judías con síntomas de bacteriosis. Para todos los aislados se examinó el conjunto de pruebas LOPAT, la degradación de esculina y caseína, la utilización de diversos compuestos como única fuente de carbono, la producción de fitotoxinas, la patogenicidad en los cultivares diferenciales de judía, y la amplificación de genes de avirulencia (*avrPphF*, *avrPphE*, *virPphA*, *avrPphB*) y virulencia (síntesis de coronatina, etileno y faseolotoxina). Un 91% de los aislados se identificaron como Pph, mientras que el resto (14) se identificaron como Pss. Los aislados de Pph mostraron las características bioquímicas típicas de este patovar y todos produjeron el amplicon correspondiente a *virPphA*, que es esencial para la patogenicidad en judía. La mayoría de los 96 aislados examinados pertenecían a la raza 7 (46 aislados) siguiendo en importancia la raza 6 (19 aislados), y la raza 1 (10 aislados). Sólo se identificaron 1 ó 2 aislados de las razas 2, 5 y 9, así como 16 aislados que podrían representar nuevas razas del patógeno. Los análisis de producción de fitotoxinas *in vitro* y la amplificación por PCR utilizando cebadores específicos, han mostrado que un 68% de los aislados españoles carecen de los genes para la producción de faseolotoxina. Estos resultados indican que en España, Pph podría no ser identificada ni detectada mediante PCR, y reflejan la necesidad de evaluar las técnicas inmunológicas con aislados españoles y diseñar nuevos cebadores para la detección por PCR.

## PRIMERA DETECCIÓN EN ESPAÑA DE *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* EN SEMILLA DE JUDÍA (*Phaseolus vulgaris*)

PALOMO, J.L.<sup>1</sup>, GARCÍA-BENAVIDES, P.<sup>1</sup>, ABELLEIRA, A.<sup>2</sup> Y LÓPEZ, M.M.<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Centro Regional de Diagnóstico. Junta de Castilla y León. Apdo. 61, 37080 Salamanca

<sup>2</sup> Estación Fitopatológica do Areeiro. Diputación Provincial de Pontevedra. Subida a la Robleda s/n, 36153 Pontevedra

<sup>3</sup> Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias. Apdo. oficial. 46113 Moncada (Valencia)

*Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* es una bacteria de cuarentena incluida en la lista B de la Unión Europea, que puede afectar principalmente al cultivo de la judía (*Phaseolus vulgaris*). España ha sido declarada zona protegida frente a esta enfermedad, y para seguir manteniendo esta consideración debe realizar controles periódicos en la producción de semilla de judía.

En Castilla y León se realizan análisis para detectar la presencia de esta bacteria en lotes de semilla de judía certificada desde el año 1994. La metodología de análisis se basa en la maceración de distintas submuestras de cada lote de semillas en una solución de maceración, concentración del macerado mediante centrifugación, resuspensión en una solución de MgSO<sub>4</sub>, y siembra en medio de cultivo. Las colonias con morfología típica se purifican y se caracterizan mediante una serie de pruebas bioquímicas y de poder patógeno.

Durante los años 1999 y 2000 se aislaron, de semilla de judía, cepas cuyo perfil bioquímico se correspondía con el de *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*, sin embargo las inoculaciones realizadas con dichas cepas no mostraron la sintomatología descrita para este patógeno. En el año 2001 se aisló la cepa 01/J1012 de un lote de semilla de judía variedad Rabona procedente de la provincia de León. Los resultados obtenidos en las pruebas bioquímicas realizadas, así como en las galerías API-20E y API-20NE, se correspondían con las descritas en la bibliografía así como con las obtenidas con una cepa de referencia de esta bacteria. Se realizaron inoculaciones en planta de judía, observándose flacidez en hojas, moteado claro y necrosis marginales en todas las plantas inoculadas, tanto con la cepa 01/J1012 como con la cepa de referencia. De las plantas con síntomas se aisló una bacteria cuya caracterización bioquímica coincidía con la cepa inoculada.

La identificación de estas cepas (inoculada y aislada) mediante análisis de los perfiles de ácidos grasos dio como resultado la identificación de *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* en ambos casos con unos coeficientes de 0.548 y 0.623 respectivamente.

El laboratorio de Referencia de Bacteriología (IVIA) confirmó esta identificación mediante caracterización bioquímica, inoculación en vaina de judía y PCR con iniciadores específicos de dicha bacteria.

A raíz de esta detección, y al tratarse de un patógeno de cuarentena, se tomaron las medidas necesarias para evitar la distribución del lote de semillas afectado.



## AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE UNA NUEVA ESPECIE DE *Erwinia*, CAUSANTE DE NECROSIS EN CORIMBOS DE PERAL EN VALENCIA

ROSELLÓ, M.<sup>1</sup>, PEÑALVER, J.<sup>2</sup>, LLOP, P.<sup>2</sup>, GORRIS, M.T.<sup>1,2</sup>, CAMBRA, M.<sup>2</sup>, CHRISTEN, R.<sup>3</sup>, GARDAN, L.<sup>4</sup> Y LÓPEZ, M.M.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio de Bacteriología. CAPA, Ctra. Alicante-Valencia, km. 276,5. 46460 Silla. Valencia.

<sup>2</sup>Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA) Apartado oficial, 46113 Moncada, Valencia.

<sup>3</sup>UMR 6078 CNRS - Université de Nice, 06230 Villefranche sur Mer, France.

<sup>4</sup>UMR Pathologie Végétale INRA-INH-Université, BP59, 49071 Beaucazoué, France.

En la primavera de 1999, 2000 y 2001 se observaron necrosis en corimbos en perales cultivados en Turís, Valencia, durante las inspecciones rutinarias de detección precoz de *E. amylovora*, causante del fuego bacteriano. Esta enfermedad no ha sido detectada nunca en la Comunidad Valenciana. La evaluación de los síntomas en fechas posteriores mostró que no se encontraron lesiones en otras partes de los árboles. Las variedades afectadas fueron Ercolini y Tendral. Tras el procesado de diversas muestras de diferentes campos se aislaron colonias que mostraban una morfología similar a la de *Erwinia amylovora* en los medios CCT, SNA y B de King. Las características metabólicas y fisiológicas de las bacterias aisladas, estudiadas con tests convencionales y con los sistemas miniaturizados API 20 E, API 20 NE, API 50 CH y API Biotype 100, permitieron clasificarla como *Erwinia* sp. Los resultados diferían de los de *Erwinia amylovora* y de los publicados para *Erwinia pyrifoliae*. Cuando se utilizó la inmunofluorescencia indirecta con anticuerpos policlonales empleados para la detección de *Erwinia amylovora* se observó la misma reacción que la que presenta ésta última. Sin embargo se encontraron diferencias respecto de *Erwinia amylovora* frente a anticuerpos monoclonales específicos de ésta, cuando se utilizó la técnica ELISA-DASI. También se observaron diferencias en la amplificación con distintos iniciadores utilizados en la detección de *Erwinia amylovora* mediante PCR. En los bioensayos en inoculaciones realizadas, *Erwinia* sp. fue capaz de inducir reacción de hipersensibilidad en hojas de tabaco cv Xanthi y de tomate cv Roma, pero no produjo exudados tras inocularla en peras inmaduras, ni necrosis en brotes de peral. Tampoco produjo síntomas en otras especies de rosáceas afectadas por *Erwinia amylovora*. En cambio, *Erwinia* sp. necrosó corimbos de peral en bioensayos con flores cortadas o en inoculaciones de perales de tres años y de las flores necróticas se reisoló el patógeno inoculado. La comparación de las secuencias 16S rADN de *Erwinia* sp. y *E. amylovora* y las hibridaciones ADN-ADN realizadas confirmaron que se trata de una nueva especie de *Erwinia*, distinta de las previamente descritas.

## ASOCIACIÓN DE FITOPLASMAS DEL GRUPO APPLE PROLIFERATION (16SrX) SUBGRUPO-D A RETAMAS CON SÍNTOMAS DE ESCOBA DE BRUJA

TORRES, E.<sup>1</sup>, BOTTI, S.<sup>2</sup>, PALTRINIERI, S.<sup>2</sup>, MARTÍN, M.P.<sup>3</sup> Y BERTACCINI, A.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Laboratori de Sanitat Vegetal, DARP, Generalitat de Catalunya, Barcelona, Spain

<sup>2</sup>DiSTA, Patologia Vegetale, University of Bologna, Italy

<sup>3</sup>Real Jardín Botánico, CSIC, Madrid, Spain

En la franja costera de Cataluña se han observado arbustos, tanto espontáneos como ornamentales, de *Spartium junceum* con síntomas de escobas de bruja y decaimiento. Estos síntomas pueden afectar a la totalidad de la planta, aunque lo habitual es observarlos sólo en algunas ramas. Las plantas afectadas también presentan brotación anticipada. Las formaciones en escoba de bruja acaban secándose y el arbusto puede morir en pocos años. Esta enfermedad es un problema importante debido a la amplia distribución de la retama en las regiones mediterráneas y al incremento de plantas afectadas que se está detectando.

Mediante “nested PCR” (doble amplificación), se ha analizado la presencia de fitoplasmas en 9 plantas sintomáticas y 4 asintomáticas procedentes de Barcelona y Gerona. Se han utilizado iniciadores específicos para rDNA de fitoplasmas: el par de iniciadores externos P1/P7 para la primera amplificación y los iniciadores internos U5/U3, R16F2/R2 o R16(X)F1/R1 para la segunda amplificación. La identificación y clasificación de los fitoplasmas se realizó por análisis de RFLP mediante la digestión de los amplímeros obtenidos con R16F2/R2 (1250 bp) con seis enzimas de restricción (*TruI*, *Tsp509I*, *RsaI*, *BfaI*, *ThaI* y *SspI*). Para corroborar la clasificación se realizaron análisis filogenéticos bajo el criterio de parsimonia. Los resultados se resumen a continuación:

- 1) De las extracciones de DNA de las 9 muestras sintomáticas, se obtuvo el producto de amplificación esperado mediante U5/U3 (900 bp); de todas las plantas asintomáticas no se obtuvo amplificado.
- 2) Para comprobar la especificidad de los iniciadores R16(X)F1/R1 del grupo 16SrX (“Apple proliferation”), se ensayaron las extracciones de las plantas T-500 y T-701. Se obtuvieron amplímeros de 1.100 bp.
- 3) Los enzimas *TruI*, *ThaI* y *BfaI* distinguieron claramente los fitoplasmas de *S. junceum* como miembros del subgrupo 16SrX-D.
- 4) El análisis filogenético de la secuencia obtenida de la muestra T-701 (AJ430067) y 45 secuencias homólogas procedentes del GenBank, mostró que la secuencia de retama se agrupa en el clado de “Apple proliferation” (16SrX), con un nivel de confianza del 100% (“bootstrap”). La secuencia de T-701 es casi idéntica a la secuencia (X92869) obtenida a partir del fitoplasma asociado a escobas de bruja en retama en Italia.

## CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LOS FITOPLASMAS ASOCIADOS A FRUTALES DE HUESO CON SÍNTOMAS DE BROTAÇÃO ANTICIPADA

TORRES, E.<sup>1</sup>, MARTÍN, M.P.<sup>2</sup>, BLANCO, V.<sup>1</sup> Y BERTACCINI, A.<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Laboratori de Sanitat Vegetal, DARP, Generalitat de Catalunya, Barcelona.

<sup>2</sup>Real Jardín Botánico, CSIC, Madrid.

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

Se han caracterizado los fitoplasmas asociados a las variedades de frutales de hueso afectadas con síntomas de brotación anticipada en fincas de Cataluña: 7 muestras de albaricoqueros (*Prunus armeniaca*) de los cultivares Canino, Torres, Traver y Kov y 10 muestras de ciruelo japonés (*Prunus salicina*) de los cvs. Songold, Fortune, Freedom, Golden Japan, Angeleno y Sta. Rosa.

La identificación y clasificación de los fitoplasmas se realizó a partir del análisis del gen 16S y parte del espaciador intergénico por los siguientes métodos:

1. Polimorfismo de la Longitud de los Fragmentos de Restricción (RFLP). Los amplímeros obtenidos con los iniciadores R16F2/R2 (1250 bp) se digirieron mediante seis enzimas de restricción (*TruI*, *Tsp509I*, *RsaI*, *BfaI*, *ThaI* y *SspI*). Los patrones obtenidos se compararon con 14 muestras control que pertenecen en su mayoría a la colección de fitoplasmas micropropagados que se mantiene en el laboratorio de DiSTA (Universidad de Bologna).
2. De algunos amplímeros se obtuvieron las secuencias mediante los iniciadores R16F2/R2 o U5/U3. Estas secuencias se compararon, mediante análisis filogenético basado en parsimonia, con 45 secuencias homólogas procedentes del GenBank.

Los patrones RFLP obtenidos indicaron que los fitoplasmas detectados en los cultivares de 9 muestras de *Prunus salicina* y 1 de *P. armeniaca* de Cataluña son molecularmente indistinguibles de otros fitoplasmas del grupo 16SrX (apple proliferation), subgrupo B.

El análisis filogenético de las secuencias obtenidas de 8 muestras de *P. salicina* y 6 de *P. armeniaca*, alineadas con las secuencias homólogas del GenBank, confirmó que los fitoplasmas de los frutales de hueso se relacionan con los fitoplasmas del grupo Apple proliferation (16SrX). El clado en el que se agrupan las muestras mostró un nivel de confianza del 100% (bootstrap); y dentro de este grupo, en el subgrupo B, con un nivel del 84%.

## PRESENCIA DE FITOPLASMAS EN FRUTALES DE HUESO EN CATALUÑA CON SINTOMAS DE “EUROPEAN STONE FRUIT YELLOWS”

TORRES, E.<sup>1</sup>, MARTÍN, M.P.<sup>2</sup>, VILA, A.<sup>3</sup>, MASALLES, R.<sup>4</sup>, LANAU, J.M.<sup>4</sup>, MONTÓN, C.<sup>1</sup> Y BERTACCINI, A.<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Laboratori de Sanitat Vegetal, DARP, Generalitat de Catalunya, Barcelona.

<sup>2</sup>Real Jardín Botánico, CSIC, Madrid.

<sup>3</sup>Agrupació de Defensa Vegetal de la Fruita del Baix Llobregat, St. Vicenç dels Horts.

<sup>4</sup>Universitat de Barcelona, Barcelona.

<sup>5</sup>DiSTA, Patologia Vegetale, Universidad de Bologna, Italia.

Sala (1935) describió en frutales de hueso, en el Baix Llobregat y Lérida, síntomas de brotación invernal y desajustes vegetativos. La situación actual en toda la zona del Baix Llobregat es de una incidencia elevada de ciruelos japoneses y albaricoqueros con estos síntomas.

El estudio se centró en 11 fincas comerciales de la cuenca del Llobregat, durante el año 2001. Se analizaron 17 muestras de frutales de hueso con síntomas: 12 ciruelos (*Prunus salicina*) de los cultivares Freedom, Songold, Fortune, Golden Japan, Angeleno y Sta. Rosa y 5 albaricoqueros (*Prunus armeniaca*) de los cvs. Canino, Torres, Traver y Kov. Se analizaron también 30 árboles adultos asintomáticos situados en fincas afectadas: 6 ciruelos de los cvs. Stanley, Fortune y Golden Japan, 17 albaricoqueros de los cvs. Moniqui y Kov y 6 melocotoneros del cv. Spring Crest.

Se prospectó la flora arvense y arbustiva presente en las parcelas estudiadas. En total se analizaron 30 muestras, de algunas especies de los géneros *Lepidium*, *Rumex*, *Bromas*, *Sonchus*, *Senecio*, *Cynodon*, *Conyza*, *Diplotaxis*, *Oxalis*, *Convolvulus*, *Plantago*, *Chenopodium*, *Kickxia*, *Foeniculum*, *Coriaria*, *Rubus*, *Cistus*, *Pistacia*, *Echium*, *Carduus*, *Amaranthus*, *Senecio*, *Diplotaxis*, *Portulaca*, *Calendula*, *Malva* y *Medicago*.

La detección de fitoplasmas se realizó mediante “nested PCR” (doble amplificación) con iniciadores específicos para rDNA de fitoplasmas: el par de iniciadores externos P1/P7 para la primera amplificación y los iniciadores internos R16F2/R2 para la segunda amplificación.

De todas las extracciones de DNA de muestras sintomáticas, se ha obtenido el producto de amplificación esperado (1250 bp). Se han detectado fitoplasmas en el 10% de frutales asintomáticos: en 1 ciruelo cv. Fortune y en 2 albaricoqueros cv. Kov. Estos árboles han presentado síntomas de brotación anticipada en enero de 2002. No se han detectado fitoplasmas en ninguna de las 30 muestras de flora espontánea analizada.

## ESTUDIO DE LA SENSIBILIDAD DE DIFERENTES VARIEDADES COMERCIALES DE BERENJENA A *Fusarium oxysporum* f. sp. *melongenae* SCHL. (MATUO & ISHIGAMI)

URRUTIA, M<sup>a</sup>.T. <sup>1</sup>, GÓMEZ, V.M<sup>a</sup>. <sup>1</sup> Y TELLO, J.C <sup>2</sup>.

<sup>1</sup> Unidad de Hongos y bacterias. Laboratorio de Sanidad Vegetal. Consejería de Agricultura y Pesca. Junta de Andalucía. La Mojonera. Almería.

<sup>2</sup> Dpto. Producción Vegetal. Escuela Politécnica Superior, Universidad de Almería. La Cañada de San Urbano. Almería.

En octubre de 1998 se diseñó un ensayo para comprobar las posibles diferencias, en respuesta de sensibilidad al patógeno, de cultivares de berenjena de uso extendido en la provincia. Completando, de ésta manera el ensayo de patogeneicidad, en el que se inocularon dos cultivares y, en el que no se manifestaron síntomas, ni se realsló el patógeno en la variedad "Diva".

De las cepas de *Fusarium oxysporum* Schl. aisladas en campo e inoculadas para comprobar su patogeneicidad, se escogieron las tres (una de cada parcela) que habían presentado una mayor agresividad. Las variedades comerciales inoculadas han sido: "Cava", "Diva", "Bonica", "Cynthia" y "Madonna". Las inoculaciones se llevaron a cabo en un invernadero de ambiente controlado y el método de inoculación efectuado fue por riego al sustrato. Se efectuaron tres repeticiones de 10 plantas por variedad y aislado separados en tres bloques. Tras la inoculación se llevo a cabo un seguimiento semanal, para establecer la fecha de aparición de los primeros síntomas, así como la evolución de los mismos con el tiempo. La sintomatología observada se corresponde con la descrita como "amarilleamientos".

En las condiciones en las que se ha llevado a cabo el ensayo todos los aislados inoculados han sido patógenos sobre las cinco variedades de berenjena ensayadas. No han existido diferencias en la exteriorización de la enfermedad entre las diferentes variedades y, por lo tanto, tampoco se puede hablar de resistencia genética vertical en las variedades.

La respuesta de la sensibilidad de las diferentes variedades a la enfermedad dependió tan sólo de aislado inoculado en el caso de los cultivares "Cava", "Diva" y "Madonna". La variedad "Cynthia" es más sensible y "Bonica" es la que presenta una menor susceptibilidad.

## PATOGENEICIDAD Y SINTOMATOLOGÍA DE *Fusarium oxysporum* SCHL. AISLADO DE PLANTAS DE BERENJENA

URRUTIA, M<sup>a</sup>.T. <sup>1</sup>., GÓMEZ, V.M<sup>a</sup>. <sup>1</sup>Y TELLO, J.C <sup>2</sup>.

<sup>1</sup> Unidad de Hongos y bacterias. Laboratorio de Sanidad Vegetal. Consejería de Agricultura y Pesca. Junta de Andalucía. La Mojonera.

<sup>2</sup> Dpto. Producción Vegetal. Escuela Politécnica Superior, Universidad de Almería. La Cañada de San Urbano. Almería.

Desde el año 1990 se ha detectado la presencia de *Fusarium oxysporum* en el xilema de plantas con síntomas de enfermedad vascular en cultivos de berenjena del poniente almeriense.

Durante la campaña 96/97 se realizó una prospección programada a cinco invernaderos bajo plástico de berenjena en la provincia de Almería, en los que se había aislado *Fusarium oxysporum* de los vasos de las plantas con síntomas de traqueomicosis. En campo, se han podido diferenciar claramente dos tipos de síntomas. Uno que fácilmente se puede encuadrar en una sintomatología descrita como “amarilleamientos” (‘yellows’ en inglés), y otra, intermedia entre la anterior y la descrita como “marchitamientos” (‘wilts’ en inglés). Todas las plantas con síntomas de la enfermedad se marchitaban irreversiblemente. Los aislados obtenidos se conservaron en tierra a 4°C.

En la parcela situada en Santa M<sup>a</sup> del Águila, en la que la incidencia de la enfermedad era mayor se realizó un seguimiento más exhaustivo., en la que la incidencia de la enfermedad fue de 130 plantas afectadas (de aproximadamente 3570 plantas), 117 muertas y 13 con síntomas.

Con el fin de comprobar la especificidad parasitaria se inocularon once cepas del patógeno (procedentes de su aislamiento en vasos de tallo, peciolo y pedúnculo) de tres fincas distintas, sobre dos cultivares de berenjena (“Cava” y “Diva”) en tomate y pimiento; confirmándose su especificidad en berenjena, y reproduciendo una sintomatología tipo “yellows”, no siendo patente el oscurecimiento vascular en todas las plantas. Ninguno de los aislados fue patógeno sobre los dos cultivares, ya que la variedad “Diva» se mostró asintomática durante todo el ensayo.

Es la primera cita de *Fusarium oxysporum f.sp. melongenae* en Almería.

## DIAGNÓSTICO MOLECULAR DEL NEMATODO LESIONADOR DE RAÍZ DE CEREALES Y LEGUMINOSAS, *Pratylenchus thornei*

CARRASCO BALLESTEROS, S.<sup>1</sup>, PÉREZ-ARTÉS, E.<sup>1</sup>, CASTILLO, P.<sup>1</sup> Y JIMÉNEZ-DÍAZ, R.M.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Protección de Cultivos, Instituto de Agricultura Sostenible (IAS), Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), Apartado 4084, 14080 Córdoba.

<sup>2</sup> Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos y Montes, Universidad de Córdoba, Apartado 3048, 14080 Córdoba.

Los nematodos lesionadores de raíz del género *Pratylenchus* son endoparásitos migratorios de gran importancia económica y distribución cosmopolita. *P. thornei*, el nematodo lesionador de raíz de cereales y leguminosas, causa zonas necróticas en las raíces de sus huéspedes que en muchos casos pueden llegar a afectar la mayor parte del sistema radical. Además, esta infección se acentúa por la interacción con otros agentes patógenos, como en el patosistema *P.thornei*-garbanzo-*Fusarium oxysporum* f.sp.*ciceris*, influyendo así la respuesta de la planta y la colonización del hongo. Tradicionalmente, la identificación de *Pratylenchus* spp. se ha basado en varios caracteres morfológicos y morfométricos. Dicha identificación se ha visto dificultada por el solapamiento de estos caracteres, que incluso pueden ser influidos por factores ambientales como el clima, el tipo de suelo o la planta huésped. Este problema se ve agravado por la amplia distribución geográfica de estos nematodos, así como por la existencia de poblaciones mixtas en muchos suelos de importancia agrícola. Por ello, es importante disponer de una herramienta rápida y precisa para la identificación de *Pratylenchus* spp., que puede ser de utilidad en el manejo integrado de enfermedades y en la inspección fitosanitaria.

Estudios anteriores han demostrado la utilidad de los análisis RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) en la identificación de nematodos fitoparásitos y en la variación inter-e intraespecífica entre *Pratylenchus* spp.

En este estudio se ha desarrollado una pareja de iniciadores que amplifica un fragmento de ADN específico de *P. thornei*. Además, se discute la aplicación de dicho par de iniciadores a la detección de *P. thornei* en raíces de plantas de garbanzo infectadas, así como en muestras de suelo artificialmente infestadas con dicho nematodo.

## PRESENCIA DE NEMATODOS FORMADORES DE QUISTES EN LOS SUELOS DE CULTIVO DE LA JUDÍA TIPO GRANJA ASTURIANA EN EL PRINCIPADO DE ASTURIAS

ROA, E.<sup>1</sup> Y GONZÁLEZ, A.J.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Consejo Regulador de la Denominación Específica "Faba asturiana", La Mata, Grado. Asturias.

<sup>2</sup> Laboratorio de Fitopatología. SERIDA. Carretera de Oviedo s/n, 33300 Villaviciosa. Asturias.

La presencia de nematodos formadores de quistes en suelos se analizó en 123 muestras de tierra de cultivo de judía tipo granja asturiana, en un 40% de las mismas se había sembrado judía durante 1-2 años, en un 46% de 3-5 años y en un 5% más de 5 años. Además se incluyeron otras 20 parcelas en las que se iba a iniciar el cultivo y en las que nunca se habían cultivado judías.

El método de muestreo fue el habitual, tomando varios puntos en cada parcela y homogenizando y tamizando la muestra en laboratorio, recogiendo los quistes en una malla, lavándolos con acetona y filtrándolos para identificarlos al microscopio.

Del total de parcelas analizadas (143) se han encontrado quistes en el 24%. Las poblaciones de nematodos encontradas en las parcelas positivas han sido de medias a nulas, siendo la más alta de 8 quistes/100g. Este valor se considera un grado de infestación moderado y se encontró en una parcela que fue erial durante años y en la que nunca se habían sembrado judías.

Los quistes encontrados correspondieron a los géneros *Heterodera* y *Globodera*.

De los resultados obtenidos parece deducirse que no existe relación entre el número de quistes encontrado con el porcentaje de arena del suelo y con el pH; mientras que si parece existir una relación con el porcentaje de materia orgánica presente en el suelo. Los máximos obtenidos en presencia de quistes parecen coincidir con los mínimos en materia orgánica del suelo.

En cuanto a la práctica habitual del estercolado, de las parcelas estudiadas, el 71% había recibido aporte de estiércol y de ellas el 73% tuvo una infestación nula, frente al 65,8% de infestación nula entre las que no se aportó estiércol.

Por último, la inclusión en el muestreo de dos parcelas en las que se sembraron judías durante 10 años con 2 y 3 quistes/100 g. respectivamente, y otras tres con infestación nula (en dos se habían sembrado judías durante 10 años y en la tercera durante 20 años), nos lleva a plantearnos si en el caso de la judía granja asturiana, la siembra reiterada en una misma parcela constituye un factor que favorezca el incremento de las poblaciones de nematodos formadores de quistes o por el contrario están pesando más otros factores como, por ejemplo, el alto porcentaje de materia orgánica del suelo para que este aumento no se produzca.



## PRIMERA DETECCIÓN EN ESPAÑA DE UN AISLADO DEL TSWV EN TOMATE QUE SOBREPASA LA RESISTENCIA CONFERIDA POR EL GEN SW-5

ARAMBURU, J.<sup>1</sup>, CRESCENTI, A.<sup>1</sup> Y MARTI, M.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>IRTA. Departamento De protección Vegetal. Crta. de Cabriels s/n. 08348 Cabriels. Barcelona.

<sup>2</sup> ADV del Baix Maresme

El TSWV causante de la enfermedad del bronceado en tomate es uno de los virus mas ampliamente distribuidos en todo el mundo y responsable de ocasionar cuantiosas perdidas económicas. Después de su llegada a España pasó a ser el factor que más limitó el cultivo de tomate en toda la franja Mediterránea, hasta la introducción de híbridos comerciales que incorporaban una resistencia natural conferida por el gen dominante SW-5, proveniente de *Lycopersicum peruvianum*, que atajó muy eficazmente la epidemia en este cultivo.

Durante el año 2001 se observó la aparición de plantas de tomate infectadas por este virus, en una parcela plantada con el híbrido Bodar de Seminis (resistente al TSWV), en una proporción algo superior a lo que se podría admitir por la penetración incompleta del gen SW-5. Esta situación se ha vuelto a repetir durante esta primavera, en el mismo lugar y con la misma variedad, llegando a alcanzarse incidencias superiores al 30% en la mitad del periodo de cultivo.

En primer lugar se ha comprobado la autenticidad de la semilla, se ha confirmado la presencia de marcadores del gen SW-5 mediante PCR y se han reproducido los síntomas de infección mediante la inoculación del virus en un grupo de plántulas procedente del mismo lote de semillas, que fueron positivos a TSWV mediante la técnica ELISA. Finalmente, se ha probado la infectividad de este aislado por inoculación en lotes de plantas de distintos híbridos de tomate comercial (entre las que se incluyeron semillas de Bodar) que en un estudio realizado hace 4 años frente a diferentes aislados de TSWV se habían comportado como resistentes por llevar incorporado el gen SW-5. La infección sistémica se observó después de 10 días, a pesar de que en una parte de las hojas directamente inoculadas se formaron las manchas necróticas típicas de la reacción de hipersensibilidad desencadenada por el gen de resistencia.

Todos estos resultados confirman la presencia de una variante del virus capaz de sobrepasar la resistencia conferida por el gen SW-5, al que se le ha atribuido el poseer un largo espectro de acción frente a distintas variantes dentro del genero Tospovirus. Solamente en Sudáfrica se ha descrito la existencia de una variante natural que sobrepasó esta resistencia en 1993, pero no llego a establecerse en años sucesivos como una epidemia. En nuestro caso, sin embargo, las observaciones de campo parecen indicar que esta variante sigue conservando una eficiente capacidad de diseminación a través del insecto vector, *Frankliniella occidentalis*, lo que de nuevo podría condicionar en un futuro no muy lejano el cultivo de tomate en exterior.

## EVALUACIÓN DE LA SENSIBILIDAD/TOLERANCIA DE ESPECIES DE CÍTRICOS Y GÉNEROS AFINES A LOS VIROIDES DE LOS CÍTRICOS

BARBOSA, C.J., PINA, J.A., NAVARRO, L. Y DURAN-VILA, N.

*Departamento de Protección Vegetal y Biotecnología. Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias. Apartado Oficial. 46113 Moncada (Valencia).*

En cítricos se han descrito 5 especies de viroides entre las que se encuentran los agentes causales de dos enfermedades de importancia económica, la exocortis causada por el viroide de la exocortis de los cítricos (CEVd) y la cachexia causada por determinadas variantes del viroide del enanismo del lúpulo (HSVd). Sin embargo el efecto de los viroides en especies no comerciales de cítricos y géneros afines no ha sido evaluado. En este trabajo se describen los resultados obtenidos al evaluar la sensibilidad de 31 accesiones de Banco de germoplasma del IVIA en vistas a su utilización en programas de mejora.

Se realizaron propagaciones de estas accesiones mediante injerto en el patrón limonero rugoso y se inocularon con una mezcla artificial de las cinco especies de viroides. Las plantas inoculadas se mantuvieron en invernadero a 25-32°C durante 5 años y se realizaron evaluaciones periódicas del contenido en viroides y la manifestación o no de síntomas.

La infectividad y el título de cada uno de los viroides inoculados se determinó mediante el análisis de preparaciones de ácidos nucleicos por sPAGE e hibridación molecular. El título de cada uno de los viroides varió considerablemente dependiendo de la combinación viroide/huésped. No se detectó ninguno de los viroides inoculados en *Atalantia citroides* ni en *Microcitrus australis*, lo que indica que estas especies pudieran ser resistentes.

La comparación del título viroidal obtenido a partir de extractos de corteza con el obtenido a partir de los tejidos de limbo foliar mostró que en 10 de las especies ensayadas, determinados viroides podían detectarse a partir de la corteza pero no a partir de los tejidos del limbo foliar. Esta observación sugiere que aunque las infecciones con viroides son sistémicas, en determinadas combinaciones viroide/huésped, existen limitaciones para el movimiento del viroide desde los tejidos vasculares al resto de la planta.

La mayoría de accesiones estudiadas se comportaron como portadores asintomáticos. Solamente *Citrus excelsa*, *C. ichangensis*, *C. karna*, *C. meyeri*, *C. latifolia* and *C. pyriformis* desarrollaron síntomas.

## CARACTERIZACIÓN BIOLÓGICA DE AISLADOS ESPAÑOLES DEL VIRUS DEL MOSAICO DE LA SANDÍA 2 (WMV-2)

DÍAZ, J.A.<sup>1</sup>, FRAILE, A.<sup>2</sup>, ARANDA, M.A.<sup>1,3</sup> Y MORIONES, E.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Estación Experimental «La Mayora», CSIC, 29750 Málaga

<sup>2</sup> Departamento de Biotecnología, ETSI Agrónomos, 28040 Madrid.

<sup>3</sup> Dirección actual: Centro de Edafología y Biología Aplicada del Segura (CEBAS)-CSIC. Campus Universitario de Espinardo, 30100 Murcia.

El melón (*Cucumis melo* L.) es una especie hortícola de gran importancia económica en España donde un 75% de la producción se realiza en cultivos al aire libre. En estos cultivos las enfermedades virales transmitidas por pulgones que ocasionan mosaicos son, frecuentemente, el factor limitante para la producción. De los aproximadamente 30 virus diferentes descritos en cucurbitáceas, en los cultivos de melón realizados al aire libre en España se han detectado el cucumovirus del mosaico del pepino (CMV), y los potyvirus de las manchas anulares de la papaya W (PRSV-W), del mosaico de la sandía 2 (WMV-2), y del mosaico amarillo del calabacín (ZYMV), de los que CMV y WMV-2 son los más frecuentes (Luis-Arteaga et al., 1998. *Plant Disease* 82:979-982.). Se dispone de una amplia colección de aislados de WMV-2 recogidos en las principales regiones productoras de melón al aire libre españolas durante un amplio muestreo realizado entre 1994 y 1999. Una parte de estos aislados (45 aislados) se han clonado biológicamente mediante pases sucesivos de lesiones locales en *Chenopodium amaranticolor* y *C. quinoa* y posterior multiplicación en *Cucurbita pepo*. Se ha estudiado la variabilidad genética de estos aislados y en este trabajo se presenta la caracterización biológica de una parte (21 aislados) de ellos representativos de diferentes epidemias y regiones geográficas. Se ha estudiado la sintomatología ocasionada en una serie de huéspedes vegetales representativos de diferentes familias (Cucurbitáceae, Fabaceae, Solanaceae, Chenopodiaceae, Amaranthaceae, y Lamiaceae) tras inoculación mecánica de los mismos. Los resultados indican que no existen grandes diferencias entre los diferentes aislados en su capacidad de infectar los distintos huéspedes lo que sugiere cierta homogeneidad biológica en la población analizada. Sí se ha observado alguna diferencia en la agresividad de los aislados en alguno de los huéspedes incluidos en el estudio.

## INTRODUCCIÓN DE RESISTENCIAS A GRASA Y MOSAICO EN VARIETADES LOCALES DE ALUBIA DE LA COMUNIDAD AUTÓNOMA VASCA

DIEZ-NAVAJAS, A.M., RUIZ DE GALARRETA, J.I., MARQUÍNEZ, R. Y LEGORBURU, F.J.

*NEIKER-Instituto Vasco de Investigación y Desarrollo Agrario*. Granja Modelo de Arkaute, Apartado 46, 01080 VITORIA/GASTEIZ

Los daños que afectan al cultivo de la alubia (*Phaseolus vulgaris* L.) están provocados por patógenos ampliamente distribuidos. En la Comunidad Autónoma Vasca provocan grandes pérdidas y disminución de los rendimientos en las variedades locales: Gernikesa, Tolosana y Alavesa.

El cultivo se ve principalmente afectado por la bacteria *Pseudomonas axonopodis* pv. *phaseolicola*, que causa la “grasa” y los virus del mosaico común (BCMV) y necrótico (BCMNV), que pueden provocar pérdidas de hasta el 40% de la cosecha.

Estos patógenos presentan un poder dañino elevado, ya que unas pocas semillas infectadas son suficientes para iniciar una epidemia bajo condiciones favorables. Las pérdidas económicas debido a los mismos son cuantiosas y la comercialización de las semillas se hace costosa.

Para reducir los daños provocados por las bacterias se tratan las semillas con antibiótico (antes Streptomina, actualmente no recomendado, ahora con Kasugamicina) y posteriormente la planta con una dilución de cobre (Cuproxtat®).

Respecto a los virus, puesto que estos se transmiten por áfidos, se ha propuesto la utilización de mallas térmicas o mallas antipulgón cubriendo las parcelas para evitar el contacto de los mismos con la planta; pero esto resulta inviable cuando las parcelas son grandes y en campos de agricultor, debido a la carestía del método, principalmente. Sin embargo, estos métodos sí son apropiados para la producción de semilla.

Frente a estos tratamientos preventivos y a corto plazo, con vistas al largo plazo se ha llevado a cabo la introducción de genes de resistencia a “grasa” y a los virus del mosaico y necrótico (gen *l* y gen *bc-3*) en las variedades de alubia arriba mencionadas, mediante un programa de cruzamientos y selección de las semillas obtenidas.

## ESTUDIO PRELIMINAR SOBRE LA DISTRIBUCIÓN DEL *Virus del cribado del melón* (MNSV) EN PLANTAS DE MELÓN

GOSÁLVEZ, B., LORCA, A., PALLÁS, V. Y SÁNCHEZ-PINA, M.A.

*Departamento de Mejora y Patología Vegetal. CEBAS-C.S.I.C. Campus Universitario de Espinardo. 30100 Murcia. Instituto de Biología Celular y Molecular de Plantas (UPV-CSIC). Avda. de los Naranjos s/n. 46022 Valencia*

El virus del cribado del melón (MNSV) es un *Carmovirus* que se transmite a través del hongo quitridiomicete *Olpidium bornovanus* y afecta a los cultivos de cucurbitáceas, en especial al melón en cultivo hidropónico. La sintomatología de la enfermedad en hoja se manifiesta con manchas cloróticas que finalmente se hacen necróticas y forman un enrejado necrótico a lo largo de las nerviaciones. En la base de los tallos se producen estrías y en los frutos pueden aparecer manchas necróticas que impiden su comercialización. En el presente trabajo se ha realizado un estudio sobre la distribución del MNSV en plantas de melón inoculadas mecánicamente utilizando tres técnicas complementarias: la hibridación molecular no radioactiva tipo 'dot-blot' (DB) y 'tissue-printing'(TP), así como la hibridación *in situ* (HIS) al microscopio óptico. El trabajo incluye desde los primeros estadios de la infección (1 día post inoculación), momento en que la primera hoja verdadera no se ha formado todavía, hasta 20 dpi cuando las plantas poseen 3 hojas verdaderas. Tal y como era de esperar, ya que la inoculación se realiza en los mismos, son los cotiledones los únicos que presentan un muy elevado nivel de infección desde los primeros estadios hasta los últimos, lo que se observa con las tres técnicas empleadas, mostrando, mediante TP, una distribución no homogénea localizada sobre los síntomas observados y exclusivamente en la zona sintomática mediante HIS. Respecto a los otros órganos de la planta estudiados, son las raíces las que presentan los niveles mas altos de infección después de los cotiledones, pero la señal en las mismas no aparece hasta los 4 dpi en los DB, siendo, mediante t-p, heterogénea al principio, pero sobre toda su longitud, para hacerse homogénea y muy fuerte a partir de los 7 dpi. En cuanto al tallo, mediante DB, se observa señal débil en todos los estadios estudiados, mediante TP, señal en cortes transversales y longitudinales, presentando en estos últimos una distribución heterogénea, que suele ser más fuerte en la zona basal que comunica con la raíz. Las hojas verdaderas muestran señal en los DB, desde los estadios de desarrollo tempranos que corresponden a los 4 dpi, con una distribución heterogénea en los TP, que parece corresponder a los síntomas observados, lo que es más claro a partir de 7 dpi donde el tamaño de la hoja permite distinguirlos claramente. Con el fin de completar este trabajo estudiaremos la distribución en los peciolo de cotiledones y de hojas verdaderas, así como en el brote apical mediante TP e HIS, discutiremos los resultados obtenidos y los compararemos con otros *carmovirus* estudiados previamente.

## EFEECTO DEL CULTIVO DE VARIEDADES RESISTENTES Y SENSIBLES SOBRE LA PROPORCIÓN DE TYLCV-Is / TYLCV-Sar EN PLANTACIONES DE TOMATE DEL SURESTE ESPAÑOL

HERNÁNDEZ-GALLARDO, M.D., GUERRERO, M.M., BARCELÓ, N., MIGUEL, M., ALCÁZAR, A., GENIS, J.L. Y LACASA, A.

*Centro de Investigación y Desarrollo Agroalimentario, Consejería de Agricultura, Agua y Medio Ambiente, C/ Mayor s/n, 30150 La Alberca (Murcia).*

El virus del rizado amarillo del tomate (TYLCV) causa graves daños en los cultivos de tomate del sureste español. El control del vector, *Bemisia tabaci*, por medios químicos, biológicos, culturales o integrados, ha resultado insuficiente para paliar los efectos de la virosis cuando se producen explosiones demográficas de la mosca blanca en el verano. La utilización masiva de variedades resistentes a TYLCV puede provocar cambios en las poblaciones del virus y modificaciones en la epidemiología de la virosis, que es preciso conocer para establecer las estrategias para el adecuado manejo de las resistencias.

Durante la campaña 2000/01 se ha realizado una prospección en los cultivos de tomate de Murcia, cuando se han empezado a cultivar variedades resistentes. Se ha determinado la proporción de aislados de TYLCV-Is/TYLCV-Sar en plantaciones de variedades resistentes y sensibles, tanto en plantas como en adultos de *B. tabaci*. El diagnóstico, tanto en planta como en insecto, se ha realizado mediante hibridación molecular con sendas sondas específicas de las dos especies virales.

En variedades resistentes, muestreadas por síntomas, la proporción TYLCV-Is/TYLCV-Sar media fue 10 y de 9 cuando se muestrearon plantas sin síntomas. En esas plantaciones la proporción de aislados en adultos de *B. tabaci* fue 1, con más del 60% de los adultos portadores del virus. En las variedades sensibles la relación TYLCV-Is/TYLCV-Sar fue también 10 cuando se muestrearon plantas con síntomas, mientras que cuando se muestrearon plantas sin síntomas la relación estuvo comprendida entre 4 y 5, siendo inferior a 1 la proporción en los adultos de *B. tabaci*, con más del 70% de los adultos como portadores del TYLCV-Sar.

La elevada proporción de adultos portadores de TYLCV-Sar no se corresponde con la escasa presencia de este aislado en las plantas, sobre todo en las variedades resistentes, donde es mayoritariamente detectado el TYLCV-Is. Serán precisos ensayos más detallados para explicar este último hecho. Se hace patente la presencia masiva y casi exclusiva de TYLCV-Is en algunas variedades resistentes, lo que podría inducir a un proceso de selección cuando se generalice, tanto en el espacio como en el tiempo, el cultivo de variedades resistentes.

## TRANSMISIÓN ARTIFICIAL DE MNSV A MELÓN MEDIANTE INOCULACIÓN MECÁNICA Y CON EL HONGO VECTOR *Olpidium bornovanus*

MALLOR, C., ÁLVAREZ, J.M. Y LUIS-ARTEAGA, M.

Servicio de Investigación Agroalimentaria, D.G.A., Apartado 727. 50080 Zaragoza

El virus de las manchas necróticas del melón (MNSV) es uno de los de mayor incidencia en los cultivos protegidos de melón del litoral mediterráneo español. El vector natural de este virus es el hongo del suelo *Olpidium bornovanus* (Satiyanci) Karling y también es transmitido por la semilla de melón.

Tras la inoculación mecánica artificial con MNSV, las plantas de melón pueden presentar tres comportamientos diferentes: reacción local (lesiones necróticas) sin reacción sistémica, reacción local y reacción sistémica (mosaico con manchas cloro-necróticas en hojas y estrías necróticas en tallos y peciolo), y ausencia de reacción. Este último comportamiento lo presentan las variedades portadoras del gen *nsv* en homocigosis que les confiere resistencia a MNSV. En la variedad 'Doublon' se ha observado que tras la inoculación mecánica todas las plantas reaccionan sólo de forma local y el virus queda restringido al tejido de las lesiones necróticas; este comportamiento se ha observado en diferentes condiciones ambientales y es un carácter heredable. El objetivo de este trabajo es verificar si la ausencia de síntomas sistémicos se mantiene cuando la inoculación se realiza mediante el hongo vector *O. bornovanus*. Se presentan los resultados obtenidos sobre localización del virus en las plantas comparando dos métodos de inoculación artificial: inoculación por el hongo vector e inoculación mecánica, utilizando tres variedades de melón ('PMR-5', 'ANC-42' y 'Doublon') que difieren en su comportamiento frente al virus en inoculación mecánica artificial.

La variedad 'PMR-5' no presentó síntomas en las plantas inoculadas mecánicamente; cuando se inocularon utilizando el vector, la parte aérea no mostró síntomas y el virus se detectó por ELISA sólo en las raíces, que presentaron desarrollo normal respecto al testigo sin inocular y coloración parda en algunas zonas. La variedad 'ANC-42' desarrolló síntomas severos con los dos métodos de inoculación. Las plantas de la variedad 'Doublon' inoculadas mecánicamente, reaccionaron con lesiones locales necróticas sin síntomas sistémicos, quedando el virus restringido a la zona de las lesiones. Cuando la inoculación se hizo con *Olpidium*, las plantas de 'Doublon' mostraron síntomas leves de necrosis en la base del tallo y pardeamiento en algunas zonas del sistema radicular, donde se detectó MNSV; no hubo síntomas en las hojas y el desarrollo de las plantas fue similar al del testigo sin inocular.

La resistencia conferida por el gen *nsv* es la única descrita para MNSV y es superada por aislados del virus descubiertos recientemente en España. A la vista de los resultados obtenidos, parece necesario profundizar en el comportamiento de 'Doublon' para verificar si puede constituir una nueva forma de resistencia al virus.

## EFFECTO DE LA TEMPERATURA SOBRE LA RESISTENCIA MEDIADA POR EL GEN L<sub>3</sub> DE *Capsicum chinense* FRENTE A LOS TOBAMOVIRUS

MOLINA GALDEANO, M., GUEVARA, M.A., GARCÍA LUQUE, I. Y SERRA, M.T.

*Departamento de Biología de Plantas. Centro de Investigaciones Biológicas. C.S.I.C.*

C/ Velázquez, 144. 28006. Madrid.

Los tobamovirus constituyen uno de los principales agentes etiológicos de las virosis de los cultivos de pimiento. La resistencia frente a los tobamovirus en el género *Capsicum* está conferida por cuatro genes diferentes L<sub>1</sub>-L<sub>4</sub>, considerados alelos del locus L (Boukema, 1980. *Euphytica* 29:433; Gilardi *et al.*, 1999. *Recent Research Developments in Virology*. Vol I, pp 547. S.G. Pandalai (Ed.) Transworld Research Network.). Esta resistencia es un proceso activo, que se manifiesta mediante la formación de lesiones locales necróticas (LLN) y corresponde a una respuesta hipersensible (HR).

Para profundizar en el estudio de la resistencia conferida por el gen L<sub>3</sub> en plantas de *C. chinense* frente a los tobamovirus, hemos analizado la influencia de la temperatura sobre su expresión. Para ello, las plantas fueron inoculadas con las cepas virulenta (I) y avirulenta (S) del virus del moteado suave del pimiento (PMMoV) y mantenidas a distintas temperaturas. En todos los casos (25, 30, 32 °C), PMMoV-I infectó de forma generalizada las plantas, mientras que la infección por PMMoV-S quedó localizada en las hojas inoculadas, con la consiguiente formación de LLN, en todas las plantas cultivadas a 25°C (100%) y en algunas de las mantenidas a 30°C (75%), Por el contrario, en las plantas cultivadas a 32°C, se produce su infección sistémica a partir de las 48 hpi, indicando que la resistencia no es activa a esta temperatura. No obstante, la reducción a 25°C de la temperatura de cultivo de las plantas infectadas sistémicamente con PMMoV-S produce la formación de LLN y la inducción de los genes marcadores de la respuesta de defensa de la planta PR1 y PR4.

El análisis de las tasas de acumulación de ambas cepas virales en las plantas cultivadas a 25 y 32°C mostró que la acumulación de PMMoV-I en las hojas sistémicas de las plantas cultivadas a 32°C es 1,5-2,5 veces inferior a la de la cepa S, y 1,5-4 veces inferior a la de las plantas cultivadas a 25°C. Estos resultados indican que el incremento de la temperatura afecta negativamente la acumulación de la cepa virulenta de PMMoV.



MEJORAMIENTO GENÉTICO EN *Capsicum* VERSUS VARIABILIDAD VIRAL

CUNHA, L.C.V.<sup>1</sup>, NAGATA, A. I.<sup>2</sup> Y RESENDE, R.O.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Lab. de Virologia e Microscopia Eletrônica, Depto. de Biologia Celular, UnB, 70919-970, Brasília/DF

<sup>2</sup>Embrapa Hortaliças, Brasília, DF, Brasil; e-mail: resende@unb.br.

Buscando genotipos de *Capsicum*, resistentes a Tospovirus y Potyvirus, fueron estudiados un total 361 genotipos de *Capsicum*, y así, fueron seleccionados genotipos presentando resistencia específica o múltiple a estos virus. En *C. annuum* casi 51% de los genotipos mostraron resistencia a Tospovirus y Potyvirus, entretanto que ese porcentaje fue superior en las otras especies, obteniéndose 54,9% en *C. baccatum*, 74,7% en *C. frutescens* y 78,9% de los genotipos seleccionados en *C. chinense*. Esto evidencia que esas especies constituyen una fuente importante de resistencia para ser usada en programas de mejora genética de *Capsicum* para la resistencia a virus. Con relación a los *Potyvirus*, estos han sido detectados con cierta frecuencia en cultivos comerciales de pimentón y tomate. En contraste, pocos trabajos han sido realizados apuntando al conocimiento de su variabilidad, tanto en condiciones de campo, cuanto en especies aisladas para selección de fuentes de resistencia. El presente trabajo pretendió también caracterizar a nivel biológico, serológico y molecular cuatro aislados de *Potyvirus*, siendo Sa66 y Sa115 procedentes de pimentón, y IAC3 y Sa21 de tomate. Los datos biológicos indicaron la existencia de nuevas especies de *Potyvirus*, nunca descritos en Brasil. Utilizando el tests de DAS-ELISA para los aislados, se vio que no había reacción con el anti-suero para PVY en ningún aislado. Por otro lado, todos los aislados dieron positivos con el anti-suero para PepYMV, aunque se observaron diferencias significativas en la intensidad de reacción entre los diferentes aislados. Como parte de este trabajo se hizo la secuenciación del gen de la proteína de la cápsida (CP) y de la región 3' no traducible (3'-NTR) de su genoma y a través del análisis de la secuencia de aminoácidos deducida para la CP, se vio una alta identidad en todos los aislados estudiados con PepYMV, variando esta identidad de 97 a 99%, siendo el porcentaje de identidad con otros Potyvirus entre 69 y 80%. Estos datos indican que los aislados analizados son algunas variantes de PepYMV. Estos resultados fueron confirmados a través del análisis de secuencia de nucleótidos de la 3' NTR, la cual dio 97 a 98% de homología para PepYMV, entretanto, que ese porcentaje con otros Potyvirus varió de 47 a 71%. El análisis del árbol filogenético construido para la secuencia de aminoácidos de la CP, mostró que los aislados fueron agrupados según el huésped de origen.

## DESARROLLO DE UN SISTEMA ESTABLE DE EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS EN LEGUMINOSAS, EMPLEANDO LOS RNAs DEFECTIVOS INTERFERENTES DEL VIRUS MOTEADO DEL HABA (BBMV)

SANDOVAL, C., LARENAS, J., CASTRO, S. Y ROMERO, J.

*Departamento de Protección Vegetal. INIA. Carretera de La Coruña Km. 7,0. 28040 Madrid.*

Existen dos estrategias en plantas para producir proteínas de interés comercial: a) transformación genética de plantas con un determinado gen y b) infección con vectores virales. Durante los últimos años, muchos estudios han sido hechos para evaluar la expresión de genes foráneos en vectores de plantas basados en genomas virales. El uso de vectores virales tiene algunas ventajas sobre las plantas transgénicas, como la producción de proteínas en un tiempo determinado, el poder probarlas en diversas plantas, el poder usar el mismo vector para la producción de proteínas diferentes y su utilización podría evitar fenómenos indeseables como el silenciamiento génico o la co-supresión que generalmente sucede en las plantas transgénicas. El virus del moteado del haba (BBMV) es un miembro del género Bromovirus en el cual se han descrito en algunas razas la presencia de RNAs defectivos interferentes derivados de una deleción interna del RNA-2 que mantiene la ORF de la proteína 3a expresando una proteína truncada (Romero *et al.*, 1993). En este trabajo describimos el desarrollo de un vector viral basado en los DI-RNAs del BBMV. El gen de la proteína fluorescente de la medusa GFP fue insertado como un producto de fusión en el plásmido pMo71 (Pogany *et al.*, 1995) dando lugar al pMo71-GFP. Plantas de haba y guisantes fueron inoculados con RNA viral de BBMV y transcritos RNAs sintetizados *in vitro* a partir del clon pMo71-GFP. Las plantas fueron analizadas diariamente en un microscopio epifluorescente para observar la expresión de la proteína GFP, la cual se manifestó a partir del tercer día después de la inoculación. La estabilidad de la producción de la GFP fue estudiada realizando pases seriados del virus conteniendo el DI-RNA quimérico a partir de plantas mostrando síntomas a otras plantas sanas, después de 7 pases el DI-RNA quimérico conteniendo el gen de la GFP estaba todavía presente en las plantas analizadas y la fluorescencia observada en el microscopio era similar a la de la primera inoculación. Igualmente plantas inoculadas con el virus y el DI-RNA quimérico fueron mantenidas en el invernadero durante 90 días, observando que después de ese periodo las plantas seguían mostrando la expresión de GFP. Estos resultados nos indican que los DI-RNAs del BBMV pueden constituir un sistema estable de expresión de proteínas en leguminosas, con las ventajas inherentes de expresar proteínas en estas plantas que constituyen una fuente importante de proteínas en la alimentación animal y que se usan como remediadores de los suelos agrícolas.

## EFFECTO DEL PATRÓN INTERMEDIO EN EL MOVIMIENTO A LARGA DISTANCIA DEL *Plum pox virus* EN ALBARICOQUERO

RUBIO, M., MARTÍNEZ-GÓMEZ, P. Y DICENTA, F.

*Dpto. de Mejora y Patología Vegetal. Centro de Edafología y Biología Aplicada del Segura (CSIC). Campus Universitario de Espinardo. Apartado 4195. CP: 30100 Murcia.*

En este trabajo se ha estudiado la implicación de la madera intermedia en el movimiento del *Plum pox virus* (PPV, sharka) a larga distancia a través de la planta en albaricoquero. El melocotonero 'GF305' se utilizó como patrón por su elevada susceptibilidad al PPV, injertando sobre él como patrón intermedio 20 repeticiones del propio 'GF305' clonal (testigo susceptible), y las variedades de albaricoquero 'Stark Early Orange' (resistente) y 'Canino' (susceptible). A su vez, todos los patrones intermedios se injertaron con yemas provenientes de plantas de 'GF305' infectadas con sharka que mostraban cuantiosos síntomas de la enfermedad, para así garantizar la inoculación. Los estudios se realizaron en invernadero sellado, aplicándoles a las plantas periodos de letargo artificial mediante tratamientos en cámara fría a 7°C. Durante dos ciclos de estudio se procedió a la observación de síntomas y la realización de la prueba ELISA-DASI en todos los materiales implicados en el ensayo, patrón, patrón intermedio y variedad injertada. Cuando las yemas de 'GF305' brotadas mostraron síntomas, se consideró que la inoculación había sido efectiva y se procedió al estudio de la distribución del virus en el patrón intermedio de albaricoquero y en el patrón 'GF305'. Después de dos ciclos de estudio las plantas realmente inoculadas fueron 3 en el caso del 'GF305' y 'Stark Early Orange' utilizados como patrón intermedio, y 8 en el caso de 'Canino'. Los resultados mostraron el paso del virus a través del 'GF305' y la variedad 'Canino', mientras que la variedad Stark Early Orange no permitió el paso del virus a través de ella.

## EVALUACIÓN DE LA RESISTENCIA A LA TRANSMISIÓN DE TRES AISLADOS DEL *Potato virus Y* POR *Myzus persicae* Sulz. EN VARIEDADES DE PATATA

SALAS, F.J.S.<sup>1</sup>, LOPES, J.R.S.<sup>2</sup> Y FERERES, A.<sup>3</sup>

<sup>1</sup> *Becario - CNPq /Brasil. Laboratório de Fitovirologia e Fisiopatologia. Instituto Biológico.*

São Paulo (SP), Brazil. CP 04014-002.

<sup>2</sup> *Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", ESALQ-USP. Piracicaba/SP, Brazil. CP 13418-970*

<sup>3</sup> *Centro de Ciencias Medio Ambientales. Consejo Superior de Investigaciones Científicas. Madrid, España. CP 28006.*

Brasil es el cuarto productor de patata en Latinoamérica, donde es un cultivo en amplio crecimiento. El estado de São Paulo es responsable de la 2ª producción del país totalizando 676.130 t. Actualmente la infección por el virus y de la patata (PVY) crece en importancia probablemente debido al incremento poblacional del principal vector – *Myzus persicae* – y a la aparición de cepas del virus mas agresivas. Se ha realizado la caracterización de los principales aislados virales en las regiones productoras evaluando los niveles de resistencia de las 4 principales variedades cultivadas (Agata, Jaette Bintje, Mondial e Monalisa) frente a la transmisión del PVY por *M. persicae*. Se realizaron muestreos de plantas con síntomas de etiología viral en varios municipios de Brasil. Se identificaron los aislados de PVY mediante ELISA y por inoculación mecánica en huéspedes diferenciales. Posteriormente, en estudios de transmisión por pulgones, se emplearon aislados españoles del virus (PVY<sub>O</sub>, PVY<sub>N</sub> e PVY<sub>NTN</sub>). Inicialmente se hizo un ensayo de transmisión (mecánica y por áfidos) con la finalidad de comprobar la transmisibilidad de los aislados. Para tal efecto, se utilizaron los 3 aislados y las variedades de patata antes mencionadas. También se realizaron varios ensayos para evaluar la resistencia varietal por antibiosis y no preferencia por libre elección al principal vector, *M. persicae*. Los resultados obtenidos mostraron que los aislados de PVY detectados en los campos de producción de Brasil fueron: PVY<sub>O</sub>, PVY<sub>N</sub> y PVY<sub>C</sub> (por ELISA) y PNY<sub>NTN</sub> (por sintomatología en plantas huéspedes). Los experimentos de resistencia a la transmisión mostraron gran variación en los porcentajes de infección de acuerdo con la variedad de patata y el tipo de aislado viral empleado. Las variedades Jaette Bintje (PVY<sub>O</sub> y PVY<sub>N</sub>), Mondial y Monalisa (PVY<sub>N</sub>) y Agata (PVY<sub>O</sub>) presentaron niveles moderados de resistencia. La única variedad que presentó resistencia total a todos los aislados fué Santè, que fue empleada como control. El test de libre elección indicó que la variedad Mondial fue la preferida por *M. persicae* a diferentes tiempos de exposición. Asimismo, se observó que *M. persicae* tiene una elevada tasa de reproducción en la variedad Jaette Bintje. Este último resultado tiene un importante valor epidemiológico, ya que Jaette Bintje muestra una alta tolerancia al principal vector y a los distintos tipos de PVY. Ello supone que dicho cultivar pueda actuar como una importante fuente de infección secundaria y planta-huésped de vectores pasando inadvertida para el agricultor y pudiendo por tanto constituir un reservorio del virus para otros cultivos próximos.

P-90

## ¿TIENE LA VIRULENCIA UN COSTE? ANÁLISIS DE LOS TOBAMOVIRUS QUE INFECTAN PIMIENTO

VICENTE, D., GARCÍA-ARENAL, F. Y FRAILE, A.

*Área de Patología Vegetal. Dpto. de Biotecnología. E.T.S.I. Agrónomos. Universidad Politécnica de Madrid. Ciudad Universitaria s/n 28040 Madrid.*

La superación de la resistencia y los costes de virulencia son problemas clásicos en patología vegetal que rara vez se han estudiado con virus de plantas. El cultivo del pimiento bajo plástico se ve afectado por la infección de virus del grupo del mosaico del tabaco (tobamovirus) que se intentan controlar mediante el uso de genes de resistencia de la serie alélica L. Se conocen 5 alelos de esta serie, 4 de ellos superables por especies de tobamovirus. En España se han usado fundamentalmente los alelos L2, L3 y L4, y en campo se encuentran los patotipos P0 (que supera el alelo silvestre), P12 (que supera los alelos L1 y L2) y P123 (que supera los alelos L1, L2 Y L3). El análisis de las poblaciones de tobamovirus que infectan pimientos y del porcentaje de superficie cultivadas con los diferentes alelos durante los últimos 18 años sugieren que las diferentes virulencias tienen diferente coste biológico y/o puede haber complementación entre patotipos. Hemos hecho experimentos dirigidos a analizar estos aspectos. Se presentan los resultados de los análisis de la evolución de la población del virus, y de los costes de virulencia.

## ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA Y EN PATOGÉNESIS DE MANGOTOXINA; TOXINA PRODUCIDA POR *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*

ARREBOLA, E., DEL MORAL, E., PÉREZ-GARCÍA, A., OLEA, F., DE VICENTE, A. Y CAZORLA, F.M.

*Departamento de Microbiología, Facultad de Ciencias, Universidad de Málaga. Campus de Teatinos S/N. 29071 Málaga. E-mail: adevicente@uma.es*

Algunos patovares de *P. syringae* producen toxinas antimetabolito, como tabtoxina, (pv. tabaci, coronafaciens o garcae), que inhibe específicamente a la Glutamina sintetasa (GS) o faseolotoxina, (pv. phaseolicola), que inhibe a la enzima Ornitinacarbamoiltransferasa (OCT). Ambas toxinas actúan sobre enzimas de la ruta de biosíntesis de glutamina y arginina.

*Pseudomonas syringae* pv. *syringae* (*P.s.s.*) ha sido identificada como el agente causal de la necrosis apical del mango, así como de un elevado número de enfermedades de plantas. El análisis de producción de toxinas antimetabolito, por parte de cepas de *P.s.s.* aisladas de mango, mediante ensayos de inhibición del crecimiento de *Escherichia coli* en medio mínimo, mostró la producción de una toxina antimetabolito no descrita previamente a la que se ha denominado mangotoxina, haciendo alusión al origen de las cepas. Esta toxina actúa en la ruta de biosíntesis de arginina inhibiendo la enzima Ornitina N-acetiltransferasa (OAT).

En este trabajo se determina el papel de la mangotoxina en la patogénesis sobre planta (tomate) y/o en la competencia con otros microorganismos epifitos de *P.s.s.* durante su residencia en la filosfera. Para ello se han realizado experimentos que determinen el espectro de acción de cepas de *P.s.s.* productoras de mangotoxina frente a 25 cepas de diferentes bacterias y hongos epifitos y/o fitopatógenos que podrían actuar como posibles dianas durante la etapa epifítica de las cepas de *P.s.s.* Resultados preliminares muestran un efecto tóxico de la mangotoxina sobre distintas especies del género *Bacillus*; en cuanto a bacterias gram negativas, sólo algunas cepas del grupo *Erwinia/Pantoea* sp. parecen verse afectadas por la producción de esta toxina.

Por otra parte, utilizando diferentes cepas de *P.s.s.* productoras de mangotoxina así como no productoras, entre las que se incluyen mutantes miniTn5 deficientes en esta actividad tóxica, se han realizado ensayos de crecimiento y aparición/desarrollo de síntomas necróticos sobre folíolos de tomate mantenidos *in vitro*, con objeto de poner de manifiesto si la mangotoxina interviene activamente en la patogénesis de *P.s.s.* del mismo modo que lo hacen la tabtoxina y la faseolotoxina, en plantas infectadas por los respectivos patovares de *P. syringae* productores de las mismas.

## SENSIBILIDAD DE ESPECIES ORNAMENTALES DE ROSÁCEAS AL FUEGO BACTERIANO

RUZ, L., MORAGREGA, C., MONTOJO, O. Y MONTESINOS, E.

*Institut de Tecnologia Agroalimentaria-CeRTA-CIDSAV. Universitat de Girona. Campus de Montilivi. 17071. Girona. E-mail: lruz@intea.udg.es.*

La bacteria *Erwinia amylovora* es el agente causal de la enfermedad conocida con el nombre de fuego bacteriano que afecta a plantas de la familia de las rosáceas entre las cuales se encuentran frutales de gran importancia económica como el peral y el manzano, así como especies de plantas ornamentales (*Crataegus*, *Pyracantha*, *Sorbus*). Dentro de la familia de las rosáceas la subfamilia más afectada es la pomoidea, aunque también se ha descrito en rosoideas (*Rubus* spp.) y recientemente en prunoideas (*Prunus salicina*).

La gravedad del fuego bacteriano varía en función de las planta huésped (sensibilidad y estado fenológico), de las condiciones climáticas, y del inóculo (dosis y virulencia). La sensibilidad del material vegetal a la enfermedad depende principalmente de la especie y de la variedad. Así, hay especies de la subfamilia de la pomoideas que son más sensibles que otras y entre éstas hay variedades que presentan mayor sensibilidad que otras.

En el presente trabajo se ha evaluado la sensibilidad de 20 especies y variedades de los géneros *Chaenomeles*, *Crataegus*, *Cotoneaster*, *Malus*, *Photinia*, *Pyracantha*, *Pyrus* y *Sorbus*, a una cepa virulenta de *Erwinia amylovora* aislada de Lleida. En el estudio se inocularon, con la suspensión del patógeno, plantas en contenedor y se incubaron en condiciones de ambiente controlado, óptimas para el desarrollo de la enfermedad. Se siguieron las normas de seguridad requeridas para la manipulación de un patógeno de cuarentena. Se observó que un 15 % de las especies evaluadas presentaban una baja sensibilidad, un 40 % sensibilidad moderada, y finalmente un 45 % de las especies presentaba una elevada sensibilidad a la enfermedad.

Estos resultados pueden ser útiles para completar el espectro de huéspedes de *E. amylovora* y seleccionar el uso de variedades o especies menos sensibles con el fin de evitar su introducción o dispersión en nuestras condiciones.

P-94

## ENSAYO DE PATOGENICIDAD DE TRES ESPECIES DE *Armillaria* SOBRE *Pseudotsuga menziesii*

AGUÍN, O.<sup>1</sup>, PINTOS, C.<sup>1</sup>, LOUREIRO, B.<sup>1</sup> Y MANSILLA, J.P.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Estación Fitopatológica "Do Areeiro". Subida a la Robleda S/N. 36153. Pontevedra.

<sup>2</sup>Dpto. de Producción Vegetal. Universidad de Santiago de Compostela. 27002 Lugo.

El pino de Oregón, *Pseudotsuga menziesii* (Mirb.) Franco, se considera en la actualidad una conífera de gran interés para repoblación forestal debido a la buena calidad de su madera y a sus bajas exigencias en cultivo. En enclaves forestales gallegos de esta especie, se han detectado árboles afectados por diversas enfermedades causadas por hongos, entre las que destaca la podredumbre blanca radicular causada por *Armillaria*. En muestras sintomáticas de *P. menziesii*, recibidas en nuestro laboratorio, se ha encontrado *A. mellea* o *A. gallica*. Por otro lado, diversos estudios señalan que *A. ostoyae* es la especie más patógena en coníferas.

En este trabajo, se ha evaluado la patogenicidad de estas tres especies de *Armillaria* sobre planta de dos savias de *P. menziesii*.

El material vegetal consistió en 200 plantas obtenidas a partir de semilla, que se dispusieron en macetas de 1,5 L rellenas con suelo. Se inocularon 50 plantas con cada una de las especies de *Armillaria*, dejando como control otras 50 plantas no inoculadas. El inóculo de *Armillaria* consistió en varetas de avellano de 5 x 1,5 cm completamente infectadas por el hongo correspondiente. Para la inoculación, se colocó en cada maceta una vareta de avellano en contacto con las raíces. En los controles, se dispuso una vareta sin infectar. Todas las macetas se colocaron al azar en una cámara de crecimiento con un fotoperiodo de 12 horas, temperatura entre 22-24°C y humedad del 80-85%. Se registró la aparición de los primeros síntomas y su evolución hasta la muerte de la planta. En las plantas muertas se midió el número de brotes, la longitud del brote principal y la longitud de avance del micelio en la planta, se estimó el porcentaje de acículas afectadas y la presencia de rizomorfos en el sustrato, se determinaron el peso seco de raíz y de parte aérea y se asignó un nivel de incidencia del hongo.

En todas las plantas muertas, se realizó la especie de *Armillaria* correspondiente a partir de las raíces afectadas, confirmando su infectividad. *P. menziesii* resultó especialmente sensible al ataque por *A. mellea* que mostró un comportamiento altamente patógeno, causando una mortalidad elevada; a los cuatro meses de su inoculación, se observaron los primeros síntomas y, un mes después, el 50% de las plantas murieron, mientras que las plantas inoculadas con *A. gallica* o *A. ostoyae*, en el mismo período de tiempo, no mostraron ningún síntoma de infección.



## MEJORA DE PIMIENTO (*Capsicum annuum* L.) FRENTE A *Phytophthora capsici*. ANÁLISIS DE CARACTERES CUANTITATIVOS EN RELACIÓN CON LA RESISTENCIA AL HONGO

BILOTTI, G.<sup>1</sup>, EGEA-GILABERT, C.<sup>2</sup>, CANDELA, M.<sup>3</sup>, VIVO, J.M.<sup>4</sup> Y CANDELA, M.<sup>3</sup>.E.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Dpto. Biología de Vegetal. Facultad de Biología. Universidad de Murcia. Campus Espinardo. 30100 Espinardo (Murcia).

<sup>2</sup>Dpto. Producción Agraria. ETSI Agrónomos. Universidad Politécnica Cartagena.

<sup>3</sup>Dpto. Genética. Facultad de Biología. Universidad Complutense de Madrid.

<sup>4</sup>Dpto. Métodos Cuantitativos para la Economía. F. Economía y Empresa. Universidad de Murcia.

*Phytophthora capsici* es un hongo telúrico que puede diseminarse en el agua de riego, invadir plantas de pimiento y causar un marchitamiento generalizado ante el cual no existe remedio eficaz. La utilización de plantas resistentes es la única alternativa defensiva y la obtención de variedades resistentes al hongo, pero con características agronómicas idóneas para su cultivo en la Región de Murcia y con sabor dulce, constituye el objetivo fundamental de nuestro trabajo.

Semillas de pimiento de las líneas parentales Americano (A) sensible al hongo, y Serrano Criollo de Morelos (SCM) resistente, junto a la descendencia F<sub>1</sub>, obtenida de su cruzamiento AxSCM así como las F<sub>2</sub> y F<sub>3</sub>, obtenidos por autopolinización, se cultivaron hasta el estadio de 5 hojas verdaderas, momento en el cual fueron infectadas con el hongo patógeno. Los resultados indicaron que la inoculación por decapitación induce una reacción hipersensible en el tallo de las plantas de pimiento que es inversamente proporcional a la resistencia. Los datos de longitud de necrosis en las plantas de la generación F<sub>2</sub> indican que este carácter muestra herencia cuantitativa, encontrándose segregantes transgresivos. Entre ellos, se seleccionaron para proseguir la mejora, los que muestran menor longitud de necrosis y por tanto mayor resistencia al hongo que el parental resistente SCM y al mismo tiempo fueran tolerantes a virosis.

En las plantas adultas se midieron los caracteres: longitud, anchura y forma de la hoja, existencia de pelos en tallo y hojas, longitud, anchura y forma de los frutos, peso de los frutos, sabor picante, (por existencia de capsaicina) en frutos y longitud de necrosis en tallos. Estos 10 caracteres se analizaron en 20 plantas de cada parental y de la F<sub>1</sub>, en 166 plantas F<sub>2</sub> y en 20 plantas de la generación F<sub>3</sub>, provenientes de las diferentes plantas F<sub>2</sub> que sobrevivieron a la infección con micelio de *P.capsici* adicionado en vermiculita. Los datos obtenidos se analizaron mediante análisis de varianza de un factor (ANOVA) y regresión lineal múltiple y se calculó la heredabilidad en sentido amplio, obteniéndose una ecuación lineal modelo que se puede usar para predecir la resistencia de la planta al hongo en función de la longitud de necrosis.

*Agradecimientos:* Trabajo financiado por el Proyecto PB98-0377, CICYT, España.

P-96

## OBTENCIÓN DE VARIEDADES DE FRESA RESISTENTES A *Phytophthora cactorum* y *Verticillium dahliae*

ELVIRA-RECUENCO, M., DE CAL, A. Y MELGAREJO, P.

*Departamento de Protección Vegetal, SGIT-INIA. Ctra. La Coruña Km. 7.5, 28040 Madrid.*

*Phytophthora cactorum* y *Verticillium dahliae*, agentes causantes en fresa de la podredumbre del cuello y rizoma y de la verticilosis respectivamente, son hongos del suelo, polívoros y con una capacidad larga de perpetuación en el suelo. Los síntomas causados son marchitez, enanismo y necrosis en el cuello, lo que hace que, en ocasiones, sea difícil distinguirlos de daños causados por heladas, frío, etc. Las principales medidas de control son la utilización de material vegetal sano, de variedades resistentes y evitar terrenos infectados. La incidencia de estas enfermedades es relevante, y se espera que se agrave en un futuro cercano debido a la eliminación del uso del bromuro de metilo como desinfectante del suelo. Esto conlleva que la obtención de variedades resistentes sea una medida prioritaria.

En la campaña 2000, aproximadamente un 95% de la superficie de fresa en Huelva era de la variedad californiana 'Camarosa'. Esta dependencia del cultivo español de fresa de las variedades californianas llevó en 1984 al inicio de programas de mejora en España para la obtención de variedades adaptadas a condiciones de cultivo españolas y sin pago de royalties. Ha sido recientemente cuando se ha incluido en estos programas de mejora el análisis de resistencia a *P. cactorum* y *V. dahliae* en selecciones avanzadas, como parte de un convenio INIA-IVIA-CIFA-FNM-AVF.

Para la puesta a punto de los tests de patogenicidad se han estudiado: 1) distintos sustratos, solución nutritiva en matraz y suelo en maceta, en cámara a 20-23°C, 16h. luz; 2) distintos métodos de inoculación; 3) patogenicidad de los aislados y 4) variedades testigo. Se evalúan los síntomas de marchitez de la parte aérea y en el cuello, el peso fresco y el consumo de solución nutritiva. Cuando la inoculación con *V. dahliae* se realizó mediante inmersión de las raíces en una suspensión de conidias ( $10^6$  con/ml) con un único aislado por inoculación, se observaron grandes diferencias de patogenicidad entre aislados y diferencias significativas en consumo de solución nutritiva entre plantas inoculadas y no inoculadas dependiendo de la variedad y el aislado. Se está comparando la eficacia de la inoculación en matraz y maceta, utilizando una combinación de aislados o un único aislado muy agresivo, para el próximo análisis de las selecciones avanzadas. Se ha puesto a punto el test de patogenicidad para *P. cactorum*, en el que se pulveriza el cuello de la planta con una suspensión de zoosporas ( $10^4$  zoosp./ml) compuesta de cuatro aislados (dos de Huelva y dos de Inglaterra) y se utilizan como variedades testigo: 'Elsanta' (sensible), 'Camarosa' (ligeramente sensible) y 'Pandora' (parcialmente resistente). Se está trabajando con las selecciones avanzadas tanto en matraz como en maceta.

## RESISTENCIA DE CULTIVARES DE OLIVO A LAS VARIANTES PATOGENICAS DE *Verticillium dahliae*

LÓPEZ-ESCUADERO, F.J.<sup>1</sup>, MARTOS-MORENO, C.<sup>1</sup>, RAYA-ORTEGA, M.C.<sup>1</sup>, DEL RÍO, C.<sup>2</sup>, CABALLERO, J.M.<sup>2</sup> Y BLANCO-LÓPEZ, M. A.<sup>1</sup>

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

<sup>2</sup>Dpto. Olivicultura y Arboricultura Frutal, C.I.F.A.,

Alameda del Obispo, Apdo. 3092, 14080, Córdoba.

El uso de resistencia es el principal método de control de las enfermedades causadas por hongos de suelo y, en especial, de las marchiteces vasculares, como las causadas por *Verticillium dahliae*. En la Unidad de Patología Vegetal (Dpto de Agronomía, Univ. de Córdoba) se está desarrollando desde 1994 la evaluación de la resistencia de cultivares de olivo a las variantes patógenicas de *V. dahliae*. Durante estos años, el Banco de Germoplasma Mundial de Olivo del CIFA de Córdoba ha provisto del material vegetal necesario para los experimentos. Las plantas de olivo de 9 a 12 meses de edad se inocularon por inmersión de sus raíces heridas en una solución de 10<sup>7</sup> conidias/ml, 30 min y se trasladaron a cámaras de crecimiento de ambiente controlado (22°C, 80% de HR y fotoperiodo de 12 h) durante 12 semanas. En todos los experimentos se incluyeron los cvs 'Picual' y 'Oblonga' como testigos de infección por su respuesta conocida a los aislados del hongo.

Durante el periodo 1994-97, se evaluaron las reacciones de 23 cvs de olivo a los aislados defoliante (D) y no defoliante (ND) de *V. dahliae*. La severidad de los síntomas en la parte aérea de las plantas se evaluó según una escala de 0 (no síntomas) a 4 (planta muerta). Para determinar la cantidad de enfermedad y evaluar la resistencia de los cvs se estimaron los siguientes parámetros: área bajo la curva de progreso de enfermedad porcentual, porcentaje de plantas muertas y recuperación de la infección al final del periodo de evaluación. La evaluación de resistencia continuó a partir de 1998 con la misma metodología, pero eliminando el aislado ND ya que todos los cvs susceptibles al aislado D, evaluados hasta ese momento, eran susceptibles o extremadamente susceptibles al ND. Así mismo, los estudios de campo han demostrado por primera vez que el aislado D de *V. dahliae* se halla extendido a campos comerciales de olivar en Andalucía, donde produce infecciones con un progreso epidémico muy superior al ocasionado por aislados ND.

La metodología descrita permite diferenciar claramente la respuesta de los cultivares testigo, 'Picual' y 'Oblonga', y asignar categorías de resistencia a los cultivares evaluados. Los cvs 'Oblonga', 'Frantoio', 'Empeltre' y 'Changlot Real' se mostraron resistentes y moderadamente resistentes al aislado ND y D, respectivamente. También destacaron R=723 y 'Koroneiki' por su reacción moderadamente resistente al aislado D. El control de las condiciones ambientales es básico para reducir la variabilidad en la expresión de los síntomas de la enfermedad, especialmente los causados por el aislado ND de *V. dahliae*.

P-98

## ESTUDIO DEL COMPORTAMIENTO TÉRMICO EN MEDIO DE CULTIVO Y PATOGENICIDAD DE *Lophodermium pinastri* (SCHRAD. EX HOOK.) CHEV

MARTÍN, J., MARTÍN, P. Y DIEZ, JJ.

Universidad de Valladolid. Unidad de Entomología y Patología Forestales. Departamento de Producción Vegetal y Silvopascicultura. Escuela Técnica Superior de Ingenierías Agrarias (E.T.S.II.AA.). Avl de Madrid 57. 34071. Palencia.

*Lophodermium pinastri* es un ascomiceto mundialmente distribuido, que aparece con frecuencia sobre acículas y pinocha, del que se conoce su biología pero apenas existen estudios sobre su comportamiento térmico en medio de cultivo y poder patogénico.

En el presente trabajo se obtuvieron 20 aislamientos de *L. pinastri* a partir de cinco especies de pinos (*Pinus pinea*, *P. halepensis*, *P. nigra*, *P. sylvestris* y *P. pinaster*), procedentes de distintas provincias de Castilla y León, sobre los que se evaluó el crecimiento en distintos medios de cultivo y a diversas temperaturas. Además, se evaluó el poder patogénico de *L. pinastri* sobre acículas aisladas en el laboratorio y acículas de ramillos en pinos adultos mediante inoculación con micelio.

El crecimiento en cultivo presentó diferencias, principalmente entre aislamientos obtenidos de distintas especies de pinos. El comportamiento térmico de cada grupo de aislamientos obtenidos de un mismo hospedante, permaneció estrechamente vinculado a las condiciones climáticas a las que estuvo sometido. El micelio de *L. pinastri* progresó sobre las acículas causando zonas necróticas en forma de bandas. Los genotipos obtenidos de un hospedante distinto del inoculado causaron necrosis de mayor longitud.

Este trabajo ha sido cofinanciado por la Consejería de Educación y Cultura de la Junta de Castilla y León y la Unión Europea, F S E (Proyecto: VA031/01)

## EVALUACIÓN DE LA RESISTENCIA DE VARIEDADES AUTÓCTONAS DE MANZANO A MOTEADO (*Venturia inaequalis*) Y DETERMINACIÓN DE LAS RAZAS DEL PATÓGENO PRESENTES EN EL NORESTE DE ESPAÑA

MARTÍNEZ-BILBAO, A.<sup>1</sup>, DAPENA, E.<sup>2</sup>, RUIZ, E.<sup>2</sup>, EZPARZA, M.<sup>3</sup> Y MURILLO, J.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Dept. Producción Agraria, Universidad Pública de Navarra, 31006 Pamplona, fax: 948-169187, e-mail: [jesus@unavarra.es](mailto:jesus@unavarra.es);

<sup>2</sup> Servicio Regional de Investigación y Desarrollo Agroalimentario, Apdo. 13, 33300 Villaviciosa;

<sup>3</sup> Instituto Técnico de Gestión Agrícola (ITGA), Edificio de El Sario, 31006 Pamplona,

*Venturia inaequalis* y *Erwinia amylovora* son los agentes causales del moteado y del fuego bacteriano, respectivamente, que constituyen, junto al oidio (*Podosphaera leucotricha*), las principales enfermedades que atacan a este cultivo frutícola. Uno de los principales métodos utilizados en el control integrado de estas enfermedades se basa en el cultivo de variedades resistentes o poco susceptibles, lo que contribuye a frenar su diseminación y a reducir los costes de producción. En Navarra, el ITGA cuenta con un banco de germoplasma que comprende 253 variedades de manzano autóctonas del noreste de España, y cuya susceptibilidad a fuego bacteriano hemos evaluado previamente. Con el fin de complementar estos trabajos, hemos acometido la valoración de la susceptibilidad a moteado de estas variedades, y en especial de las que mostraron susceptibilidad reducida a fuego bacteriano. Hemos inoculado un total de 94 variedades (3-8 repeticiones por variedad) utilizando una mezcla de esporas preparada a partir de lesiones naturales de moteado (inóculo mixto UPNA99). Después de 17-21 días bajo condiciones de crecimiento controladas, se evaluaron la severidad y la incidencia de moteado, el grado de esporulación, y el grado de susceptibilidad/resistencia, según la escala cualitativa de Chevalier. Un 42% de las variedades (38 var.) mostraron elevada (19 var.) o débil resistencia (19 var.) al inóculo UPNA99, mientras que el resto mostraron una leve (29 var.) o alta (25 var.) susceptibilidad al mismo. Doce de las 19 variedades con elevada resistencia a moteado también fueron poco susceptibles a fuego bacteriano, por lo que podrían ser una alternativa a otras variedades más susceptibles a estas enfermedades. Adicionalmente, cuatro de las 12 variedades mostraron elevada resistencia a las razas 1, 6 y 7 de *V. inaequalis*, y dos produjeron bandas de amplificación con el marcador SCAR AL07 pero no con CAP M18, asociados al gen de resistencia Vf, lo que sugiere que estas variedades podrían poseer una resistencia de control poligénico o nuevos genes de resistencia frente al moteado. Asimismo, nos encontramos evaluando, en cámara de cultivo, la existencia de las diferentes razas de *V. inaequalis* en varios lugares del norte de España mediante la preparación de inóculo a partir de hojas con moteado recogidas en esos lugares y su inoculación en los huéspedes diferenciales de las siete razas actualmente conocidas.

P-100

## PARÁMETROS FOLIARES Y OTROS FACTORES RELACIONADOS CON LA SENSIBILIDAD AL OÍDIO (*Microsphaera alphitoides*) DE DISTINTOS CLONES DE *Quercus robur*

VÁZQUEZ-RUIZ DE OCENDA, R.A., LORENZO, J.L. Y IGLESIAS, I.

Dpto. de Botánica. Escola Politécnica Superior. Universidad de Santiago de Compostela. Campus de Lugo. 27002. Lugo.

El Oídio, *Microsphaera alphitoides* Griffon & Maublanc, tanto por su grado de incidencia como por su amplia distribución geográfica, es el hongo patógeno más importante en las plantaciones de *Quercus robur* L. Por ello, dentro del programa de selección de clones de *Q. robur* var. *fastigiata* que está llevando a cabo nuestro grupo de investigación, se ha querido estudiar la sensibilidad de los mismos a este patógeno por las consecuencias que tendría la propagación en vivero de clones altamente sensibles. Se han analizado inicialmente 105 clones de tres años de edad, establecidos en campo y sometidos a la presión del inóculo ambiental. Las plántulas fueron obtenidas a partir de semilla de un clon centerario de *Q. robur* var. *fastigiata*, seleccionado por su elevado interés ornamental. Se han evaluado también plantas del clon comercial *Q. robur* 'Fastigiata-Koster', situadas en la misma parcela, así como un robledal antiguo, utilizado como referencia del nivel de inóculo.

Los datos de incidencia en la parcela fueron tomados de Abril a Septiembre, siendo muy baja en Primavera (< 2%), media en Verano (> 50%) y muy alta a inicios del Otoño (>90%). Dado que se trata de un patógeno foliar, la mayor sensibilidad al Oídio registrada con el transcurso del tiempo puede ser debido no sólo a la posible presencia del inóculo sino también a un incremento en la sensibilidad de la mayor parte de los clones a causa de la senescencia foliar.

Con el fin de analizar ciertos parámetros foliares que podrían estar relacionados con la variabilidad detectada en campo en la sensibilidad al Oídio, se han tomado muestras de hojas, tanto sintomáticas como asintomáticas, de algunos de estos clones. Con ayuda de un microtomo se han realizado secciones transversales de las hojas y, en ellas, se han medido al microscopio: el espesor foliar (105-187  $\mu$ m) y el grosor de la cutícula (1,8-6  $\mu$ m). También se ha determinado la densidad de estomas y la densidad y longitud de los tricomas. Los datos obtenidos hasta este momento no permiten concluir sobre la importancia relativa de estos parámetros.

Finalmente, mediante siembra en medios de cultivo (PDA y AM) se ha analizado la presencia de otros microorganismos que podrían afectar a la relación patogénica, siendo aislados: *Cladosporium* sp., *Alternaria* sp., *Epicoccum nigrum*, *Aureobasidium pullulans*, *Phoma* sp. y *Ulocladium* sp. así como diversos micelios sin fructificar. *Epicoccum*, *Aureobasidium* y *Ulocladium* han sido descritos como agentes de control biológico frente a otros hongos fitopatógenos.

## INFLUENCIA DEL TAMAÑO DEL FRUTO DE MANDARINA FORTUNE EN LA SUSCEPTIBILIDAD A *Alternaria alternata* pv. *citri*

VICENT, A., SANZ, N., BADAL, J., ARMENGOL, J. Y GARCÍA-JIMÉNEZ, J.

Instituto Agroforestal Mediterráneo. Universidad Politécnica de Valencia. Camino de Vera s/n 46022 Valencia

La mancha marrón de la mandarina Fortune, causada por *Alternaria alternata* pv. *citri* fue detectada en España en diciembre de 1998. En la bibliografía extranjera se cita que diversas variedades de cítricos muestran una marcada reducción de la sensibilidad o incluso resistencia cuando el fruto alcanza los 30 mm de diámetro. Estudiar la influencia que podía tener el tamaño del fruto en la susceptibilidad a este patógeno en el caso de la mandarina Fortune, donde no había sido descrita anteriormente esta afección, resulta de una gran importancia en la estrategia de control de la enfermedad, debido a que en las épocas coincidentes con el mayor tamaño del fruto pueden presentarse las condiciones climáticas idóneas para la infección.

Se inocularon frutos de mandarina Fortune con diámetros comprendidos entre 10 y 70 mm con tres aislados de *A. alternata* pv. *citri* procedentes de Alzira y Ribarroja (Valencia) y Pilar de la Horadada (Alicante) utilizando dos dosis de inóculo:  $10^4$  y  $10^5$  conidios/ml (Solel y Kimchi, 1998).

Con los tres aislados se obtuvieron resultados similares, presentado una mayor expresión de síntomas las inoculaciones con la dosis de inóculo mayor. Se encontró una correlación entre el diámetro del fruto y la susceptibilidad del fruto: a mayor diámetro la expresión de síntomas fue menor, pero ni siquiera con el mayor diámetro ensayado se pudo considerar el fruto como resistente, ya que la expresión de síntomas solo decrecía aproximadamente en un 50% respecto al diámetro menor. Estos resultados han sido confirmados con observaciones de campo durante la pasada campaña, en la que tras un seguimiento semanal se detectó una fuerte infección en frutos de 60-70 mm de diámetro en noviembre de 2001.

Como conclusión se puede considerar que el fruto de mandarina Fortune permanece plenamente receptivo a la infección de *A. alternata* pv. *citri*, siendo en sus primeras fases cuando presenta una mayor susceptibilidad. Por este motivo habría que mantener la estrategia de control en todas las fases de desarrollo del fruto.

## INDUCCIÓN DE ENZIMAS RELACIONADOS CON EL ESTRÉS OXIDATIVO EN LÍNEAS DE INTROGRESIÓN TRIGO/*Aegilops* PORTADORAS DE LOS GENES DE RESISTENCIA A *Heterodera avenae* *Cre2*, *Cre5* Y *Cre7*

MONTES, M.J.<sup>1</sup>, GÓMEZ-COLMENAREJO, M.<sup>1</sup>, ANDRÉS, M.F.<sup>2</sup>, ROMERO, M.D.<sup>2</sup> LÓPEZ-BRAÑA, I.<sup>1</sup> Y DELIBES, A.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Dpto. de Biotecnología. E.T.S.I. Agrónomos. U.P.M. Avd/ Complutense sn. 28040-Madrid.

<sup>2</sup>Centro de Ciencias Medioambientales, CSIC, Serrano 115, 28006-Madrid.

Tres genes dominantes de resistencia (*Cre 2*, *Cre5* y *Cre 7*) al nematodo de quiste de los cereales, *Heterodera avenae*, se transfirieron independientemente a trigo hexaploide desde las especies *Aegilops ventricosa* y *Aegilops triuncialis* respectivamente. Estudios previos han demostrado que las tres líneas obtenidas: H-93-8 (*Cre2*), 6D/6M<sub>v</sub> (*Cre5*) y TR-353 (*Cre 7*) son altamente resistentes a la mayoría de los patotipos de *H. avenae*. En el presente estudio se analizan mediante electroforesis (IEF Y PAGE) los cambios enzimáticos desencadenados en dichas líneas por la infección del nematodo.

A los siete días de infección por el patotipo Ha71 de *H. avenae*, se observa en raíz un incremento de los niveles de enzimas detoxificantes (peroxidasa, esterasa, superóxido dismutasa, catalasa y glutatión reductasa). Las diferencias más significativas corresponden a la actividad peroxidasa en cuyos patrones electroforéticos se detectan bandas nuevas (ausentes en los controles). Las tres líneas resistentes muestran una respuesta incompatible similar, con ligeras diferencias en cuanto a intensidad o movilidad de alguna de las isoenzimas. No se detectaron cambios significativos de las actividades enzimáticas estudiadas en raíces de los controles susceptibles (respuesta compatible).

La resistencia conferida por los genes *Cre2*, *Cre5* y *Cre7* puede ser parcialmente debida a la acumulación de compuestos tóxicos para el nematodo que son producidos durante la polimerización de lignina, mediada por peroxidasa. Sin embargo, no se detectó inducción de siquimato deshidrogenasa que también participa (vía ruta del siquimato) en la síntesis de lignina. Las esterasas parecen estar implicadas en la primera fase del programa de lignificación de la pared celular que aísla al patógeno de la zona sana de la raíz. Las actividades catalasa, superóxido dismutasa y glutatión reductasa podrían desempeñar una función protectora frente al estrés oxidativo causado por el nematodo.



## CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DEL VIRUS DEL ARA-BESCO DEL PELARGONIUM

CASTAÑO, A. Y HERNÁNDEZ, C.

*Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas (UPV-CSIC), Universidad Politécnica de Valencia, 46022 Valencia.*

El geranio se encuentra a menudo afectado por enfermedades de etiología viral que repercuten negativamente en la producción y en la calidad de esta planta ornamental. En los últimos años, las infecciones causadas por el virus del arabesco del Pelargonium (*Pelargonium line pattern virus*, PLPV) han adquirido una importancia creciente al alcanzar porcentajes de incidencia muy elevados. El PLPV presenta partículas isométricas y un genoma monopartito de RNA de simple cadena y polaridad positiva de aproximadamente 4 kb. Este virus ha sido adscrito provisionalmente al género *Carmovirus* dentro de la familia *Tombusviridae*, pero no existen suficientes datos moleculares para confirmar dicha adscripción. En este trabajo nos hemos planteado determinar la estructura primaria del RNA genómico (gRNA) de un aislado del PLPV, con el fin de averiguar si la organización genómica de este patógeno es similar a la de otros carmovirus secuenciados y establecer de forma más precisa sus relaciones filogenéticas con otros miembros del grupo. Para ello se han generado cDNAs derivados de distintas partes de la molécula mediante amplificación por RT-PCR y se están utilizando procedimientos estándar de 5' y 3' RACE para completar la caracterización del genoma viral. Asimismo, los RNAs virales extraídos de viriones purificados o presentes en preparaciones de RNA total de plantas infectadas, han sido analizados mediante hibridación Northern utilizando sondas específicas del PLPV. Los resultados obtenidos hasta el momento indican que a pesar de que la organización genómica de este virus es bastante semejante a la de la mayoría de los carmovirus, sus mecanismos de expresión génica presentan diferencias notables.

## SECUENCIA COMPLETA DEL GENOMA DEL VIRUS DEL MOSAICO DEL PEPINO DULCE (PepMV)

AGUILAR, J.M.<sup>1</sup>, HERNÁNDEZ-GALLARDO, M.D.<sup>2</sup>, CENIS, J.L.<sup>2</sup>, LACASA, A.<sup>2</sup> Y ARANDA, M.<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>Estación Experimental "La Mayora"-CSIC, 29750 Algarrobo-Costa (Málaga).

<sup>2</sup>Centro de Investigación y Desarrollo Agroalimentario, 30150 La Alberca (Murcia).

<sup>3</sup>Dirección actual: Centro de Edafología y Biología Aplicada del Segura (CEBAS)-CSIC, Campus Universitario de Espinardo, 30100 Murcia.

Se ha determinado la secuencia nucleotídica completa (Nº Accesoión AF484251) del genoma de ARN del virus del mosaico del pepino dulce, *Pepino Mosaic Virus* (PepMV). PepMV es el agente etiológico de una nueva enfermedad que afecta a los cultivos de tomate en Europa y Norte América. El genoma del PepMV consiste en una cadena simple de ARN de sentido positivo, de 6.410 nucleótidos de longitud que contiene cinco pautas de lectura abierta (*Open Reading Frames*, ORFs). ORF 1 codifica presuntamente la ARN polimerasa ARN dependiente, dado que contiene los motivos característicos de la metil transferasa, NTP-binding y polimerasa. ORF 2 al 4 forman el triple bloque de genes del PepMV. ORF 5 codifica la proteína de la cápsida. Dos regiones cortas no traducidas flanquean las regiones codificantes y hay una cola de poli(A) en el extremo 3' del RNA genómico. Por tanto, la organización del genoma del PepMV es la típica de un miembro del género *Potexvirus*. La secuencia nucleotídica obtenida comparte un 99% de identidad con el ARN genómico de un aislado de PepMV procedente del Reino Unido que ha sido parcialmente secuenciado. La proteína codificada por el ORF 4 es la menos conservada entre ambos aislados (95% de identidad de aminoácidos), mientras que las proteínas codificadas por los ORF 3 y ORF 5 son idénticas.

## VARIABILIDAD GENÉTICA DEL VIRUS DEL MANCHADO FOLIAR DE LOS CÍTRICOS (CLBV)

VIVES, M.C., RUBIO, L., GALIPIENSO, L., MORENO, P., NAVARRO, L., Y GUERRI, J.

*Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA),*

Cra. Moncada-Náquera Km. 4.5, 46113-Moncada, Valencia.

El virus del manchado foliar de los cítricos (CLBV) posee un genoma de RNA de cadena sencilla y polaridad positiva, de 8.747 nt, que está organizado en tres marcos de lectura abierta (ORFs) y tiene capacidad para codificar una posible poliproteína de replicación, una posible proteína de movimiento y la proteína de la cápsida, respectivamente. El virus se ha detectado en distintos huéspedes cítricos de varios países.

En este estudio se analizó la estructura poblacional y la diversidad genética de diversos aislados de CLBV mediante análisis de SSCP y comparación de la secuencia nucleotídica de dos regiones genómicas localizadas en los ORFs correspondientes a la poliproteína de replicación (R) y a la proteína de la cápsida (C). Para estudiar la variación genética de la población dentro de un aislado se analizaron treinta clones de cada región genómica de dos aislados de CLBV. Este análisis mostró que la población de ambos aislados estaba compuesta por una secuencia predominante y unas pocas variantes de secuencia genéticamente relacionadas, que se hallaban a muy baja frecuencia. La diversidad genética dentro de cada aislado osciló entre 0.0005 y 0.0017. También se estudió la diversidad genética entre 37 aislados de una población española, obtenidos de árboles de campo de naranjo dulce, clementino y mandarino naturalmente infectados con el virus. La baja diversidad genética calculada (0.0041 y 0.0018 para las regiones genómicas R y C, respectivamente) sugieren que la población de aislados españoles de CLBV es muy homogénea y que podría derivar de una introducción única y reciente. Por último, se estudió la variación genética de 14 aislados de CLBV procedentes de diferentes huéspedes cítricos de España, USA (Florida), Japón, Australia y Francia (Córcega). La diversidad genética entre aislados fue de 0.0318 y 0.0209 en las regiones genómicas R y C, respectivamente, no encontrándose correlación entre distancia genética y origen geográfico o especie huésped. La baja proporción entre sustituciones no sinónimas y sustituciones sinónimas en estos aislados indica una fuerte presión selectiva negativa para el cambio de aminoácidos en ambas regiones genómicas, lo que explicaría en parte la baja diversidad genética observada.

## ESTUDIO SOBRE LA TRANSMISIÓN VERTICAL DEL *virus de las manchas en anillo de los prunus* (PNRSV) EN EL ALBARICOQUERO

AMARI, K., PALLÁS, V. Y SÁNCHEZ-PINA, M.A.

*Departamento de Mejora y Patología Vegetal. CEBAS-C.S.I.C. Campus Universitario de Espinardo. 30100 Murcia. Instituto de Biología Celular y Molecular de Plantas (UPV-CSIC). Avda. de los Naranjos s/n. 46022 Valencia*

El albaricoquero es un frutal de hueso de gran importancia económica. En España se cultivan aproximadamente 25.000 ha con una producción anual de 200.000 toneladas. La Región de Murcia constituye el 65% de la producción nacional. Las principales enfermedades virales del albaricoquero, además de la Sharka, están causadas por los virus pertenecientes al grupo de los ilarvirus (el *virus de las manchas en anillo de los prunus*, PNRSV; el *virus del enanismo del ciruelo*, PDV y el *virus del mosaico del manzano*, ApMV). En el caso del PNRSV, el crecimiento de los árboles infectados se ve reducido aproximadamente en un 30% y el rendimiento entre un 20 y un 56%. Además, los árboles infectados presentan una mayor susceptibilidad al daño invernal. En la Región de Murcia, la incidencia del PNRSV es alta en la variedad Real Fino que es el patrón más usado. Dicho patrón se obtiene a partir de semillas obtenidas de las conservas. En el presente trabajo se estudia la implicación de la transmisión vertical del PNRSV, a través de los gametos y la semilla, en su incidencia en el campo. Para llevar a cabo este estudio hemos localizado, en diferentes zonas de la Región de Murcia, árboles infectados con el virus, mediante la hibridación molecular no radioactiva tipo "dot-blot" o "tissue-printing". En el estudio de la distribución del PNRSV en los granos de polen, en los ovarios y en las semillas, se ha usado la técnica de hibridación *in situ* sobre secciones semifinas de 7 mm de material fijado en Karnovsky e incluido en parafina. Además, hemos puesto a punto la técnica de hibridación *in situ* de tipo "whole-mount" para localizar el RNA del PNRSV en los granos de polen y en el tubo polínico. De manera interesante, en los granos de polen de estadíos tempranos el RNA viral presenta una distribución uniforme mientras que en los granos de polen maduros el RNA viral se localiza en las aperturas. En polen germinado *in vitro* el RNA viral se ha localizado en el grano y a lo largo del tubo polínico. Estudios preliminares con ovarios de albaricoquero han mostrado una distribución uniforme del RNA viral. Los dos tegumentos, al igual que la nucela, presentan infección. Sin embargo, en algunos ovarios analizados la nucela estaba libre de la infección, a excepción de la zona de la misma que rodea el saco embrionario que sí estaba infectada. Estudios preliminares con semillas inmaduras han mostrado la infección de embriones en el estadio globular así como una distribución del RNA viral en el sistema vascular de los tegumentos. Se discutirán las posibles vías de transmisión vertical del PNRSV en albaricoqueros.

Este trabajo ha sido financiado con el proyecto BIO99-0854 (DIGICYT, MCyT).

## CARACTERIZACIÓN BIOLÓGICA Y MOLECULAR DE AISLADOS ESPAÑOLES DEL VIRUS Y DE LA PATATA, PROCEDENTES DE TOMATE Y PIMIENTO

LUIS ARTEAGA, M., GIL ORTEGA, R., ARNEADO, M.S., MONTES, M.\*, ROMERO, A.\*, BLANCO-URGOITI, B.\* Y PONZ, F.\*

Servicio de Investigación Agroalimentaria, D.G.A., Apartado 727, 50080-Zaragoza

\*INIA, Depto. de Mejora Genética y Biotecnología, Autovía A6, Km 7,5 28040-Madrid

El virus Y de la patata (PVY) está extendido por todo el mundo y puede causar pérdidas económicas importantes en cultivos de solanáceas como patata, pimiento, tomate y tabaco. Los vectores son varias especies de pulgones que lo transmiten de forma no persistente. Los aislados de PVY han sido objeto de varias clasificaciones, según la especie de procedencia y utilizando criterios diferentes. Los aislados de patata se agrupan en los grupos  $Y_0$ ,  $Y_N$  e  $Y_C$ , de acuerdo con la sintomatología que producen sobre huéspedes diferenciales, aunque esta clasificación se ha revelado insuficiente a la vista de distintos resultados obtenidos por análisis moleculares. Los aislados de pimiento se agrupan en los patotipos PVY 0, PVY 1, PVY 1-2, PVY 1-3 y PVY 1-2-3, de acuerdo con la sintomatología que producen sobre variedades diferenciales de pimiento portadoras de genes de resistencia. Los aislados de tomate se reparten en siete patotipos en función de su virulencia sobre una gama de genotipos del género *Lycopersicon*.

Se presentan la caracterización biológica y molecular de 34 aislados de pimiento y 17 de tomate, procedentes de diferentes zonas de cultivo españolas, recolectados entre 1981 y 2001. La caracterización biológica se realizó por inoculación mecánica de especies indicadoras, incluyendo variedades de pimiento y tomate con genes de resistencia, y verificando, visualmente y/o por ELISA-DAS, la presencia/ausencia de infección sistémica por el virus. La caracterización molecular se llevó a cabo mediante inmunocaptura-RT-PCR y RFLP, utilizando 5 enzimas de restricción: *Dde* I, *Eco* RV, *Hinf* I, *Rsa* I y *Taq* I; los resultados se analizaron genéticamente para agrupar los aislados según su distancia genética relativa. Los resultados obtenidos permiten concluir que es posible agrupar los aislados, tanto de pimiento como de tomate, mayoritariamente en dos grupos: Grupo 1, integrado por los aislados que producen síntomas necróticos en tabaco 'Xanthi nc' y 'Paraguay' y ausencia de necrosis en pimiento 'Doux des Landes' y en *Physalis floridana*, que molecularmente corresponden a la raza N de patata. Este grupo incluye aislados de Aragón, Navarra, País Vasco y León; y Grupo 2, integrado por los aislados que no producen necrosis en dichos tabacos y si la producen en pimiento 'Doux des Landes' y en *P. floridana*; la caracterización molecular los encuadra en la raza NP (no patata), la cual engloba los aislados característicos de pimiento. En este grupo se incluyen los aislados del litoral mediterráneo, desde Barcelona hasta Málaga, pasando por Castellón, Valencia, Murcia y Almería, y alguno de León. Se discutirán las posibles razones y consecuencias de esta segregación geográfica en la distribución de los aislados.

## ANÁLISIS DE LA SENSIBILIDAD DE 24 LÍNEAS DE ALUBIA (*Phaseolus vulgaris* L.) A LAS ENFERMEDADES FOLIARES CAUSADAS POR HONGOS

VALENCIANO, J.B. Y REINOSO, B.

*Departamento de Ingeniería Agraria. ESTIA. Universidad de León*

Avda. Portugal, nº 41. 24.071 León

La alubia es un cultivo tradicional de la provincia de León, siendo dicha provincia la principal productora española de judía grano. Las enfermedades foliares causadas por hongos pueden comprometer seriamente la productividad de la judía especialmente en parcelas muy fértiles y en variedades de ciclo largo y hábito postrado; sobre todo teniendo en cuenta que aparecen en las últimas fases de cultivo, cuando por los plazos de seguridad o por la imposibilidad física en muchas explotaciones debido al sistema de cultivo, no se pueden realizar tratamientos fungicidas.

El presente trabajo se desarrolló durante los años 1997 y 1998. En él se evaluaron 24 líneas de alubia, pertenecientes a las variedades más cultivadas en la provincia de León. Se establecieron las parcelas experimentales en 3 ambientes distintos cada año, en las comarcas más representativas de su cultivo en la provincia de León, Páramo, Valduerna y Cepeda. Para evaluar la intensidad de estas enfermedades se estableció una escala de daño de 0 a 9.

Los hongos detectados fueron roya (*Uromyces phaseoli*), moho blanco (*Sclerotinia sclerotiorum*) y moho gris (*Botrytis cinerea*). Su incidencia, generalmente, fue poco elevada, debido principalmente a la utilización de bajas dosis de siembra.

Los resultados mostraron diferencias altamente significativas entre ambientes, la roya se detectó en un solo ambiente, mientras que los otros dos hongos se detectaron en más ambientes. La mayor incidencia de estos hongos se presentó en las parcelas más fértiles, y en las que por ello se desarrolló excesivamente la masa foliar y se alargó exageradamente el ciclo. En el Páramo la incidencia de estos hongos fue inferior.

También, existieron diferencias altamente significativas entre líneas, siendo más susceptibles las líneas con hábito de crecimiento indeterminado postrado (Tipo III). Las líneas que presentaron ataques de roya fueron: De la Virgen, Pinta larga, Amarilla y Arrocina. Los dos mohos (blanco y gris) se presentaron más frecuentemente, sobre todo el moho gris, existiendo campos en los que más de 50 % de las líneas presentaban algún síntoma, aunque en la mayor parte las lesiones eran aisladas. La incidencia de los mohos fue mayor en las líneas Planchada, Plancheta, Arrocina, Amarilla, Pinta larga y De la Virgen. No se observaron síntomas, en ningún ambiente, en 8 líneas.

## RELACIÓN GENÉTICA DETERMINADA MEDIANTE SECUENCIACIÓN DE LA REGIÓN ITS Y AFLPs DE SIETE FORMAS ESPECIALIZADAS DE *Fusarium oxysporum*

ARROYO, R.<sup>1</sup>, CENIS, J.L.<sup>2</sup>, TELLO, J.<sup>3</sup>, MARTÍNEZ-ZAPATER, J.M.<sup>1</sup> Y CIFUENTES, D.<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Centro Nacional de Biotecnología-CSIC, Cantoblanco, 28049 Madrid.

<sup>2</sup>Centro de Investigación y Desarrollo Agroalimentario, 30150 La Alberca (Murcia).

<sup>3</sup>ETS Ingenieros Agrónomos, Universidad de Almería, 04120 Almería

<sup>4</sup>ETS Ingenieros Agrónomos, Universidad Politécnica de Cartagena, Pº Alfonso XIII s/n, 30203 Cartagena (Murcia).

Con el objetivo de diseñar cebadores PCR para la detección específica de diferentes formas especializadas de *Fusarium oxysporum*, se procedió a secuenciar la región ITS (*Internal Transcribed Spacer*) del ADN ribosomal de 17 aislados pertenecientes a siete de dichas formas: *F.o. melonis* (4 aislados), *F.o. dianthi* (2), *F.o. niveum* (4), *F.o. lycopersici* (2), *F.o. radicle-lycopersici* (3), *F.o. lagenaria* (1) y *F.o. luffae* (1). La reacción PCR se realizó con los cebadores *Its-4* e *Its-5*, que amplificaron un fragmento de 560 pb que incluye las zonas ITS 1, ITS 2 y el gen 5.8S comprendido entre ambas. El análisis de estas secuencias reveló la escasa variabilidad existente entre las formas especializadas, insuficiente para el diseño de cebadores específicos de las mismas. Además, se comprobó que aislados de diferentes formas presentan una secuencia idéntica mientras aislados de la misma forma aparecen en grupos diferentes del correspondiente dendrograma.

Esta observación se confirmó en un experimento diferente en el que se estudió la variabilidad mediante marcadores AFLP de la misma colección de aislados y 10 más pertenecientes a *F.o. ciceris*, *F.o. cucumerinum* y *F.o. proliferatum*. El dendrograma obtenido no reveló ninguna estructuración genética de las 10 formas especializadas. Estos datos, que están en la línea de los obtenidos por otros autores, parecen indicar que las formas especializadas de *F. oxysporum* no constituyen linajes monofiléticos que evolucionan de forma separada. Parece más bien que genotipos ampliamente diferentes podrían compartir similares factores de especificidad y especialización patogénica.

## DIFERENCIAS DE AGRESIVIDAD Y DIVERSIDAD GENOTÍPICA DE AISLADOS DE *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* (Xcp) Y SU VARIANTE *fuscans* (Xcpf) PROCEDENTES DE LAS PRINCIPALES ZONAS DE CULTIVO DE JUDÍA-GRANO DE CASTILLA-LEÓN

LÓPEZ, R.<sup>1</sup>, GILBERTSON, R.L.<sup>2</sup>, MURILLO, J.<sup>3</sup> Y ASENSIO, C.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Servicio de Investigación y Tecnología Agraria (SITA), Junta de Castilla y León, Apdo. 172, 47080 Valladolid.

<sup>2</sup>Department of Plant Pathology, University of California, Davis.

<sup>3</sup>Dpto. Producción Agraria, Universidad Pública de Navarra, 31006 Pamplona.

La tabaquera de las judías está causada por los patógenos *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* (Xcp) y su variante *fuscans* (Xcpf). Junto con *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* constituyen uno de los principales condicionantes de este cultivo en Castilla y León. Se conoce muy poco sobre la diversidad genotípica tanto de Xcp como de Xcpf. Gilbertson *et al.*, (1991) demostraron mediante análisis del polimorfismo de restricción (RFLP) la existencia de considerable diversidad genética entre cepas de Xcp/Xcpf procedentes de distintos puntos geográficos, indicando que pueden existir subpoblaciones locales, tanto en Xcp como en Xcpf, que han evolucionado conjuntamente respecto a un ancestro inicial. Con el objetivo de investigar esta variabilidad genética, así como las posibles diferencias en agresividad, se inició un muestreo por las principales zonas de cultivo de la Comunidad que permitió establecer una colección de 31 aislados.

La variabilidad presente en esta población se contrastó con la de aislados representativos de otras regiones del Este de África, así como del Norte, Centro y Sur de América. Los aislados fueron identificados mediante cebadores específicos (Audy *et al.*, 1994) y de acuerdo a pruebas bioquímicas convencionales (Schaad, 2001). La caracterización genotípica mediante rep-PCR (secuencias REP, ERIC y BOX) demostró que Xcp presenta una gran homogeneidad y un patrón de bandas distinto al de las cepas africanas e igual al de las cepas procedentes del continente americano. Respecto a Xcpf, la variabilidad genética encontrada es mayor, encontrándose perfiles de bandas similares a los patrones americanos y africanos. La prueba de patogenicidad se llevó a cabo sobre cuatro variedades de judía común representativas de los dos orígenes de nacimiento del cultivo: mesoamericano y andino, ya que anteriormente se han encontrado indicios de una posible co-evolución del patógeno con los dos orígenes del huésped (Mkandawire, *et al.*, 2001). No se encontró variabilidad patogénica significativa ni en Xcp ni en su variante *fuscans*. Se comprobó, sin embargo, la elevada agresividad de estos dos patógenos comparable, así mismo, a la de los aislados del continente americano.

El conocimiento de la variabilidad presente en este patógeno es una herramienta imprescindible dentro del programa de mejora de judía-grano para resistencia a bacteriosis que se desarrolla en el SITA. El hecho de que la diversidad encontrada no sea especialmente importante simplificará en gran medida, tanto los trabajos de selección de individuos resistentes, como la evaluación de germoplasma por su resistencia a tabaquera.



## EL AGENTE DE LA GRASA DE LAS JUDÍAS EN ESPAÑA (*Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*) ESTÁ COMPUESTO DE DOS LÍNEAS GENÓMICAS DIFERENCIADAS POR LA POSESIÓN DE LA REGIÓN GÉNICA PARA LA BIOSÍNTESIS DE FASEOLOTOXINA

OGUIZA, J.A.<sup>1</sup>, RICO, A.<sup>1</sup>, SUTRA, L.<sup>2</sup>, VIVIAN, A.<sup>3</sup> Y MURILLO, J.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Dpto. Producción Agraria, U. Pública de Navarra, 31006 Pamplona;

<sup>2</sup>UMR de Pathologie Végétale INRA-INH-Université, Beaucauzé, Francia;

<sup>3</sup>Centre for Research in Plant Sciences, University of the West of England, Bristol, Gran Bretaña.

La bacteria *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* (*Pph*) produce la grasa de las judías (*Phaseolus vulgaris* L.), aunque también puede infectar a diversos cultivares de soja. Recientemente se ha descrito que la capacidad de *Pph* para producir enfermedad en judía y soja se basa en la posesión de una isla de patogenicidad (PAI) localizada en un plásmido de 150 kb, siendo los principales genes de patogenicidad identificados *virPphA* y *avrPphF*. Además de la PAI, está admitido que la característica que define a las cepas de *Pph* es la posesión del cluster de genes *argK-tox* que dirige la biosíntesis de la fitotoxina faseolotoxina. Esta región, que parece incrementar la virulencia, se utiliza como diana para la detección e identificación de *Pph*. Más de un 66% de los aislados españoles de *Pph* carecen del cluster *argK-tox* (aislados *tox*<sup>-</sup>; ver póster de Rico *et al.*), por lo que en este trabajo se aborda la caracterización molecular de estas cepas con el fin de estudiar la evolución de los genes de virulencia, y para identificar posibles dianas que sirvieran para su detección. Los patrones de amplificación de secuencias de DNA repetidas por PCR fueron altamente similares en los 40 aislados españoles examinados y en aislados de *Pph* de colecciones internacionales, pero claramente diferentes de los patrones mostrados por cepas de *Ps* pv. *glycinea*. Teniendo en cuenta estos patrones, se han diferenciado dos grupos: el Grupo 1 contiene todos los aislados *tox*<sup>+</sup> españoles e internacionales, mientras que el Grupo 2 contiene exclusivamente los aislados *tox*<sup>-</sup> españoles. Los aislados del Grupo 2 se caracterizan, además, por no producir faseolotoxina y carecer de PAI; mostrar un perfil plasmídico característico con ausencia del plásmido de 150 kb, y poseer perfiles de hibridación, con diversos genes de virulencia, característicos y distintos del Grupo 1. Sin embargo, no se han encontrado diferencias significativas de secuencia entre aislados de los dos grupos en la región EEL a diferencia de lo que se observa en otros patovares. Por otro lado, los ensayos de movilidad del DNA heteroduplex (HMA) de la ITS de los operones de rDNA han permitido diferenciar claramente a los aislados del Grupo 1, que muestran una única banda, de los del Grupo 2, que muestran tres bandas. En conjunto, los resultados confirman que los aislados *tox*<sup>-</sup> españoles pertenecen al pv. *phaseolicola*, pero representan una línea evolutiva distinta que la de los aislados que producen faseolotoxina, y sugiere que este cluster de genes, así como la PAI, se han adquirido en un periodo reciente de la evolución.

P-102

## EFFECTO DEL Fe Y DEL Cu SOBRE LA GERMINACIÓN DE LAS CONIDIAS DE *Spilocaea oleagina*

AL SALIMIYA, M., ALCÁNTARA, E. Y TRAPERO, A.

Dpto. Agronomía, ETSIAM, Universidad de Córdoba.

Avda. Menéndez Pidal s/n, 14071 Córdoba.

El conocimiento de los factores que influyen sobre la germinación de las conidias de *Spilocaea oleagina*, hifomiceto causante del Repilo del olivo, es fundamental para conocer la biología de este patógeno y para evaluar la eficacia de medidas de control que actúen en esta fase de la patogénesis. Observaciones recientes pusieron de manifiesto que algunos nutrientes que contienen quelatos de Fe y Cu favorecen la germinación de las conidias de este hongo. Por ello, en este trabajo se ha estudiado el efecto de los cationes Fe y Cu sobre la germinación de las conidias de *S. oleagina*.

Las conidias se obtuvieron mediante raspado de hojas de olivo naturalmente infectadas que presentaban lesiones con abundante esporulación. La suspensión conidial se preparó con una gradación de concentraciones de los dos cationes. Los productos utilizados para obtener las soluciones de los cationes metálicos fueron diferentes sales inorgánicas, quelatos y variantes de solución nutritiva de Hoagland. La suspensión conidial se incubó a 15°C durante 48 hr. Tras la incubación, se realizaron los montajes correspondientes para las observaciones microscópicas, determinando el porcentaje de conidias germinadas.

Los resultados obtenidos mostraron que el Fe posee un efecto estimulante de la germinación de los conidias, pero este efecto varió marcadamente en función de la concentración de Fe y del producto base utilizado. Para las sales inorgánicas, el efecto estimulante se produjo para concentraciones de Fe bajas (<10 µg/ml); mientras que para los quelatos, el máximo de estimulación se produjo en torno de 100 mg/ml. Para concentraciones de Fe superiores a la óptima, el efecto estimulante se redujo drásticamente, existiendo toxicidad para las concentraciones más elevadas. La estimulación de la germinación fue más notable cuando las conidias tuvieron un nivel de germinación bajo (< 50%). Este efecto estimulante de la germinación de conidias también se tradujo en una mayor severidad de las infecciones en hojas. Por el contrario, para el Cu no se observó ningún efecto estimulante y desde concentraciones muy bajas (0.001 µg/ml) ya se detectó un efecto tóxico, produciéndose la inhibición completa de la germinación de los conidias a partir de 10 µg/ml. La solución completa de Hoagland inhibió ligeramente la germinación de las conidias y dicho efecto inhibitor se redujo al diluir la solución.

## RESISTENCIA AL REPILO EN LAS DESCENDENCIAS DE LOS CRUZAMIENTOS DEL PROGRAMA DE MEJORA GENÉTICA DEL OLIVO

AL SALIMIYA, M. Y TRAPERO, A.

Dpto. Agronomía, ETSIAM, Universidad de Córdoba. Avda. Menéndez Pidal s/n, 14071 Córdoba

En 1994 se inició en el Departamento de Agronomía de la Universidad de Córdoba un programa de mejora genética del olivo, cuyos objetivos generales son obtener nuevas variedades con mejores características agronómicas y de calidad. Entre estas características se incluyó la resistencia a la enfermedad más común del olivar: el Repilo causado por el hifomiceto *Spilocaea oleagina*. En este trabajo se resumen las últimas investigaciones que se han llevado a cabo en esta línea.

Los parentales seleccionados para los diferentes cruzamientos fueron cuatro variedades muy resistentes ('Dolce Agogia', 'Frantoio', 'Leccino' y 'Lechín de Sevilla'), una moderadamente susceptible ('Arbequina') y una muy susceptible ('Picual'). El material vegetal evaluado fueron plántulas de semilla de unos 6 meses (20-25 cm altura) cultivadas en macetas y hojas separadas de árboles de varios años cultivados en campo. Las plántulas y hojas separadas se inocularon mediante pulverización con una suspensión conidial ( $1 \times 10^5$  conidias/ml) de un aislado local, siguiendo la metodología puesta a punto en trabajos anteriores. La severidad de las infecciones visibles y latentes se determinó a los 2 meses de la inoculación. Para homogeneizar los resultados, los valores de severidad se relativizaron con respecto a la variedad 'Picual', clasificando las descendencias en cinco categorías desde muy susceptible (>75% 'Picual') hasta muy resistente (<5% 'Picual').

La respuesta a la infección en las diferentes descendencias de los cruzamientos presentó una amplia variación entre individuos, obteniéndose curvas unimodales cuyo máximo osciló entre valores de resistencia elevada hasta susceptibilidad moderada, en función de los parentales. No obstante, en los cruzamientos entre cultivares resistentes se obtuvieron individuos susceptibles, y viceversa, de cruzamientos entre parentales susceptibles se obtuvieron individuos resistentes. El número variable de descendencias evaluado para cada cruzamiento, junto a la existencia de un cierto grado de contaminación en los cruzamientos, no han permitido realizar un análisis preciso de la herencia de la resistencia; si bien, los resultados obtenidos sugieren la implicación de múltiples genes en la resistencia del olivo a *S. oleagina*. Los individuos resistentes con buenas características agronómicas se han seleccionado para realizar estudios más extensos de comportamiento en campo antes de su propagación vegetativa como nuevas variedades.

P-104

## PATOGENICIDAD DE *Colletotrichum* spp. EN PLANTONES DE OLIVO

DE OLIVEIRA, R. Y TRAPERO, A.

Dpto. de Agronomía, ETSIAM, Universidad de Córdoba.

Avda Menéndez Pidal s/n, 14071 Córdoba.

La aceituna jabonosa o antracnosis, causada por *Colletotrichum* spp., es una grave enfermedad del olivo en algunas comarcas olivareras durante los años de abundantes lluvias otoñales. En España, tradicionalmente sólo se han observado infecciones de los frutos, que dan lugar a importantes pérdidas de rendimiento y, sobre todo, a una pésima calidad de los aceites obtenidos. En las últimas epidemias de esta enfermedad en Andalucía también se han detectado en los árboles severamente afectados defoliación, desecación y muerte apical de las ramas. Por ello, en el presente trabajo se ha estudiado el proceso de patogénesis de *Colletotrichum* spp., en plantones y estaquillas de olivo en condiciones controladas.

En todos los experimentos se incluyeron dos cultivares de reacción conocida: Hojiblanca (susceptible) y Picual (resistente). El material vegetal utilizado fueron plantones de olivo de 3 y 1 años, con y sin frutos, y estaquillas no enraizadas. Se emplearon dos aislados de *Colletotrichum*, uno identificado como *C. acutatum* y el otro como *C. gloeosporioides*. El inóculo consistió en una suspensión conidial ( $10^6$  conidias ml<sup>-1</sup>) de cada uno de los dos aislados. Mensualmente desde el cuajado del fruto (mediados de Junio) hasta la maduración de la aceitunas (mediados de Diciembre) se pulverizaron los plantones con la suspensión conidial y se incubaron en condiciones favorables para el desarrollo de la enfermedad. Las estaquillas no enraizadas se han inoculado mediante inmersión de la parte basal en un filtrado crudo (0.2  $\mu$ m) de un cultivo del hongo en los medios PD (Patata-Dextrosa) y Richards modificado.

Los resultados han demostrado que las aceitunas son susceptibles a la infección en cualquier estado de su desarrollo; si bien, la susceptibilidad aumenta con la maduración del fruto. Por otro lado, se ha demostrado que la desecación foliar y puntiseado de ramas es un síndrome asociado con la podredumbre del fruto, ya que sólo se presenta en las ramas con frutos afectados. Este síndrome se desarrolla varias semanas o meses después de la podredumbre del fruto y está relacionado con el incremento de la temperatura. Los plantones sin fruto, tanto los de la variedad susceptible como los de la resistente, así como los plantones con frutos de la variedad resistente, no presentaron ningún síntoma y el patógeno pudo aislarse sólo esporádicamente de los tejidos inoculados. Los experimentos con estaquillas no enraizadas determinaron que el síndrome de desecación de ramas se debe probablemente al efecto de una toxina del patógeno que se produce en los frutos afectados. La variedad resistente Picual no resultó afectada por el filtrado tóxico del hongo.

## EL MOSAICO DE LA HIGUERA: EXPRESIÓN E INCIDENCIA

CASTELLVELL, D.<sup>1</sup>, SEGARRA, J. <sup>1</sup>, JUÁREZ, M. <sup>2</sup>, ACHÓN, M.A. <sup>1</sup> Y MEDINA, V. <sup>1</sup>

<sup>1</sup> Dpto. Producció Vegetal i Ciència Forestal. ETSEA de Lleida. UdL. Avda. Alcalde Rovira Roure, 177. 25198 Lleida.

<sup>2</sup> Dpto. Producción Vegetal. Escuela Superior Politécnica. Universidad Miguel Hernández. Carretera de Beniel, Km. 3, 2. 03312. Orihuela (Alicante).

El mosaico de la higuera es una enfermedad distribuida mundialmente que afecta al cultivo de la higuera (*Ficus carica* L.). Es una enfermedad de etiología incierta, que se transmite por ácaros eriófidos y de la cual se desconoce su efecto sobre la producción.

Con el objetivo de determinar la importancia del mosaico de la higuera en España se están realizando prospecciones aleatorias en campos comerciales en dos regiones españolas y muestreos en distintas colecciones de variedades de higuera. Los resultados de las primeras prospecciones indican que esa enfermedad está ampliamente distribuida. Se observó en todos los campos muestreados y la incidencia media fué superior al 90%. Los síntomas se distribuyen irregularmente dentro de cada árbol, y se pueden clasificar en tres tipos: a) manchas cloróticas anulares, b) decoloraciones cloróticas siguiendo la nerviación de la hoja y c) mosaicos. La máxima expresión de los síntomas se observa durante el mes de junio y después decrece paulatinamente.

La severidad de la enfermedad varía según el árbol dentro de un mismo campo. Así, mientras que algunos árboles presentan síntomas en pocos brotes otros árboles de la misma parcela presentan síntomas en más del 50% del árbol. La severidad media se ha estimado alrededor del 15%.

Asimismo, se ha detectado en los campos visitados la presencia de *Aceria ficus* Cotte, ácaro descrito como transmisor de esta enfermedad.

## ADQUISICIÓN Y TRANSMISIÓN DEL VIRUS DEL BRONCEADO DEL TOMATE (TSWV) POR LARVAS DE *Frankliniella occidentalis* SOBRE DISTINTAS VARIEDADES DE PIMIENTO

ALCÁZAR, A. 1, FERNÁNDEZ, P. 2, ONCINA, M.1, MIGUEL, M.1 Y LACASA, A.1

<sup>1</sup> Centro de Investigación y Desarrollo Agroalimentario. Consejería de Agricultura, Agua y Medio Ambiente. C/ Mayor s/n, 30.150 La Alberca (Murcia).

<sup>2</sup> Programa de Colaboración FECOAM-Consejería de Agricultura, Agua y Medio Ambiente, c/ Caballero, 13, 30.003 Murcia.

En las condiciones en que se realiza el cultivo de pimiento en invernadero en la comarca productora del Campo de Cartagena, las epidemias de Tomato Spotted wilt Virus derivan del inóculo generado en el interior del propio cultivo, ya que el virus es transmitido de forma persistente; siendo las larvas de primer estadio las que lo adquieren y los adultos los transmisores. Los focos primarios de la virosis se establecen en los invernaderos por inmigración de adultos infectivos. Cuando el virus es adquirido por la larva en edades muy tempranas, el periodo de latencia puede concluir antes de alcanzar los estadios ninfales, pudiendo realizar la transmisión las larvas de segundo estadio.

El ensayo se llevó a cabo en un invernadero con cuatro variedades, dos sensibles (Sonar y Orlando), y dos resistentes (BRF1007 y RL588), dispuestas en bloques al azar. Semanalmente se muestrearon todas las plantas del invernadero para determinar el porcentaje de TSWV para cada una de las cuatro variedades presentes, eligiéndose una muestra de 80 larvas en estadio L1 por variedad, que eran colocadas en una caja Penna sobre discos de hoja de idéntico material vegetal sobre el cual se habían recogido. Se determinó la adquisición de TSWV como el porcentaje de trips del total recuperado que dieron positivos en el análisis por inmunopresión, una vez completado su ciclo biológico. La transmisión se determinó como el número de larvas en relación al total recuperado, que inoculó la enfermedad al disco de hoja, sometido éste a análisis por inmunopresión.

El grado de correlación obtenido entre la evolución de TSWV para cada variedad y el porcentaje de adquisición de la enfermedad por parte de las larvas es satisfactorio, obteniéndose una correlación  $r_2= 0.85$  para Sonar;  $r_2= 0.97$  para Orlando;  $r_2= 0.8$  para RL588 y  $r_2= 0.85$  para BRF1007.

La correlación resultante entre la evolución de TSWV para cada variedad y el porcentaje de transmisión larvario de la enfermedad, se puede considerar satisfactorio, obteniéndose una correlación  $r_2= 0.88$  para Sonar;  $r_2= 0.86$  para Orlando;  $r_2= 0.97$  para RL588 y  $r_2= 0.93$  para BRF1007.

## VIRUS EN CULTIVOS DE CRUCÍFERAS Y LECHUGA: INCIDENCIA, ACTIVIDAD VECTORIAL Y RESERVORIOS

MORENO, A.<sup>1</sup>, DE BLAS, C.<sup>2</sup>, NEBRED, M.<sup>3</sup>, DUQUE, M.<sup>1</sup> Y FERERES, A.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Dpto. Protección Vegetal. Centro de Ciencias Medioambientales. CSIC. C/ Serrano, 115 dpdo. 28006 Madrid.

<sup>2</sup> Dpto. Protección Vegetal INIA. Ctra. de la Coruña, Km. 7.5. 28040 Madrid.

<sup>3</sup> Dpto. Biodiversidad. Museo Nacional de Ciencias Naturales. CSIC. C/ José Gutiérrez Abascal, 2. 28006 Madrid.

Entre los principales agentes patógenos que atacan a los cultivos de crucíferas del género *Brassica* (coliflor, nabo, brocoli, col, etc) y lechuga hay que destacar los virus transmitidos por insectos, responsables de grandes pérdidas. Dada la importancia económica que tienen tales cultivos en España, para poder llevar a cabo las medidas de control oportunas es imprescindible la identificación de los virus predominantes y sus principales vectores, así como sus reservorios naturales.

Nuestro objetivo fue identificar los virus presentes en distintas regiones españolas (Madrid, Murcia, Navarra, Cataluña, Asturias, León y Zamora) en los cultivos citados, su incidencia en la flora adventicia y la aparición de infecciones mixtas.

El muestreo se realizó sobre plantas sintomáticas durante dos años consecutivos (2001-2002) y la identificación de los virus mediante la técnica ELISA, usando anticuerpos comerciales específicos. En algunos casos, la infección se comprobó por inoculación sobre plantas huéspedes e IC-RT-PCR.

Hasta el momento, los resultados obtenidos mostraron una notable mayor incidencia de virus en los muestreos realizados en otoño que en los llevados a cabo en primavera, probablemente debido a una mayor actividad de las especies de pulgones vectores de virus. En este contexto, se han encontrado colonias de *Hyperomyzus lactucae* en *Sonchus spp.* próximos a los cultivos muestreados en Madrid, Cataluña y Asturias. Además, esta misma especie de pulgón es la que presenta una mayor actividad vectorial en las regiones muestreadas. Este dato, junto con el hecho de que *Sonchus spp.* es un reservorio natural de *lettuce mosaic potyvirus* (LMV), parece indicar que *H. lactucae* es el principal vector de LMV en cultivos de lechuga.

En los cultivos de *Brassica spp.* los principales virus encontrados fueron *cauliflower mosaic caulimovirus* (CaMV) y *beet western yellows luteovirus* (BWYV). En lechuga, los *potyvirus* fueron los virus predominantes en Madrid, siendo LMV el más frecuente, mientras que en Murcia resultó ser *tomato spotted wilt tospovirus* (TSWV) el virus más abundante. En cuanto a los virus encontrados en flora adventicia, hasta la fecha los más frecuentes fueron TSWV y BWYV.

Aunque se encontraron infecciones mixtas en muchos casos, su frecuencia fue mayor en *Sinapis spp.* y *Sonchus spp.*, donde encontramos infecciones dobles y triples, respectivamente.

P-116

## TOMATO YELLOW LEAF CURL VIRUS: EVOLUCIÓN Y SITUACIÓN ACTUAL EN ESPAÑA

FONT, I.<sup>1</sup>, RUBIO, L.<sup>2</sup>, GUERRI, J.<sup>2</sup>, MORENO, P.<sup>2</sup> Y JORDÁ, C.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> *Unidad de Patología Vegetal, Departamento de Ecosistemas Agroforestales, E.T.S.I. Agrónomos, Universidad Politécnica de Valencia. Camino de Vera s/n 46022 Valencia, España.*

<sup>2</sup> *Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA), Apdo. Oficial, 46113 Moncada, Valencia, España.*

El virus del rizado amarillo del tomate fue detectado por primera vez en España en 1992, ocasionando importantes pérdidas en cultivos de tomate de Murcia la especie *Tomato yellow leaf curl Sardinia virus* (TYLCSV, nombrada anteriormente TYLCV-Sar) (Moriones et al., 1993. *Plant Dis.* 77:953) y extendiéndose posteriormente a otras áreas productoras (Noris et al., 1994. *Arch. Virol.* 135:165-170 y Reina et al., 1994. *Hortofruticultura*, 6:36-40). En el año 1997 se detectó en Almería la especie *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV, nombrada anteriormente TYLCV-Is) (Navas-Castillo et al., 1997. *Plant Dis.* 81:1461), que también se fue extendiendo por otras zonas compartiendo nicho ecológico con TYLCSV. En el año 1999, se detectó, en cultivos comerciales de judía en Almería, la presencia de un virus recombinante entre las dos especies de TYLCV, el cual presentaba una mejor adaptación biológica que los parentales, ya que el recombinante era capaz de infectar a tomate, judía y *Solanum nigrum*; y hasta la fecha únicamente TYLCSV había sido capaz de infectar a *Solanum nigrum* y únicamente TYLCV a judía (Monci et al., 2001. *Plant Dis.* 85:1289).

Desde 1992 hasta la fecha las dos especies de TYLCV se encuentran distribuidas por las principales zonas productoras de tomate de España (Jordá et al., 2001. *Plant Dis.* 85:445). El objetivo del presente trabajo es el estudio de la distribución de los tipos del virus en los cultivos de tomate de distintas zonas de España analizando, mediante hibridación molecular y PCR, muestras recogidas desde 1992 hasta la fecha.



## SEGUIMIENTO EPIDEMIOLÓGICO DEL VIRUS DEL MOSAICO DEL PEPINO DULCE (PepMV) EN LAS PRINCIPALES ZONAS PRODUCTORAS DE MURCIA

HERNÁNDEZ-GALLARDO, M.D. <sup>1</sup>, GUERRERO, M.M. <sup>1</sup>, ALCÁZAR, A. <sup>1</sup>, MARTÍNEZ, M.A. <sup>1</sup>, BIELZA, P. <sup>2</sup>, ARANDA, M. <sup>3</sup>, CENIS, J.L. <sup>1</sup> Y LACASA, A. <sup>1</sup>

<sup>1</sup>Centro de Investigación y Desarrollo Agroalimentario, 30150 La Alberca (Murcia).

<sup>2</sup>ETS Ingenieros Agrónomos, Univers. Politécnica de Cartagena, 30203 Cartagena (Murcia).

<sup>3</sup>Centro de Edafología y Biología Aplicada del Segura (CEBAS)-CSIC, Campus Universitario de Espinardo, 30100 Murcia.

El Virus del Mosaico del Pepino Dulce (PepMV) detectado en Europa en 1999, está causando importantes daños en las principales zonas productoras de tomate del Sureste Español. Se transmite mecánicamente de forma muy eficiente, lo que ha promovido su rápida expansión.

Durante las campañas de verano 2001 y otoño-invierno 2001/02, se han prospectado varios cultivos de tomate al aire libre, bajo malla y bajo invernadero, en diferentes zonas costeras del término municipal de Mazarrón con características productivas diferentes, con el fin de evaluar la incidencia de la virosis y su evolución a lo largo del ciclo de cultivo. Los seguimientos se realizaron cada dos semanas desde el comienzo del cultivo hasta que éste se dio por concluido, tomando muestras al azar en cada parcela, mediante la impresión de peciolo sobre una membrana de nylon positivamente cargada, *in situ*, para su análisis en laboratorio por el método de hibridación molecular.

En la campaña de verano 2001, tanto en cultivos al aire libre como bajo malla, la enfermedad no aparece hasta los meses de septiembre y octubre, con una incidencia que no supera en la mayoría de las parcelas el 35%. Paralelamente al seguimiento de las parcelas se analizaron diferentes especies de malas hierbas asociadas al cultivo, encontrándose el virus en *Amaranthus blitoides*, *Malva sp.*, *Solanum nigrum*, *Chenopodium album* y *Conyza bonariensis*.

En la campaña de otoño-invierno 2001/02, las primeras manifestaciones del virus se dan en los meses de noviembre y diciembre, al principio del cultivo, con un 5-65% de plantas afectadas según parcelas. La enfermedad se va extendiendo a lo largo del ciclo de cultivo rápidamente, hasta afectar a todo el invernadero en los meses de abril y mayo. Se analizaron separadamente plantas injertadas y no injertadas, comprobándose que el virus aparece entre 15 y 20 días antes en las injertadas. Sin embargo, cuando aparece en las plantas no injertadas, éstas mantienen un porcentaje de infestación del orden del 5-10% o superior.

P-118

## EPIDEMIOLOGÍA DEL PEPINO MOSAIC VIRUS (PepMV). DISEMINACIÓN EN TOMATE POR ABEJORROS (*Bombus* spp.)

LACASA, A.<sup>1</sup>, GUERRERO, M.M.<sup>1</sup>, HITA, I.<sup>1</sup>, HERNÁNDEZ, M.D.<sup>1</sup>, MARTÍNEZ, M.A.<sup>1</sup>, BARCELÓ, N.<sup>1</sup>, CONTRERAS, J.<sup>2</sup>, BIELZA, P.<sup>2</sup> Y JORDÁ, C.<sup>3</sup>.

<sup>1</sup> Centro de Investigación y Desarrollo Agroalimentario. Consejería de Agricultura, Agua y Medio Ambiente. C/ Mayor s/n, 30150 La Alberca (Murcia).

<sup>2</sup> Dpto. Producción Agraria, ETSIA. Universidad Politécnica de Cartagena. Paseo Alfonso XIII, s/n. 30203. Cartagena (Murcia).

<sup>3</sup> Dpto. Ecosistemas Agroforestales, ETSIA, Universidad Politécnica de Valencia. c/ Camino de Vera, 14, 46021 Valencia.

El virus del mosaico del pepino dulce (Pepino Mosaic Virus, PepMV) afecta al tomate en numerosos países de la Unión Europea, transmitiéndose eficazmente por contacto entre plantas y en las labores de manipulación de las plantas (entutorado, desbrotado, deshojado, etc). La amplia distribución de la virosis en las plantaciones de la Región de Murcia y su elevada incidencia nos hizo sospechar de que los abejorros (*Bombus terrestris* y *B. canariensis*) utilizados de forma generalizada como polinizadores estuvieran implicados en la diseminación del virus.

En dos campañas consecutivas, se dispusieron plantas libres del virus en invernaderos altamente contaminados de PepMV, aislándolas con mallas densas de forma que sólo pudieran acceder a ellas los *Bombus* por encima de las mallas. A las 4 semanas de la introducción de las plantas, más del 6% eran portadoras del virus, estando todas contaminadas a las 8 semanas, para un nivel medio de flores visitadas del 31% en las plantas experimentales y del 39% en las plantas del cultivo comercial. Más del 70% de los abejorros capturados en los invernaderos experimentales que portaban polen en las patas dieron reacción positiva al suero de PepMV proporcionado por DMSZ. Al inocular plantas de tomate (variedad Marmande) con un triturado tamponizado de las patas de los abejorros y del polen que portaban capturados en invernaderos con alto nivel de incidencia de la virosis, se obtuvo infección y síntomas de PepMV. Observaciones realizadas en los invernaderos experimentales permiten significar que la transmisión se produciría o bien al tocar los sépalos con las patas contaminadas o bien al posarse sobre las hojas y restregar los peines de las patas traseras, en la acción de limpieza y aseo corporal habituales. La aportación de los abejorros a la diseminación del PepMV resulta, en cualquier caso, inferior a la producida en las labores culturales.

## ESTUDIO EPIDEMIOLÓGICO SOBRE LAS IMPLICACIONES DEL PepMV EN LA ETIOLOGIA DEL COLAPSO DE LAS PLANTAS DEL TOMATE

LACASA, A.<sup>1</sup>, GUERRERO, M.M.<sup>1</sup>, HERNÁNDEZ, M.D.<sup>1</sup>, HITA, I.<sup>1</sup>, JORDÁ, C.<sup>2</sup>, MARTÍNEZ, M.A.<sup>1</sup>, BIELZA, P.<sup>3</sup>, CONTRERAS, J.<sup>3</sup>, CANO, A.<sup>1</sup>, CENIS, J.L.<sup>1</sup> Y BARCELÓ, N.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Centro de Investigación y Desarrollo Agroalimentario. Consejería de Agricultura, Agua y Medio Ambiente. C/ Mayor s/n, 30.150 La Alberca (Murcia);

<sup>2</sup>Dpto. Ecosistemas Agroforestales, ETSIA, Universidad Politécnica de Valencia.

c/ Camino de Vera, 14, 46.021 Valencia;

<sup>3</sup>Dpto. Producción Agraria, ETSIA. Universidad Politécnica de Cartagena.

Paseo Alfonso XIII, s/n. 30.203. Cartagena (Murcia).

Desde el otoño-invierno de la campaña 1998/99 son numerosos los cultivos de tomate de los invernaderos de la Región de Murcia que se ven afectados por una alteración, que se manifiesta por un conjunto de síntomas: marchitez inicial del ápice que puede ser pasajera o evolucionar a una marchitez más acentuada, con el amarilleo y la desecación de las hojas bajas y luego de toda la planta; el tallo está hueco, por reducción de la médula a las paredes interiores de los haces vasculares; desaparición de las raicillas y de los pelos absorbentes; lesiones sobre raíces secundarias y, finalmente, la podredumbre parcial del sistema radical. La aparición masiva y persistente de este síndrome se produjo después de la detección del virus del mosaico del pepino dulce en la comarcas tomateras afectadas. Prospecciones y seguimientos epidemiológicos realizados en las dos últimas campañas en las comarcas de Mazarrón y Águilas, muestran que el PepMV fue un elemento común a todas las plantas con colapso. Sin embargo, fueron mayoría las plantas infectadas de PepMV que no presentaron colapso. Algunos aislados del virus producen marchitez pasajera al inocularlos en condiciones controladas. La presencia de *Oplidium (brassicae)* y en menor cuantía *bornovanus*) en las raíces, ha sido otro elemento común en las plantas con síntomas de marchitez o colapso y ambos patógenos se han encontrado presentes al reproducir los síntomas en condiciones controladas, partiendo de sustratos de parcelas donde las plantas habían muerto por colapso. En ensayos comparativos realizados en diferentes invernaderos y con diferentes variedades se ha comprobado que las plantas no injertadas (que mayoritariamente presentaron colapso) contenían mayores niveles de PepMV que las injertadas (que sólo llegaron a mostrar ligeros marchitamientos) en los periodos críticos de manifestación del síndrome colapso, pese a que en las injertadas los niveles fueron mayores al inicio del cultivo. Se continúan los estudios sobre la hipótesis de la interacción de estos patógenos con las condiciones ambientales y de cultivo en la manifestación del colapso.

P-120

## EL VIRUS DEL BRONCEADO DEL TOMATE (TSWV) Y SU VECTOR *Frankliniella occidentalis* (Pergande) EN LAS PRINCIPALES ZONAS PRODUCTORAS DE PIMIENTO DE GALICIA

LORES, M., LÓPEZ, V., CABALEIRO, C. Y MARTÍN, B.

Dpto. de Producción Vegetal. Universidad de Santiago de Compostela. Escola Politécnica Superior. Campus Universitario S/N. 27002. Lugo.

El pimiento, con algo más de 700 ha de cultivo en toda Galicia, es una de las principales producciones hortícolas de esta Comunidad Autónoma. Es un cultivo de gran tradición, siendo las variedades Padrón y Arnoia, las más cultivadas. Desde la aparición, a mediados de la década de los 90, de los primeros focos del virus del bronceado del tomate (TSWV) en el sur de la provincia de Pontevedra, la gravedad y extensión de esta enfermedad aumenta año a año. En Galicia, las pérdidas de cosecha causadas por el virus del bronceado varían en función de las condiciones climáticas del año y de la zona de cultivo, no obstante, han sido importantes en determinadas campañas y comarcas productoras, lo que está causando una gran preocupación en el sector productor y demás sectores relacionados.

En parcelas de pimiento, de cultivo tanto al aire libre como en invernadero, situadas en las cuatro principales comarcas productoras de Galicia, O Salnés y O Rosal en Pontevedra, Padrón en A Coruña y Rivadavia en Orense, se colocaron trampas cromáticas azules con el fin de estudiar la evolución de las poblaciones del vector de la enfermedad, el tisanóptero *Frankliniella occidentalis*. Mediante muestreos de planta y trips en 26 parcelas de estas comarcas, se está evaluando la incidencia de TSWV en las distintas fases del cultivo, desde el trasplante hasta el final de la recolección, así como la presencia/ausencia de insectos virulíferos a lo largo de este periodo. La detección del virus tanto en hoja como en trips se realiza por Inmunoimpresión Directa-ELISA en membranas de nitrocelulosa. También se está llevando a cabo un estudio de las prácticas habituales de cultivo en estas zonas y su posible correlación con la aparición y dispersión de las infecciones del virus del bronceado.

Se ha podido determinar que las poblaciones del vector son abundantes en todas las comarcas estudiadas y que la aparición de las primeras parcelas con plantas infectadas es temprana, transcurridos pocos días desde el trasplante y con poblaciones de trips aún bajas o inexistentes, lo que hace sospechar que en algunos casos la fuente de infección está en el semillero. Igualmente se han detectado graves deficiencias de manejo del cultivo, que pueden favorecer notablemente la presencia y abundancia de las poblaciones de *F. occidentalis* y por lo tanto la dispersión de la enfermedad.

## EPIDEMIOLOGÍA DE VIRUS TRANSMITIDOS POR MOSCA BLANCA EN CULTIVOS DE CUCURBITÁCEAS BAJO PLÁSTICO EN ALMERÍA

RUIZ, L., JANSSEN, D., VELASCO, L., SEGUNDO, E., MARTÍN, G., CANO, M., BELMONTE, A. Y CUADRADO, I.M.

*Centro de Investigación y Formación Agraria (CIFA)*. Apdo de correos, 91. E-04700 El Ejido (Almería)  
Actualmente la mosca blanca *Bemisia tabaci* es la responsable de la transmisión de dos virus en cultivos de cucurbitáceas en Almería. El primero es *Cucurbit yellow stunting disorder virus* (CYSDV) (*Crinivirus*), presente en la zona productora de Almería desde principios de los 90. El segundo virus se detectó en la zona en otoño del año 2000: *Cucumber vein yellowing virus* (CVYV) (*Ipomovirus*). Ambos virus son transmitidos de forma semi-persistente por *B. tabaci*, sin embargo el resto de sus características biológicas son radicalmente diferentes.

Durante cinco campañas consecutivas de pepino se ha realizado un seguimiento en el espacio y en el tiempo de enfermedades transmitidas por *B. tabaci* en invernaderos del tipo "multicapilla simétrico" (parral mejorado). De los análisis de los datos epidemiológicos en el espacio (test  $\chi^2$  e índice de Jaccard), se concluye que la expresión de ambas enfermedades no está asociada. Dentro de las características agronómicas de Almería, la probabilidad de que una planta presente síntomas de CVYV o de CYSDV es similar. Sin embargo, en el desarrollo de la enfermedad, CVYV se ajusta a una distribución de probabilidad beta-binomial mientras que CYSDV lo hace a una distribución binomial. Esta diferencia nos indica que la distribución de CVYV en el espacio del invernadero es mucho más agregada que la de CYSDV que tiende a comportarse más bien de forma aleatoria. Estos resultados se corroboran también con los análisis del índice de Taylor (Taylor's binomial power law analysis).

Se relacionaron los datos de incidencia en el tiempo de las dos enfermedades con los de temperatura del invernadero ( $^{\circ}$ Día) mediante el ajuste a curvas sigmoidales y el análisis de tablas de vida (Kaplan-Meier). Con ambos métodos se obtuvieron valores de  $P_{0.5}$  que son estimaciones del intervalo de grados-día necesarios para que el 50% de las plantas presenten la enfermedad de un virus u otro. Al comparar estos valores, observamos que en cultivos de otoño, el  $P_{0.5}$  es igual para CVYV y CYSDV. No obstante, durante las campañas de primavera, este valor aumenta ya que la infección por CVYV es más tardía que por CYSDV.

Puesto que los cultivos de primavera se infectan primero por CYSDV y luego por CVYV, las temperaturas bajas podrían afectar al desarrollo de este último virus, ya sea a nivel de la planta o a nivel del vector. Además, las diferencias entre los dos virus en cuanto a su distribución espacial es probablemente debido a diferencias en la vida media de un virus y otro dentro del vector, siendo descrito para CVYV y CYSDV, intervalos de 5 horas y 9 días respectivamente.

## EPIDEMIOLOGÍA DE VIRUS DE PLANTAS HORTÍCOLAS EN LA FLORA ARVENSE Y SU PAPEL EN LAS INFECCIONES VIRALES DE LOS CULTIVOS

SACRISTÁN, S.<sup>1</sup>, BERNARDOS, A.<sup>1</sup>, DEL MONTE, J.P.<sup>2</sup>, FRAILE, A.<sup>1</sup> Y GARCÍA-ARENAL, F.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Biotecnología

<sup>2</sup>Departamento de Producción Vegetal

E.T.S.I. Agrónomos, Universidad Politécnica de Madrid. Av. Complutense s/n. 28040 Madrid.

Hemos hecho un seguimiento de la presencia e incidencia de los virus de plantas hortícolas más importantes de la Comunidad de Madrid en la vegetación espontánea. Durante tres años se han analizado, con periodicidad mensual, las siguientes variables:

- 1) Presencia de virus. Los virus analizados son los del género *Potyvirus* en general y las especies de este género: LMV (virus del mosaico de la lechuga), PVY (virus Y de la patata), BYMV (virus del mosaico amarillo de la judía), PRSV (virus de las manchas en anillo de la papaya), ZYMV (virus del mosaico amarillo del calabacín) y WMV-2 (virus del mosaico de la sandía) y las especies CMV (virus del mosaico del pepino) y TSWV (virus del bronceado del tomate) de los géneros *Cucumovirus* y *Tombusvirus* respectivamente.
- 2) Composición de la flora arvensis.
- 3) Variación de la biomasa total y de la fracción que representan las especies principales.

Con este trabajo se ha comprobado la presencia en la vegetación espontánea de huéspedes alternativos que efectivamente pueden actuar durante el invierno y primavera como reservorios o huéspedes puente de las virosis que afectan a los cultivos hortícolas en primavera y verano, e influir sobre su incidencia. Sin embargo, hay datos que apuntan a una posible estructuración por huésped de las poblaciones de ciertos virus, lo que subraya la complejidad de la ecología de estos virus.

## ESTUDIO DE LA TRANSMISION DEL FITOPLASMA DEL STOLBUR A TRAVÉS DE *Macrosteles quadripunctulatus* (Kirschbaum, 1868)

ALTABELLA, N., LAVIÑA, A. Y BATLLE, A.

Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentàries (IRTA). Dpto. Protecció Vegetal.

Ctra Cabrils s/n. 08348-CABRILS-Barcelona

En estudios epidemiológicos realizados en cultivos hortícolas y vinícolas de Cataluña, con el objetivo de identificar las especies de insectos transmisoras del fitoplasma del stolbur, se identificaron diferentes especies de cicadélidos y de fulgóridos como vectores potenciales de la enfermedad. Entre ellos, individuos de la especie *Macrosteles quadripunctulatus* se determinaron como infectados por el fitoplasma en la mayoría de las parcelas muestreadas. El cicadélido *M. quadripunctulatus* es un importante transmisor del fitoplasma causante de los Aster yellows y otras especies del mismo género como *M. laevis* han sido citadas como vectores del stolbur en tomate. En este trabajo se evalúa el potencial de *M. quadripunctulatus* como vector del stolbur. Los ensayos de transmisión han sido llevados a cabo con colonias sanas del cicadélido, siguiendo el método descrito por, Alma *et al.* 2000. Los cicadélidos se criaron en avena, *Avena sativa* L., y se mantuvieron en jaulas en una cámara de condiciones controladas, temperatura de (25 +2AC) y fotoperíodo de 16:8 h. Una planta de *Catharanthus roseus* identificada por PCR como infectada por stolbur se escogió para realizar la adquisición del fitoplasma. En cada ensayo 225 individuos sanos entre ninfas (3er-5º estadio) y adultos, se colocaron sobre la planta infectada por un periodo de adquisición de cinco días, seguidos por un periodo de incubación o latencia de 14 días sobre planta sana de avena. A continuación los individuos supervivientes se traspasaron a otra jaula con cinco plantas sanas por ensayo. Los ensayos de transmisión se han llevado a cabo con plantas sanas de vinca, tomate, zanahoria, lechuga y viña. Los análisis de PCR se realizaron con iniciadores específicos para stolbur, fsterol/ rstol (Maixner *et al.* 1995).

Se ha determinado la presencia del fitoplasma en los individuos que habían pasado el periodo de adquisición y de incubación. Los análisis realizados hasta el momento indican que ha habido transmisión positiva a plantas de vinca, zanahoria y tomate. Los síntomas causados por el fitoplasma fueron evidentes al mes de haberse realizado la transmisión, observándose menor desarrollo vegetativo, flores de menor tamaño y hojas cloróticas en vinca y afilamiento de hojas, frutos alargados y sépalos anormalmente grandes en tomate. En zanahoria también se han observado síntomas indicativos de fitoplasmosis como enrollamiento, amarilleamiento y menor tamaño de hojas. Las restantes especies vegetales con las que se han realizado los ensayos de transmisión se mantienen en invernadero para observar la posible aparición de síntomas y realizar periódicamente análisis mediante PCR para determinar si ha habido o no-transmisión.

## EVOLUCIÓN DE LAS POBLACIONES EPÍFITAS DE *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* EN OLIVO: EFECTO DE TRATAMIENTOS QUÍMICOS DE CONTROL SOBRE LA DINÁMICA POBLACIONAL

QUESADA, J.M.<sup>1</sup>, PEÑALVER, R.<sup>1</sup>, GARCÍA, A.<sup>1</sup>, SALCEDO, C.I.<sup>1</sup>, CLIMENT, F.<sup>2</sup> Y LÓPEZ, M.M.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Protección Vegetal y Biotecnología. Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA). Apartado Oficial, 46113 Moncada, Valencia.

<sup>2</sup>Estación Experimental Agraria de Llutxent, c/ Ronda Oeste s/n, 46838 Llutxent, Valencia.

*Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* es la bacteria causante de la tuberculosis del olivo, cuyos síntomas más característicos son la aparición de tumores o agallas en tronco, ramas, brotes y con menor frecuencia en hojas y frutos. Esta enfermedad está distribuida por todas las zonas de cultivo de olivo de España y *P. savastanoi* pv. *savastanoi* sobrevive mayoritariamente de una estación a otra en los tumores o como epífita en ramas y hojas. El estudio de su dinámica poblacional en nuestras condiciones es crucial para poder aconsejar los tratamientos de control en las épocas más adecuadas.

Se han analizado las poblaciones epífitas de *P. savastanoi* pv. *savastanoi* en ramas, hojas y frutos en olivos naturalmente infectados de las variedades Arbequina, Blanqueta, Cornicabra, Manzanilla, Picual, Picudo y Villalonga, en 6 localidades de Valencia y Andalucía durante los años 1999-2002. Además, se está estudiando el efecto de tres tratamientos de control (oxicloruro de cobre (Cu 50%), sulfato cuprocálcico (Cu 20%)+Mancozeb 8% y Bion® (Novartis)) sobre la evolución de estas poblaciones epífitas en ramas y hojas en una plantación experimental de las variedades Arbequina y Picudo, inoculadas con la bacteria al inicio del estudio. Se analizaron las poblaciones en ramas y hojas utilizando de 5 a 20 gramos de material vegetal sin síntomas por árbol, que fue lavado en solución de Ringer con agitación y posteriormente sembrado en los medios King B y PVF-1. La identidad de las colonias se confirmó mediante PCR y ELISA-i utilizando anticuerpos específicos de *P. savastanoi* pv. *savastanoi*.

En los olivos naturalmente infectados, la proporción de muestras en las que se aisló la bacteria fue similar en ramas y hojas (»26% de las muestras analizadas), siendo las poblaciones medias de *P. savastanoi* pv. *savastanoi* en los tres años de estudio de  $10^4$  y  $10^3$  UFC/gr de tejido en ramas y hojas, respectivamente. La bacteria se aisló con mayor frecuencia en primavera (33.8%), siendo el verano la época en que dicho porcentaje fue menor (15.8%). En los olivos inoculados, se observó que los dos tratamientos cúpricos afectaron significativamente a las poblaciones epífitas de *P. savastanoi* pv. *savastanoi*, ya que la bacteria se aisló con menor frecuencia en los olivos tratados que en las plantas control.



## IDENTIFICACIÓN DE VECTORES POTENCIALES DEL BOIS NOIR DE LA VIÑA Y EVALUACIÓN DE SU CAPACIDAD DE TRANSMISIÓN

SABATÉ, J., LAVIÑA, A. Y BATLLE, A.

*Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentàries (IRTA). Dpto. Protecció Vegetal.*

Ctra Cabrils s/n. 08348-CABRILS-Barcelona

El Bois Noir de la viña esta causado por un fitoplasma perteneciente al grupo stolbur. Este fitoplasma puede ser hospedado por un gran número de especies vegetales, siendo el causante de distintas sintomatologías en cultivos hortícolas (tomate, zanahoria, perejil, endibia, pimiento, etc), leñosos (viña y distintos frutales) y especies silvestres (*Convolvulus arvensis*, Lavanda, tomillo, etc). Distintas especies de cicadelidos y fulgoridos han sido identificadas como portadoras del fitoplasma, sin embargo en viña únicamente ha sido confirmada la transmisión a través del fulgorido *Hyalesthes obsoletus*. En distintas prospecciones realizadas en áreas vinícolas de nuestro país, la especie *H.obsoletus* se determinó en un bajo numero de parcelas. En este trabajo se pretende identificar cual o cuales pueden ser los vectores en las zonas donde no se identificó *H. obsoletus*. Con este fin se realizó un seguimiento de cicadélidos y fulgoridos en una parcela de viña afectada por Bois Noir y se determinó el porcentaje de individuos positivos del fitoplasma para cada una de las especies. Las capturas se realizaron mediante colocación de trampas amarillas de 20 x 20 cm, colocadas en los márgenes de las parcelas afectadas, a dos alturas del suelo, 10 y 40 cm. Se capturaron cicadelidos desde principios de mayo hasta octubre, obteniéndose la máxima población desde principios de junio hasta finales de agosto.

El promedio de individuos capturado la segunda quincena de julio, fue de 60 individuos por placa amarilla. El mayor número de individuos pertenecían a las especies *Scaphoideus titanus* vector de la Flavescencia dorada y *Empoasca vitis*. Las especies en las que se identificaron un mayor número de individuos positivos de stolbur fueron, *Psammotettix striatus*, *Neotalitrus fenestratus*, *Peragallia sinuata*, *Hardya tenuis*, *Macrosteles sp.* y *Euscelidius variegatus*.

Una vez conocidas cuales eran las especies que se encontraban con mayor frecuencia en el interior de las parcelas y en las que se identificaban un mayor numero de individuos positivos, se iniciaron los ensayos de transmisión. Estos se realizaron en primer lugar con individuos capturados por aspiración en las parcelas afectadas. Treinta individuos de cada especie fueron colocados individualmente, en un recipiente con un medio nutritivo para insectos que simula en algunos aspectos la composición de la savia. La utilización de medios artificiales permite conocer en un corto periodo de tiempo, si una determinada especie es capaz de transmitir el fitoplasma. La presencia del fitoplasma en las distintas especies de insectos y en el medio nutritivo, fue determinada por PCR-nido con iniciadores universales y específicos para stolbur (fsto/rstol) (Maixner et al. 1995). Una vez seleccionadas las especies que transmiten a este medio, se iniciarán ensayos de transmisión a plantas

sanas de vid.

P-126

## APLICACIÓN DE UN SISTEMA DE INFORMACIÓN GEOGRÁFICA Y DE MODELOS DE PREDICCIÓN PARA EL ESTUDIO DE LA DISTRIBUCIÓN DEL RIESGO DE FUEGO BACTERIANO

RUZ, L. 1, LLORENTE, I. 1, CAMBRA, M.A. 2 Y MONTESINOS, E. 1

<sup>1</sup>*Institut de Tecnologia Agroalimentaria-CeRTA-CIDSAV. Universitat de Girona. Campus de Montilivi. 17071. Girona. E-mail: lruz@intea.udg.es.*

<sup>2</sup>*Centro de Protección Vegetal. Gobierno de Aragón. Avda. Montañana, 930. 50059. Zaragoza*

El fuego bacteriano es una de las enfermedades más graves que afecta a plantas de la familia de las rosáceas entre las que se encuentran algunas de gran interés económico, como el peral, el manzano, el níspero y algunas plantas ornamentales como *Pyracantha*, *Crataegus* y *Cotoneaster*, entre otras.

En España la enfermedad se detectó por primera vez en 1995, en Guipúzcoa (País Vasco). Desde entonces han ido apareciendo nuevos focos en la zona noreste de España (Navarra, Cataluña, Aragón, La Rioja).

La gravedad del fuego bacteriano varía en función de las condiciones climáticas, sensibilidad y estado fenológico de las plantas huésped y presencia de inóculo. Es necesario por tanto utilizar sistemas de evaluación de riesgo de la enfermedad que permitan guiar los tratamientos para el control de la enfermedad, realizar muestreos selectivos en el momento y lugar de mayor riesgo, y confeccionar mapas de riesgo en base a datos fenoclimáticos.

En el presente trabajo se presenta el mapa de riesgo fenoclimático de fuego bacteriano de los años 2000 y 2001, de las zonas de Cataluña y Aragón, realizado con un sistema de información geográfica (SIG). A partir de los datos climáticos de varios años (5-10) procedentes de 61 estaciones meteorológicas, se obtuvieron los niveles de riesgo de la enfermedad mediante el Sistema de Billing Revisado (SBR) y el modelo de Powell. Los parámetros climáticos básicos utilizados fueron la temperatura y pluviometría.

Se presentan también los resultados preliminares de evaluación de dos modelos de predicción de riesgo de la enfermedad, el Maryblyt de la Universidad de Maryland y el Cougarblight de la Universidad de Washington. Este estudio se realizó durante la campaña 2001-2002, en una finca comercial de peral de Zaragoza con antecedentes de fuego bacteriano.

## VIABILIDAD DE *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* y f. sp. *lycopersici* EN EL COMPOST ELABORADO CON RESTOS DE PLANTAS ENFERMAS

AGUILAR, M.I.<sup>1</sup>, GUIRADO, M.L.<sup>1</sup>, MELERO, J.M.<sup>2</sup> Y GÓMEZ, J.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Sección de Micología. Centro de Investigación y Formación Agraria de Almería (C.I.F.A.). Apdo 91, 04700 El Ejido (Almería).

<sup>2</sup> Instituto de Agricultura Sostenible, C.S.I.C. Apdo. 4084. 14080 Córdoba.

Las Fusariosis vasculares del melón y del tomate, causadas por *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* y f. sp. *lycopersici*, respectivamente, son enfermedades presentes en la provincia de Almería desde la década de los 80, aunque la presencia de la enfermedad en tomate está limitada a las escasas variedades sin genes de resistencia cultivadas en la provincia.

Una parte de los restos de los cultivos hortícolas es transformada en un compost que se utiliza como enmienda orgánica de los suelos de cultivo. Ante la posibilidad de que estos composts pudieran constituir una fuente de inóculo de los dos patógenos para los cultivos de melón y tomate, se planteó como objetivo estudiar la permanencia de ambos en los restos de plantas enfermas abandonadas durante un periodo de tiempo al aire libre y en el compost obtenido.

Cada uno de los fitopatógenos se estudió en cuatro procesos consistentes en la recogida de plantas enfermas en invernaderos (770 plantas en total), su secado al aire libre durante un periodo comprendido entre 120 y 210 días y su introducción posterior en el interior de una pila de restos vegetales triturados para su compostaje durante 2 meses.

Los restos de las plantas enfermas y el compost elaborado se analizaron, mediante la utilización de medios de cultivo, con una cadencia aproximadamente mensual para detectar la presencia del hongo, realizándose posteriormente pruebas de patogenicidad de 278 aislados. Además, el estudio de la viabilidad de los fitopatógenos en el compost obtenido se completó, en cada uno de los procesos de compostaje realizados, cultivando plantas susceptibles sobre una mezcla compuesta por vermiculita estéril y los restos compostados procedentes de cada especie vegetal enferma.

*F. oxysporum* f. sp. *melonis* y *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* se conservaron en los restos de plantas enfermas durante el periodo de secado.

Aunque *F. oxysporum* se detectó, mediante la utilización de medios de cultivo, en el compost elaborado con los restos de plantas enfermas de tomate y de melón, ninguna de las cepas aisladas resultó patogénica. Estos resultados se confirmaron mediante el cultivo de plantas de melón y tomate sobre el compost obtenido, las cuales no mostraron síntomas de Fusariosis vascular.

## DETERMINACIÓN DE LA DENSIDAD DE INÓCULO DE *Verticillium dahliae* EN LA SOLUCIÓN RECIRCULANTE EN CULTIVO SIN SUELO DE FRESA

CASTILLO, S<sup>1</sup>., MARTÍNEZ, F<sup>1</sup>., TELLO, J.C<sup>2</sup>. Y AVILÉS M<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Dpto. de Ciencias Agroforestales. Universidad de Sevilla. E.U.I.T.A. Ctra. Utrera km 1, s/n, 41013, Sevilla.

<sup>2</sup>Dpto. de Producción Vegetal. Universidad de Almería. E.P.S. La Cañada de San Urbano s/n, 04120, Almería.

Previo a la extensión de las fumigaciones de suelo con bromuro de metilo, *Verticillium dahliae* era considerado uno de los patógenos más importantes del cultivo de la fresa. Por otro lado, es conocida la próxima restricción en el empleo del citado fumigante. Entre las posibles alternativas al uso del bromuro de metilo en el cultivo de la fresa aparecen los sistemas de cultivo sin suelo. En los cultivos hidropónicos la recirculación hace más eficiente y sostenible el sistema. No obstante, los sistemas cerrados, sin saneamiento previo de la recirculante, puede mejorar la dispersión de los fitopatógenos de suelo y, por tanto, aumentar su incidencia. En el caso de *V. dahliae* la conidia es la estructura de dispersión mayoritaria en estos sistemas. Los objetivos de este trabajo son: i) desarrollar un método para detectar/cuantificar los propágulos de *V. dahliae* en la solución recirculante; ii) realizar un seguimiento de la concentración de conidias en la recirculante durante la campaña de cultivo.

Para la cuantificación de la concentración de conidias de *V. dahliae* en la solución recirculante se mostró la filtración a través de un papel de filtro de celulosa de poro levemente inferior al tamaño de la conidia (Albet 414) como la mejor técnica de concentración. Seguidamente se hacen pasar tres volúmenes de agua estéril para limpiar. Se transfiere el papel de filtro a una placa de petri y se cubre con medio semiselectivo (Isaac, I. *et al.*, 1971) fundido hasta una altura de 2 mm. Tras una incubación en oscuridad a 25 °C durante 4 días se identifican y cuentan las colonias (ufc). El método fue validado mediante el filtrado de distintos volúmenes de una suspensión de conidias en agua estéril de concentración conocida y se obtuvo una recuperación media del 97,54 %.

El seguimiento de los propágulos del hongo en la recirculante se llevo a cabo en líneas suspendidos de 6 m de largo con unas 65 plantas de la variedad Camarosa, en sistema hidropónico cerrado sobre sustratos orgánicos. La inoculación se realizó al inicio del cultivo mediante baño de raíces de las 12 últimas plantas en una suspensión de conidias. El diseño experimental era de bloques al azar con tres repeticiones y estaba localizado en un invernadero de cristal en Huelva. Se tomaban muestras de la recirculante (dos submuestras por línea) cada 15-25 días. Para cada submuestra se empleaban 10 filtros y por cada uno se filtraba 20 ml de recirculante. La concentración de conidias fue máxima en los meses de enero y febrero (100 a 130 ufc / l) y mínima al inicio y al final del cultivo (6 a 18 ufc / l).

## IMPORTANCIA DE LA VERTICILOSIS DEL ALGODONERO Y DISTRIBUCIÓN DE PATOTIPOS DE *Verticillium dahliae* EN ANDALUCÍA

BEJARANO-ALCÁZAR, J.<sup>1</sup> Y PÉREZ-ARTÉS, E.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Protección Vegetal, CIFA "Alameda del Obispo" de Córdoba, JA. Apartado 3092, 14080 Córdoba (jbejarano.cifao@cap.junta-andalucia.es).

<sup>2</sup> Departamento de Protección de Cultivos, Instituto de Agricultura Sostenible, CSIC. Apartado 4084, 14080 Córdoba (ag1peare@uco.es).

*Verticillium dahliae* causa epidemias severas en cultivos de algodón en Andalucía. Investigaciones realizadas en 1985 indicaron que ataques graves de Verticilosis (VA) en la zona baja del Valle del Guadalquivir estaban asociados con la infección por un patotipo defoliante (D), altamente virulento, de *V. dahliae*, que se identificó únicamente en dicha zona. Por el contrario, un patotipo no-defoliante (ND), moderadamente virulento, presentó una distribución geográfica más amplia y fue el único patotipo identificado en las zonas media y alta del Valle, donde las epidemias de VA fueron mucho menos severas. En este trabajo se presentan los resultados de prospecciones llevadas a cabo en 1991 en el Valle del Guadalquivir, con objeto de actualizar el conocimiento sobre la distribución geográfica de los patotipos D y ND de *V. dahliae* y la importancia de la VA en Andalucía.

La Verticilosis afectó el 87,9% de 66 campos de algodón inspeccionados. La incidencia media de VA fue de 31,9%, con una severidad de síntomas de 2,2 (escala 0-4) y un Índice de Intensidad de Enfermedad (IIE) de 19,2%. La severidad de los ataques y la densidad de inóculo de *V. dahliae* en el suelo fueron en promedio mucho más elevados en la zona baja que en las zonas media y alta del Valle. Asimismo, en la zona baja los valores de incidencia de enfermedad y del IIE fueron más de dos veces superiores en 1991 que en 1985, mientras que en las zonas media y alta dichos valores fueron similares en los dos años de muestreo.

Una muestra de 104 aislados monospóricos de *V. dahliae* obtenidos de plantas afectadas de 56 de los campos muestreados, se caracterizó en cuanto a patotipo mediante análisis RAPD y PCR específica. El 66,3% de los aislados fueron del patotipo D y el 33,7% pertenecieron al patotipo ND. Todos los campos inspeccionados en la zona baja del Valle y el 57,9% de los de la zona media, contuvieron el patotipo D. Por el contrario, el patotipo ND se diagnosticó en el 10,3, 68,4 y 100% de los campos de las zonas baja, media y alta, respectivamente.

En conclusión, en los 6 años entre prospecciones sistemáticas el patotipo D de *V. dahliae* se ha dispersado hasta campos de la zona media del Valle del Guadalquivir situados a más de 200 km de distancia del foco inicial en la zona baja. Posteriores investigaciones en 1998 han confirmado la presencia del patotipo D también en la zona alta (Jaén) del Valle. Nuestros resultados sugieren, además, que el patotipo D está desplazando progresivamente al patotipo ND en las poblaciones de *V. dahliae* de las áreas donde se ha establecido.

## COMPORTAMIENTO AGRONÓMICO Y EVOLUCIÓN DE LA INFECCIÓN EN DIVERSOS MATERIALES DE ALCACHOFA CULTIVADOS EN SUELO INFESTADO Y NO INFESTADO CON *Verticillium dahliae*

GIMÉNEZ-JAIME, A., BELTRÁN, R., VICENT, A., ARMENGOL, J., Y GARCÍA-JIMÉNEZ, J.

*Instituto Agroforestal Mediterráneo. Universidad Politécnica de Valencia. Camino de Vera s/n, 46022-Valencia.*

En los últimos años la verticilosis de la alcachofa causada por *Verticillium dahliae* se ha convertido en la principal enfermedad de este cultivo en todas las zonas productoras de la Comunidad Valenciana. En su expansión ha contribuido el sistema de reproducción vegetativa de la alcachofa con el uso de material vegetal de plantación (zuecas) infectado. A fin de estudiar el comportamiento agronómico y la evolución de la infección, se han cultivado diversos materiales vegetales de alcachofa en suelo infestado y no infestado con *V. dahliae*.

Se eligieron tres materiales de plantación diferentes: A (zuecas procedentes de un campo en el que no se habían observado síntomas de la enfermedad), B (zuecas procedentes de un campo en el que se habían observado síntomas de la enfermedad en el año anterior) y C (alcachofa de semilla). Un estudio previo del aislamiento de *V. dahliae* de 50 zuecas elegidas al azar de los materiales A y B mostró que el porcentaje de infección en ambos era del 2% y 16 % respectivamente.

Estos materiales fueron plantados en agosto de 2001 en un campo situado en Benicarló (Castellón) infestado con *V. dahliae* y que había presentado incidencia de la enfermedad en años anteriores y un campo en Alginet (Valencia) en el que nunca se había plantado alcachofa. En ambos se realizó un diseño en bloques al azar con repeticiones y se siguieron las prácticas culturales habituales. Se estudió el aislamiento mensual de *V. dahliae* en hojas de cada una de las plantas desde octubre hasta abril y se evaluó su producción durante el cultivo.

Los materiales A, B y C sembrados en el campo infestado mostraron un elevado porcentaje de infección ya en el mes de octubre, que fue incrementándose progresivamente durante el cultivo alcanzando en el mes de abril valores del 93 % de plantas en las que se aisló *V. dahliae* para el material A y del 100 % para los materiales B y C. Especialmente sensibles resultaron las plantas de semilla en las que se observaron síntomas de falta de desarrollo, curvamiento unilateral de las hojas y marchitez severa. En el campo no infestado estos porcentajes fueron del 3,3 % para el material A, 16 % para el material B y 0 % para el material C; valores que aproximadamente coinciden con los porcentajes iniciales de infección, comprobándose la transmisión del patógeno en un primer año de cultivo. La producción por planta fue significativamente mayor para todos los materiales en el campo no infestado. Estos resultados muestran que el control adecuado de esta enfermedad pasa por la elección de material de plantación sano en suelo no infestado con *V. dahl.*

## CUANTIFICACIÓN DE ASCOSPORAS DE *Monosporascus cannonballus* EN SUELOS DE CAMPOS DE MELÓN EN LA COMUNIDAD VALENCIANA

BELTRÁN, R., FERRER, F., ARMENGOL, J., Y GARCÍA-JIMÉNEZ, J.

*Instituto Agroforestal Mediterráneo. Universidad Politécnica de Valencia. Camino de Vera s/n, 46022-Valencia*

Las zonas de cultivo de melón (*Cucumis melo* L.) de la Comunidad Valenciana han sufrido en los últimos años graves pérdidas de producción debidas al síndrome conocido como colapso. Entre los agentes causales más importantes asociados al colapso están *Acremonium cucurbitacearum* y *Monosporascus cannonballus*. Éste último es un ascomiceto del suelo que posee la particularidad de formar una sola ascospora por asca, esférica, de color negro y con un tamaño de 30 a 50 mm.

Se ha puesto a punto un método de extracción de ascosporas modificando los ya existentes de Stanghellini y Rasmussen (1992) y de Mertely *et al.* (1993). Este método está basado en el cribado de las muestras de tierra a través de cedazos de 200, 75 y 30 mm para eliminar elementos gruesos, seguido de centrifugaciones sucesivas a 900 g en un medio de sacarosa al 25 %, logrando así separar las ascosporas de las partículas de tierra.

Se tomaron muestras de diferentes campos situados en las principales zonas productoras de melón de la Comunidad Valenciana. Asimismo, dentro de cada campo se escogieron zonas con plantas afectadas de colapso y plantas sin síntomas. Las muestras de tierra se extrajeron a una profundidad de entre 10 y 20 cm, tomadas de las líneas de cultivo de melón y de las entrelíneas. Se observaron diferencias significativas entre las zonas con y sin colapso, así como en líneas y entrelíneas. Paralelamente se consiguió aislar *M. cannonballus* de raíces de melón de todos los campos estudiados en los que se apreciaba muerte de plantas.

Con este trabajo se pretende sentar las bases para un posterior estudio epidemiológico que pudiese conducir a la predicción de posibles ataques de este hongo.

## ERRATICIDAD DE SÍNTOMAS EXTERNOS EN UNA PARCELA DE VID AFECTADA DE YESCA

LEDÓ, C., BELTRÁN, R., VICENT, A., ARMENGOL, J., Y GARCÍA-JIMÉNEZ, J.

*Instituto Agroforestal Mediterráneo. Universidad Politécnica de Valencia. Camino de Vera s/n, 46022-Valencia*

Uno de los síntomas característicos de lo que se ha denominado “yesca” en vid es la aparición de decoloraciones y necrosis internerviales en las hojas. A fin de estudiar la evolución de este síntoma en plantas individuales, se ha realizado un seguimiento planta por planta de una parcela con 1866 cepas de la variedad Bobal de aproximadamente 50 años de edad situada en el término de San Antonio de Requena (Valencia).

La evaluación se realizó en el mes de septiembre de tres años sucesivos, 1999 a 2001, empleando una escala de 0 (plantas sin síntomas foliares) a 6 (plantas con el 100% de las hojas con necrosis internerviales). Paralelamente a esta evaluación se realizó aislamiento de algunas plantas sintomáticas de la parcela, detectándose los hongos *Fomitiporia punctata*, *Botryosphaeria obtusa*, *Phaeoacremonium aleophilum* y *Phaeomoniella chlamydospora*.

Entre el primer y segundo año, un total de 482 plantas (25,83%) mejoraron su aspecto, 640 (34,29%) empeoraron y 744 (39,65%) permanecieron inalteradas. Entre el segundo y tercer año 518 (27,76%) mejoraron, 701 (37,56%) empeoraron y 647 (34,67%) mostraron el mismo índice de daños. En la comparación entre el primer y tercer año 511 plantas (27,38%) mejoraron, 837 (44,85%) mostraban un aumento del índice de daños y 518 (27,76%) permanecieron inalteradas. Solamente 217 plantas (11,63%) mostraron el mismo índice durante los tres años de seguimiento.

Los resultados obtenidos ponen de manifiesto la erraticidad de los síntomas aéreos del síndrome de “yesca”. Se discute la dificultad de evaluar la efectividad de los tratamientos fungicidas en esta afección, atendiendo únicamente a la observación de síntomas externos.



## INFLUENCIA DEL TIPO DE SUELO EN LA PATOGENICIDAD DE *Phytophthora cinnamomi* SOBRE *Quercus* spp.

LUCAS CAETANO, P.C., SÁNCHEZ HERNÁNDEZ, M.E. Y TRAPERO CASAS, A.

Departamento de Agrosnomía. E.T.S.I.A.M. Universidad de Córdoba. Avda. Menéndez Pidal, s/n. 14071-Córdoba.

La Seca de los *Quercus* es un decaimiento que viene afectando a las encinas (*Quercus ilex*) y a los alcornoques (*Quercus suber*) en dehesas de España y Portugal. El oomiceto *Phytophthora cinnamomi* ha sido asociado con la podredumbre radical de estos árboles en sitios afectados de Seca.

En este trabajo se ha estudiado la variación de la severidad de los síntomas producidos por *P. cinnamomi* en plántones de encina y alcornoque creciendo en tipos de suelo diferentes: limoso y arcilloso, e inoculados con dos aislados de diferente origen: PA<sub>20</sub> (de alcornoque) y PE<sub>13</sub> (de encina), previamente caracterizados morfológicamente. Se han utilizado dos métodos de evaluación de síntomas: evaluación visual (según la escala 0-4) e incremento de peso de la planta después de transcurrido el experimento.

El inóculo se preparó batiendo en agua estéril el micelio producido en placas de Petri con extracto de zanahoria, en oscuridad durante 15 días a 22° C. La inoculación se realizó aplicando directamente el micelio batido sobre las raíces de la planta previamente lavadas en agua corriente, de forma que al añadir 100ml de inóculo así preparado se aportara el micelio contenido en 3 placas de Petri. Las plantas testigo fueran tratadas con agua libre de micelio. Se tomó el peso fresco de la planta antes de inocular y al final del experimento. Todas las plantas fueron sometidas a saturación hídrica del suelo durante dos días por semana.

Al cabo de 3 meses, el análisis de varianza mostró diferencias significativas entre los valores de severidad de síntomas de las plantas inoculadas con respecto a sus correspondientes testigos. La encina es la especie más afectada y el suelo limoso en el que las plantas han presentado la sintomatología más severa. No se observaron diferencias significativas entre los dos aislados de *P. cinnamomi* ensayados para ninguna de las dos especies de plantas.

Los dos métodos de evaluación de síntomas utilizados dieron lugar a resultados similares, si bien el método del incremento de peso no ha mostrado diferencias significativas para los dos tipos de suelo y el método visual sí. Además, con el método de evaluación visual se han encontrado valores de severidad de los síntomas radicales muy elevados para las encinas en suelo limoso e inoculadas con el aislado PA<sub>20</sub> con respecto a sus testigos, mientras que estas diferencias no fueron detectadas con el análisis de varianza de los valores del incremento de peso de la planta. La evaluación visual se ha mostrado un método sensible, práctico y eficaz para detectar variaciones en la severidad de los síntomas radicales, comparando con el método más engorroso del incremento de peso de la planta.

## COMPORTAMIENTO EPIDÉMICO DE VARIEDADES DE OLIVO EN CAMPOS COMERCIALES INFESTADOS CON *Verticillium dahliae*

MARTOS-MORENO, C., LÓPEZ-ESCUADERO, F.J. Y BLANCO-LÓPEZ, M.A.

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

La Verticilosis del olivo causada por *Verticillium dahliae* es una de las enfermedades más importantes que afectan a este cultivo en España. El empleo de cultivares resistentes es una de las medidas de lucha más eficaces para su control. Sin embargo, la escasez de cultivares con niveles elevados de resistencia requiere la complementación con otras medidas de lucha según una estrategia integrada. El objetivo de este trabajo ha sido conocer cual es el comportamiento en campos naturalmente infestados de algunos cultivares de olivo, seleccionados previamente por su reacción a *V. dahliae* en condiciones controladas.

Para este estudio se ha utilizado una finca de olivar (cv Picual) de 14 ha situada en Ecija (Sevilla), plantada en 1991 sobre un suelo tradicionalmente cultivado de algodón y otros cultivos susceptibles a *V. dahliae*. En Abril de 1998, la incidencia media de la Verticilosis en la finca era del 15.4%. En un área situada bajo la influencia por la pendiente, del arrastre de suelo y restos vegetales, de cultivos susceptibles colindantes, la incidencia media era del 67.5% de plantas sintomáticas, con un 85% de plantas muertas. En una zona de esta parcela se establecieron 7 plantas de los cvs Changlot Real, Cornicabra, Hojiblanca, Lechin de Granada, Manzanilla de Sevilla y Picudo (primavera 2000). La densidad de inóculo en distintas zonas de la parcela se determinó, en primavera u otoño de cada año, mediante la técnica del Tamizado Húmedo tomando para cada muestra, 20 submuestras de los 25 cm superficiales del suelo.

La densidad de inóculo de *V. dahliae* varió desde 2.6 en Abril de 1998 a 3.5 ppg en Marzo de 2001. Los primeros síntomas de Verticilosis aparecieron en Noviembre de 2000 (8 meses después de la plantación) en los cvs Cornicabra y Picudo, alcanzando ambos el 57.1% en mayo de 2002, mientras que los cultivares menos afectados fueron Changlot Real y Lechín de Granada que no mostraron síntomas.

El progreso de enfermedad mostrado por los cultivares evaluados en campo, confirma los resultados obtenidos en los estudios de evaluación de resistencia en condiciones controladas, donde Changlot Real mostró una respuesta moderadamente resistente al aislado defoliante de *V. dahliae*.

## HETEROGENEIDAD DE AISLADOS DE *Sphaerotheca fusca* DE CUCURBITÁCEAS EN ALMERÍA Y MÁLAGA

PÉREZ-GARCÍA, A.<sup>1</sup>, ROMERO, D.<sup>1</sup>, OLALLA, L.<sup>2</sup>, DEL PINO, D.<sup>1, 2</sup>, RIVERA, E.<sup>1</sup>, CAZORLA, F.M.<sup>1</sup>, TORÉS, J.A.<sup>2</sup> Y DE VICENTE, A.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Microbiología. Universidad de Málaga. Facultad de Ciencias. Campus Universitario de Teatinos S/N. 29071. Málaga.

<sup>2</sup>Estación Experimental "La Mayora". C.S.I.C. Algarrobo-Costa. 29750. Málaga.

Las cucurbitáceas son un cultivo de enorme importancia en toda España y especialmente Andalucía. El oídio o ceniza es una de las enfermedades más comunes de estos cultivos. Los síntomas iniciales se caracterizan por la presencia de manchas redondeadas de color blanquecino y aspecto pulverulento. La enfermedad causa pérdidas importantes debidas a las reducciones de rendimiento de las cosechas y calidad de los frutos, sobre todo en cultivos protegidos. La enfermedad puede ser causada por dos especies de hongos, *Erysiphe orontii* o *Sphaerotheca fusca*, parásitos obligados que producen síntomas idénticos pero que pueden ser fácilmente distinguidos al microscopio. Las principales medidas de control de la enfermedad se basan en el empleo intensivo de fungicidas y en el uso de cultivares resistentes, no obstante, el oídio continúa imponiendo serias limitaciones al cultivo de las cucurbitáceas en todo el mundo.

Desde 1996 estamos llevando a cabo un estudio epidemiológico sobre el agente causal del oídio de las cucurbitáceas en las provincias de Almería y Málaga. Hasta la fecha, se han obtenido y caracterizado 139 aislados monospóricos de oídio. Todos los aislados obtenidos fueron identificados como *Sphaerotheca fusca*. El análisis de razas reveló la presencia de cuatro razas fisiológicas del patógeno (razas 1, 2, 4 y 5). Durante el periodo de estudio se observó un cambio en las poblaciones de *S. fusca* de la provincia de Almería, de forma que la raza 1 fue progresivamente reemplazada por otras razas del patógeno. Además, se detectó la coexistencia de al menos dos razas en varios invernaderos de cucurbitáceas de la provincia de Almería. El análisis de patotipos o rango de huéspedes reveló la existencia de 4 patotipos mayoritarios entre los aislados de *S. fusca*. Todos los aislados resultaron ser muy virulentos sobre melón y especialmente sobre calabacín. El análisis estadístico de los datos no permitió establecer ninguna relación clara entre las razas y los patotipos observados, si bien es cierto que los aislados virulentos sobre sandía fueron preferentemente asociados a la raza 1 de *S. fusca*. Estos datos muestran una aparente heterogeneidad de las poblaciones de *S. fusca* en el Sur de España que debe ser analizada en mayor detalle. Actualmente, se ha iniciado una segunda fase de este proyecto en la que se analizará la diversidad de *S. fusca* mediante estudios biológicos y moleculares de aislados de las diferentes áreas de cultivo de cucurbitáceas de España.

## DIVERSIDAD GENÉTICA Y RESISTENCIA A TRIAZOLES EN EL OIDIO DE LA VID (*Uncinula necator*)

RAPOSO, R.

Dpto. de Protección Vegetal, INIA. Ctra. Coruña km 7.5, 28040 Madrid

El Oidio de la vid (causado por *Uncinula necator*) es una enfermedad que ocurre prácticamente en cualquier área donde se cultiva esta especie, por lo que se considera una enfermedad de importancia económica mundial. A pesar de ello, hay grandes lagunas en el conocimiento de la biología del hongo y de la epidemiología de la enfermedad.

*U. necator* puede invernar como micelio en las yemas durmientes de la cepa o como cleistotecas en la superficie de la madera. Cada una de estas formas invernantes da lugar a un tipo de síntoma inicial de la enfermedad que se manifiesta en dos épocas distintas. Durante años se ha pensado que ambos síntomas constituían diferentes formas de ataque del mismo patógeno, pero esta hipótesis debe ser investigada detalladamente. Se están utilizando marcadores moleculares (AFLPs) para analizar la diversidad genética de los aislados de estas dos poblaciones, atendiendo al origen de las infecciones primarias, con objeto de determinar si se trata de poblaciones genéticamente separadas o no.

La enfermedad del Oidio se controla químicamente con tratamientos de Azufre y fungicidas del grupo de los triazoles (inhibidores de la biosíntesis del ergosterol). Existe la posibilidad de que se estén seleccionando genotipos resistentes a estos fungicidas como consecuencia de los repetidos tratamientos, lo que provocaría un cambio en la sensibilidad de la población del patógeno a los triazoles. Uno de los objetivos de este trabajo ha sido determinar la curva dosis-respuesta de *U. necator* al triadimenol en una muestra de aislados de la población del hongo que no ha sido tratada con estos fungicidas. Esto permite establecer la curva de referencia de una población del patógeno no expuesta al fungicida, que sirve de base para comparar el nivel de resistencia de otras poblaciones del hongo que sí hayan sido expuestas.

## VIRULENCIA DIFERENCIAL DE LOS PATOTIPOS DEFOLIAN-TE Y NO DEFOLIANTE DE *Verticillium dahliae* SOBRE LINO

RODRÍGUEZ JURADO, D.<sup>1</sup>, GARCÍA ANDRÉS, S.<sup>1</sup>, HERVÁS VARGAS, A.<sup>1</sup>, BEJARANO ALCÁZAR, J.<sup>3</sup> Y JIMÉNEZ DÍAZ, R.M.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Instituto de Agricultura Sostenible, C.S.I.C., Apdo. 4084, 14080 Córdoba.

<sup>2</sup>Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos y de Montes, Universidad de Córdoba, Apdo. 3048, 14080 Córdoba.

<sup>3</sup>CIFA "Alameda del Obispo", Apdo. 3092, 14080 Córdoba.

Los aislados de *V. dahliae* que infectan algodón y olivo en Andalucía se clasifican en altamente virulentos (patotipo D) o de virulencia moderada (patotipo ND) según defolien la planta completamente o causen marchitez moderada con escasa o nula defoliación, respectivamente. La caracterización biológica de un gran número de aislados de *V. dahliae* sobre cultivares de su huésped de origen es tediosa por los requerimientos metodológicos y experimentales. El lino (*Linum usitatissimum*) es huésped de *V. dahliae* y fácilmente manejable en condiciones experimentales controladas idóneas para el desarrollo de Verticilosis. Por ello, en este trabajo hemos explorado la posibilidad de utilizar lino para diferenciar niveles de virulencia entre aislados de *V. dahliae*. El patosistema *V. dahliae*/lino se caracterizó utilizando los aislados monoconídicos V138I (D) y V4I (ND) de *V. dahliae*, cuya virulencia en algodón y olivo es conocida por estudios previos. La patogenicidad de dichos aislados sobre los cvs. Linda, Júpiter, Mikael, Oliver y Elise de lino se determinó en condiciones controladas, considerando un rango de seis densidades de inóculo de cada aislado. Las características del patosistema se validaron comparando la virulencia de aislados de *V. dahliae* de alcachofa y almendro sobre los cvs. Linda de lino y Acala SJ-2 de algodón con la reacción causada por aislados D y ND de referencia. Además, los aislados de alcachofa y almendro se caracterizaron mediante análisis de VCG y por análisis PCR específica de patotipo. Ninguno de los aislados evaluados indujeron defoliación en lino. Por el contrario, ambos patotipos indujeron síntomas de clorosis y necrosis foliar en las plantas de lino, y el patotipo D causó además enanismo en las plantas infectadas. La reacción fue significativamente diferencial entre patotipos en el cv. Linda con densidades de inóculo en el suelo iguales o superiores a 10<sup>4</sup> conidias/g. La caracterización de los aislados D, altamente virulentos, en lino coincidió con su caracterización biológica (algodón), genética (VCG) y molecular (PCR). Los aislados ND restantes indujeron significativamente menor cantidad de enfermedad que los aislados D, y fueron más heterogéneos en su virulencia sobre lino. Los bioensayos en lino quizás se puedan utilizar para explorar el potencial de ciertas medidas de control de la Verticilosis.

Subvencionado por los proyectos 1FD97-1322-C04-02 y AGL2000-1444-C02-01

## POTENCIAL DE LAS HOJAS DE OLIVO CAÍDAS TRAS LA INFECCIÓN POR EL PATOTIPO DEFOLIANTE DE *Verticillium dahliae* COMO FUENTE DE INÓCULO EN LAS EPIDEMIAS DE VERTICILOSIS

RODRÍGUEZ JURADO, D.<sup>1</sup>, PORRAS ALONSO, R.<sup>1</sup>, TRAPERO CASAS, J.L.<sup>1</sup> Y JIMÉNEZ DÍAZ, R.M.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Instituto de Agricultura Sostenible, C.S.I.C., Apdo. 4084, 14080 Córdoba.

<sup>2</sup>Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos y de Montes, Universidad de Córdoba, Apdo. 3048, 14080 Córdoba.

En un estudio epidemiológico de la Verticilosis del olivo (VO) en una parcela de "Arbequina" de 3 años infectados por el patotipo defoliante (D) de *V. dahliae*, la incidencia de VO aumentó de tres a 107 árboles enfermos en un periodo de 2,5 años, con un máximo de 19 nuevos árboles afectados al mes. Este rápido aumento de incidencia de VO difícilmente se explica por la sola existencia de microesclerocios de *V. dahliae* libres en el suelo o embebidos en restos de tejidos, como único inóculo. Se ha sugerido que las hojas de olivos afectados pueden jugar un papel importante en las epidemias de VO, porque *V. dahliae* puede formar microesclerocios en hojas senescentes sobre el suelo. El establecimiento de nuevas plantaciones de olivar en regadío puede proporcionar condiciones para que las hojas verdes recién caídas de árboles infectados por el patotipo D contribuyan como fuente de inóculo adicional al existente en el suelo. En este trabajo se ha determinado si las hojas verdes y senescentes caídas de árboles afectados de Verticilosis contienen al patógeno, así como su potencial para originar infecciones patogénicas. Se realizaron aislamientos de 10 hojas senescentes y 100 hojas verdes de cada uno de ocho y 10 árboles "Arbequina", respectivamente, infectados por el patotipo D. El potencial infectivo de hojas verdes caídas de cada uno de cuatro olivos se determinó en bioensayos en condiciones controladas utilizando el cv. Linda de lino, y en condiciones naturales sobre plántones de olivo "Arbequina". Las hojas infectadas se incorporaron troceadas al suelo en el que crecieron 24 plantas de lino ó cinco de olivo. *V. dahliae* se aisló del 15,0% de las hojas senescentes en dos árboles y del 67,1% de las hojas verdes en todos los árboles muestreados. Las plantas de olivo y lino cultivadas en suelo infestado con hojas verdes infectadas mostraron síntomas para cada uno de los árboles muestreados. La incidencia de infección en las plantas de lino varió del 27,8 al 89,5% según el árbol del que procedían dichas hojas. Por tanto, el inóculo del patotipo D que puede incorporarse al suelo a partir de hojas verdes de árboles afectados, tiene el potencial de infectar y causar síntomas de Verticilosis; y estas hojas deben considerarse como fuente de inóculo potencial en las epidemias causadas por el patotipo D de *V. dahliae*.

Subvencionado por el proyecto CAO00-017

## GAMA DE PLANTAS HUÉSPED DE LOS 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

<sup>1</sup>Departamento de Protección Vegetal, CIFA "Alameda del Obispo" de Córdoba, JA. Apdo.3092. 14080 Córdoba. ([vrodriquez.cifao@cap.junta-andalucia.es](mailto:vrodriquez.cifao@cap.junta-andalucia.es))

<sup>2</sup>Departamento de Protección de Cultivos. Instituto de Agricultura Sostenible, CSIC. Apdo.4084. 14080 Córdoba; y ETSIAM, Universidad de Córdoba ([ag1jdir@uco.es](mailto:ag1jdir@uco.es))

Los patotipos defoliante (D) y no-defoliante (ND) de *Verticillium dahliae* causan epidemias severas de Verticilosis en algodónero y olivo en Andalucía. La práctica de rotaciones con cultivos no huésped y el control de malas hierbas podrían ser medidas eficaces contra dichas Verticilosis. En este trabajo hemos estudiado la reacción de distintas especies cultivadas y adventicias a la infección por dos aislados representativos de los patotipos D y ND que son de elevada y moderada virulencia, respectivamente, sobre algodónero y olivo; incluyendo: alfalfa (cv 'Alfaro'), berenjena (cvs 'Black beauty', y 'Listada de Gandía'), cebolla (cvs 'Babosa', y 'Recas'), girasol, (cvs 'Sanbro', y 'Turbo'), melón (cv 'Valenciano Temp. Rochet') y sandía (cv 'Sugar baby'); y *Amaranthus retroflexus*, *Avena sterilis*, *Echinochloa crus-galli*, *Portulaca oleraceae*, y *Solanum nigrum*. Como testigos se incluyeron los cvs Acala SJ-2 y Crema 111 de algodónero, que son susceptible y tolerante a la Verticilosis, respectivamente. Las plantas se inocularon por inmersión del sistema radical en una suspensión de conidias del aislado.

Los dos aislados, D y ND, de *V. dahliae* fueron patogénicos sobre alfalfa, berenjena, girasol, melón, sandía, *A. retroflexus*, *P. oleraceae* y *S. nigrum*. El patrón de virulencia de los aislados varió según la especie estudiada pero no difirió entre cultivares. El patotipo D fue más virulento que el ND en sandía y *P. oleraceae*, similarmente a lo observado en algodón, y causó síntomas foliares severos (incluyendo defoliación en *P. oleraceae*) y reducción del crecimiento. El aislado ND fue más virulento que el D en berenjena, girasol, *A. retroflexus* y *S. nigrum*, causando síntomas foliares moderados con defoliación en berenjena y leves en las otras tres especies. Ambos aislados fueron similarmente virulentos en alfalfa y melón, causando síntomas de severidad leve. La inoculación de cebolla, *A. sterilis* y *E. crus-galli* no resultó sintomática, pero la infección de la raíz y parte aérea de plantas de cebolla y *A. sterilis*, por ambos patotipos, fue confirmada por el aislamiento del patógeno. Por consiguiente, estas dos especies tienen el potencial de comportarse como huéspedes asintomáticos. La virulencia diferencial de los aislados ND y D de *V. dahliae* sobre las especies incluidas en este estudio, es de importancia significativa respecto de la supervivencia y dispersión del patógeno, en ausencia de las principales especies huésped y debe ser tenida en cuenta en la elaboración de estrategias para el control de las Verticilosis de algodónero y olivo.

## INCIDENCIA DE *Phytophthora cinnamomi* ASOCIADA A LA SECA DE *Quercus* EN ANDALUCÍA

SÁNCHEZ, J.E., SÁNCHEZ, M.E. Y TRAPERO, A.

Departamento de Agronomía. E.T.S.I.A.M. Universidad de Córdoba. Avda. Menéndez Pidal, s/n. 14071 Córdoba.

La Seca de los *Quercus* es un decaimiento que afecta a las masas de *Quercus ilex* y *Quercus suber* del sudoeste de España y sureste de Portugal. Actualmente la Seca de los *Quercus* es probablemente el problema fitosanitario de mayor envergadura en España. Entre los factores implicados en el decaimiento destaca la podredumbre radical causada por el oomiceto *Phytophthora cinnamomi*. Si bien, en numerosas ocasiones, este hongo ha sido citado como el principal agente del decaimiento, no existe información precisa acerca de su incidencia y distribución en las masas de *Quercus* que sufren el síndrome en Andalucía.

En este trabajo se ha estudiado la incidencia de *P. cinnamomi* asociada a la podredumbre radical en masas de *Quercus* en Andalucía. Este estudio se ha llevado a cabo en ocho fincas situadas en las cuatro provincias andaluzas más afectadas de Seca: Cádiz, Córdoba, Huelva y Sevilla.

Las tomas de muestras de raíces y de suelo de la rizosfera se realizaron en otoño y primavera por ser las épocas más favorables para obtener lesiones frescas de las raíces, al tratarse generalmente de épocas de lluvias. La estación más propicia para el aislamiento de *P. cinnamomi* fue el otoño, en la que se aisló el hongo en 5 de las 8 parcelas de estudio. Los resultados de los aislamientos de raíces y de suelo de la rizosfera reflejan que *P. cinnamomi* se encuentra presente en 6 de las 8 parcelas muestreadas, siendo las 2 parcelas con resultados negativos las situadas en la provincia de Sevilla. De hecho, en estas dos parcelas apenas se observaron síntomas de podredumbre radical, a pesar de que los árboles presentaban un desarrollo escaso de la raíz absorbente, que en ocasiones estaba muerta.

En nuestro estudio se han obtenido bajos porcentajes de aislamiento de *P. cinnamomi* en raíz en las parcelas donde estaba presente, mientras que los porcentajes obtenidos en suelo, en general, son elevados. No obstante, el intervalo de porcentaje de aislamiento varía desde el 4,2% hasta el 100%.

Además, se ha estudiado la correlación entre la presencia del hongo en árboles afectados y variables meteorológicas. Se ha establecido que el aislamiento de *P. cinnamomi* no presenta buena correlación con la lluvia acumulada, humedad del suelo o temperaturas máxima, mínima y media registradas en las fincas en las 8 semanas anteriores al muestreo, aunque le favorecieron las temperaturas mínimas y medias elevadas. El aislamiento de *P. cinnamomi* estuvo más influido por la lluvia acumulada en períodos largos de tiempo, que por la lluvia acumulada en las semanas anteriores a la toma de muestras.



## DISTRIBUCIÓN RACIAL DE *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* EN CASTILLA-LA MANCHA

SORIANO MARTÍN, M.L.<sup>1</sup>, PORRAS SORIANO, A.<sup>2</sup> Y PORRAS PIEDRA, A.<sup>2</sup>

Universidad de Castilla-La Mancha.

<sup>1</sup>Departamento de Producción Vegetal y T.A.

<sup>2</sup>Departamento de Ingeniería Mecánica. Ronda de Calatrava 7. 13071 Ciudad Real

La producción de melón (*Cucumis melo* L.) en España ha tenido un desarrollo constante desde 1975. Castilla-La Mancha, con 13.716 ha, es la comunidad autónoma con mayor superficie dedicada a este cultivo (32,5% de la superficie nacional). La extensión e intensificación del cultivo del melón en los últimos años han dado lugar al agravamiento de problemas fitopatológicos, como es el caso de la Fusariosis vascular, que provoca la muerte de la planta y puede llegar a destruir más del 90% de la cosecha.

El organismo causal, *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* (Fom), se caracteriza por presentar una diversidad patogénica y genética substancial, cuya caracterización y distribución son desconocidas en Castilla-La Mancha. Sin embargo, el conocimiento de dicha diversidad es de trascendental importancia para el control de esta enfermedad mediante la utilización de cultivares resistentes.

El trabajo realizado ha permitido conocer la distribución racial de Fom en Castilla-La Mancha. Para ello se han realizado prospecciones periódicas, durante dos años, tanto en los invernaderos productores de plántulas de melón como en un total de 149 parcelas comerciales, en muchas de las cuales se repitió el muestreo, lo que supone un total de 214 prospecciones de campo. El tamaño de las parcelas oscilaba entre 0,5-5 ha, siendo el 45% de ellas de una extensión de 2 ha.

El año 2000 se analizaron 107 plantas con síntomas de Marchitez o de Amarilleamiento, obteniéndose 390 aislados de *Fusarium oxysporum*, de los cuales se eligieron 139 para las pruebas de patogenicidad en plántulas de melón 'Amarillo canario', mediante inmersión de las raíces desnudas en una suspensión de 10<sup>6</sup> conidias/ml, resultando sólo 5 aislados patogénicos y uno de ellos no era vascular. Estos aislados pertenecían a tres parcelas de campo diferentes. Realizados los ensayos de caracterización de razas, con cultivos monoconídicos de estos aislados, en cultivares de melón diferenciales (Sancho, Tucán y Zeus), tres de ellos corresponden a la raza 0 y uno a la raza 1 de Fom.

El año 2001 se analizaron 979 plantas con síntomas, en 96 de las cuales se aisló *Fusarium oxysporum*, resultando todos ellos patógenos vasculares en las inoculaciones realizadas en plántulas de melón 'Amarillo canario'. Estos aislados pertenecían a 86 parcelas de campo diferentes, y, en los ensayos de caracterización de razas se pudo determinar que 7 de ellos pertenecen a la raza 0, 8 a la raza 1, 31 a la raza 2 y 50 a la raza 1,2 de Fom.

## INFLUENCIA DE DIVERSAS VARIABLES METEOROLÓGICAS EN LA CONCENTRACIÓN AMBIENTAL DE CONIDIOS DE *Alternaria* spp. EN UNA PARCELA DE MANDARINO FORTUNE AFECTADA DE MANCHA MARRÓN

BADAL, J., VICENT, A., ARMENGOL, J. Y GARCÍA-JIMÉNEZ, J.

Instituto Agroforestal Mediterráneo. Universidad Politécnica de Valencia. Camino de Vera s/n 46022 Valencia

La incidencia de la mancha marrón causada por *Alternaria alternata* pv. *citri* en mandarina Fortune está directamente relacionada con la cantidad de inóculo presente en las parcelas afectadas. Como una primera aproximación a la cuantificación de dicha densidad de inóculo, se ha realizado un seguimiento desde mayo de 2000 hasta abril de 2001 de la concentración ambiental de conidios de *Alternaria* spp. en una parcela fuertemente afectada por la enfermedad.

El seguimiento se realizó con un capturador de esporas mod. Burkard, con el que se obtenía la concentración de conidios por m<sup>3</sup> de aire a intervalos de una hora. Complementariamente se instaló una estación meteorológica con la que se registraron los valores de temperatura, humedad relativa, agua libre y lluvia. Todos estos datos se integraron a fin de encontrar relaciones entre la concentración ambiental de conidios y las variables meteorológicas.

La evolución diaria de la concentración ambiental de conidios de *Alternaria* spp. resulta muy influenciada por la temperatura, humedad relativa y el agua libre. Dicha concentración aumenta a medida que aumenta la temperatura, baja la humedad relativa y se seca la superficie foliar. Los resultados obtenidos apuntan a que los conidios se forman sobre las lesiones durante la noche y las primeras horas de la mañana y a medida que avanza el día se produce su dispersión.

De mediados de abril a final de junio y de finales de agosto a inicios de noviembre, aparecen las mayores concentraciones ambientales de conidios. Estos meses son los que presentan a la vez temperaturas superiores a 15°C y humedades relativas alrededor del 80%, frecuentemente acompañadas de agua libre.

En el período estudiado, se observaron infecciones de *A. alternata* pv. *citri* el 15 de mayo y el 31 de agosto de 2000. Estas fechas corresponden con épocas en las que la temperatura estaba comprendida entre 18°C y 25°C y se daban más de 8 horas de agua libre al día, estando comprendida la concentración media diaria de conidios de *Alternaria* spp. en el ambiente entre 75 y 150 conidios/m<sup>3</sup>/h.

## IDENTIFICACIÓN E INCIDENCIA DEL HONGO ENDOFÍTICO *Epichloë festucae* EN POBLACIONES DE *Festuca rubra* subsp. *pruinosa* EN ACANTILADOS MARINOS

ZABALGOGEAZCOA, I., VÁZQUEZ DE ALDANA, B.R., GARCÍA CIUDAD, A., ROMO VAQUERO, M. Y GARCÍA CRIADO, B.

*Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología, CSIC.*

Cordel de Merinas 40-52, 37008 Salamanca

*Festuca rubra* subsp. *pruinosa* es una gramínea cuyo hábitat son los acantilados marinos de la costa Atlántica de Europa. En estos ecosistemas las plantas crecen en grietas de la roca en las cuales apenas hay suelo y además están constantemente expuestas al viento y agua de mar. Esto implica que la subespecie *pruinosa* está adaptada a un ecosistema con condiciones muy desfavorables para la vida vegetal.

En un estudio realizado en cuatro poblaciones de *F.r. pruinosa* de la costa norte de Galicia se observó que una media del 70% de las plantas estaban infectadas por un hongo endofítico. Las plantas infectadas no muestran síntomas externos y el hongo se transmite verticalmente por semilla con una frecuencia cercana al 100%. En las plantas infectadas se detectó el alcaloide tóxico para herbívoros ergovalina, que es producido por el hongo. Utilizando caracteres morfológicos y moleculares, el hongo endofítico que infecta a estas plantas ha sido identificado como *Epichloë festucae*. Esta es la primera vez que se identifica *Epichloë festucae* en plantas de esta subespecie de *Festuca rubra*.

La elevada incidencia de infección endofítica observada en poblaciones situadas en un ambiente inhóspito podría indicar que la asociación con *E. festucae* beneficia a las plantas de *F.r. pruinosa*.

## ESTUDIO DE LAS POBLACIONES DE *Rhizoctonia solani* EN EL CULTIVO DE PATATA

EL BAKALI, M.A.<sup>1</sup>, MARTÍN, M.P.<sup>2</sup>, NADAL, M.<sup>1</sup> Y MORET, A.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Dept. Biología Vegetal, Fac. Biología, Univ. Barcelona, Avda. Diagonal 645, 08028 Barcelona.

<sup>2</sup> Real Jardín Botánico (C.S.I.C.), Plaza de Murillo 2, 28014 Madrid.

*Rhizoctonia* causa grandes pérdidas en gran variedad de cultivos y en diferentes sistemas agrícolas. Hasta el momento se han descrito 13 grupos de anastomosis (AGs) de esta especie colectiva. Entre ellos, el AG-3 afecta principalmente a los cultivos de patata, tabaco y tomate. La producción masiva de esclerocios, la supervivencia de micelio viejo en restos vegetales y la capacidad de colonizar cualquier materia orgánica son elementos claves en el desarrollo de las enfermedades causadas por este hongo.

*Rhizoctonia solani* es el hongo con mayor incidencia en cultivo de patata, por dos razones: 1) Debido a que este hongo no forma parte de la lista de patógenos de cuarentena se escapa a todos los controles fitosanitarios y 2) Por la poca importancia a la hora de siembra de la selección de la patata, ya que el material importado o producido localmente puede contener entre 2-30% de inóculo de patógeno (esclerocios).

Más de 200 cepas *R. solani* fueron aisladas de plantas de patata con síntomas de "Damping off" o de tubérculos con síntomas de la mancha negra. En su caracterización se han utilizado métodos morfológicos y moleculares para la identificación del grupo de anastomosis (AG) de *R. solani* responsable de las enfermedades de patata. Con este objeto, se han utilizado amplificaciones por PCR con microsatélites (RAMS), polimorfismo de la longitud de fragmentos de restricción (RFLP) y grupos de anastomosis.

Existe una gran coherencia entre los patrones obtenidos por RAMS y por RFLP de los aislamientos de *R. solani*. El AG-3 se separa claramente del resto de los AGs analizados.

En el presente trabajo se pretende recopilar toda la información que hemos obtenido hasta la fecha sobre la gravedad de las enfermedades causadas por *Rhizoctonia solani* en cultivo de patata.

Palabras clave: Grupos de Anastomosis , *Rhizoctonia solani*, *Solanum tuberosum*, RAMS, RFLP, PCR.

## EVOLUCIÓN Y DISTRIBUCIÓN DE LA POBLACIÓN DE NEMATODOS FORMADORES DE QUISTES (*Globodera* sp.) EN EL CULTIVO DE LA PATATA EN LA COMARCA SA POBLA-MURO (MALLORCA. BALEARES)

ALONSO, R.<sup>1</sup>, ALEMANY, A.<sup>1</sup> Y ANDRÉS, M.F.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Biología. Universidad de las Islas Baleares. Ctra. de Valldemossa km. 7,5. 07071-Palma de Mallorca. Baleares.

<sup>2</sup> Dpto Protección Vegetal. Centro de Ciencias Medioambientales, CSIC, Serrano 115, 28006-Madrid.

La patata (*Solanum tuberosum*, L.) constituye uno de los cultivos de mayor importancia en las Islas Baleares, principalmente por los rendimientos económicos que genera. El mayor porcentaje de la producción se concentra en la comarca de Sa Pobla-Muro (Mallorca), que supone unas 1.500 ha de superficie de regadío dedicada a su cultivo, destinándose gran parte de la cosecha a la exportación. Uno de los mayores problemas que afectan a esta solanácea lo constituyen los nematodos formadores de quistes (*Globodera* sp.) considerados como uno de los patógenos que causan mayores perjuicios económicos en la agricultura mundial, registrándose pérdidas de hasta el 90% de la cosecha. Apenas tenemos datos sobre la epidemiología de *Globodera* en el archipiélago Balear, por lo que el objeto de este estudio es conocer tanto la adaptación de dicho patógeno a las condiciones meteorológicas regionales, prácticas culturales y variedades de patata utilizadas, como identificar las especies presentes.

Los resultados obtenidos muestran un nivel poblacional prácticamente homogéneo en toda la comarca que se mantiene en valores bajos debido a los tratamientos, lo que demuestra además de la eficacia de las actuales prácticas de control, que no está condicionado por el microclima. Asimismo se ha llevado a cabo un seguimiento de la evolución del nivel del patógeno en varias de las fincas durante dos años consecutivos, mostrando cómo dicho nivel depende más bien del número de cultivos/año y de las variedades de patata utilizadas que de las prácticas culturales que en ellas se realizan, en especial de los tratamientos nematocidas.

Se cita por primera vez en Baleares la presencia de *Globodera rostochiensis*.

P-146

## ESTUDIO DE LA INCIDENCIA DE NEMATODOS FORMADORES DE NÓDULOS (*Meloidogyne* spp.) Y TRANSMISORES DE VIRUS (*Xiphinema* spp.) EN CULTIVOS DE VID Y MELÓN DE LA COMARCA DE TOMELLOSO

ANDRÉS, M.F.

Dpto Protección Vegetal. Centro de Ciencias Medioambientales, CSIC, Serrano 115, 28006-Madrid.

Entre los cultivos de valor estratégico en la Comunidad de Castilla-La Mancha, el más importante socio-económicamente es la vid, el cual en la Comarca de Tomelloso supone un 70% de suelo cultivado, una de las mayores concentraciones de viñedos del mundo. Así mismo esta Comunidad es líder en producción y comercialización del melón siendo muy frecuente en la Comarca el cultivo de esta hortícola en bandas intercaladas con las cepas de vid. Para ambos cultivos el factor limitante es el agua, por lo que el regadío se está extendiendo paulatinamente. Se han realizado amplios estudios de la distribución de nematodos fitoparásitos y transmisores de virus en los viñedos la Comunidad de Castilla-La Mancha, sin embargo no se tiene prácticamente información sobre la Comarca específica de Tomelloso. El presente estudio tiene como objetivo analizar el impacto que sobre los cultivos de vid y melón pueden ejercer dos grupos de nematodos fitoparásitos (*Meloidogyne* spp y *Xiphinema* spp. ) de gran importancia patológica, en la Comarca de Tomelloso.

El análisis de los resultados demuestra la amplia distribución de los nematodos formadores de nódulos en esta zona. Respecto a su incidencia presentan un comportamiento diferencial entre melón y vid, detectándose niveles máximos de infestación en las parcelas con ambos cultivos (simultaneados en hileras intercaladas). Es evidente la gran influencia de los factores ambientales en el desarrollo de la enfermedad causada por *Meloidogyne* sp, de tal forma que la variación de un factor limitante como la humedad, mediante la introducción del riego por goteo y de cultivos hortícolas altamente susceptibles (melón) favorece el incremento y expansión de sus poblaciones. Respecto a los nematodos transmisores de virus, se confirma la presencia de dos especies (*X. index* y *X. italiae*) transmisoras del GFLV en el cultivo del viñedo donde presentan una distribución irregular y contagiosa, frecuentemente asociada a cepas con síntomas de virosis. A partir del estudio estacional y estructura de algunas de sus poblaciones se detecta el fuerte condicionamiento que el riego ejerce en la duración de su ciclo biológico, provocando un aumento considerable en la densidad de población y por tanto del riesgo potencial de transmisión de virus a las plantas de vid.

## EVOLUCIÓN DE LA VIABILIDAD DE QUISTES DE *Globodera rostochiensis* EN LA COMARCA DE A LIMIA (OURENSE)

COUCEIRO, C.<sup>1</sup>, ROSENDE, O., ALVAREZ, S.<sup>1</sup>, GARCÍA-CALVO, L.<sup>2</sup> Y CABALEIRO, C.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Universidade de Santiago de Compostela. Departamento de Producción Vexetal. Escola Politécnica Superior, Campus Universitario s/n 27002 LUGO.

<sup>2</sup>Instituto do Campo, INORDE.

*Globodera spp* es uno de los principales problemas fitopatológicos a los que se enfrenta la comarca de A Limia. Desde los años 70 el patógeno se ha extendido a la mayoría de las parcelas y en algunos casos los niveles de población son elevadísimos. La rotación con trigo, uso de algunas variedades resistentes y uso de nematicidas consiguen mantener las poblaciones a niveles que no causen descensos de producción importantes. Desde 1999 en el Instituto do Campo se analizan suelos para realizar las recomendaciones pertinentes; gracias a esos análisis se ha podido tener en cuenta el efecto de condiciones meteorológicas especiales como han sido las inundaciones prolongadas del otoño-invierno-primavera de 2000-2001 que redujeron viabilidad de los quistes en los suelos de la comarca entre un 50 y un 95%.

En una parcela de unos 6000 m<sup>2</sup> de un agricultor particular en la que había un alto nivel de infestación por *Globodera* y se dieron distintos tratamientos nematicidas se llevó a cabo un seguimiento de poblaciones de nematodo dorado desde primavera de 2001 en que se estableció una variedad sensible (Kennebec) hasta siembra de nuevo cultivo en 2002. Los muestreos fueron mas intensivos durante primavera y verano (cada 15 días) y menos en otoño e invierno (cada 2 meses). En muestras de 100 cm<sup>3</sup> de tierra se extrajeron los quistes, se estableció su viabilidad y se determinó el número de J2/cm<sup>3</sup> utilizando una cámara Macmaster.

La evolución de la viabilidad de los quistes siguió pautas similares en todos los tratamientos, con un pico de J2/cm<sup>3</sup> que se produce a finales de Agosto, un descenso posterior y después de cosecha un nuevo incremento debido a la maduración de los quistes que se desprendieron en cosecha o siguieron evolucionando en restos de raíces y tubérculos en el suelo. El efecto de los nematicidas fue muy variable y difícil de evaluar, la relación entre J2/cm<sup>3</sup> final e inicial en cada parcela está entre 2 y 4 veces para algún tratamiento nematicida hasta casi 18 veces en el caso del control. La irregularidad en la distribución de quistes en las parcelas hace que la efectividad de los nematicidas sea muy variable y aunque evitan que las poblaciones se incremente excesivamente, los niveles de población resultantes siguieron siendo muy altos (superiores a 200 J2/cc) cuando se parte de suelos con alto nivel de infestación en los que se cultivan variedades susceptibles.

P-148

## INCIDENCIA DE *Globodera tabacum* EN EL CULTIVO DE TABACO EN EL VALLE DEL TIÉTAR

ESPÁRRAGO, G. <sup>1</sup>, BLANCO, I. <sup>2</sup> Y PULIDO, I. <sup>1</sup>

<sup>1</sup>Servicio de Investigación y Desarrollo Tecnológico. Junta de Extremadura. Finca La Orden. 06187 Guadajira. Badajoz. Spain.

<sup>2</sup>CETARSA Finca La Cañalera. Ctra. Santa María de las Lomas, Km 3,5. 10310 Talayuela. Cáceres Spain

El nematodo de los quistes del tabaco, *Globodera tabacum*, se detectó por primera vez sobre tabaco en los regadíos del valle del Tiétar (Cáceres) en Agosto del año 2001.

*Globodera* se encuentra ampliamente distribuida en toda la zona y para estudiar la incidencia de la enfermedad y establecer su posible relación con factores bióticos y abióticos del suelo se realizó un muestreo de suelo en febrero del año 2002.

En este trabajo se muestran los resultados preliminares de ese estudio referidos a densidad de inóculo en suelo y relación de la presencia de *Globodera* con factores bióticos y abióticos del suelo



## EFFECTO DE DISTINTAS ÉPOCAS DE SIEMBRA EN LAS INFECCIONES DE GIRASOL POR LA RAZA F DE JOPO

AKHTOUCH, B.<sup>1</sup>, FERNÁNDEZ-MARTÍNEZ, J.M.<sup>1</sup>, DOMÍNGUEZ, J.<sup>2</sup> Y MELERO-VARA, J.M.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Instituto de Agricultura Sostenible – CSIC. Apdo. 4084. 14080 Córdoba.

<sup>2</sup>CIFA “Alameda del Obispo”. Junta de Andalucía. Apdo. 3092. 14080 Córdoba.

El jopo, *Orobanche cumana* Wallr., constituye una de las mayores limitaciones de la producción del girasol en España. El objetivo de este trabajo es estudiar cómo la fecha de siembra del huésped y la cantidad de semillas de este holoparásito en el suelo afectan al desarrollo del parásito sobre diferentes genotipos del huésped.

Con el fin de evaluar el efecto de las condiciones ambientales, se compararon cuatro fechas de siembra, a intervalos de 15 días (desde la segunda quincena de Febrero hasta la última de Abril) y tres dosis de inóculo: 12.5, 25 y 50 mg. de semillas de jopo (raza F) por planta. Tres genotipos fueron evaluados: P96 una línea completamente resistente a dicha raza; Rodrigo, híbrido comercial que tiene una resistencia moderada a la raza F y Nr5, línea que es susceptible a ésta raza pero con el gen Or5 efectivo contra las razas anteriores a la F. Las semillas de girasol germinadas se plantaron en macetitas con suelo inoculado con las tres dosis mencionadas y tras 15 días en umbráculo fueron transplantadas al campo. El experimento fue realizado durante dos años consecutivos 1999-2001 utilizando un diseño experimental de parcelas divididas con cuatro repeticiones, con la fecha de siembra asignada a las parcelas principales. Dentro de cada parcela principal, se distribuyeron en diseño factorial las combinaciones dosis de inóculo y genotipo. La severidad de la enfermedad (número de jopos por planta) fue evaluada a intervalos de 15 días a partir de la aparición de los primeros jopos.

Los resultados mostraron que no existen diferencias significativas entre años, y que la severidad disminuye desde la 1ª a la 4ª fecha de siembra: 17.46, 16.73, 9.93 y 7,32 jopos/planta, respectivamente, mientras que aumenta linealmente con la dosis de inóculo según la ecuación (JOPO / PLANTA = 0,1107 DOSIS + 9,6506;  $R_2 = 0,91$ ). Las diferencias entre los genotipos fueron altamente significativas ( $P = 0,0006$ ). Nr5 presentó la máxima susceptibilidad (27,48 jopo / planta), Rodrigo mostró una resistencia moderada (11,11 jopo /planta), y la línea P96 no fue atacada en ningún momento.

## CONTROL QUÍMICO DEL VIRUS Y DE LA PATATA (PVY) EN EL CAMPO: PRODUCTOS Y PERÍODOS DE PROTECCIÓN

HANDIZI, A. Y LEGORBURU, F.J.

*NEIKER-Instituto Vasco de Investigación y Desarrollo Agrario.*

*Granja Modelo de Arkaute, Apartado 46, 01080 VITORIA/GASTEIZ*

El virus Y de la patata (Potato virus Y, PVY, género *Potyvirus*) es uno de los dos virus graves que afectan a este cultivo. Su control a largo plazo se basa en la introducción de variedades resistentes, mientras que a corto se utiliza material de partida con una sanidad controlada: la patata de siembra. Ésta es producida por agricultores especializados, en zonas diferenciadas y bajo control oficial, a partir de material libre de patógenos proveniente de cultivo *in vitro*. Con una cultura heredada del control del virus del enrollado (PLRV), estos agricultores aplican insecticidas contra los pulgones vectores y realizan una selección (eliminación) de plantas con síntomas. La rápida transmisión del PVY, de tipo no persistente, burla estos dos métodos de control.

En el anterior Congreso de la SEF se presentaron resultados que identificaban el primer tercio del cultivo como el período más crítico de infección y se mostraba una cierta eficacia de los repelentes basados en aceite de neem<sup>1</sup>. En esta ocasión se ha querido afinar la duración del período de protección (cuatro, seis u ocho semanas), en combinación con diferentes fechas de siembra, y se han ensayado un aceite vegetal y un inductor de resistencia. Se han seguido los vuelos de pulgón mediante bandejas amarillas.

En estos dos años adicionales de ensayos, se ha confirmado una mejor sanidad de las siembras tempranas (abril), en contradicción con las ideas preconcebidas. No se obtuvo un control apreciable del PVY con el aceite vegetal. El aceite de neem confirmó su eficacia y inductor de resistencia Bion® de Syngenta (principio activo acibenzolar-S-methyl) dió una protección similar a la de aquél.

Dejando a salvo las cuestiones de registro de estos fitosanitarios, nuestra recomendación actual sería aplicar pulverizaciones semanales de aceite de neem o Bion® hasta que las capturas de pulgones caigan por debajo de 100 individuos por bandeja y semana.

<sup>1</sup>Handizi, A., Legorburu, F. J. y Sierra, J. A. (2000), Influencia de las fechas de siembra y los repelentes en la infección por PVY, X Congreso de la Sociedad Española de Fitopatología, Valencia, 3-6 octubre 2000: 93

## NUEVA FORMULACIÓN DE ACEITE MINERAL PARA EL CONTROL DEL VIRUS Y DE LA PATATA (PVY) EN LA PRODUCCIÓN DE PATATA DE SIEMBRA

MARÍN, A.<sup>1</sup> Y LEGORBURU, F.J.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>TOTAL-FINA-ELF España. Ribera del Loira 46, 28042 MADRID

<sup>2</sup>NEIKER-Instituto Vasco de Investigación y Desarrollo Agrario. Granja Modelo de Arkaute, Apartado 46, 01080 VITORIA/GASTEIZ

El virus Y de la patata (Potato virus Y, PVY, género *Potyvirus*) es la principal causa de declasificación en cultivos de patata de siembra. Los métodos de control químico de la propagación de este virus son extremadamente limitados, ya que los insecticidas no pueden frenar su rápida transmisión no persistente. El uso de los aceites minerales está ampliamente extendido en las zonas de siembra de la Bretaña Francesa y los Países Bajos; sin embargo, en nuestras condiciones, se han mostrado ineficaces (<sup>3</sup>Legorburu y cols., 1996) o fitotóxicos (Fernando Alonso, Centro de Control de Patata de Siembra de Castilla y León, comunicación personal).

Se han realizado ensayos de campo en la Llanada y la Montaña Alavesas, comparando dos formulaciones de aceite mineral a dos dosis frente al método habitual de control del agricultor (insecticida sistémico en siembra; la pulverización de organofosforado prevista en vegetación no se aplicó, debido a la ausencia de colonias). Los aceites se aplicaron semanalmente, desde la nascencia hasta el fin del vuelo de pulgón (cuatro tratamientos en la Montaña y siete en la Llanada). El material de partida era Certificada A, de la variedad Kennebec, con una tasa de infección por PVY del 2,5%. Esto resulta excesivo para las condiciones de La Llanada, pero en La Montaña se consiguió un control efectivo del virus. Las dos formulaciones, a la dosis máxima dieron un 4,3 y un 5,3% de infección por virus graves en la cosecha (infección máxima para Certificada B = 10%), frente a un 19% del control sin tratar y un 10% raspado del insecticida sistémico.

<sup>3</sup>Legorburu, F. J., Ruiz de Arcaute, R., Marquínez, R. y Ruiz de Gauna, J. A. (1996), Problemática del potyvirus Y de la patata (PVY) en la producción de patata de siembra: causas y ensayos de control físico-químico, *VIII Congreso de la Sociedad Española de Fitopatología, Valencia, 23-27 setiembre 1996*: 41.

P-152

## PROSPECCIÓN Y EVALUACIÓN DE LA EFICACIA DE AGENTES DE CONTROL BIOLÓGICO DEL FUEGO BACTERIANO DE LAS ROSÁCEAS

CABREFIGA, J. Y MONTESINOS, E.

*Insitut de Tecnologia Agroalimentaria-CerTA-CIDSAV. Universitat de Girona. Campus Montilivi s/n 17071. Girona. E-mail: jordi.cabrefiga@udg.es*

El fuego bacteriano es una enfermedad producida por la bacteria *Erwinia amylovora* que afecta a variedades y especies de plantas de la familia de las rosáceas. El control de la enfermedad se basa principalmente en medidas de exclusión del patógeno y en el control químico que se realiza principalmente mediante derivados de cobre o antibióticos. La utilización del control biológico puede significar un avance importante en el control de la enfermedad en un futuro próximo y se plantea como una alternativa o complemento al control químico. El problema del control biológico es la dificultad para obtener aislados de microorganismos antagonistas que sean suficientemente eficaces en condiciones de campo. Para ello en este trabajo se ha confeccionado una metodología de prospección de potenciales agentes de biocontrol del fuego bacteriano, basada en la evaluación de la eficacia en la inhibición de infecciones de un gran número de aislados de plantas mediante ensayos “ex vivo” que presentan cierta similitud con el patosistema natural. Gracias a esta metodología se ha observado que algunos aislados presentaban baja consistencia en los resultados de inhibición de infecciones, mientras que otros sí la mantenían y en este caso fueron considerados como potenciales antagonistas o agentes de biocontrol. Mediante este proceso de selección se ha obtenido una cepa potencial agente de biocontrol tras observar que presentaba una alta eficacia y consistencia en la inhibición de infecciones causadas por *E. amylovora* tanto en frutos inmaduros de peral de la variedad Passe Crassane cómo en flores de peral de la variedad Doyenne du Comice. Además esta cepa ha mostrado una alta eficacia en la inhibición de infecciones en planta de peral en maceta tanto en condiciones de confinamiento como en invernadero, así como una elevada capacidad de colonización y de mantenimiento de niveles poblacionales efectivos tanto en heridas en frutos inmaduros como en flores en condiciones naturales. Los resultados obtenidos animan a continuar investigando con el objetivo de una posible aplicación comercial de esta cepa una vez resueltos los problemas de formulación y conservación de la misma.

## CARACTERIZACIÓN DE LA FLORA BACTERIANA DE PIMENTÓN E INHIBICIÓN POR COMPUESTOS ANTIBACTERIANOS EXTRAÍDOS DE ALGAS

RUBIO, L.<sup>1</sup>, EZZIYANI, M.<sup>1</sup>, HEGAZI, M.<sup>2</sup>, CANDELA, M.E.<sup>1</sup> Y REQUENA, A.<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Área de Fisiología Vegetal, Dpto. de Biología Vegetal, Fac. de Biología, Univ. de Murcia, Campus de Espinardo, 30100, Espinardo, Murcia.

<sup>2</sup>Dpto. Ciencias Marinas. Fac. Ciencias. Univ. Canal de Suez, Ismailia, Egipto.

<sup>3</sup>Dpto. de Química-Física, Fac. de Químicas, Univ. de Murcia.

Los objetivos de este trabajo son la obtención de compuestos con capacidad antibacteriana constitutivos de algas bentónicas, y su posible utilización como agentes de control post-cosecha en pimentón.

Se han estudiado muestras de pimentón comercial para identificar su carga microbiológica. Una de las bacterias recurrentes encontradas ha sido *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*.

Aislados de este microorganismo procedentes de pimentón, han sido enfrentados a compuestos antimicrobianos extraídos de las siguientes algas: *Caulerpa prolifera*, *Cystoseria compressa* y *Laurencia obtusa* (algas verde, marrón y roja respectivamente), típicas representantes de la ficoflora murciana.

Las extracciones se realizaron en un aparato extractor Soxhlet, para ello se utilizaron diferentes disolventes según el alga, Éter de petróleo para las verde y roja, y Metanol para la marrón; el tiempo total de las extracciones fue de 36 horas y el extracto obtenido se concentró en un rotavapor.

El extracto crudo se separó mediante TLC usando como fase móvil Hexano: Etil acetato (4:6 v/v) para los extractos de Éter de petróleo, y Hexano: Éter: Ácido acético 1% (5:4:1 v/v/v) para los de Metanol.

Una vez desarrollada la cromatografía, 2 cm de la placa de TLC se recortan y se usa para el siguiente bioensayo; 1 ml del medio (NB) donde crece la bacteria se adiciona a 10 ml de medio PDA (con colorante para viraje de pH) y antes de que solidifique la mezcla, se siembra sobre la TLC y se introduce en una cámara de vidrio húmeda y sellada. Ésta se incuba en la cámara a 32 °C durante 24 hs.

Las bandas que cambian de color (de naranja a incoloro) denotan crecimiento bacteriano y de las que no viraron porque contienen el compuesto antibacteriano, se midió su Rf. En el resto de la placa de TLC se recogen las bandas con dicho Rf, y se ensaya su capacidad antibacteriana por el método de difusión en agar.

Las bandas recogidas fueron purificadas por HPLC, para su identificación mediante sus espectros de absorción V y UV, infrarrojos y RMN.

Agradecimientos: Este trabajo ha sido financiado en parte por los proyectos PB 98-03776 CYCIT y por FIT-020100-2001-564 (PROFIT) del MCYT.

Luis Rubio esta incorporado al Programa Torres Quevedo del Ministerio de Ciencia y Tecnología.

## OBTENCIÓN DE MUTANTES DE LA CEPA K84 DE *Agrobacterium* DEFICIENTES EN EL CONTROL BIOLÓGICO DE *A. tumefaciens*

PEÑALVER, R.<sup>1</sup>, OGER, P.<sup>2</sup>, SALCEDO, C.I.<sup>1</sup>, PIQUER, J.<sup>1</sup>, LÓPEZ, M.M.<sup>1</sup> Y FARRAND, S.K.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Protección Vegetal y Biotecnología. Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA). Apartado Oficial, 46113 Moncada, Valencia.

<sup>2</sup>Department of Crop Sciences. University of Illinois, Urbana, Illinois 61801, USA.

*Agrobacterium tumefaciens* es la bacteria causante de tumores en el cuello y raíces de gran número de plantas cultivadas. El control biológico mediante el uso de la cepa K84 se ha mostrado como el método más eficaz de control de esta enfermedad. Sin embargo, no se conocen exactamente las características de la cepa K84 ni los mecanismos que ésta emplea en el biocontrol. Las cepas del patógeno pueden ser sensibles o resistentes a un antibiótico producido por la cepa K84, llamado agrocina 84.

El objetivo de este trabajo es desarrollar un bioensayo en invernadero que simule las condiciones en las que K84 es utilizada en campo, que pueda ser aplicado al análisis de un gran número de mutantes, e identificar aquellos incapaces de controlar totalmente la enfermedad. Para validar el bioensayo desarrollado, se han analizado 2000 mutantes de K84 (inducidos por el transposón Tn5), frente a una cepa patógena sensible a la agrocina 84. Se aislaron tres mutantes de K84 deficientes en biocontrol y los tres fueron también deficientes en la producción de agrocina 84. Uno de los mutantes aislados, el M9-22, fracasa completamente en el biocontrol, está afectado en la velocidad de crecimiento en medio mínimo y es deficiente en la producción de agrocina 84. La secuenciación de las regiones de ADN adyacentes a la inserción del transposón indican que el Tn5 está insertado en el gen cromosómico que codifica la S-adenosil L-homocisteína hidrolasa (*ahcY*). Los otros dos mutantes aislados, el M19-158 y M19-164, muestran menor capacidad de control que K84. El primero produce menor cantidad de agrocina 84 que la cepa salvaje K84, y tiene el transposón insertado en un gen cromosómico que presenta una elevada homología con un gen presente en otras bacterias de la familia *Rhizobiaceae* de función desconocida. El segundo mutante produce sólo trazas de agrocina 84 y tiene el transposón insertado en la región del plásmido pAgK84 que codifica la síntesis de agrocina 84. Mediante este bioensayo hemos confirmado que mutantes al azar de K84 afectados en la producción de agrocina 84, no controlan eficazmente la enfermedad producida por cepas de *A. tumefaciens* sensibles a dicho antibiótico. Por tanto, la producción de agrocina 84 es uno de los mecanismos que juegan papel en el control de cepas de *A. tumefaciens* sensibles a agrocina 84.

La obtención de nuevos mutantes de K84 que fracasen en el biocontrol frente a cepas de *A. tumefaciens* resistentes a agrocina 84, pondrá de manifiesto otros mecanismos, distintos de la producción de agrocina 84, que puedan estar implicados en este sistema modelo de control biológico.

## LA REITERACIÓN DE LA BIOFUMIGACIÓN CON SOLARIZACIÓN Y LOS EFECTOS EN LA DESINFECCIÓN DE SUELOS DE INVERNADEROS DE PIMIENTO

GUERRERO, M.M.<sup>1</sup>, LACASA, A.<sup>1</sup>, ROS, C.<sup>2</sup>, GUIRAO, P.<sup>2</sup>, MARTÍNEZ, M.A.<sup>1</sup>, BARCELÓ, N.<sup>1</sup>, BELLO, A.<sup>3</sup>, FERNÁNDEZ, P.<sup>2</sup> Y GONZÁLEZ, A.<sup>1</sup>.

<sup>1</sup> Centro de Investigación y Desarrollo Agroalimentario. Consejería de Agricultura, Agua y Medio Ambiente. C/ Mayor s/n, 30.150 La Alberca (Murcia).

<sup>2</sup> Programa de Colaboración FECOAM-Consejería de Agricultura, Agua y Medio Ambiente, c/ Caballero, 13, 30.003 Murcia.

<sup>3</sup> Dpto. de Agroecología, Centro de Ciencias Medioambientales, CSIC, c/ Serrano, 115, 28.006 Madrid.

La biofumigación es considerada como la acción de las sustancias volátiles procedentes de la biodescomposición de la materia orgánica sobre los patógenos del suelo. En combinación con la solarización, la biofumigación se muestra como un método eficaz de desinfección de suelos de invernadero destinados al cultivo de pimiento, resultando viable y válido tanto para producciones ecológicas, integradas o convencionales. En un invernadero donde previamente se había reiterado ininterrumpidamente el cultivo de pimiento y cuyo suelo es colonizado por *Meloidogyne incognita*, se han medido los efectos de la reiteración de la biofumigación con solarización a dosis decreciente de la enmienda orgánica (estiércol fresco de oveja y gallinaza: 7 + 3 kg/m<sup>2</sup> el primer año, 5 + 2'5 kg/m<sup>2</sup> el segundo y 4 + 2 kg/m<sup>2</sup> el tercero), comparándolo con bromuro de metilo (30 g/m<sup>2</sup> de BM 98:2 y plástico VIF) y con un testigo sin desinfectar. A medida que se reitera la biofumigación con solarización se obtiene mejor control de *M. incognita*, medido en % de plantas colonizadas (50'0% para el primer año, 43'3% para el segundo, 40'0% para el tercero, 36'7% para BM y 100% para el testigo) y en el índice de nodulación (4'5 para el primer año, 1'8 para el segundo, 1'3 para el tercero 1'5 para BM y 6'7 para el testigo). Además, se incrementa la producción comercial (10'0 kg/m<sup>2</sup> el primer año, 11'3 kg/m<sup>2</sup> el segundo, 11'2 kg/m<sup>2</sup> el tercero, 11'2 kg/m<sup>2</sup> el BM y 9'3 kg/m<sup>2</sup> el testigo) y total. Al mismo tiempo, se produce un aumento de macro (N, P, K) y micronutrientes (Fe, Mn, Cu, Zn) en forma asimilable, en los suelos biofumigados. La conductividad eléctrica y el pH, que aumentan tras la primera biofumigación, van descendiendo paulatinamente a medida que se reitera el tratamiento.

P-156

## EFECTO DE RIZOBACTERIAS PROMOTORAS DEL CRECIMIENTO VEGETAL SOBRE LA REPRODUCCIÓN DE *Meloidogyne javanica* EN PLATANERA

RODRÍGUEZ ROMERO, A.S. Y JAIZME-VEGA., M.C.

*Instituto Canario de Investigaciones Agrarias (ICIA)*

*Dpto. Protección Vegetal*

Apdo. 60 38270. La Laguna, Tenerife, España.

E-mail: [arquezr@icia.es](mailto:arquezr@icia.es), [mcjaizme@icia.es](mailto:mcjaizme@icia.es)

Los nematodos agalladores *Meloidogyne* spp. constituyen uno de los patógenos de suelo más importantes de la platanera en Canarias.

Por otra parte, estudios recientes apuntan la actividad biocontroladora frente a nematodos fitoparásitos de algunas cepas de rizobacterias, que funcionan también como estimuladoras del crecimiento vegetal (PGPR).

En el presente trabajo se propone estudiar bajo condiciones de invernadero, el uso de 3 cepas bacterianas (2 *Pseudomonas fluorescens* y 1 *Bacillus subtilis*) para el control de *M. javanica* en platanera.

En la mayoría de las variables físicas estudiadas, el empleo de las bacterias mejora el estado general de la planta. Observando la interacción con el nematodo, se aprecia una mejoría cuando la bacteria está presente. Existe además una reducción de la población del patógeno en presencia de cualquiera de las cepas, siendo esta disminución para dos de ellas estadísticamente significativa. Estos datos indican diferencias en la intensidad del efecto según la cepa analizada.



## DAÑOS POR FRÍO EN TOMATE DANIELA: INCIDENCIA DEL PARASITISMO FÚNGICO

VALENZUELA, J.L.<sup>1</sup>, BLANCO, R.<sup>2</sup>, SANTOS, M.<sup>2</sup> Y TELLO, J.C.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Biología Vegetal y Ecología. Área de Fisiología Vegetal. Edificio CITE-II B. Universidad de Almería. Carretera de San Urbano s/n. 4120 Almería.

<sup>2</sup>Departamento de Producción Vegetal. Área de Producción Vegetal. Edificio CITE-II B. Universidad de Almería. Carretera de San Urbano s/n. 4120 Almería.

La frigoconservación de tomate tiene un límite en la aparición del síndrome conocido como daños por frío (*chilling injury*). Este síndrome aparece cuando el fruto de tomate es conservado a temperaturas por debajo de 12 °C según variedades y tiempo de frigoconservación y limita la vida postcosecha del producto.

En este trabajo se conservaron frutos de tomate Daniela de dos estados de madurez diferentes (pintón y maduro) a 9 °C durante 30 días. Se realizaron controles para evaluar el aspecto externo de los frutos semanalmente hasta que la presencia del deterioro era evidente. De igual modo se aislaron e identificaron los hongos que aparecieron registrándose el porcentaje de frutos afectados.

De los resultados podemos destacar que a la tercera semana de conservación el 30% de los frutos maduros se encontraban afectados por *Botrytis cinerea* y *Alternaria tenuis*, mientras que en los frutos pintones se encontró además *Cladosporium*.

En la cuarta semana el deterioro de los frutos era patente, así el 60% de los frutos pintones aparecieron muy dañados con un ablandamiento muy notorio y la presencia de *B. cinerea*. En los frutos maduros apareció podredumbre gris en el 50% de los mismos.

P-158

## RESPUESTA A LA MICORRIZACIÓN DEL PORTAINJERTOS DE CIRUELO MYROCAL (*Prunus cerasifera*) EN PRESENCIA DE NEMATODOS AGALLADORES (*Meloidogyne javanica*) Y LESIONADORES (*Pratylenchus vulnus*)

BONET, A.<sup>1</sup>, CALVET, C.<sup>1</sup>, ESTAÚN, V.<sup>1</sup>, CAMPRUBÍ, A.<sup>1</sup> Y PINOCHET, J.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentàries (IRTA), Dpto. de Protecció Vegetal, Ctra. de Cabriels s/n, 08348 Cabriels, Barcelona, España.

<sup>2</sup> Agromillora Catalana sa, El Rebatos/n,08739 T.M. Subirats, Barcelona, España.

Con el objetivo de evaluar el efecto de la micorrización artificial del ciruelo Myrocal en suelos infestados por nematodos agalladores y lesionadores se estableció un experimento de tres años de duración en condiciones de microparcela con material vegetal micropropagado. Las plantas se inocularon con una mezcla de dos hongos formadores de micorrizas arbusculares: *Glomus mosseae* y *Glomus intraradices* y tras permanecer durante tres meses en un invernadero se transplantaron a microparcelas individuales de 30 l de capacidad en condiciones de campo. El suelo se inoculó quince días más tarde con *Meloidogyne javanica* o con *Pratylenchus vulnus*. Al final de la primera temporada de crecimiento, la micorrización artificial había causado un incremento de crecimiento significativo en las plantas tanto en el suelo libre de nematodos como en los suelos infestados por ambas poblaciones de nematodos. Este efecto se repitió al final de la segunda temporada de crecimiento. Al término del tercer año, el efecto estimulador de la inoculación con hongos seleccionados se mantenía en el suelo infestado por el nematodo agallador *M. javanica*, a pesar de que las raíces de las plantas no micorrizadas artificialmente con los hongos arbusculares de colección ya habían sido colonizadas por hongos arbusculares nativos.

## ESTUDIOS DE INTERACCIÓN ENTRE HONGOS FORMADORES DE MICORRIZAS ARBUSCULARES Y LOS PATÓGENOS DE RAÍZ *Armillaria mellea* Y *Rosellinia* spp.: PRODUCCIÓN DE INÓCULO E INOCULACIÓN CONTROLADA DE PORTAINJERTOS DE FRUTALES Y DE VID

GARCÍA FIGUERES, F.<sup>2</sup>, CALVET, C.<sup>1</sup>, CAMPRUBÍ, A.<sup>1</sup> Y ESTAÚN, V.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentàries (IRTA), Dpto. de Protecció Vegetal, Ctra. de Cabrils s/n, 08348 Cabrils, Barcelona, España.

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

Se han caracterizado hasta el momento mediante técnicas de PCR-RFLP 4 aislados de *Armillaria mellea* y dos aislados de *Rosellinia* spp. caracterizados morfológicamente, a partir de suelos de replante de vid y de frutales de pepita y hueso. Estos hongos han sido utilizados en experimentos de inoculaciones mixtas con dos hongos formadores de micorrizas arbusculares: *Glomus mosseae* y *Glomus intraradices*. Para asegurar una fuente continua de inóculo de *A. mellea*, y su dosificación en los experimentos, se utilizaron bellotas de *Quercus suber* esterilizadas e inoculadas con los aislados seleccionados. El inóculo de *Rosellinia* spp. fue producido sobre un soporte orgánico de salvado de trigo, perlita y serrín. Tres portainjertos de frutal de hueso: GF 677, Mayor y G x N 22, uno de frutal de pepita: Peral Conference y dos portainjertos de vid: SO4 y R110 se inocularon con los hongos micorrícicos. Nueve meses después de su inoculación y tras comprobar la colonización micorrícica en las raíces, las plantas se establecieron en microparcels dónde fueron inoculadas con los hongos patógenos. El objetivo de estas inoculaciones mixtas es evaluar a corto y largo plazo el potencial de la inoculación con hongos formadores de micorrizas arbusculares para favorecer el desarrollo de los portainjertos en situaciones de replante.

P-160

## UNA DÉCADA DE APLICACIÓN DE LA SOLARIZACIÓN EN ARAGÓN

GONZÁLEZ TORRES, R.

*Servicio de Investigación Agroalimentaria. DGA. Apartado 727. 50080. Zaragoza.*

La aplicación de la solarización en Aragón durante la última década del siglo XX se ha estudiado en parcelas hortofrutícolas del Servicio de Investigación Agroalimentaria situadas en Montañana (Zaragoza) y en fincas comerciales del Valle del Ebro. Se evaluaron cultivos leñosos (cerezo, ciruelo, manzano, melocotonero y peral) y herbáceos (ajo, borraja, melón y sandía). Con anterioridad a 1990, los investigadores Gil Ortega, Barriuso, Palazón y Zaragoza, realizaron estudios sobre el efecto de la solarización en el cultivo del pimiento.

En todos los casos se observó que:

-La solarización del suelo en parcelas experimentales incrementó los regímenes térmicos entre 4-10° C a 20 cm de profundidad, siendo superiores a 10 cm de profundidad, consiguiéndose temperaturas máximas que promediaron entre 42-50 °C.

-Nuestros resultados mostraron la mayor eficacia del polietileno transparente de 100 mm frente al de 50 mm para solarizar en el Valle del Ebro, por su resistencia al Cierzo.

-Todos los microorganismos fitopatógenos y malas hierbas que se encontraron en nuestras parcelas experimentales fueron eliminados mediante la solarización. La juncia (*Cyperus rotundus* L.) fue eliminada complementando la solarización con glifosato a dosis baja (720 g/ha).

-La solarización durante los meses de julio y agosto, bajo condiciones meteorológicas del Valle del Ebro, previno el ascenso capilar de la solución del suelo y su concentración por evaporación en la superficie, resultando en una disminución de la salinidad del suelo.

-Todos los cultivos sembrados tras la solarización en Aragón incrementaron su crecimiento y rendimiento en más del doble que los testigos no solarizados.

-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, resultó efectiva en la mayoría de los casos.

Nuestros resultados de una década confirman la eficacia de la solarización del suelo como tratamiento fitosanitario e incrementador del crecimiento de los cultivos estudiados en Aragón. Dado que los máximos incrementos de temperaturas observados en Aragón tienen lugar a finales de julio y principios de agosto, se sugiere el comienzo de la solarización no más tarde de mediados de julio. La predicción de las temperaturas del suelo antes de la solarización mediante el análisis de Fourier resulta de gran utilidad a la hora de sugerir su aplicación en comarcas pre-pirenáicas o del Bajo Aragón.

## CERTIFICACIÓN FITOSANITARIA DE LA SEMILLA DE TRIGO, DISTRIBUCIÓN INTERNACIONAL EN EL CYMMYT

SÁNCHEZ RAMÍREZ, C.

*Dpto. de Agronomía, ETSIAM, Universidad de Córdoba.*

Avda. Menéndez Pidal, s/n. 14071-Córdoba.

El Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo (CIMMYT) de México, genera y distribuye su germoplasma a nivel nacional e internacional, reforzando el control sanitario interior a través de la Unidad de Sanidad de Semillas, cuyo objetivo es certificar la calidad fitosanitaria de su germoplasma.

El germoplasma es sembrado un ciclo antes de sus envíos en Mexicali, B.C.N., zona libre de carbón parcial, reconocida oficialmente por la Dirección General de Sanidad Vegetal (DGSV); México y el American Plant Health Inspection Service (APHIS); Estados Unidos. Se hace un monitoreo en campo por lo menos en dos ocasiones y se trata con propiconazol.

Cuando es cosechado el germoplasma, las bolsas de manta y etiqueta son nuevas, el material se embarca en contenedores sellados y se transporta al Batán sin pasar por las zonas cuarentenadas, antes de su ingreso al CIMMYT, los camiones son lavados, aspirados y llevados a zonas restringidas para su descarga, inspección y proceso. Las bodegas se mantienen con cero tolerancia a *T. indica*, y el recinto es lavado y cerrado con cloro expuesto 24 horas, enjuagándose, tomando muestras y revisando al microscopio en laboratorio. Las áreas de trigos harineros, duros, triticales, cebada, calidad industrial y banco de germoplasma son monitoreados por portaobjetos trampa con gelvatol-tolueno-parafina. No se permite el ingreso a éstas zonas de material procedente de áreas cuarentenadas.

Cuando la semilla se limpia y selecciona para los Ensayos Internacionales, inician las pruebas rutinarias que consisten en la detección de esporas de carbón parcial, otros patógenos que puedan transmitirse por semilla, pruebas de ELISA para el virus del mosaico estriado de la cebada, técnica de inmunofluorescencia para *Xanthomonas translucens* y pruebas de germinación. El total del material que se maneja y revisa anualmente es de 8 ton con aproximadamente 5000 líneas conformadas en 25-30 ensayos. Cuando las pruebas finalizan y es certificado el material, la DGSV otorga los Certificados Fitosanitarios Internacionales (CFI), entonces el departamento de Ensayos Internacionales se encarga de lavar, tratar, envasar y enviar el material a su destino final.blanco

## EFFECTO DE FUNGICIDAS, ENSILADO DE SOJA Y *Glomus aggregatum* EN EL CONTROL DE *Armillaria mellea* EN EL PATRÓN DE VID 110 RICHTER

AGUÍN, O.<sup>1</sup>, SÁINZ, M.J.<sup>2</sup>, PINTOS, C. <sup>1</sup>, LOUREIRO, B. <sup>1</sup>, VILARIÑO, A.<sup>3</sup> Y MANSILLA, J. P. <sup>1, 2</sup>

<sup>1</sup>Estación Fitopatológica "Do Areeiro". Subida a la Robleda S/N. 36153. Pontevedra.

<sup>2</sup>Dpto. de Producción Vegetal. Universidad de Santiago de Compostela. 27002. Lugo.

<sup>3</sup>Instituto de Investigaciones Agrobiológicas de Galicia.CSIC.17580.Santiago de Compostela.

La podredumbre blanca de raíz causada por *Armillaria mellea* provoca importantes pérdidas en plantaciones vitícolas de Galicia. Este patógeno es muy difícil de controlar debido a su persistencia en el terreno, como consecuencia de su carácter saprófito y de la formación de rizomorfos, y a su establecimiento entre la madera y la corteza de las cepas, que lo protege de la acción de fungicidas. Por el momento no se han encontrado materias activas que resulten plenamente eficaces para su control. Una alternativa de control biológico que hasta la fecha no se ha estudiado es el manejo de hongos formadores de micorrizas arbusculares (MA). Se ha demostrado que esta simbiosis puede jugar un papel importante en la protección de las plantas frente a patógenos fúngicos de raíz.

El objetivo de este trabajo fue comprobar las posibilidades de control de *A. mellea* mediante fungicidas, ensilado de soja y hongos MA en plantas del patrón de vid 110 Richter, uno de los más utilizados en Galicia.

El material vegetal consistió en 80 estaquillas enraizadas, de las cuales 40 se inocularon con el hongo MA *Glomus aggregatum* en la cama de enraizamiento y las otras 40 no. Las plantas se dispusieron en macetas de 1,5 L (una estaquilla por maceta) que contenían suelo con su propia población nativa de hongos MA. Para cada grupo de plantas (MA-inoculadas y no inoculadas), se establecieron 8 tratamientos: control, inoculación de *Armillaria*, aplicación de ciproconazol, aplicación de ensilado de soja, aplicación de cubiet, y las interacciones *Armillaria* x ciproconazol, *Armillaria* x ensilado de soja y *Armillaria* x cubiet. Las plantas se mantuvieron en cámara de cultivo con condiciones controladas de temperatura, humedad y fotoperíodo de 16 horas de luz. El ensayo finalizó a los nueve meses, momento en el que la mayoría de las plantas inoculadas con *Armillaria* habían muerto. En cada planta, se contó el número de brotes y de hojas, la longitud y número de yemas del brote principal, se determinaron el peso seco de parte aérea y de raíz, se estimó el porcentaje de colonización de la raíz por hongos MA y se asignó un nivel de incidencia.

La inoculación con *G. aggregatum* antes del contacto de la planta con *A. mellea* determinó una mayor tolerancia al patógeno respecto a las plantas no inoculadas. La aplicación del ciproconazol disminuyó el índice de enfermedad por *A. mellea*, aunque tuvo un importante efecto fitotóxico. El cubiet y el ensilado de soja disminuyeron el índice de enfermedad de forma similar al ciproconazol; su efecto protector fue comparable al que proporcionó la inoculación con *G. aggregatum*. Esta es la primera referencia de que los hongos MA pueden aumentar la tolerancia de la vid frente a basidiomicetos patógenos de raíz.

## APLICACIÓN DE FILTRADOS PROTEICOS DE CEPAS DE *Trichoderma* PARA EL CONTROL DE ENFERMEDADES EN CULTIVO DE FRESA

AZPILICUETA, A.<sup>1</sup>, RODRÍGUEZ, A.<sup>2</sup>, ROMÁN, F.<sup>2</sup>, TAMARGO, O.<sup>1</sup> Y LLOBELL, A.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Instituto de Bioquímica Vegetal y Fotosíntesis, CSIC-Universidad de Sevilla.

<sup>2</sup>Newbiotechnic S.A., Sevilla, España.

Una de las principales etapas del micoparasitismo de *Trichoderma* spp. es la síntesis y secreción de enzimas que degradan componentes de la pared celular de los hongos fitopatógenos. Asimismo se han descrito cepas de *Trichoderma* capaces de inducir resistencia de la planta huésped y de potenciar su crecimiento.

Con el fin de evaluar algunos de estos efectos, en el presente trabajo se explora el potencial de los filtrados proteicos de *Trichoderma* spp. sobre la producción, calidad e incidencia de enfermedades de frutos en un cultivo de fresa cv. Camarosa en condiciones de campo. Para ello, se prepararon filtrados de cultivos de *Trichoderma* spp. en medio líquido con quitina como inductor. Tras un período de crecimiento, se separó el micelio mediante filtración y se procedió a la concentración de las proteínas extracelulares (filtrados proteicos). A continuación, se diseñó un ensayo en el que se probaron dos filtrados obtenidos a partir de: *T. inhamatum* CG77 y *T. atroviride* IMI20640; un tratamiento estándar con fungicidas comerciales y como testigo se utilizó agua. Los filtrados proteicos empleados se seleccionaron en base a la actividad antifúngica *in vitro* de inhibición de la germinación y el crecimiento de *B. cinerea*, de entre 18 filtrados provenientes de distintas cepas *Trichoderma* spp. Las aplicaciones se efectuaron antes de la plantación sumergiendo los plantines en las soluciones y, durante el cultivo, realizando pulverizaciones foliares quincenales. Se evaluó el peso, la calidad de los frutos y la incidencia de las enfermedades en el momento de la cosecha. Frutos sanos se colocaron a 4 °C y luego se incubaron a 20°C y alta HR evaluando diariamente las pudriciones por *B. cinerea* y *Rhizopus* sp. Ninguno de los tratamientos afectó al establecimiento de las plantas, ni se presentaron efectos de fitotoxicidad durante todo el cultivo. El rendimiento total fue significativamente superior en los tratamientos con los filtrados proteicos respecto al tratamiento estándar y al testigo. Asimismo los tratamientos con los filtrados fueron significativamente superiores en número y peso de frutos de calibre comercial al testigo. La incidencia de enfermedades en el momento de la cosecha fue muy baja y no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos. En las evaluaciones postcosecha, solo se observó una reducción de la incidencia de podredumbres en el tratamiento estándar.

La baja incidencia de enfermedades en el cultivo nos ha impedido confirmar el efecto de control de patógenos de los filtrados. No obstante, los resultados obtenidos nos permiten afirmar que los filtrados proteicos manifiestan un claro efecto potenciador sobre el rendimiento del cultivo.

## ESPECTRO FITOPATOLÓGICO ASOCIADO AL ARÁNDANO *Vaccinium corymbosum*, L., *V. ashei* R. EN HUELVA

BARRAU, C., DE LOS SANTOS, B. Y ROMERO, F.

CIFA "Las Torres-Tomejil". Consejería de Agricultura y Pesca de la Junta de Andalucía.

Apdo. Correos Oficial 41200. Alcalá del Río (Sevilla).

e-mail: [cifatorr@cap.junta-andalucia.es](mailto:cifatorr@cap.junta-andalucia.es)

El arándano fue introducido en la provincia de Huelva a principio de los años 90, como cultivo complementario a la fresa, estableciéndose en el entorno del Parque de Doñana, que constituye el hábitat natural de varias especies de Ericáceas, las cuales han podido actuar como fuente potencial de inóculo en la adaptación del cultivo del arándano al espectro fitopatológico asociado, aunque no existen especies silvestres del género *Vaccinium* en la zona.

Variedades de los grupos «highbush» y «rabbiteye», de bajo requerimientos en horas-frío, son las que actualmente se cultivan en la provincia de Huelva en una superficie aproximada de 150 ha.

Este trabajo recoge el resultado de prospecciones sistemáticas realizadas, desde 1995 hasta 2002, a diferentes campos de arándanos en los que se ha observado la presencia de: *Colletotrichum acutatum*, *C. gloeosporioides*, *Pucciniastrum vaccinii*, *Alternaria Spp. A. Alternata*, *Septoria spp.* Y *Phomopsis spp.*



## CONTROL DE PATÓGENOS PRESENTES EN AGUA DE RIEGO EN CULTIVOS DE PEPINO Y TOMATE CEREZA EN PERLITA

BERENGUER, J.J.<sup>1</sup>, GARCÍA, M.<sup>1</sup>, GÓMEZ, J.<sup>2</sup>, ÁLVAREZ, A.<sup>2</sup> Y ESCOBAR, I.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Estación Experimental La Nacla. Caja Rural de Granada. Circunvalación, 2. 18006 Granada

<sup>2</sup> Centro de Investigación y Desarrollo Agrario de Almería. Apartado 91, El Ejido. Almería

La presencia de aislados patógenos pertenecientes a los géneros *Pythium* y *Phytophthora* en el agua de riego, concretamente en los embalses en la Comarca de Motril ha sido constatada por Álvarez et al. (2000).

Desde 1996 se viene observando la muerte de plantas en invernaderos comerciales, en cultivos de pepino y tomate cereza en diversos sistemas de cultivos en sustratos. La adición de hipoclorito sódico a la balseta de riego a una concentración de 5 ppm ha resultado ser un método eficaz en el control de éstos patógenos en cultivo de tomate cereza ( Berenguer et al., 2000).

El presente trabajo evalúa la eficacia de diferentes métodos en el control de *Pythium* y *Phytophthora* en un cultivo de pepino de otoño-invierno y en uno de tomate cereza de primavera. En el primer cultivo se plantearon ocho tratamientos, cuatro regados con agua de canal y los otros regados con ésa misma agua infectada una vez al mes con una mezcla de aislados patógenos, consistiendo aquellos en, testigo, hipoclorito sódico disuelto en la balseta de riego a una concentración de 5 ppm, inyectado con una bomba a la misma concentración y por último injerto sobre RS-841. Se constata la eficacia de los diferentes métodos de cloración, frente al testigo e injerto, ya sea por una mayor producción total, como por una menor mortandad de plantas.

En tomate cereza de primavera sólo se plantean cuatro tratamientos, adición de hipoclorito sódico a una concentración de 5 ppm en la balseta de riego, con el cultivo en sacos de perlita nuevos, inyección de hipoclorito sódico con bomba a la misma concentración y con dos opciones, saco nuevo y viejo de perlita (procedente del cultivo anterior de pepino) y testigo en bolsa de cultivo nueva. Se constata una mayor eficacia del primero de los sistemas de control, porque significativamente es superior tanto en las cifras de producción como en el porcentaje de plantas muertas al final del ciclo, que fue cero

## CONTROL DE *Verticillium dahliae* MEDIANTE LA APLICACIÓN DE TRATAMIENTOS ORGÁNICOS AL SUELO

MWANZA, C. Y BLANCO-LÓPEZ, M. A.

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

Los microesclerocios (ME) de *Verticillium dahliae* constituyen la principal estructura de infección de la planta y de supervivencia en el suelo. Por ello, su reducción es un factor esencial para controlar las Verticilosis. El uso de enmiendas orgánicas es uno de los métodos culturales que se pueden emplear para alcanzar este objetivo. La descomposición de estos materiales, puede liberar compuestos con efecto fungicida contra patógenos de suelo o estimulador de organismos antagonistas beneficiosos.

Para estudiar el efecto de distintas materias orgánicas sobre la supervivencia de ME de *V. dahliae*, se trituraron materiales secos de *Brassica oleracea*, *Cistus albidus*, *C. ladanifer*, *C. salvifolius*, *Citrus aurantium*, *Diplotaxis spp.*, *Eucalyptus globulus*, *Lavandula stoechas*, *Pinus pinea*, *Sorghum halepense*, *Thymus mastichina* y *Zea maydis* hasta conseguir un polvo fino. Cada uno de éstos se incorporó a suelo estéril o no, a razón de 2%(w/w) de peso seco y cada mezcla se dispuso en una fiambarrera de 19x12x5 cm. En cada fiambarrera se enterraron 3 sobres de nylon de 3x3 cm en los que se habían incluido los ME. Las fiambarras se regaron con 150 ml de agua estéril y se incubaron cerradas en oscuridad a 22-23°C. Cada sobre se retiró de la fiambarrera después de 3, 6, y 9 semanas de incubación, recuperando los ME en 10 ml de agua estéril. La viabilidad de los ME se determinó por la formación de colonias de *V. dahliae* sobre Agar Polipectato Sódico Modificado (APSM) a los 14 días de incubación. Las especies de *P. pinea*, *E. globulus* y *Z. madis* tuvieron escaso efecto sobre la viabilidad comparada con las otras especies. Los restos de *C. ladanifer*, *C. salvifolius* y *C. albidus* tuvieron una eficacia intermedia y los de *B. oleraceae*, *Diplotaxis spp.*, *C. aurantium*, *L. stoechas* y *T. mastichina* redujeron de forma absoluta la viabilidad de los ME de ambos aislados.

Para confirmar la eficacia de los sustratos orgánicos en la erradicación de ME de *V. dahliae*, restos de *C. albidus*, *C. salvifolius*, *Diplotaxis spp.*, *E. globulus*, *L. stoechas* o *T. mastichina*, se mezclaron con suelo infestado (5 ppg) al 2%. Cada tratamiento se incubó en una bolsa cerrada durante 6 semanas y se distribuyó en 6 macetas sobre la que se cultivó algodón. A partir de las 6 semanas, se evaluó la severidad de la enfermedad (escala 0-4), determinándose la DI del patógeno en el suelo infestado en cada tratamiento. Todos los materiales empleados redujeron la incidencia y la severidad de la enfermedad causada por ambos aislados. Además, se recuperó mayor cantidad de ME (de ambos aislados) en el testigo infestado no tratado que en los suelos tratados con *C. albidus*, *C. salvifolius* o *E. globulus* y no se recuperó el patógeno de ninguno de los suelos tratados con restos de *Diplotaxis spp.*, *L. stoechas* o *T. mastichina*. Los resultados confirman la capacidad de los sustratos utilizados para la erradicación de *V. dahliae* y el control de la Verticilosis.

## VALORACIÓN DE LA ACTIVIDAD IN VITRO DE EXTRACTOS ACUOSOS DE COMPOST PROCEDENTE DEL CULTIVO DE CHAMPIÑÓN FRENTE A *Verticillium fungicola* var. *fungicola*

GEA, F.J.<sup>1</sup>, NAVARRO, M.J.<sup>1</sup>, SANTOS, M. <sup>2</sup>, BLANCO, R.<sup>2</sup>, AVILÉS, M.<sup>3</sup>, SINOBAS, J.<sup>4</sup> Y TELLO, J.C.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Centro de Investigación, Experimentación y Servicios del Champiñón (C.I.E.S.). C/ Peñicas, s/n. 16220 Quintanar del Rey (Cuenca).

<sup>2</sup>Dpto. de Producción Vegetal. Universidad de Almería. La Cañada de San Urbano s/n. 04120 Almería.

<sup>3</sup>Dpto. Ciencias Agroforestales. Universidad de Sevilla. Ctra. Utrera. 41013 Sevilla.

<sup>4</sup>Dpto. de Producción Vegetal: Botánica y Protección Vegetal. EUITA. Universidad Politécnica de Madrid.

*Verticillium fungicola* (Preuss) Hassebrauk var. *fungicola* es el agente causal de la enfermedad de la mole seca en las dos especies de champiñón que se cultivan en España: *Agaricus bisporus* (Lange) Imbach y *A. bitorquis* (Quélet) Saccardo. Este hongo micoparásito llega a ocasionar elevadas pérdidas de cosecha, al tiempo que deprecia la calidad comercial del producto, ya que deforma y mancha los cuerpos fructíferos. Los métodos de control habitualmente utilizados consisten en la aplicación de fungicidas (procloraz) y en la observancia de estrictas medidas de higiene.

La utilización de extractos acuosos de compost de residuos agrícolas se ha convertido, en los últimos años, en una alternativa a los productos químicos en el control de hongos fitopatógenos foliares. En este sentido, los residuos del cultivo de champiñón representan una fuente potencial para la obtención de dichos extractos.

En este trabajo se presentan los resultados de los ensayos *in vitro* realizados para valorar la eficacia de los extractos acuosos de compost procedente del cultivo de champiñón en el control del hongo *V. fungicola* var. *fungicola*. Para ello, se han realizado mezclas de compost: agua, en relación 1:4 y 1:8 (p/v), utilizando periodos de extracción de 1, 7 y 14 días. Los extractos acuosos obtenidos se han ensayado sin tratamiento previo, autoclavados y microfiltrados, frente a 3 aislados de *V. fungicola* var. *fungicola*. Los experimentos se realizaron por duplicado con cinco repeticiones en cada uno de ellos.

La utilización de extractos acuosos sin tratamiento previo registró los mejores resultados. La mezcla 1:4 inhibió entre un 66 y un 100% el crecimiento miceliar del hongo, mientras que la mezcla 1:8 inhibió entre el 73 y 100%. De los tiempos de extracción utilizados, los más adecuados fueron los de 1 y 7 días, ya que con ellos se obtuvo una mayor inhibición.

Este trabajo ha sido subvencionado por el proyecto FEDER 1FD97-1322-CD4-

## CONTROL DE LA VERTICILOSIS DEL ALGODONERO MEDIANTE TRATAMIENTOS CON COMPUESTOS QUÍMICOS NO FUNGICIDAS

BONGUE, D.<sup>1</sup>, RODRÍGUEZ-JURADO, D.<sup>2</sup>, JIMÉNEZ-DÍAZ, R.M.<sup>2</sup> Y BEJARANO-ALCÁZAR, J.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Protección Vegetal, CIFA "Alameda del Obispo" de Córdoba, J.A. Apdo. 3092. 14080 Córdoba. (jbejarano.cifao@cap.junta-andalucia.es)

<sup>2</sup> Instituto de Agricultura Sostenible, CSIC. Apdo. 4084. 14080 Córdoba; y ETSIAM, Universidad de Córdoba (ag1jidir@uco.es)

La Verticilosis del algodón (VA), causada por *Verticillium dahliae*, es la enfermedad más importante de este cultivo en Andalucía. En la actualidad, el control de la VA se lleva a cabo mediante estrategias dirigidas a reducir el inóculo inicial del hongo en el suelo y su eficacia para causar enfermedad. En este trabajo se ha investigado el efecto de tratamientos de la planta con dos compuestos químicos, BION™ (CGA-245704) y Brotomax®, sobre el desarrollo de la Verticilosis del algodón en condiciones de invernadero.

Se han realizado tres experimentos, dos con BION™ y uno con Brotomax®, en los que plantas del cv Crema 111 de algodón, altamente tolerante a la VA, fueron inoculadas con aislados representativos de los patotipos defoliante y no-defoliante de *V. dahliae* mediante inyección en el tallo de una suspensión de conidias. Las condiciones de incubación de las plantas inoculadas fueron óptimas para el desarrollo de la VA. En el primer experimento con BION™ se utilizaron dos dosis, 2,5 y 5,0 g p.c./100 l de agua, y cinco esquemas de aplicación que consideraron acciones en pre-infección, post-infección, o ambas. En el segundo experimento la dosis alta se redujo a 3,5 g p.c./100 l de agua, se disminuyó el número de aplicaciones antes y después de la inoculación, y se amplió el periodo de tiempo entre aplicaciones. En el experimento con Brotomax®, se utilizó una metodología similar a la anterior, con dosis de 0,75 y 1,5%. La reacción de las plantas a los tratamientos se evaluó periódicamente por la severidad de los síntomas inducidos, usando una escala 0-4 (0=no síntomas; 4=planta muerta). Los síntomas de fitotoxicidad se evaluaron semanalmente utilizando una escala 0-2 (0=planta sana; 2=síntomas graves). Una vez finalizado el experimento se determinó el peso fresco de las plantas.

Los resultados de los experimentos con BION® sugieren que las aplicaciones a dosis de 2,5 y 3,5 g p.c./100 l de agua antes de que la infección tenga lugar podrían ser las más adecuadas para reducir el desarrollo de la VA sin causar daños de fitotoxicidad. La aplicación de Brotomax® no redujo de forma significativa la severidad de la enfermedad ni indujo síntomas de fitotoxicidad. Sin embargo, en varios de los tratamientos se observó un incremento significativo en el peso fresco de las plantas.

## ESTIMACIÓN «IN VITRO» DE LA CAPACIDAD ANTAGONISTA DE LA MICROBIOTA OBTENIDA DEL COMPOSTADO DEL CHAMPIÑÓN

CASTILLO, P.<sup>1</sup>, DIÁNEZ, F.<sup>1</sup>, CHEBÁANI, M.<sup>1</sup>, YÉLAMOS, J.<sup>1</sup>, VILLAESCUSA, J.<sup>1</sup>, SANTOS, M.<sup>1</sup>, BLANCO, R.<sup>1</sup>, GEA, F.J.<sup>2</sup>, TRILLAS, I.<sup>3</sup>, AVILÉS, M.<sup>4</sup>, SINOBAS, J.<sup>5</sup> Y TELLO, J.C.<sup>1</sup>

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

<sup>2</sup>Centro de Investigación, Experimentación y Servicios del Champiñón (C.I.E.S.C). C/ Peñicas, s/n 16220 Quintanar del Rey (Cuenca).

<sup>3</sup>Dpto. Biología Vegetal, Facultad de Biología, Universidad de Barcelona, Av. Diagonal 645, 08028 Barcelona.

<sup>4</sup>Dpto. Ciencias Agroforestales. Universidad de Sevilla 41013 Ctra. Utrera. Sevilla.

<sup>5</sup>Dpto. de Producción Vegetal: Botánica y Protección Vegetal. Universidad Politécnica de Madrid. Ciudad Universitaria, s/n. 28040 Madrid.

Existe una gran preocupación por el importante acúmulo de restos agrícolas que se origina en las industrias agroalimentarias debido a que ocasionan graves problemas para su gestión. La mayoría de los residuos generados por estas industrias agrícolas, son materia renovable y disponible en gran cantidad, están constituidos fundamentalmente por residuos orgánicos. Estos residuos son apropiados para su compostado y uso como sustrato.

En muchos casos, estos composts presentan supresividad natural, cualidad que los hace deseables como componentes de los sustratos para controlar las enfermedades de origen telúrico. Así encontramos compost con supresividad frente a enfermedades producidas por *Rhizoctonia solani*, algunas *formae specialis* de *Fusarium oxysporum* y por *Verticillium dahliae* y *V. fungicola*.

El objetivo de este trabajo es facilitar el aprovechamiento de residuos agroalimentarios como los del cultivo del champiñón y su utilización en el control biológico y ambiental de enfermedades producidas por hongos edáficos. En primer lugar se llevó a cabo una caracterización y cuantificación de bacterias y actinomicetos tanto mesófilos como termófilos, así como de hongos y levaduras presentes en el compost del cultivo del champiñón. Posteriormente se estudió la capacidad antagonista «in vitro» de toda la microbiota caracterizada frente a *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* (razas 0 y 1), *F. oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*, *Rhizoctonia solani*, *V. dahliae* y *V. fungicola*.

Al llevar a cabo el estudio de la capacidad antagonista se encontraron gran diversidad de microorganismos con gran poder antagonista entre los cuales caben destacar levaduras con un comportamiento de supresividad general para todos los hongos patógenos. Se identificaron además especies de *Trichoderma* con gran poder antagonista frente a *R. solani* encontrándose en ellas dos posibles mecanismos para ejercer su supresividad basados en la producción de sustancias volátiles y el micoparasitismo.

## VARIABILIDAD EN LA RESPUESTA A TEBUCONAZOL DE DIFERENTES AISLADOS DE *Sclerotium cepivorum*

LARA, A.<sup>1</sup>, MOLINERO, L.<sup>2</sup>, CORPAS, C.<sup>1</sup>, MELERO, J.M.<sup>2</sup>, PRADOS, A.M.<sup>3</sup> Y BASALLOTE, M.J.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> CIFA "Las Torres-Tomejil", DGIFAP, Apdo. 41200, Alcalá del Río (Sevilla).

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

<sup>3</sup> CIFA "Alameda del Obispo", DGIFAP, Apdo. 3092, 14080 Córdoba.

Para controlar la Podredumbre Blanca de *Allium* spp. ocasionada por *Sclerotium cepivorum*, se recomienda la solarización de los suelos con un elevado nivel de infestación, mientras que la utilización del fungicida tebuconazol en tratamientos de semilla ha dado resultados satisfactorios en parcelas con baja densidad de inóculo. Recientemente se ha descrito la existencia de grupos de compatibilidad micelial en *S. cepivorum*, pero se desconoce si la variabilidad genética en el patógeno puede traducirse en un cambio en la efectividad de las medidas de control.

Para determinar el grado de sensibilidad a tebuconazol de 20 aislados de *S. cepivorum*, de distinta procedencia geográfica, se llevaron a cabo dos experimentos *in vitro*. Se utilizó el método de siembra en medio de cultivo (PDA), al que se añadió previamente el fungicida. Se evaluaron diez concentraciones diferentes de tebuconazol (0 - 5 ppm). Por cada combinación aislado/dosis de tebuconazol se dispusieron cinco repeticiones (placas) en un diseño completamente al azar. Los distintos tratamientos se compararon en base al porcentaje de inhibición. La DE 90 varió entre 0.05 y 0.66 ppm, según el aislado considerado.

En dos ciclos de cultivo de ajo se estudió la efectividad de tebuconazol frente a cuatro poblaciones de *S. cepivorum* seleccionadas *in vitro*. Los experimentos se realizaron según un diseño de parcelas divididas, constituyendo el aislado del patógeno la parcela principal y la dosis de tebuconazol utilizada la subparcela. Las parcelas principales se infestaron artificialmente con esclerocios del aislado correspondiente incrementado en dientes de ajo. Independientemente del aislado utilizado, la mayor incidencia de plantas muertas se obtuvo en los testigos no tratados y disminuyó progresivamente al incrementarse la dosis de tebuconazol. Los rendimientos fueron significativamente mayores cuando se aplicaron las máximas dosis de tebuconazol.

P-171

## BIOCONTROL DE HONGOS XILÓFAGOS Y CROMÓGENOS. UNA APROXIMACIÓN

TROYA, M.T., LLINARES, F., RUBIO, F., RUBIO, V. Y VILLARREAL, M.

CIFOR-INIA, Apdo. 8111, 28080 Madrid

Universidad San Pablo CEU, Apdo. 67, Boadilla del Monte (Madrid)

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

Los importantes daños causados en la industria de la madera por hongos xilófagos y cromógenos, y la creciente presión internacional sobre la utilización de productos biocidas con principios activos tóxicos para el ser humano y el medioambiente, hacen necesaria, tanto la búsqueda de productos químicos alternativos para proteger la madera, como la posibilidad de utilizar organismos como controladores biológicos. Esta última posibilidad podría constituir una buena alternativa a los biocidas clásicos, por sus ventajas económicas y ecológicas.

La utilización de biocontroladores en los sistemas agrícolas está siendo evaluada desde hace algunos años, pero existe un total desconocimiento sobre la utilización de los mismos en los sistemas forestales. Por ello, el objetivo de este trabajo ha sido valorar mediante la realización de estudios preliminares, la eficacia de estos en la industria forestal.

En los ensayos se han utilizado como biocontroladores un *Ophiostoma piliferum* albino (Cartapip™), y un aislado español albino (*Ophiostoma* sp.) de pino larricio, que se han enfrentado a los hongos de pudrición *Postia placenta*, *Coniophora puteana* y *Gloeophyllum trabeum*, y a los hongos cromógenos *Pullularia pullulans*, *Sclerophoma pityophila* y diferentes aislados españoles de *Ophiostoma* spp.

El problema se ha enfocado, por un lado, pretratando madera con los biocontroladores, para posteriormente situarlas en cultivos puros de los hongos mencionados, y por otro, inoculando probetas de madera con el biocontrolador y el causante del daño a ambos lados de la madera, con el fin de observar la competencia poblacional que puede llegar a establecerse.

Los resultados obtenidos con el primero de los ensayos han mostrado una capacidad de control de las cepas albinas frente a los hongos causantes del azulado, y parcialmente frente a los de pudrición. Mientras que con el segundo ensayo, muestra una capacidad inhibitoria frente a la mayoría de ellos. Estos resultados preliminares indican que la utilización de este tipo de hongos podría constituir una alternativa a los tratamientos químicos clásicos para la protección de la madera.

## EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTAGONISTA DE LA MICROBIOTA OBTENIDA DEL COMPOSTADO DE ORUJO DE VID

DIÁNEZ, F., SANTOS, M.<sup>1</sup>, VILLAESCUSA, J.<sup>1</sup>, CASTILLO, P.<sup>1</sup>, CHEBÂANI, M.<sup>1</sup>, YÉLAMOS, J.<sup>1</sup>, BLANCO, R.<sup>1</sup>, SINOBAS, A. J.<sup>2</sup> Y TELLO, J.C.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Área de Producción Vegetal. Dpto. de Producción Vegetal. Universidad de Almería. Edificio CITE II-B. Cañada San Urbano s/n. 04120 Almería.

<sup>2</sup>Dpto. de Producción Vegetal: Botánica y Protección Vegetal. Universidad Politécnica de Madrid. Ciudad Universitaria, s/n. 28040 Madrid.

La microbiota de compost juega el mayor papel en la supresión de fitopatógenos y en ocasiones, la supresividad de algunos sustratos es dependiente del patógeno y del huésped. Por ello, es necesario, evaluar la aparición de este fenómeno utilizando diferentes patosistemas, y en su caso, la naturaleza de la supresividad, tales como antibiosis, competición, hiperparasitismo o resistencia sistémica inducida en la planta huésped.

La supresividad natural o inducida de residuos compostados de orujo de vid ha sido analizada frente a *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* raza 0 y 1, *F. o. f. sp. radidis-lycopersici*, *Verticillium dahliae*, *V. fungicola* y *Rhizoctonia solani*. Para ello, en primer lugar se ha caracterizado y cuantificado la microbiota bacteriana (bacterias y actinomicetos) presente en el compost y se ha realizado una evaluación de la capacidad antagonista del material frente a dichos patógenos. Como resultado se ha obtenido una gran diversidad bacteriana muchas de las cuales han resultado ser supresoras para los hongos ensayados. Dicha supresión puede ser tanto específica como generalizada para diversos géneros fúngicos. Así, hemos encontrado varios actinomicetos que inhiben el crecimiento únicamente de *Rhizoctonia solani*, e incluso bacterias cuya actividad supresora es diferente para las dos razas de *Fusarium* utilizadas en el presente trabajo. Otras, sin embargo, han inhibido el crecimiento fúngico de todos los géneros ensayados. La reducción del crecimiento fúngico debida a actinomicetos no superó el 30%. El estudio de la evaluación supresora de las bacterias y actinomicetos frente a los hongos fitopatógenos ha mostrado dos mecanismos principales de supresión, la producción de antibióticos y la competición por nutrientes entre el patógeno y el microorganismo supresor.

Desde el punto de vista medioambiental y de la sostenibilidad de los sistemas agrarios, el uso de sustratos a base de compost reduciría en gran medida el uso químicos que comporta en la mayoría de los casos contaminación de suelos y de aguas, siendo además tóxico para el hombre y otros organismos. Por ello, frente a esta problemática, resulta fundamental el encontrar vías alternativas no contaminantes y que no disminuyan la productividad de los cultivos.



P-173

## EFFECTO DE LOS HONGOS ECTOMICORRÍCICOS *A. ovoidea* Y *L. deliciosus* Y LOS SAPRÓFITOS *T. viride* Y *C. cladosporoides* SOBRE EL CRECIMIENTO “IN VITRO” Y GERMINACIÓN DE LAS ESPORAS DE *F. oxysporum*

IBEAS, F., PAJARES, J.A., MARTÍN, P., MARTÍNEZ, A., FERNÁNDEZ, M. Y DIEZ, J.J.

Universidad de Valladolid. Unidad de Entomología y Patología Forestales. Departamento de Producción Vegetal y Silvopascicultura. Escuela Técnica Superior de Ingenierías Agrarias (E.T.S.II.AA.). Av/ de Madrid 57. 34071. Palencia.

*Fusarium oxysporum* Schlecht es uno de los principales hongos causantes de la enfermedad conocida como “Damping-off”, que afecta a un amplio número de especies tanto agrícolas como forestales especialmente en viveros, destacando dentro de estas últimas el género *Pinus*.

En este trabajo se ha estudiado el efecto antagonista que ejercen los hongos micorrícicos *Lactarius deliciosus* y *Amanita ovoidea*, y los hongos saprófitos *Trichoderma viride* y *Cladosporium cladosporoides* sobre el crecimiento “in vitro” de 6 aislamientos distintos de *Fusarium oxysporum*, obtenidos de plántulas de 1 y 2 savias, de diferentes especies de pinos. Igualmente, se ha evaluado el efecto inhibitor que poseen los filtrados de estos hongos, sobre la germinación de las esporas de los distintos aislamientos de *F. oxysporum*.

El antagonismo “in vitro” entre los aislamientos de *F. oxysporum* y los hongos micorrícicos y saprófitos, se observó confrontando en una placa petri cada aislamiento del patógeno con cada uno de los hongos antagonistas. Para evaluar el efecto inhibitor de los filtrados de estos hongos sobre la germinación de las esporas de *F. oxysporum*, se cultivaron disoluciones de esporas de cada uno de los aislamientos con los filtrados de cada hongo antagonista, y se registró el número de esporas germinadas a las 6, 12 y 24 horas del inicio del ensayo.

Los hongos micorrícicos *L. deliciosus* y *A. ovoidea* no ejercieron antagonismo “in vitro” sobre el crecimiento de las colonias de *F. oxysporum*. De los dos hongos saprófitos empleados, sólo *T. viride* ejerció antagonismo por competición. Los filtrados de todos los hongos ensayados inhibieron significativamente, la germinación de las esporas de *F. oxysporum*, especialmente los filtrados de *Lactarius deliciosus*.

Este trabajo ha sido financiado por el Ministerio de Ciencia y Tecnología, y Fondos Europeos de Desarrollo Regional (FEDER) dentro del Programa del Plan Nacional de Investigación Científica, Desarrollo e Innovación Tecnológica 2000-2003 (Proyecto AGL2001-1771)

## CONTROL BIOLÓGICO DEL AHOGAMIENTO DE PLÁNTULAS DE PEPINO CAUSADO POR *Pythium aphanidermatum* MEDIANTE EL USO DE HONGOS (*Penicillium funiculosum*, *Paecilomyces marquandii*)

GALLEGO, E., MARÍN, A. Y SÁNCHEZ, J.

Dpto. Biología Vegetal y Ecología. Universidad de Almería.

Ctra. Sacramento, s/n. E-04120 La Cañada de S. Urbano. Almería. Spain. [telf. 34 950015017; fax: 34 950015069; e-mail: [egallego@ual.es](mailto:egallego@ual.es)]

El ahogamiento ("damping-off") de plántulas causado por *Pythium* provoca la muerte de las plantitas de semillero. En este sentido, *P. aphanidermatum* resulta la especie fitopatógena más importante en los invernaderos de Almería.

En la actualidad, el control químico de esta enfermedad es habitual en los semilleros hortícolas almerienses, con los consiguientes problemas ambientales.

Los hongos que se utilizan como biocontroladores de fitopatógenos comprenden un reducido número de especies. El presente trabajo busca conocer la actividad antagonista de otras especies de hongos, y de hongos aislados en la región, que por lo tanto, no plantearán los problemas de alteraciones ecológicas de los suelos que podría conllevar la introducción de microorganismos exóticos.

En el presente trabajo, dos aislados fúngicos de suelos almerienses, uno de *Penicillium funiculosum* y otro de *Paecilomyces marquandii* se han probado *in vivo* como agentes biocontroladores de *Pythium aphanidermatum*. Estos aislados se habían probado su antagonismo *in vitro* con anterioridad.

El ensayo se realizó en los laboratorios del departamento, a una temperatura de 20-25°C, en macetas con sustrato de vermiculita y sembradas con semillas de pepino var. *Ashley*. El hongo se aplicó con una semana de antelación al patógeno, que se inoculó durante la siembra. En ambos casos, se utilizó como inóculo el batido en agua de colonias desarrolladas en PDA. Durante todo el ensayo se mantuvieron las máximas condiciones de asepsia, para ello, las macetas se cubrieron con una lámina de plástico transparente.

Se calcularon los porcentajes de nascencia y supervivencia a diferentes dosis de los antagonistas y se estimaron las dosis efectivas (DE) para conseguir un 50% y 90% de protección (calculado como  $100 \cdot (PA-TP)/(T-TP)$ ), para poder comparar la supervivencia a las diferentes dosis empleadas.

Como resultados, *Penicillium funiculosum* tuvo una  $DE_{50} = 1,14 \cdot 10^{10}$  ufc/ml de sustrato y una  $DE_{90} = 1,27 \cdot 10^{18}$  ufc/ml de sustrato, y *Paecilomyces marquandii* tuvo  $DE_{50} = 1,08 \cdot 10^9$  ufc/ml de sustrato y  $DE_{90} = 1,81 \cdot 10^{16}$  ufc/ml de sustrato.

En resumen, *Paecilomyces marquandii* ha tenido mejores resultados que *Penicillium funiculosum*, aunque ambos han resultado antagonistas a dosis elevadas.

P-175

## EVALUACIÓN DE LA SOLARIZACIÓN, BIOFUMIGACIÓN Y METAM-SODIO EN EL CULTIVO DEL TOMATE

DÍAZ HERNÁNDEZ, S., RODRÍGUEZ PÉREZ, A., DOMÍNGUEZ CORREA, P. Y GALLO LLOBET, L.

Dpto. Protección Vegetal. Instituto Canario de Investigaciones Agrarias (I.C.I.A.),

Apdo. 60, 38200 La Laguna, Tenerife, Islas Canarias.

La solarización es un proceso hidrotérmico en el que se utiliza la radiación solar como fuente de energía para aumentar la temperatura del suelo humedecido y acolchado con plástico transparente hasta niveles letales para los patógenos de suelo. La biofumigación emplea como agente de control los gases generados en la descomposición de materia orgánica, y puede incrementar el efecto de la solarización cuando se combinan.

Ambas técnicas se han utilizado como alternativas al sistema convencional de desinfección de suelo. El ensayo se llevó a cabo en un invernadero de malla infestado de forma natural con *Pyrenochaeta lycopersici* en el que se compararon 4 tratamientos: solarización, solarización combinada con biofumigación, metam-sodio y control. La solarización se aplicó entre julio y septiembre (7 semanas), registrándose la temperatura de forma continua con un "data logger". Se evaluó la incidencia de raíces corchosas, el crecimiento de las plantas, la producción y el efecto de los tratamientos sobre la población microbiana del suelo. *P. lycopersici* fue aislado de raíces sintomáticas e identificado tras la inducción de picnidios.

El tratamiento de biofumigación registró la temperatura de suelo más alta, con 44° y 37° C a 10 y 30 cm de profundidad, respectivamente. Las diferencias entre tratamientos fueron estadísticamente significativas ( $p=0,05$ ) sólo en el parámetro producción, no obstante las plantas de parcelas solarizadas y solarizadas-biofumigadas tuvieron menor incidencia de raíces corchosas. La mayor producción se alcanzó en el tratamiento solarización, con un incremento de 0,9 kg/planta respecto al control.

La población microbiana del suelo se estimó mediante la técnica de dilución en placa en medio selectivo, y la actividad biológica utilizando diacetato de fluoresceína (DAF). La solarización y solarización+biofumigación produjeron efectos similares al metam-sodio en las poblaciones microbianas. Todos los tratamientos redujeron la población de hongos, bacterias y actinomicetos, con valores que se situaron en torno al 50% de las poblaciones control.

## COMPORTAMIENTO DE FORMULADOS COMERCIALES DE BIOCONTROL FRENTE A *Phytophthora cinnamomi* RANDS

GONZÁLEZ GONZÁLEZ, S., DOMÍNGUEZ CORREA, P., RODRÍGUEZ PÉREZ, A. Y GALLO LLOBET, L.

Dpto. Protección Vegetal. Instituto Canario de Investigaciones Agrarias (I.C.I.A.),

Apdo. 60, 38200 La Laguna, Tenerife, Islas Canarias.

La podredumbre radicular producida por *Phytophthora cinnamomi* es una limitación para el cultivo del aguacate en Canarias y en todas las áreas productoras. El control de la enfermedad mediante métodos químicos tradicionales se ha revelado hasta el momento poco eficaz. Este hecho, junto con el creciente interés por la protección del medio ambiente ha llevado al desarrollo de métodos alternativos de control biológico. En este trabajo se estudia *in vitro* e *in vivo* el efecto sobre *P. cinnamomi* de productos comerciales de control biológico recomendados para *Phytophthora* y para géneros afines como *Pythium*.

Los productos de biocontrol utilizados fueron Companion® (*Bacillus subtilis*, *B. megaterium*, *B. licheniformis*), Intercept® (*Pseudomonas cepacia*), Supresivit® (*Trichoderma harzianum*) y Trieco® (*Trichoderma viridae*), que se ensayaron *in vitro* sobre 30 cepas de *P. cinnamomi* aisladas en su mayoría de aguacate. Todos los productos, excepto *Trichoderma viridae* (Trieco®), redujeron significativamente el crecimiento de *P. cinnamomi* entre un 40 y un 50% en enfrentamientos en placa. *Pseudomonas cepacia* (Intercept®) produjo sustancias volátiles con efecto inhibitorio sobre *P. cinnamomi*. Companion® (*Bacillus* spp.) liberó al medio sustancias de carácter antibiótico solubles en acetato de etilo.

Se probaron *in vivo* sobre plántulas de aguacate los tres productos que mostraron resultados positivos en los ensayos *in vitro* (Companion®, Intercept®, Supresivit®) así como el producto comercial Binab® (*Trichoderma harzianum* y *T. polysporum*), cuyo efecto *in vitro* sobre *P. cinnamomi* ya había sido puesto de manifiesto en trabajos anteriores. Los microorganismos se aplicaron directamente en las raíces, sumergiéndolas en una suspensión del producto a la dosis recomendada. El ensayo se realizó en condiciones controladas, en sustrato inoculado artificialmente con el patógeno. Los resultados obtenidos indican que en nuestras condiciones ningún producto fue eficaz en el control de la enfermedad, no obstante Companion® (*Bacillus* spp.) redujo significativamente ( $p=0,05$ ) la población del patógeno en la rizosfera.

## TÉCNICAS DE FORMULACIÓN DE *Penicillium frequentans* Y SU APLICACIÓN AL CONTROL BIOLÓGICO DE *Monilinia laxa* EN MELOCOTONERO

GUIJARRO, B., LARENA, I., DE CAL, A. Y MELGAREJO, P.

Dpto. de Patología Vegetal. Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentarias. INIA. Carretera de la Coruña Km 7, Madrid, 28040.

Una de las enfermedades que más afectan al melocotonero son las inducidas por el hongo *Monilinia laxa*, causante de la podredumbre parda y momificación de la fruta y del marchitamiento de flores y brotes. Es necesario emplear estrategias de control que reduzcan la presión selectiva ejercida por los productos químicos, como el control biológico con antagonistas. *Penicillium frequentans* es un hongo de la micoflora epífita de los brotes de melocotonero. Tras el estudio de su eficacia como agente de biocontrol contra la podredumbre parda, se procedió a su producción en masa mediante fermentación en sustrato sólido, obteniéndose un rendimiento de 10<sup>9</sup> conidias /g peso seco, con una viabilidad del 85%. Su acondicionamiento como formulado seco se ha conseguido mediante deshidratación de las conidias por lecho fluido, manteniendo éstas, una vez secas, su viabilidad inicial durante 90 días.

Se están desarrollando formulados con aditivos y diluyentes para mejorar la viabilidad y eficacia de las conidias secas de *P. frequentans*. Para la selección de las sustancias y dosis se ha tenido en cuenta su falta de toxicidad a *P. frequentans* y sus características específicas como estabilizantes, adherentes, dispersantes, humectantes y protectores osmóticos. Estos compuestos se añaden en diferentes etapas del proceso de formulación (fermentación antes del secado) para determinar el momento óptimo de su incorporación. Se han seleccionado Tween 20 (1%) y tween 80 (1%) como agentes dispersantes. Gelatina (2%) y carboximetil celulosa (2%) mejoran la adherencia de las conidias secas de *P. frequentans*. La glicerina (10%) mejora la viabilidad actuando como protector osmótico durante el secado y usando talco (10%) como diluyente.

Se están realizando en la presente campaña tratamientos en campo (floración y precosecha), en dos huertos de melocotón y nectarina (Alfarrás en Lérida y Vinebre en Tarragona) con dos formulados de conidias secas de *P. frequentans* (10<sup>7</sup> conidias/ml) a los que se han incorporado un grupo de aditivos seleccionados previamente en nuestro laboratorio.

## CONTROL ORGÁNICO DE *Leveillula taurica* (Lév.) Arn. EN CULTIVO DE TOMATE

HERNÁNDEZ, J.M.<sup>1</sup>, ALCOVERRO, T.<sup>1</sup> Y SABADELL, S.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>ICIA. Dpto. de Protección Vegetal. Apdo. 60. La Laguna. Tenerife.

<sup>2</sup>Becaria Predoctoral INIA. Dpto. Protección Vegetal. Apdo. 60. La Laguna. Tenerife.

En las últimas campañas, el virus de la cuchara (TYLCV) ha causado grandes pérdidas económicas en el cultivo del tomate en Canarias. El uso de variedades tolerantes y la modificación de algunas de las práctica agrícolas, está permitiendo, por el momento, un control satisfactorio de la enfermedad. Observaciones preliminares sugerían que la variedad 'Boludo', tolerante y de interés por algunas de sus características, parecía sin embargo, muy susceptible a *L. taurica*, otro patógeno común del cultivo.

Con el objetivo de valorar la eficacia de algunos productos autorizados en agricultura orgánica se planeó un ensayo en el que se probaron bajo condiciones de invernadero de malla los siguientes: Azufre en polvo; Propóleo; mezcla de Sil-ka-ben, azufre en polvo y Bentonita; control no tratado. El ensayo se dispuso según un diseño totalmente aleatorio de 4 tratamientos, 4 repeticiones por tratamiento y 3 plantas por tratamiento y repetición aplicándose los productos semanalmente. Las variables estudiadas fueron el número total de manchas por planta en observaciones mensuales y las variables de producción.

Para los tratamientos Propóleo, Mezcla y Control no tratado se han obtenido diferencias significativas en el número de manchas de las sucesivas observaciones y a partir de la tercera (Marzo) entre tratamientos y en la interacción observación por tratamiento, siendo los valores mas altos los del control no tratado. En la última observación (Mayo) se apreciaron diferencias significativas entre los cuatro tratamientos, siendo los valores más bajos los del Propóleo. Para la producción total no se observaron diferencias significativas entre tratamientos, sino diferencias en las producciones mensuales. El incremento del número de manchas coincide con temperatura media de 27 C y HR del 70%. Estos resultados indican que sólo en condiciones extremadamente favorables para la enfermedad *L. taurica* podría producir mermas en la producción. No obstante, como medida preventiva se recomienda seguir usando los tratamientos.

P-179

## EFECTO PROTECTOR DE *Glomus mosseae* SOBRE PLATANERA MICROPROPAGADA AFECTADA POR EL “MAL DE PANAMÁ” (FOC)

JAIZME-VEGA, M.C., RODRÍGUEZ ROMERO, A.S. Y HERNÁNDEZ HERNÁNDEZ, J.

INSTITUTO CANARIO DE INVESTIGACIONES AGRARIAS (ICIA)

DPTO. PROTECCIÓN VEGETAL

APDO. 60 38270. LA LAGUNA, TENERIFE, ESPAÑA.

E-MAIL: [MCJAIZME@ICIA.ES](mailto:MCJAIZME@ICIA.ES)

El mal de Panamá es la enfermedad de mayor importancia económica de la platanera en Canarias. Las variedades cultivadas en las Islas (subgrupo Cavendish), son susceptibles al agente causal del mal, *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* (FOC), de ahí la gran incidencia de esta patología en el archipiélago.

El uso de hongos formadores de micorrizas arbusculares (MA), en las fases iniciales de los cultivos proporciona un incremento en la tolerancia frente al ataque de patógenos de suelo.

En el presente trabajo se propone estudiar la interacción de ambos hongos en platanera micropropagada bajo condiciones de invernadero. Las plantas previamente micorrizadas con *Glomus mosseae* durante la fase de aclimatización fueron inoculadas con el patógeno con una dosis de  $10^6$  CFU/mL de suelo.

Los resultados mostraron la existencia de diferencias significativas en la expresión y severidad de los síntomas externos de la enfermedad a favor de las plantas micorrizadas.

## COMPORTAMIENTO DE PATRONES DE PIMIENTO FRENTE A PATÓGENOS DEL SUELO EN INVERNADEROS DEL SURESTE

ROS, C.<sup>1</sup>, GUERRERO, M.M.<sup>2</sup>, LACASA, A.<sup>2</sup>, GUIRAO, P.<sup>1</sup>, MARTÍNEZ, M.A.<sup>2</sup>, MARTÍNEZ, M.C.<sup>2</sup>, BARCELÓ, N.<sup>2</sup>, ONCINA, M.<sup>2</sup>, BELTRÁN, C.<sup>2</sup> Y BIELZA, P.<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Programa Colaboración FECOAM-Consejería de Agricultura, Agua y Medio Ambiente, c/ Caballero, 13, 30.003 Murcia,

<sup>2</sup>Centro de Investigación y Desarrollo Agroalimentario. Consejería de Agricultura, Agua y Medio Ambiente. C/ Mayor s/n, 30150 La Alberca (Murcia),

<sup>3</sup>Producción Agraria, ETSIA, Universidad Politécnica de Cartagena. Paseo Alfonso XIII, s/n. 30.203 Cartagena (Murcia).

Las variedades comerciales de pimiento con resistencia a patógenos del suelo (*Phytophthora capsici* y *Meloidogyne incognita*) no satisfacen las exigencias comerciales de las producciones de los invernaderos del Sureste. Dado que a finales del año 2004 está prevista la eliminación del bromuro de metilo (BM) para la desinfección de suelos en los países miembros de la Unión Europea, y que las más de 1.800 ha de invernaderos de Murcia y del Sur de Alicante destinados al cultivo de pimiento se vienen desinfectando todos los años con BM, se ha estudiado la posibilidad de utilizar el injerto como una alternativa. En invernaderos comerciales y experimentales contaminados de *P. capsici* y/o *M. incognita* se ha evaluado el comportamiento de unos 75 patrones frente a los patógenos y su capacidad productiva, en comparación a BM y a testigos sin desinfectar y sin injertar. Más del 70% de los patrones ensayados presentaron aceptables porcentajes de plantas afectadas por *P. capsici* (< 3%), resultando un buen número de ellos totalmente indemnes, o con niveles de afección similares al BM. Poco más del 30% de los patrones presentaron índices medios de nodulación por *M. incognita* similares a los de BM, siendo más reducido el número de los que presentaron similares niveles de infestación que el BM. La producción comercial de más del 30% de los patrones (8'3 kg/m<sup>2</sup> del híbrido C-58; 8'0 kg/m<sup>2</sup> del C-57, 8'2 kg/m<sup>2</sup> del C-30) fue similar a la del BM (8'9 kg/m<sup>2</sup>). Al reiterar el cultivo del mismo patrón durante tres años consecutivos en el mismo suelo sin desinfectar, no varió el comportamiento frente a *P. capsici* de la mayor parte de los patrones. Sin embargo, se asistió a un aumento de agresividad de las poblaciones de *M. incognita*, lo que se tradujo en mayores índices medios de nodulación y en mayor porcentaje de plantas colonizadas por el nematodo (por ejemplo, para el híbrido C-30 el primer año el % de plantas infestadas fue del 0'1% y el índice de nodulación de 0'1, siendo del 73'3% y del 4'1 el índice de nodulación el segundo año). La reiteración del cultivo de plantas injertadas en el mismo suelo también se traduce en una pérdida progresiva de producción por efecto de la fatiga del suelo.



P-181

## MICROBIOTA ANTAGONISTA (HONGOS, BACTERIAS, ACTINOMICETOS Y LEVADURAS) EN EL COMPOSTADO DE RESIDUOS DE OLIVO (ALPERUJO)

CHEBÂANI, M.<sup>1</sup>, CASTILLO, P. <sup>1</sup>, YÉLAMOS, J. <sup>1</sup>, DIÁNEZ, F. <sup>1</sup>, SANTOS, M. <sup>1</sup>, VILLAESCUSA, J.<sup>1</sup>, BLANCO, R. <sup>1</sup>, TRILLAS, I. <sup>2</sup>, AVILÉS, M. <sup>3</sup>, Y TELLO, J.C<sup>1</sup>.

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

<sup>2</sup>Dpto. Biología Vegetal, Facultad de Biología, Universidad de Barcelona. Av. Diagonal 645, 08028 Barcelona. <sup>3</sup>Dpto. Ciencias Agroforestales. Universidad de Sevilla. 41013 Ctra. Utrera. Sevilla.

El cultivo del olivar y la industria de obtención del aceite de oliva tienen una importancia económica y social considerable en los países de la cuenca mediterránea. Sin embargo, estas actividades generan grandes cantidades de subproductos y/o residuos cuya eliminación constituye uno de los mayores problemas medioambientales en estas áreas. Uno de los procedimientos de reutilización de estos residuos es el compostaje. Este último permite la transformación de estos desechos en un material de interés agrícola como abono, enmienda o sustrato con probable actividad fungicida según el tipo de supresividad de éste.

La supresividad de un suelo o sustrato, es denominada «específica» o «general», según se manifieste contra uno o a varios patógenos, respectivamente. La supresividad general está directamente relacionada con la actividad biológica total en el medio en momentos críticos de la patogénesis, particularmente durante la germinación en la rizosfera del huésped. En cambio, la supresividad específica está asociada a la actividad de determinados grupos o especies de microorganismos antagonistas respecto al fitopatógeno en cuestión.

De hecho, y en este contexto hemos emprendido varios trabajos de investigación cuyos objetivos son los siguientes: caracterizar la microbiota total del compost de alperujo (es un compostado de alperujo con cáscara de arroz ya que no tendría utilidad de otra manera como sustrato agrícola), bacterias y actinomicetos tanto termófilos como mesófilos, hongos y levaduras y determinar el poder antagonista de dicha microbiota frente a hongos fitopatógenos edáficos (*Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* razas 0 y 1, *F. oxysporum* f.sp. *radicis-lycopersici*, *Verticillium fungicola*, *V. dahliae* y *Rhizoctonia solani*).

De los resultados obtenidos a partir de la realización de varios ensayos, se destaca que los hongos *Penicillium*, *Aspergillus* y *Trichoderma* tienen un poder antagonista frente a todos los hongos fitopatógenos ensayados. Las levaduras obtenidas han demostrado ser supresoras de la actividad fúngica en todos los casos salvo con *R. solani*. En el caso de las bacterias encontramos aislados que presentan antagonismo específico y una bacteria termófila perteneciente a *Xanthomonas* que presenta antagonismo general. Los actinomicetos presentan un antagonismo específico frente a los fitopatógenos ensayados en este

trabajo.

P-182

## PRODUCCIÓN Y FORMULACIÓN DE *Epicoccum nigrum* PARA EL CONTROL DEL MOMIFICADO DE FRUTALES DE HUESO

LARENA, I., DE CAL, A. Y MELGAREJO, P.

*Departamento de Protección Vegetal. SGIT-INIA. Carretera de La Coruña Km 7. 28040 Madrid.*

*Epicoccum nigrum* Link aislado 282 es un hongo componente de la micoflora residente de flores y brotes de melocotonero en España cuyas conidias reducen el momificado de los frutales de hueso causado por *Monilinia laxa* (Aderh. et Ruhl.).

Este agente de biocontrol fue producido en fermentación sólida, en una mezcla de turba: vermiculita: harina de lenteja (1:1:0,5; p:p:p) con un grado de humedad inicial del 40% e incubado durante 10 días en cámara de cultivo a 22 °C con 16 h de alternancia de luz (125 mEm<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup>) y un 80% de humedad. En estas condiciones se obtiene una producción de 10<sup>8</sup> conidias por gramo de peso seco de sustrato, con una viabilidad superior al 90%, la cual se mantiene durante un período de 150 días a T<sup>a</sup> ambiente. Se ha comprobado la eficacia de estas conidias producidas en fermentación sólida frente al control de momificado de frutales de hueso. Las conidias se han acondicionado para una formulación seca mediante lecho fluido.

Para mejorar la estabilidad y supervivencia del formulado se determinaron las concentraciones no tóxicas de diferentes aditivos y desecantes frente al hongo antagonista y al patógeno. Los aditivos empleados fueron humectantes (glicerina, PEG 8000 y PEG 300), adherentes (glicerina, metil-celulosa y alginato sódico), mojantes (glicerina, Tween 80, Tween 20 y alginato sódico), estabilizantes (glicerina, Tween 80, Tween 20, PEG 8000, PEG 300, metil-celulosa, glutamato sódico y cloruro potásico) y protectores osmóticos (glicerina y glutamato sódico). Los desecantes empleados fueron gel de sílice, caolinita, sulfato cálcico, cloruro cálcico y talco.

Por otra parte, se ha estudiado el momento idóneo de aplicación de cada tipo de aditivo, bien en la fase de fermentación o bien en la etapa de secado de las conidias. La glicerina (25%), Tween 80 (10%), Tween 20 (10%), PEG 8000 (50%), PEG 300 (5%), metil-celulosa (2,5%) y cloruro potásico (1%) han sido seleccionados como estabilizantes para su aplicación en ambas fases del proceso.

Se ha seleccionado la metil-celulosa a un amplio rango de dosis (2,5% - 0,026%) como el aditivo que mejora la adherencia de las conidias de *E. nigrum*. Distintas mezclas de los aditivos seleccionados se están ensayando en 6 huertos de melocotoneros y nectarinos en Francia, Italia y España.

P-183

## INFLUENCIA DEL PH Y LA TEMPERATURA EN EL CRECIMIENTO DE *Epicoccum nigrum*

LIÑÁN, M. Y MELGAREJO, P.

Área de Patología Vegetal. Dpto. de Protección Vegetal. SGIT-INIA.

Ctra. de la Coruña, Km. 7,5; 28040 Madrid.

*Epicoccum nigrum* es un hongo perteneciente a la Subdivisión *Deuteromycotina*, Clase *Hyphomycete*, que crece de forma saprofítica, fundamentalmente sobre tejidos senescentes. Se encuentra muy extendido, llegándose a aislar tanto en el suelo como en las partes aéreas de gran número de plantas herbáceas y leñosas, y, dentro de éstas, en melocotonero.

*E. nigrum* está incluido en el proyecto europeo QLK-PL1999-1065: "Development of biocontrol agents for commercial application against post-harvest diseases of perishable foods" debido a que su potencial antagonista, tanto "in vitro" como "in vivo", ha sido estudiado y demostrado frente a diferentes patógenos en diferentes cultivos. En nuestro caso, el sistema sobre el que dicho antagonista va a ejercer su control es el formado por frutos de melocotonero y el patógeno *M. laxa*.

Actualmente, nos encontramos desarrollando métodos para la producción de *E. nigrum* como agente de biocontrol, tanto mediante fermentación sólida como líquida. Esta última nos permite un mejor control de las variables que pueden influir en el crecimiento del hongo, y esto supone una gran ventaja frente a la fermentación sólida, a pesar de que la producción de esporas obtenida en la fermentación sólida es significativamente mayor. Para mejorar estos métodos ha sido necesaria la realización de estudios previos sobre las mejores condiciones de crecimiento para dicho hongo. Para ello, hemos realizado, entre otros, estudios del crecimiento del hongo a diferentes temperaturas y pHs en placas de Agar-Patata-Dextrosa (PDA), para determinar cuales eran los rangos bajo los cuales el hongo se desarrolla mejor. En los estudios de temperatura, las placas inoculadas con el hongo se incubaron en estufas a diferentes temperaturas y se midieron los diámetros de crecimiento periódicamente para, posteriormente, determinar la esporulación en cada placa. Los resultados obtenidos han puesto de manifiesto que el rango de temperatura en el cual el hongo es capaz de crecer está entre los 4°C y los 30°C, presentando su crecimiento óptimo en el intervalo 20-25°C. En cuanto al pH, las placas de PDA inoculadas con el hongo se incubaron en estufa a 22°C a diferentes pHs, midiéndose sus diámetros periódicamente, así como la esporulación de cada placa. Los resultados reflejan el amplio rango de pHs en el cual puede crecer *E. nigrum*, (entre 4-11), presentando el mejor crecimiento entre los pHs 7 y 9. Los datos obtenidos serán, posteriormente, tenidos en cuenta a la hora de poner a punto el método de producción más adecuado para *E. nigrum*.

## AVANCES EN EL PROGRAMA DE SELECCIÓN DE PORTAINJERTOS DE AGUACATE TOLERANTES A LA PODREDUMBRE BLANCA CAUSADA POR *Rosellinia necatrix*

PÉREZ JIMÉNEZ, R.M.<sup>1</sup>, ZEA BONILLA, T.<sup>1</sup>, BARCELÓ MUÑOZ, A.<sup>1</sup> Y LÓPEZ HERRERA, C.J.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Centro de Investigación y Formación Agraria, Consejería de Agricultura y Pesca. Junta de Andalucía. Cortijo de la Cruz s/n, 29140, Churriana, Málaga.

<sup>2</sup>Instituto de Agricultura Sostenible, C.S.I.C., Apdo. 4084, 14080 Córdoba.

Las plantaciones de aguacate (*Persea americana* Mill.) que existen en la Península se encuentran principalmente localizadas en las provincias de Málaga y Granada. En esta zona productora, las enfermedades más importantes que afectan a este cultivo son la podredumbre radicular causada por *Phytophthora cinnamomi* Rands y la podredumbre blanca causada por *Rosellinia necatrix* Prill. Berl., con una incidencia actual de un 35% y un 39% respectivamente en fincas sintomáticas muestreadas. La selección de portainjertos de aguacate tolerantes a *P. cinnamomi*, como método de control, se viene desarrollando desde hace años en otros países cultivadores y actualmente se comercializan patrones tolerantes a este hongo de suelo. Sin embargo, la selección de material de aguacate tolerante a *R. necatrix* ha sido iniciada recientemente por nuestro equipo y aún se encuentra la fase inicial de búsqueda de material y evaluación del material seleccionado.

En concreto, este programa de selección se inició en el año 1998, utilizando principalmente como fuentes de material para este estudio; i) semillas de árboles locales aclimatados a la zona, ii) portainjertos seleccionados por la Universidad de California y Hans Merensky Holdings PTY. LTD de Sudáfrica como tolerantes a *P. cinnamomi* y iii) portainjertos procedentes de árboles seleccionados en campo como árboles escape, es decir, árboles que se presentan sanos en parcelas con un alto grado de infestación por *R. necatrix*.

Actualmente se han seleccionado 55 clones de material juvenil que han sobrevivido a una primera inoculación con *R. necatrix* y que, próximamente, tras el proceso de multiplicación (micropropagación), serán evaluados de forma definitiva. Por otro lado, las inoculaciones realizadas con 55 clones de portainjertos tolerantes a *P. cinnamomi*, han puesto de manifiesto que este material es muy susceptible a *R. necatrix* y por tanto no se puede utilizar como fuente de doble resistencia a ambos patógenos. En cuanto a la selección en campo de árboles escape, hasta el momento se han seleccionado 15 árboles, los cuales se han cortado por debajo del injerto para favorecer la brotación del portainjerto. De éstos, ocho se encuentran en fase de multiplicación (microinjertos) para su posterior evaluación.

P-185

## CONTROL BIOLÓGICO IN VITRO DE LA PODREDUMBRE BLANCA DE RAÍZ DEL AGUACATE POR *Trichoderma* sp

ZEA BONILLA, T.<sup>1</sup>, PÉREZ JIMÉNEZ, R.M.<sup>1</sup>, RUANO ROSA, D. <sup>2</sup>, LÓPEZ HERRERA, C.J. <sup>2</sup>

<sup>1</sup>Centro de Investigación y Formación Agraria. Cortijo de la Cruz s/n. 29140 Churriana. Málaga.

<sup>2</sup>Instituto de Agricultura Sostenible. C.S.I.C. Apdo.4084. 14080 Córdoba.

Se ha estudiado el control biológico de la Podredumbre blanca (PB) del aguacate (*Persea americana* Mill) causada por *R. necatrix* mediante diferentes aislados de *Trichoderma* sp. Se realizaron dos experimentos con plantas de aguacate obtenidas por cultivo de embriones *in vitro* a partir de semillas de cv. Topa Topa. Las plantas se inocularon previamente con nueve aislados diferentes de *Trichoderma* sp.(CH273, CH280, CH281, CH295, CH300, CH303, CH304, CH314 y CH316, seleccionados mediante cultivos duales en un experimento anterior) y posteriormente, diez días después, con un aislado muy virulento de *R. necatrix* (CH53), utilizándose diez repeticiones por tratamiento. Los inóculos tanto del antagonista como del patógeno se incorporaron al sustrato de las plantas en forma de trigo colonizado utilizando una sola dosis para el antagonista y dos dosis (alta y baja) para el patógeno en los experimentos 1º y 2º respectivamente. Las plantas inoculadas se incubaron, durante seis semanas, bajo condiciones de ambiente controlado. Durante el desarrollo de cada uno de los experimentos, se realizaron, lecturas semanales de síntomas aéreos y cuantificaciones quincenales de *Trichoderma* en suelo. A la finalización de cada uno de ellos, se cuantificó, en suelo la cantidad de *Rosellinia* , y en las plantas, el peso fresco de raíz, porcentaje de raíz necrosada y cantidad de *Trichoderma* en el rizoplaneo.

Como resultado del primer experimento se obtuvo que el tratamiento con el aislado de *Trichoderma* CH304 se diferenció significativamente del resto en cuanto al índice de severidad de síntomas de las plantas, retrasando la muerte de éstas. Se observó menor cantidad de *Rosellinia* en suelo, menor porcentaje de raíz necrosada, y las mayores cantidades de *Trichoderma* en el rizoplaneo para este aislado. Al final del segundo experimento, los tratamientos con las *Trichodermas*: CH303, CH314, CH304 y CH300 se diferenciaron significativamente en cuanto a su nivel de severidad de síntomas respecto al resto de los tratamientos ensayados y presentaron los niveles más bajos del porcentaje de raíz necrosada. Por tanto los aislados citados se presentan como posibles agentes de control biológico de la PB del aguacate especialmente el CH304 que en plantas inoculadas con una dosis más alta de inóculo parece ser el candidato más adecuado a testar en posteriores ensayos de control biológico en planta adulta de aguacate, bajo invernadero y en plantaciones establecidas.

## SELECCIÓN DE AISLADOS DE *Trichoderma* sp. MEDIANTE CULTIVOS DUALES EN BASE A SU ANTAGONISMO A *Rosellinia necatrix*

ZEA BONILLA, T.<sup>1</sup>, PÉREZ JIMÉNEZ, R.M.<sup>1</sup>, RUANO ROSA, D.<sup>2</sup> Y LÓPEZ HERRERA, C.J.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Centro de Investigación y Formación Agraria. Cortijo de la Cruz s/n. 29140 Churriana. Málaga.

<sup>2</sup>Instituto de Agricultura Sostenible. C.S.I.C. Apdo.4084. 14080 Córdoba.

Se ha realizado el estudio del antagonismo *in vitro*, de 50 aislados de *Trichoderma* sp., sobre un aislado muy virulento de *Rosellinia necatrix*. Aquellos se aislaron a partir de la rizosfera de distintos árboles de aguacate seleccionados como posibles árboles escape a la podredumbre blanca (PB) de este cultivo, causada por *R. necatrix* Prill. Berl.

El efecto antagonista se evaluó mediante cultivos duales de los aislados, enfrentados en placa Petri con PDA, incubados en oscuridad a 22-24 C y utilizando tres repeticiones por tratamiento. En dichos cultivos duales se determinaron las características culturales (esporulación de *Trichoderma* sobre *R. necatrix*; sobrecrecimiento de *R. necatrix*, aspecto de colonia del *R. necatrix*, formación de black line y antibiosis) y se obtuvo el porcentaje de inhibición del crecimiento radial del patógeno para cada aislado de antagonista ensayado, por medición de dos diámetros  $r_1$  y  $r_2$  de la colonia de *R. necatrix* y aplicando la formula de Royse and Ries ( $100 \times (r_1 - r_2) / r_1$ ).

En base a estos parámetros se han clasificado los aislados ensayados en cinco grupos con características culturales diferentes y se han seleccionado nueve aislados de *Trichoderma* sp., que se han utilizado en el experimento de control biológico de la PB (presentado en otro poster) en plantas de aguacate obtenidas *in vitro* e inoculadas artificialmente con el aislado virulento de *R. necatrix* utilizado en los cultivos duales.

P-187

## EFECTO EN EL TIEMPO DE LAS SUSPENSIONES DE FUNGICIDAS SOBRE LA CAPACIDAD GERMINATIVA DE LAS ARTROSPORAS DE *Geotrichum candidum*

MARIN, M. Y TUSET, J.J.

*Departamento de Protección Vegetal y Biotecnología. Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias. Ctra. Moncada-Náquera, Km 4.5. 46113 Moncada (Valencia)*

La “podredumbre ácida” en los frutos cítricos, producida por el hongo *G. candidum*, es una enfermedad en emergencia dentro de la producción citrícola debido al uso sistemático de los fungicidas bencimidazoles. La infección de los tejidos vegetales por parte de este hongo se produce generalmente por las artrosporas presentes en los medios líquidos, que en el caso de los almacenes citrícolas tienen lugar en el drencher y en la balsa. Los fungicidas recomendados actualmente para el control de esta enfermedad en los almacenes citrícolas son la guazatina y el ortofenilfenato sódico (OPPS). Debido a la actual tendencia de la producción citrícola en la eliminación de productos fungicidas no autorizados y en la reducción de la cantidad de residuos producidos de los autorizados, es necesario un mejor conocimiento de la acción de los fungicidas autorizados sobre este hongo y como puede variar ésta en el tiempo. Con el fin de conocer la toxicidad de los fungicidas guazatina y dodina sobre las artrosporas de cuatro aislados de *G. candidum*, tres procedentes de frutos cítricos y uno de patata, se obtuvo *in vitro* las concentraciones para ambos fungicidas en las cuales se produce una inhibición en la germinación de las artrosporas del 50% (CG<sub>50</sub>) y del 100% (CG<sub>100</sub>) cuando fueron expuestas durante un breve período de tiempo (minutos) a ambos fungicidas. Asimismo, en las inoculaciones de frutos cítricos por inmersión en las suspensiones de artrosporas en contacto (minutos) con las diferentes concentraciones de fungicida se contabilizó una reducción en el número de podridos. Para conocer cual podría ser el efecto de una larga exposición de las artrosporas de estos aislados de *G. candidum* a los dos fungicidas, los ensayos anteriores fueron repetidos con las artrosporas puestas en contacto con los fungicidas durante varias horas. Los resultados obtenidos en la experimentación, han indicado que las artrosporas de este hongo pierden su capacidad de germinar *in vitro* a concentraciones mayores que las que inhiben su crecimiento micelial. Del mismo modo, las artrosporas no fueron capaces de infectar los frutos después de estar en contacto durante un mínimo de una hora a concentraciones de ambos fungicidas más bajas de las empleadas en los almacenes citrícolas.

## PROTECCIÓN DE LA CEPA Vd48 DE *Verticillium dahliae* DURANTE EL PERIODO DE SUSCEPTIBILIDAD DE *Ulmus minor* A LA GRAFIOSIS

SOLLA, A., BURÓN, M., MARTÍN, J.A. Y GIL, L.

Unidad de Anatomía, Fisiología y Mejora Genética. ETSI de Montes. Universidad Politécnica de Madrid. Paseo de las Moreras s/n. 28040 Madrid.

La grafiosis, enfermedad originada por los hongos *Ophiostoma ulmi* y *O. novo-ulmi*, es responsable de la muerte de la mayoría de los olmos de Europa y Norteamérica. En la Península Ibérica, el período de susceptibilidad de *Ulmus minor* comienza a finales de abril y termina a finales de junio. Ensayos previos han mostrado que la cepa Vd48 de *Verticillium dahliae* induce resistencia en *Ulmus minor* frente a la grafiosis. Con el presente trabajo se ha pretendido comprobar la protección ofrecida por Vd-48 a lo largo del periodo de susceptibilidad.

En progenies de 6 y 12 años se realizaron tratamientos cruzados entre la cepa Vd48 (*V. dahliae*) y la cepa TO-MD (*O. novo-ulmi*). En 1998 se trataron con Vd48, por separado, olmos el 15 de abril y el 30 de abril. Un grupo de estos árboles se inoculó a los 15 días con TO-MD, otro grupo el 29 de mayo, y otro el 15 de junio (n=6 por grupo y edad). Los tratamientos e inoculaciones se realizaron inyectando, en el tronco de los árboles, esporas de los hongos suspendidas en agua destilada esterilizada (ADE) (0,2 ml / árbol;  $10^6$  esporas / ml). En cada fecha también se practicaron los tratamientos control Vd48 + ADE, ADE + TO-MD y ADE + ADE. En las proximidades del ensayo, en Puerta de Hierro (Madrid), se instaló una trampa de feromonas para conocer durante 1998 el vuelo de los escolítidos, vectores de la grafiosis.

A raíz del marchitamiento foliar registrado al final de la temporada, no se obtuvieron diferencias significativas entre las repuestas mostradas por las progenies según su edad. Vd48 no protegió a *U. minor* mediante los tratamientos del 15 de abril. Olmos tratados ese día mostraron, ante las inoculaciones con TO-MD del 29 de mayo, marchitamientos cercanos al 20 %, iguales significativamente a los registrados en árboles no tratados ( $P > 0,10$ ). Vd48 sí protegió a *U. minor* mediante los tratamientos del 30 de abril. Olmos tratados ese día mostraron, ante todas las inoculaciones posteriores, marchitamientos inferiores al 5 %, menores a los registrados en árboles sin tratar ( $P \leq 0,05$ ). La trampa de feromonas permitió capturar ejemplares de *Scolytus multistriatus* a partir del 22 de abril, luego existe un intervalo de riesgo durante el cual los olmos pueden ser infectados de modo natural antes de que se realicen los tratamientos que resultan efectivos.



## PÉRDIDA DE VIABILIDAD DEL INÓCULO DE TRES AISLADOS DE *Fusarium oxysporum* f.sp. *dianthi* INCUBADOS A DIFERENTES TEMPERATURAS

SUÁREZ BONNET, E.<sup>1</sup>, PRADOS LIGERO, A.<sup>2</sup> Y MELERO VARA, J.M.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Instituto de Agricultura Sostenible, C.S.I.C. Apdo. 4084, 14080 Córdoba,

<sup>2</sup> CIFA Córdoba, Apdo. 3092, 14080 Córdoba,

*Fusarium oxysporum* f.sp. *dianthi* (FOD), es un hongo patógeno de suelo, que infecta los cultivares de clavel (*Dianthus caryophyllus*), ocasionando graves pérdidas en los cultivos. Diferentes experimentos de campo han demostrado los efectos de la temperatura del suelo bajo plástico solo o en combinación con diversos fumigantes y la consiguiente reducción de la población del patógeno en suelo infestado por FOD.

Se seleccionaron tres aislados procedentes de suelo, A4, A3 y A7, que mostraron tener alta, media y baja virulencia frente a un conjunto de 10 cultivares de clavel. De estos, ocho eran susceptibles a A4, siete a A3 y cinco a A7. Se prepararon suspensiones de conidias de dichos aislados en agua estéril ( $0.7 \times 10^6$  /ml), y se añadieron al suelo (0.3 ml/tubo con 3 g de suelo), incubándose a continuación a 24°C durante 10 días. Tras cuantificar la densidad de inóculo (DI) inicial para cada aislado, se transfirieron éstos a baños termostáticos regulados a una temperatura constante, de donde se fueron extrayendo secuencialmente las muestras para el análisis cuantitativo del inóculo viable. Por referencia a las DI iniciales, se determinó el efecto de las diferentes temperaturas en la progresiva pérdida de viabilidad del patógeno.

En principio se realizaron dos experimentos, estudiando en ambos el efecto de la incubación del suelo infestado a 40°C y 42°C, empleando en cada muestra 10 repeticiones. Las DI se redujeron, para periodos de 204-240 h a 42°C, a niveles inferiores al 1.1% de la DI inicial, mostrándose los aislados A3 y A4 más sensibles que A7 a dicha temperatura. La incubación a 40°C durante 216-480 horas redujo la viabilidad de los aislados A4 y A7 a niveles inferiores al 1%, mientras que el aislado A3 redujo su viabilidad a 6.3 y 1.6% tras su incubación durante 216 y 480 h respectivamente. Se trata de relacionar esta información con la pérdida de viabilidad de inóculo en procesos de solarización del suelo.

## EFFECTOS DE FUMIGANTES QUÍMICOS ALTERNATIVOS AL BROMURO DE METILO EN LA SANIDAD DE LOS VIVEROS DE FRESA

DE CAL, A.<sup>1</sup>, SALTO, T.<sup>1</sup>, MARTÍNEZ-BERINGOLA, M.L.<sup>1</sup>, MARTÍNEZ-TRECEÑO, A.<sup>2</sup>, ARANDA, J.M.<sup>3</sup>, Y MELGAREJO, P.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> *Depto. Protección Vegetal, INIA, Ctra. De la Coruña km. 7, 28040 Madrid.*

<sup>2</sup> *Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, Madrid.*

<sup>3</sup> *CIFA Málaga, CAP Junta de Andalucía, Churriana, Málaga.*

España es el país más importante en Europa en producción de plantones de fresa siendo esencial la sanidad de los viveros de producción de estas plantas. La futura prohibición del bromuro de metilo en los países de la Unión Europea en el año 2005 ha estimulado la búsqueda de alternativas a este biocida del suelo. Dentro del proyecto de ámbito nacional INIA-SC97-130 "Alternativas al bromuro de metilo compatibles con el medio ambiente y viables económicamente" se han ensayado durante cinco campañas (desde 1998 a 2002) varios tratamientos químicos en diferentes viveros situados en las provincias de Ávila (Viveros California SAR) y Segovia (Viveros Rio Eresma SA). Los resultados muestran que es necesaria la fumigación del suelo para obtener una producción de planta de fresa sana: la incidencia de enfermedades en parcelas testigo era muy elevada en parcelas que no habían sido fumigadas en años anteriores, mientras que era nula o muy baja en parcelas fumigadas en años anteriores. Esto es importante porque el sistema de cultivos de viveros de fresa se basa en el arrendamiento de tierras cada año, algunas de las cuales pueden no haber sido fumigadas previamente. Los resultados también muestran que hay que tener un especial cuidado con las plantas madre procedentes de otros viveros, ya que algunas de ellas vienen infectadas con patógenos como *Phytophthora cactorum*, *Botrytis cinerea*. Los resultados muestran también claramente que hay otras alternativas químicas al bromuro de metilo en viveros de fresa como el dazomet y la mezcla de dicloropropano-dicloroproneno: cloropicrina (61:35). La aplicación de bromuro de metilo: cloropicrina (50:50) a dosis reducida (20 g /m<sup>2</sup>) bajo plástico VIF resulta también en un buen control de las principales enfermedades de la fresa en viveros, siendo este resultado importante con vistas a la posible obtención de este cultivo para uso crítico del bromuro de metilo en Europa.

P-191

## PERSISTENCIA EN POSTCOSECHA DEL EFECTO DEL TRATAMIENTO EN CAMPO CON *Trichoderma* spp. SOBRE EL CONTROL DE PATÓGENOS DE FRESA

PORRAS, M., BARRAU, C., DE LOS SANTOS, B., BLANCO, C. Y ROMERO, F.

CIFA "Las Torres-Tomejil". Consejería de Agricultura y Pesca de la Junta de Andalucía.

Aptdo. Correos Oficial 41200. Alcalá del Río (Sevilla).

e-mail: [cifatorr@cap.junta-andalucia.es](mailto:cifatorr@cap.junta-andalucia.es)

Se estudió la aparición en postcosecha de patógenos de fresas cultivadas en parcelas sometidas a tratamientos de suelo y planta con *Trichoderma* spp. (Tusal y Fertusal). De cada uno de ellos se tomaron 20 frutos asintomáticos, correspondientes a cuatro repeticiones, en el estadio previo a su madurez fisiológica completa.

Se almacenaron en cámara frigorífica a 4° C con una humedad relativa entre el 95-99 %. Los frutos se dispusieron aisladamente. Cada dos días, y hasta un total de 28, se identificaron los síntomas y agentes causales.

Aquellos frutos que procedían de parcelas tratadas con *Trichoderma* spp. tuvieron significativamente un mayor grado de protección frente a *Colletotrichum acutatum* y *Sphaerotheca macularis* con respecto a los que procedían de parcelas testigos. Resultando el tratamiento más eficaz la inmersión de las plantas en la suspensión de Tusal previa a su plantación en parcelas no solarizadas. Mientras que la aplicación de cepas de *Trichoderma* en suelo solarizado no fue significativa.

## INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA EN LA ACTIVIDAD BIOFUNGICIDA DE *Trichoderma spp.* FRENTE A *Botrytis cinerea*

PORRAS, M., BARRAU, C., DE LOS SANTOS, B., BLANCO, C. Y ROMERO, F.

CIFA "Las Torres-Tomejil". Consejería de Agricultura y Pesca de la Junta de Andalucía.

Apto. Correos Oficial 41200 Alcalá del Río (Sevilla).

e-mail: [cifatorr@cap.junta-andalucia.es](mailto:cifatorr@cap.junta-andalucia.es)

Se estudió *in vitro* el efecto de la temperatura sobre el crecimiento y la capacidad antagonista de seis cepas de *Trichoderma*, aisladas de cultivo de fresa en Moguer (Huelva) y de productos comerciales (Tusal y Hors-Solsain®), frente a *Botrytis cinerea*, patógeno de fresa. Los ensayos se repitieron dos veces, a 10, 25 y 30°C, de acuerdo con el rango de temperaturas registrado en campo. El efecto inhibitorio se evaluó mediante mediciones del crecimiento radial de los duales sobre placas Petri con PDA, usando la fórmula de Royse y Ries para obtener los porcentajes de inhibición. Las placas se distribuyeron según un diseño de bloques completos al azar, considerándose 10 repeticiones por enfrentamiento y temperatura. Se designaron testigos para cada caso. Los datos se sometieron a análisis de varianza. El objetivo de este estudio fue determinar la capacidad inhibitoria de *Trichoderma* sobre el patógeno a diferentes temperaturas.

A 10°C el aislado local se mostró significativamente más eficaz en la inhibición de *B. cinerea*. A 25°C todas las cepas de *Trichoderma* tuvieron capacidad biofungicida en más del 57 %.

## SUSCEPTIBILIDAD A *Verticillium dahliae* DE ESTAQUILLAS SEMILEÑOSAS DEL CULTIVAR DE OLIVO CORNICABRA INJERTADAS SOBRE PATRONES TOLERANTES

PORRAS SORIANO, A.<sup>1</sup>, SORIANO MARTÍN, M.L.<sup>2</sup> Y PORRAS PIEDRA, A.<sup>1</sup>.

Universidad de Castilla-La Mancha.

<sup>1</sup>Departamento de Ingeniería Mecánica.

<sup>2</sup>Departamento de Producción Vegetal y T. A. Ronda de Calatrava 7. 13071 Ciudad Real

La Marchitez vascular es una enfermedad fúngica de reciente aparición en el olivar de Castilla-La Mancha, en donde está afectando especialmente a las nuevas plantaciones, a veces con gran severidad.

El control de esta enfermedad es difícil y caro por lo que el desarrollo de nuevos métodos, distintos de los tradicionales, que eviten o al menos reduzcan la enfermedad, representa una novedad de gran interés para olivicultores.

En este trabajo se ha ensayado la influencia, en cuanto a susceptibilidad a *V. dahliae*, del injerto de jóvenes plantas de olivo Cornicabra sobre cuatro cultivares (Arbequina, Frantoio, Lechín y Empeltre) que, según la bibliografía consultada, son tolerantes a dicha enfermedad. Los ensayos se hicieron sobre plantas propagadas a partir de estaquillas semileñosas, enraizadas tanto a pie franco como enraizadas e injertadas simultáneamente sobre los referidos patrones. Las plantas utilizadas se mantuvieron cinco meses y medio en túnel de propagación, dotado de sistema inteligente de automatización y control, y seis meses en umbráculo para su endurecimiento. Posteriormente se inocularon, por inmersión de las raíces desnudas de las plantas en una suspensión de  $10^7$  conidias/cm<sup>3</sup>, con el patotipo defoliante de *Verticillium dahliae*. Las plantas inoculadas y las testigo fueron incubadas en una cámara de crecimiento a  $22 \pm 2^\circ\text{C}$  de temperatura, 75% de humedad relativa y 16 h de fotoperiodo (450 mmol E m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup>). Periódicamente se evaluó la severidad de la enfermedad según una escala de 1 a 5, en la que 1 representa la planta sana y 5 planta muerta.

Los resultados muestran que los jóvenes plantones de olivos Cornicabra son altamente susceptibles al patotipo defoliante de *Verticillium dahliae*. En éstos la severidad de la enfermedad alcanzó un valor medio de 4.2. En las variedades utilizadas como patrones se ha confirmado su tolerancia a dicha enfermedad. En ellos aparecen valores medios de severidad que van desde 1.2 en Empeltre hasta 2.3 en Arbequina. Lo más interesante y novedoso de este trabajo es que se ha demostrado por vez primera que cuando Cornicabra se injerta sobre Frantoio, la severidad de los ataques se reduce a 1.8, lo que indica que el patrón Frantoio provoca en la variedad Cornicabra una importante reducción de su susceptibilidad a *V. dahliae*, convirtiéndola en una planta con una tolerancia muy superior a la que muestra cuando se cultiva a pie franco, pasando de ser de altamente susceptible a altamente tolerante.

## CONTROL BIOLÓGICO DE LA FUSARIOSIS VASCULAR DEL CLAVEL MEDIANTE *Fusarium* NO PATOGÉNICOS

PRADOS LIGERO, A.M.<sup>1</sup>, BASALLOTE UREBA, M.J.<sup>2</sup>, LÓPEZ HERRERA, C.J.<sup>3</sup> Y MELERO VARA J.M.<sup>3</sup>

<sup>1</sup>CIFA. Apdo. 3092.14080 Córdoba,

<sup>2</sup>CIFA. Apdo. Sevilla y <sup>3</sup>IAS-CSIC. Apdo. 4084.14080 Córdoba.

En pruebas de patogenicidad con aislados de *Fusarium oxysporum* obtenidos de suelo de clavel infestado, se detectaron aislados no patogénicos, de los que se obtuvieron aislados monoconídicos (FNP). Se han realizado 4 experimentos donde se han evaluado 45 aislados de FNP, que se incrementaron en caldo de patata dextrosa durante 10 días a 24°C y en agitación continua a 150 rpm. Se evaluaron esquejes de clavel de cinco semanas del cv. Exótica, moderadamente sensible a la Fusariosis vascular del clavel (FV), repitiendo ocho de ellos en dos experimentos. Las plántulas se dispusieron en bandejas con perlita estéril, y se aportó a cada una 5 ml de suspensión conidial ( $7 \times 10^7$  conidias/planta). Tras incubarse durante 5 días a 25°C y fotoperiodo de 12 h, se inocularon con un aislado monoconídico de *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* (Fod) mediante inmersión de las plántulas en una suspensión ( $7 \times 10^6$  conidias/planta) del patógeno durante una hora, seguido del trasplante a macetas con suelo estéril. Las plantas inoculadas se incubaron en las mismas condiciones anteriores. A partir de los 30 días de la inoculación con Fod se realizaron muestreos quincenales para evaluar poblaciones de FNP en rizosfera y rizoplano, y determinar su presencia en raíz y a distintas alturas del tallo. Los aislados Fod A3, A4 y A5 se evaluaron mediante observaciones semanales de síntomas durante 90 días desde la inoculación de Fod utilizando una escala de severidad de 1-5 (no síntomas-planta muerta). La densidad de inóculo en la rizosfera y en el rizoplano disminuyó en 96-40% a los 50-65 días desde la inoculación con FNP. Todos los FNP se detectaron en las raíces y, excepto 5 de ellos, se localizaron hasta 3-4 cm de altura en el tallo. Los aislados Fod A4 y A5 se comportaron como el más y menos virulento, respectivamente, en todos los experimentos. A los 60 días desde la inoculación todas las plantas inoculadas sólo con Fod habían muerto o alcanzado valores de severidad superiores a 4, excepto para A5, en uno de los experimentos, que sólo alcanzó 2.5. De los 45 aislados de FNP evaluados, 16 (35.6%) no controlaron la FV para ninguno de los aislados Fod utilizados, el 20% redujeron la severidad por debajo de 2.5 para los tres aislados Fod utilizados, el 24.4% para dos de dichos aislados, y el 15.6% para uno sólo de los aislados Fod evaluados. Al final del experimento, la observación de incremento de la severidad con 16 de los aislados de FNP evaluados sugiere el requerimiento de un aporte continuado del FNP y de estudios de las interacciones Fod-FNP en el control de la FV del clavel.

## VALORACIÓN DE LA SENSIBILIDAD DE AISLADOS DE *Cercospora beticola* A DISTINTOS FUNGICIDAS

RAMÍREZ, M.C., SÁNCHEZ, J. Y AYALA, J

AIMCRA (Asociación de Investigación para la Mejora del Cultivo de la Remolacha Azucarera) Apdo 855, 47080 Valladolid.

La Cercosporiosis de la remolacha azucarera, causada por el hongo *Cercospora beticola*, es actualmente una de las enfermedades de mayor importancia económica de este cultivo, provocando unas pérdidas de hasta el 30% de azúcar por hectárea.

Actualmente en España el control se realiza principalmente con productos químicos. En los últimos años se están detectando en algunas zonas descensos de eficacia de algunos fungicidas, lo cual podría ser consecuencia de la existencia de resistencias.

Con el fin de conocer la razón de estas caídas de eficacia, se llevó a cabo la valoración *in vitro* de la sensibilidad de distintos aislados de *C. beticola* a diferentes materias activas utilizadas en campo para el control de esta enfermedad.

Para la valoración de la sensibilidad de estos aislados se calculó el porcentaje de Inhibición Micelial (Smith y cols. 1991), que consiste en comparar el crecimiento micelial del hongo en un medio con y sin fungicida, clasificando los aislados como sensibles o resistentes a cada concentración de cada producto en función de este parámetro.

Se utilizaron 14 aislados de *C. beticola* procedentes de las tres zonas remolacheras españolas (Norte, Centro y Sur).

Se aplicaron tanto productos técnicos como productos comerciales de las siguientes familias de fungicidas: IBS, Benzimidazoles, Estrobilurinas y Ditiocarbamatos.

Como resultado de estos ensayos se observaron importantes diferencias en la sensibilidad de los aislados a distintas concentraciones de los diversos productos utilizados, poniéndose de manifiesto la existencia de resistencias cruzadas, de forma que cepas que se comportan como resistentes a fungicidas de una familia, son sensibles frente a fungicidas de otras familias.

Esto indica la conveniencia de utilizar como estrategia de control químico de la Cercosporiosis de la remolacha en campo la alternancia o la mezcla de productos de distintas familias.

## EVALUACIÓN DE LA RESISTENCIA A *Phytophthora* spp. EN CULTIVARES DE OLIVO

RAYA ORTEGA, M.C., EXPÓSITO SEGOVIA, M.D. Y TRAPERO CASAS, A.

Dpto. Agronomía, ETSIAM, Universidad de Córdoba. Avda Menéndez Pidal s/n, 14071 Córdoba.

La muerte o «seca» de plántones jóvenes de olivo en Andalucía está asociada a una podredumbre radical, la cual se desarrolla en suelos con exceso de agua. En estudios realizados en años anteriores se identificaron diversos hongos fitopatógenos en raíces necróticas de olivo, entre los que destacaron varias especies del género *Phytophthora* y, particularmente, la especie *P. megasperma*. Los métodos de evaluación de resistencia a *Phytophthora* en plántones jóvenes de olivo son laboriosos y requieren gran cantidad de tiempo, por lo que es necesaria la búsqueda de un método rápido y eficaz con el que se pueda evaluar un gran número de variedades de olivo. Por ello, en este trabajo se ha puesto a punto un método de inoculación de estaquillas de olivo sin enraizar y se ha comparado con los resultados obtenidos en plántones.

Estaquillas de los cultivares *Arbequina*, *Picual*, *Hojiblanca*, *Lechín de Sevilla*, *Manzanilla de Sevilla* y *Frantoio*, se dispusieron en fiambreras con perlita estéril infestada con tres tipos de inóculo (sólido, líquido y zoosporas) y varios niveles de los mismos. Para el inóculo sólido y líquido, aislados de *Phytophthora* se cultivaron durante 7 días a 22°C en el medio nutritivo zanahoria-agar (CA) y zanahoria sin agar, respectivamente. Para el inóculo con zoosporas, los cultivos de los aislados de *Phytophthora* en CA, se incubaron en extracto de suelo, obteniéndose una concentración máxima aproximada de 10<sup>6</sup> zoosporas/ml. Los mejores resultados se obtuvieron con el inóculo sólido, a concentraciones elevadas (1 placa de Petri/ 400 ml de perlita), por lo que fue éste el seleccionado para experimentos posteriores. Plántones de las mismas variedades de olivo se cultivaron en suelo naturalmente infestado y en suelo infestado artificialmente con varios aislados de *Phytophthora* spp. El suelo se mantuvo continuamente en saturación hídrica y al cabo de 6-8 semanas se evaluaron los síntomas de la parte aérea y radical.

En general, los síntomas mostrados en las estaquillas inoculadas se asemejaron con los observados en los plántones, apreciándose además, diferencias de susceptibilidad entre cultivares, que se correspondieron con las observadas en plántones. Entre los cultivares ensayados, *Manzanilla de Sevilla* fue el que mostró una menor severidad de síntomas. Por consiguiente, el método de inoculación puesto a punto para estaquillas sin enraizar, resulta eficaz para la evaluación de la resistencia de cultivares de olivo a *Phytophthora* spp.



## SELECCIÓN DE BACTERIAS ANTAGONISTAS PARA EL CONTROL BIOLÓGICO DEL OÍDIO DE MELÓN

ROMERO, D., CAZORLA, F.M., RIVERA, M.E., DE VICENT, A. Y PÉREZ-GARCÍA, A.

*Departamento de Microbiología. Facultad de Ciencias. Universidad de Málaga. Campus Universitario de Teatinos S/N. 29071. Málaga.*

El cultivo de melón, al igual que el de otras cucurbitáceas, se ve frecuentemente afectado por la enfermedad conocida como oídio, caracterizada por la aparición de manchas blancas pulverulentas en la superficie de los órganos de la planta que están siendo atacados. En el sur de España la enfermedad es causada por *Sphaerotheca fusca*. Los problemas asociados al control químico de la enfermedad, (resistencias por parte del hongo, residuos, etc.) han conducido al desarrollo de estrategias de control alternativas, entre las que se encuentra el control biológico.

El objetivo de este trabajo es aislar y seleccionar bacterias que muestren actividad antagonista frente al oídio de melón. Para ello, se aislaron bacterias potencialmente antagonistas desde plantas de cucurbitáceas atacadas por el oídio, así como desde cultivos *in vitro* de *S. fusca* contaminados con microorganismos que afectaban el desarrollo del patógeno. Puesto que *S. fusca* es un patógeno biotrofo estricto, la selección de bacterias antagonistas con actividad antifúngica se realizó indirectamente mediante ensayos en placas de PDA frente a diferentes hongos fitopatógenos necrotrofos. La actividad antifúngica de los filtrados libres de células se ensayó en placas multipocillo frente al hongo *Botrytis cinerea*. Los aislados bacterianos que mostraron un mayor espectro de actividad antifúngica fueron identificados como *Bacillus* sp. usando técnicas microbiológicas clásicas y de secuenciación de DNAr-16S.

La capacidad de estos aislados de inhibir el desarrollo de *S. fusca* se evaluó *in vitro*, usando hojas de melón del cultivar Rochet susceptible al oídio, mantenidas en un sistema de doble placa Petri bajo condiciones de temperatura y humedad relativa controladas. Estas hojas se pulverizaron con una suspensión de bacterias ( $10^8$  ufc/ml) y 2 horas después se inocularon con una suspensión de esporas de *S. fusca* ( $10^5$  conidias/ml). La capacidad inhibitoria se evaluó macroscópicamente midiendo la superficie de hoja cubierta de oídio, y microscópicamente estudiando el porcentaje de germinación de conidias de *S. fusca*, así como la formación de conidióforos y conidias, mediante microscopía de campo claro.

Los resultados obtenidos sugieren que las bacterias estudiadas son buenas candidatas para ser incluidas en programas de evaluación de posibles agentes de control biológico del oídio de melón sobre plantas en campo y en invernadero.

## EFICACIA DE GIBERELINAS EN EL CONTROL DE *Colletotrichum acutatum* EN FRESA

DE LOS SANTOS, B. <sup>1</sup>, BARRAU, C. <sup>1</sup>, GRANDE, M. <sup>2</sup>, OLTRA, E. <sup>3</sup>, OLLER, J.L. <sup>3</sup>, FERNÁNDEZ, A. <sup>3</sup> Y ROMERO, F. <sup>1</sup>

<sup>1</sup> C.I.F.A. «Las Torres-Tomejil». Apdo. Oficial, Alcalá del Río - 41200, Sevilla

<sup>2</sup> Dpto. de Química Orgánica. Universidad de Salamanca

<sup>3</sup> Dpto. de Química Orgánica. Universidad de Granada

*Colletotrichum acutatum* ocasiona la antracnosis de la fresa, provocando síntomas en toda la parte aérea de la planta. Se ha estudiado la efectividad de dos formulaciones de giberelinas (GR3 y GR4) en el control de este patógeno, analizando su efecto sobre plantas de fresa.

GR3 es un extracto de componentes ácidos de la estirpe IMI 58289 de *Fusarium fijiuroi*, cuyo componente principal es ácido giberélico. GR4 es un compuesto puro con esqueleto de ent-kaureno, pudiéndose considerar como precursor biosintético de algunas giberelinas.

Se han llevado a cabo ensayos «in vitro», sobre medio de patata dextrosa agar enriquecido con cada una de estas formulaciones a concentraciones de 1, 10 y 100 µg /ml, para determinar la eficacia de dichos compuestos sobre el crecimiento micelial del patógeno.

En experiencias en invernadero se ha estudiado la influencia de las giberelinas en el desarrollo de plantas de fresa (cultivar Camarosa); así como su efecto en el control de la antracnosis, en plantas inoculadas artificialmente.

Los ensayos «in vitro» mostraron que GR4 originaba un mayor crecimiento del patógeno, mientras que GR3 redujo el desarrollo de *C. acutatum* de forma significativa respecto al control.

La aplicación de GR3 y GR4 a dosis altas indujeron un mayor desarrollo de las plantas.

La incidencia de la enfermedad aumentó al incrementar la concentración de GR4. La aplicación de GR3 a 10 µg /ml redujo, de forma significativa con respecto al testigo inoculado no tratado, la incidencia de la enfermedad en un 61%.

P-199

## FORMULACIÓN DE *Penicillium oxalicum* COMO AGENTE DE BIOCONTROL DE ENFERMEDADES DEL TOMATE

SABUQUILLO, P., MELGAREJO, P. Y DE CAL, A.

*Departamento de Protección Vegetal. CIT-INIA. Carretera de La Coruña km 7. 28040. Madrid.*

*Penicillium oxalicum* Thom. es un agente de biocontrol que induce resistencia frente a la fusariosis vascular y otros patógenos del tomate. El control de la fusariosis vascular ocurre en diferentes cultivares de tomate y dura hasta 60-80 días con eficacias variables que pueden alcanzar el 80% del control. Uno de los principales problemas para el uso generalizado de los agentes de biocontrol es su producción y formulación industrial. La producción en masa de *P. oxalicum* se realiza en fermentación sólida con un rendimiento de 10<sup>8</sup> conidias/g de substrato y una viabilidad superior al 80%. Estas conidias se preparan para una formulación seca mediante el lecho fluido. Sin embargo, existen factores que pueden disminuir su estabilidad durante el almacenamiento; entre estos factores se encuentran la temperatura, la humedad relativa y la presencia de aire en los envases. Por ello, es necesario que la formulación del producto garantice las condiciones necesarias para mantener su viabilidad, y al mismo tiempo favorecer su supervivencia.

La formulación se ha llevado a cabo eligiendo los aditivos que mejoren las propiedades de las conidias al resuspenderlas en agua: humectabilidad, adherencia, mojabilidad, estabilidad, dispersión, etc. Para ello se eligieron aquellas sustancias y dosis que no resultaron tóxicas frente a *P. oxalicum*. Posteriormente y con aquellos aditivos que resultaron inocuos frente al agente de biocontrol se han puesto a punto métodos de comprobación de las propiedades de cada uno de ellos. Paralelamente se ha realizado un estudio para determinar el mejor momento de incorporación de dichos aditivos al proceso de fermentación, antes del secado o después del secado. Metilcelulosa (1,5%), Tween 80 (1%), Glicerina (20%), Alginato (1%), Tween 20 (1%) y Sacarosa (60%) se han seleccionado como los aditivos más adecuados para mejorar las propiedades de solubilidad en agua del producto. Tween 80 (1%), Tween 20 (1%), Leche desnatada (0,1%), Glicerina (20%) y Aceite vegetal (10%) son los aditivos que mejoran las propiedades de adherencia del agente de biocontrol. Como estabilizantes se han seleccionado PEG 8000 (5%), Triton 100 (1%), ClNa (10%), Alginato (1%), Metilcelulosa (1,5%), Tween 20 (1%) y peptona (1%).

Una vez realizado la selección de los aditivos, quedaría pendiente el estudio de la utilización de sus mezclas y su viabilidad en el tiempo, para que el producto llegue en perfectas condiciones al comprador. Además, se realizarán ensayos para evaluar la eficacia de estos formulados frente a las enfermedades del tomate en cultivos protegidos y al aire libre.

## CONTROL BIOLÓGICO DEL AHOGAMIENTO DE PLÁNTULAS DE PEPINO CAUSADO POR *Pythium aphanidermatum* MEDIANTE EL USO DE ACTINOMICETOS

SÁNCHEZ, J., ERICKSON, J.C. Y GALLEGOS, E.

Dpto. Biología Vegetal y Ecología. Universidad de Almería. Ctra. Sacramento, s/n. E-04120 La Cañada de S. Urbano. Almería. Spain. [telf. 34 950015551; fax: 34 950015069; e-mail: josanche@ual.es]

El ahogamiento (“damping-off”) de plántulas es una enfermedad causada por diversos hongos (*Pythium* sp., *Fusarium* sp., *Phytophthora* sp., *Botrytis* sp., etc.) que provocan la muerte de las plantitas de semillero, aunque *Pythium* es el más temido. En este sentido, *P. aphanidermatum* resulta la especie fitopatógena más importante en los invernaderos de Almería.

*Pythium* es un hongo acuático y edáfico que pudre las raicillas y hasta el cuello de las plántulas, que en pepino muestran un típico estrechamiento conocido como “cinturilla”. También causa problemas radiculares en plantas adultas.

En la actualidad, el control químico de esta enfermedad es habitual en los semilleros hortícolas almerienses, con los consiguientes problemas ambientales.

Los actinomicetos son bacterias filamentosas. Estos microorganismos son frecuentes en el suelo. Los aislados utilizados en este trabajo se obtuvieron de suelos almerienses, y pertenecen a los géneros *Streptomyces* (A7E y A11G) y *Streptoverticillium* (A15G). En ensayos anteriores han sido probados como eficaces antagonistas *in vitro* de este hongo, así como de otros comunes en los suelos hortícolas almerienses.

En el presente trabajo, estos aislados de actinomicetos (A7E, A11G, y A15E) se han probado *in vivo* como agentes biocontroladores de *Pythium aphanidermatum*.

El ensayo se realizó en los laboratorios del departamento, a una temperatura de 20-25°C, en macetas con sustrato de vermiculita y sembradas con semillas de pepino var. *Ashley*. El actinomiceto se aplicó con una semana de antelación al patógeno, que se inoculó durante la siembra. En ambos casos, se utilizó como inóculo el batido en agua de colonias desarrolladas en medios agarizados, TSA y PDA respectivamente. Durante todo el ensayo se mantuvieron las máximas condiciones de asepsia, para ello, las macetas se cubrieron con una lámina de plástico transparente.

De entre estos actinomicetos, el A15E es el que mejores resultados obtiene, consiguiendo los mayores porcentajes de nascencia (70,43 %), de supervivencia (65,51 %) y de supervivencia de plántulas nacidas (86,67 %). Por el contrario, el aislado A19G no resultó eficaz.

En consecuencia, de entre los actinomicetos probados, algunos han demostrado tener una importante acción antagonista, pudiendo ser una alternativa ecológica a la utilización de fungicidas químicos.

P-201

## EVALUACIÓN DEL ANTAGONISMO “IN VITRO” DE HONGOS ECTOMICORRÍCICOS COMESTIBLES Y HONGOS SAPRÓFITOS SOBRE EL CRECIMIENTO Y GERMINACIÓN DE LAS ESPORAS DE *Fusarium moniliforme* Sheldon

VILLADA, D., PANDO, V., ALVES, F., SANTAMARÍA, O., ORIA, J.A. Y DIEZ, J.J.

Universidad de Valladolid. Unidad de Entomología y Patología Forestales. Departamento de Producción Vegetal y Silvopascicultura. Escuela Técnica Superior de Ingenierías Agrarias (E.T.S.II.AA.). Avl de Madrid 57. 34071. Palencia.

*Fusarium moniliforme* es un hongo que forma parte del complejo “damping-off”, tanto de preemergencia como de post-emergencia, que causa importantes pérdidas económicas en viveros forestales tanto a raíz desnuda como en contenedor. Las micorrizas realizan importantes funciones sobre las plantas hospedantes y pueden protegerlas frente a la invasión de patógenos radiculares. Sin embargo, el número de hongos micorrizógenos estudiados como agentes de biocontrol es muy reducido. Algunos de ellos han ofrecido resultados interesantes pero son especies no comestibles o tóxicas, lo que no contribuyen a aumentar los recursos del monte. Ciertos hongos saprófitos también pueden ser utilizados para el control biológico de patógenos radicales.

En este estudio se valoró el efecto inhibitorio “in vitro” de dos hongos ectomicorrícicos comestibles, *Lactarius deliciosus* y *Amanita ovoidea*, y dos hongos saprófitos, *Trichoderma harzianum* y *Cladosporium cladosporioides* sobre 8 aislamientos del patógeno *Fusarium moniliforme*. Para ello, los hongos utilizados como posibles antagonistas fueron enfrentados con el patógeno, sobre diferentes medios de cultivo en placas petri. También, se valoró el efecto de los filtrados de cultivos de los antagonistas sobre la germinación de las esporas de los distintos aislamientos de *Fusarium moniliforme*.

De todos los hongos utilizados como antagonistas sólo *Trichoderma harzianum* ejerció una inhibición “in vitro”, por competición, sobre el crecimiento en placa de *Fusarium moniliforme*. Las hifas del patógeno aparecieron enroscadas y engrosadas en la zona de contacto con este hongo saprófito. Por otra parte, los filtrados de cultivos de *Lactarius deliciosus* inhibieron de forma significativa, pero variable, la germinación de las esporas de los distintos aislamientos de *Fusarium moniliforme* “in vitro”. *Trichoderma harzianum* también inhibió la germinación de las esporas del patógeno “in vitro”, pero en menor medida que *Lactarius deliciosus*.

Este trabajo ha sido financiado por el Ministerio de Ciencia y Tecnología, y Fondos Europeos de Desarrollo Regional (FEDER) dentro del Programa del Plan Nacional de Investigación Científica, Desarrollo e Innovación Tecnológica 2000-2003 (Proyecto AGL2001-1771).

## EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD FUNGICIDA «in vitro» DE EXTRACTOS ACUOSOS DE COMPOST DE RESIDUOS AGROINDUSTRIALES FRENTE A *Sphaerotheca fusca*

SINOBAS, J.1, IGLESIAS, C.1, GEA, F.2, Y TELLO, J.C.3

<sup>1</sup> Dpto. de Producción Vegetal: Botánica y Protección Vegetal. EUITA. Universidad Politécnica de Madrid. jsinobas@agricolas.upm.es

<sup>2</sup> Centro de Investigación, Exp. y Servicios del Champiñón (CIES) Quintanar del Rey. Cuenca

<sup>3</sup> Dpto. de Producción Vegetal. Universidad de Almería

*Sphaerotheca fusca* es uno de los patógenos más importantes que ocasionan enfermedades foliares en cucurbitáceas, cuyo desarrollo micelial y formación de conidias llegan a cubrir la totalidad de la hoja. Tradicionalmente se ha recurrido a los fungicidas sintéticos o minerales como métodos de control, aunque actualmente se sugiera la búsqueda de métodos de biocontrol respetuosos con el medio ambiente.

El objetivo de este trabajo es determinar la capacidad de los extractos acuosos obtenidos de residuos agroindustriales (corcho y uva prensada) compostados para inhibir la germinación de conidias de *S. fusca* sobre cotiledones de pepino «in vitro».

Los extractos acuosos obtenidos del compost de corcho-agua en relación 1:4 (p/v) extraídos a 1 día de incubación, reducían la germinación de conidias un 25% con relación al testigo inoculado con agua. Este porcentaje de inhibición de la germinación de conidias era superior al obtenido con extracciones a 7 y 14 días de incubación. En extracciones en relación compost-agua 1:8 (p/v) a 1 día de incubación, se reducía la germinación de conidias en un 32% con relación al testigo, cuya diferencia era altamente significativa. Los extractos acuosos obtenidos a 7 y 14 días de incubación eran menos efectivos.

En los ensayos realizados con extractos acuosos obtenidos de compost de uva prensada-agua en relación 1:4 (p/v), las extracciones de 1 día reducían la germinación de conidias un 18% con relación al testigo, algo superior al obtenido con extractos de 7 y 14 días de incubación. Cuando se incubaba compost uva prensada-agua en relación 1:8 (p/v), los mejores resultados se obtenían con extracciones a 7 y 14 días de incubación, llegando a reducir la germinación de las conidias un 38 y 44% respectivamente.

Estos resultados ponen de manifiesto que los extractos acuosos de compost de corcho-agua en relación 1:8 (p/v), tienen mayor capacidad inhibitoria de la germinación de conidias que los obtenidos en relación compost-agua 1:4 (p/v) y en ambos casos a un día de extracción. Sin embargo cuando utilizamos compost de uva prensada, los mejores resultados se obtuvieron con extracción 1:8 (p/v), pero a 7 y 14 días de incubación. Estos trabajos que parecen bastante prometedores, esperamos poderlos continuar en experimentos en invernadero

P-203

## USO DE RESISTENCIA GENÉTICA COMO MÉTODO DE CONTROL DEL OÍDIO (*Blumeria graminis*) EN TRIGO DURO

CÁTEDRA, M.M. Y SOLÍS, I.

Departamento de Ciencias Agroforestales. Universidad de Sevilla. Carretera de Utrera Km. 1. 41013 Sevilla.

El oidio del trigo duro causado por *Blumeria graminis* se ha convertido en uno de los factores limitantes en la producción de este cereal en condiciones de clima mediterráneo. Durante la campaña 1.998-1.999 y 1.999-2.000 se produjeron en Andalucía fuertes infestaciones de este patógeno durante la fase de ahijamiento y encañado que coincidieron con posteriores periodos de sequía, produciéndose grandes pérdidas en la producción de la mayor parte de las variedades comerciales que alcanzaron severidades en muchos casos por encima del 50 %. De nuevo en la campaña 2.001-2.002 se han repetido unos altos niveles de incidencia de este patógeno en las variedades más cultivadas como son DON PEDRO, YAVAROS y GALLARETA por lo que el uso de fungicidas se ha generalizado para tratar de controlar las pérdidas causadas por esta enfermedad.

De las localidades prospectadas en la campaña 1.998-1.999 aquella en la que se observaron los niveles más altos de severidad en las principales variedades comerciales fue Conil de la Frontera (Cádiz) por lo que se eligió como lugar adecuado para la realización de ensayos estadísticos de productividad en las siguientes campañas 1.999-2.000, 2.000-2.001 y 2.001-2.002 para evaluar la eficacia en el control del oidio de las nuevas variedades DON MANUEL, DON RAFAEL y DON SEBASTIÁN seleccionadas como resistentes en los ensayos realizados en Escacena del Campo (Huelva) y Jerez de la Frontera (Cádiz).

A partir de los datos periódicos de severidad tomados a lo largo del ciclo vegetativo del cultivo y de sus correspondientes áreas por debajo de la curva de progresión de la enfermedad (AUDPC), se ha observado una alta correlación entre el nivel de resistencia de cada variedad y su productividad medida en Kg/ha. En la cosecha del 2.002 se han medido diferencias de rendimiento de 1.122 Kg/ha entre el promedio de las tres variedades resistentes estudiadas (3.374 Kg/ha) y el promedio de las tres variedades comerciales sensibles utilizadas como testigos de referencia (2.252 Kg/ha) lo que supone un incremento de la productividad media de un 49,8 % en las nuevas variedades que incorporan genes de resistencia a oidio.

Dada la creciente importancia de otras enfermedades foliares en el trigo duro como son la roya de la hoja y la septoria que obligan al agricultor a la realización de tratamientos fungicidas en el momento del desarrollo de la hoja bandera, se hace prioritaria la incorporación de genes de resistencia a oidio en las nuevas variedades comerciales de trigo duro para evitar la necesidad de tratamientos adicionales en los estados juveniles del cultivo.

## INFLUENCIA DE LA TÉCNICA DE SIEMBRA EN LOS DAÑOS PRODUCIDOS POR LAS MICOSIS DEL SUELO DURANTE EL PERIODO DE ESTABLECIMIENTO DE LA ALUBIA (*Phaseolus vulgaris* L.)

VALENCIANO, J.B. Y CASQUERO, P.A.

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

El establecimiento del cultivo de la alubia está condicionado, entre otros, por la incidencia de hongos parásitos del suelo, que representan un grave problema en la provincia de León. Tradicionalmente se realiza una desinfección y/o protección de la semilla antes de la siembra con fungicidas, generalmente por vía húmeda. Este método es 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 durante la siembra.

El objetivo del presente trabajo consiste en evaluar distintas técnicas de siembra. Estudiando su influencia sobre la aparición de plantas afectadas por micosis del suelo durante el periodo de establecimiento. Los ensayos se realizaron durante los años 1998 y 1999 en dos ambientes distintos cada año, en comarcas de cultivo tradicional de alubia en la provincia de León. Se siguió un diseño estadístico de *split-split-plot* con 3 repeticiones, en el que el factor principal fue la variedad (Canela y Riñón de León), el factor secundario fue la aplicación de productos fitosanitarios (sin tratamiento, aplicación de Diazinón e Himexazol a la semilla días previos a la siembra y aplicación de Carbofurano e Himexazol en la línea de siembra en el momento de realizarla), y el factor terciario fue la técnica de siembra (siembra en surcos, siembra en llano sin añadir substrato, siembra en llano añadiendo serrín en la línea de siembra y siembra en llano añadiendo vermiculita en la línea de siembra).

La técnica de siembra influyó más sobre el establecimiento de la alubia que la forma de aplicar los productos fitosanitarios. La consecución de condiciones que favorezcan una rápida nascencia de la plántula tuvo mayor influencia sobre el establecimiento que los tratamientos fitosanitarios realizados. Los hongos que se detectaron causando lesiones radiculares durante este periodo fueron *Rhizoctonia solani*, *Pythium spp.* y *Fusarium solani*. Su incidencia fue muy baja, siendo *R. solani* el que se detectó con mayor frecuencia; además, generalmente, el daño estaba causado por más de un hongo, sobre todo en la variedad Canela. Existieron diferencias altamente significativas entre ambientes, y entre técnicas de siembra, para el número de plantas afectadas. La siembra en surcos presentó mayor número de plantas afectadas que las siembras en llano, y dentro de éstas la incidencia fue menor cuando se añadía un substrato en la línea de siembra. Entre tratamientos las diferencias sólo fueron significativas, mejorando el establecimiento cuando el tratamiento se aplicaba en la línea de siembra; al igual que entre variedades siendo la variedad Riñón de León más afectada. Además existieron interacciones significativas entre variedad y ambiente y entre variedad y tratamientos



P-205

## ENSAYOS PRECOMERCIALES DE CONTROL DE LA MANCHA MARRÓN DEL PERAL MEDIANTE GUIADO DE LOS TRATAMIENTOS FUNGUICIDAS CON EL SISTEMA DE PREDICCIÓN BSPcast

VILARDELL, P., LLORENTE, I. Y MONTESINOS, E.

*Institut de Tecnologia Agroalimentaria-CeRTA-CIDSAV. Universitat de Girona Campus de Montiliví s/n 17071 Girona.*

*Fundació Mas Badia. Estación Experimental Agrícola. Mas Badia s/n 17134 La Tallada d'Empordà*

La mancha marrón del peral ha sido descrita en numerosas zonas de producción de pera de Europa, especialmente de la vertiente mediterránea. Los síntomas más relevantes de la enfermedad corresponden a manchas en los frutos y hojas con reducciones importantes de la cosecha de las plantaciones afectadas. La gravedad de los daños ocasionados depende de la variedad, de los antecedentes de la enfermedad en la plantación y de las condiciones ambientales de los años. El agente causal es el hongo Deuteromiceto *Stemphylium vesiarium* (Wallr.) cuyo teleomorfo es el Ascomiceto *Pleospora alli* (Rabenh). El control de la enfermedad se aborda principalmente con aplicaciones repetidas de funguicidas ditiocarbamatos, dicarboximidas y estrobirulinas que implican un elevado número de tratamientos, incrementan los niveles de residuos de funguicidas presentes en los frutos y limitan en la inclusión de las plantaciones afectadas en la clasificación de producción integrada. El modelo BSPcast, diseñado para el guiado de las aplicaciones funguicidas, ha demostrado ser igualmente efectivo para el control de la enfermedad a la estrategia de tratamiento a cadencia fija en ensayos en microparcelas.

Nuestro trabajo se ha centrado en implementar el control de la enfermedad mediante el modelo BSPcast en tres parcelas comerciales durante tres campañas de producción. Para ello se han dividido cada una de las tres plantaciones en dos zonas de superficie mínima una hectárea. En una se ha desarrollado una estrategia de control mediante tratamientos guiados por el modelo BSPcast, mientras en la otra zona se ha adoptado la estrategia de tratamientos a cadencia fija. Se han efectuado controles de incidencia y severidad de la enfermedad en ambas zonas durante todo el período vegetativo y durante la cosecha. Los resultados hasta el momento demuestran que el modelo permite un control similar a la estrategia a cadencia fija pero con una reducción en el número de tratamientos aplicados.

## CAPACIDAD ANTAGONISTA DE LOS GÉNEROS *PENICILLIUM* Y *ASPERGILLUS* AISLADOS DE LOS COMPOSTADOS DE ORUJO DE VID, ORUJO DE OLIVO (ALPERUJO) Y CHAMPIÑÓN

VILLAESCUSA, J.1, YÉLAMOS, J.1, CASTILLO, P.1, DIÁNEZ, F.1, SANTOS, M.1, CHEBĀANI, M.1, BLANCO, R.1, GEA, F.J.2 Y TELLO, J.C.1.

<sup>1</sup>Dpto Producción Vegetal. Área de Producción Vegetal. Edificio CITE-II B. Universidad de Almería. Carretera de San Urbano s/n. 4120 Almería.

<sup>2</sup>Centro de Investigación, Experimentación y Servicios del Champiñón (C.I.E.S.C). C/ Peñicas, s/n. 16220 Quintanar del Rey (Cuenca).

El compostado de restos de cultivo, adecuadamente realizado, genera elevadas temperaturas (55-70°C) que consiguen destruir numerosos patógenos y semillas presentes en ellos, aunque también mueren microorganismos beneficiosos. Se conoce que los géneros *Aspergillus* y *Penicillium* son capaces de ejercer actividad antagonista frente a otros microorganismos.

El objetivo de éste trabajo consiste en evaluar la capacidad antagonista *in vitro* de los *Aspergillus* y *Penicillium* aislados a partir de los composts de orujo de vid, orujo de olivo (alperujo) y sustrato agotado del cultivo del champiñón, frente a 5 fitopatógenos de suelo en cultivos hortofrutícolas y en cultivo de champiñón.

Se llevó a cabo el aislamiento de la microbiota fúngica de los tres composts mediante el método de las diluciones sucesivas, tanto en medio agar-malta como agar-malta acidificada. De los géneros detectados, se ha evaluado la capacidad antagonista de *Aspergillus* y *Penicillium* frente a 5 fitopatógenos fúngicos: *Rhizoctonia solani*, *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* (razas 0 y 1), *Verticillium dahliae* y *V. fungicola*. El ensayo «*in vitro*» de antagonismo se realizó sobre placas de Petri con agar-malta, mediante enfrentamientos individuales patógeno-aislado de compost.

Del compost de vid el 17% de los aislados de *Aspergillus* ensayados manifestó la capacidad de reducir la velocidad de crecimiento de algunos de los fitopatógenos en diversos grados y en el resto produjo respuestas variables como una disminución de la densidad o cambio de coloración del micelio dependiendo del patógeno enfrentado. El 23 y 46% de los aislados de *Penicillium* detuvo el crecimiento de las dos razas de *F.o.* f.sp. *lycopersici* y las dos especies de *Verticillium* respectivamente. Del compost de alperujo el 17% de los aislados de *Aspergillus* disminuyó la velocidad de crecimiento de todos los patógenos ensayados y del resto no se detectó modificación alguna. El 67% de *Penicillium* redujo la velocidad de crecimiento de forma general de todos los patógenos. En cuanto al compost de champiñón el poder antagonista de *Aspergillus* se manifestó en el 55% de los aislados ensayados pero a bajo nivel. El 69% de los aislados de *Penicillium* provocaron una disminución de velocidad sobre las dos razas de *Fusarium*, y el 38% sobre las dos especies de *Verticillium* y *R. solani*.

P-207

## ESTUDIO DE LA MICROBIOTA FÚNGICA, ACTINOMICÉTICA Y BACTERIANA DE SUELOS CULTIVADOS CON PIMIENTO EN MURCIA

YÉLAMOS, J.A.<sup>1</sup>, CASTILLO, P. <sup>1</sup>, DIÁNEZ, F. <sup>1</sup>, VILLAESCUSA, J. <sup>1</sup>, SANTOS, M. <sup>1</sup>, CHEBĀANI, M. <sup>1</sup>, BLANCO, R. <sup>1</sup>, LACASA, A.<sup>2</sup> Y TELLO, J.C. <sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Departamento de Producción Vegetal. Área de Producción Vegetal. Edificio CITE-II B. Universidad de Almería. Carretera de San Urbano s/n. 4120 Almería.

<sup>2</sup>Centro de Investigación y Desarrollo Agroalimentario. Consejería de Medio Ambiente, Agricultura y Agua. C/ Mayor s/n. 30150 La Alberca (Murcia).

La fecha de eliminación en agricultura del bromuro de metilo (BM) en los países miembros de la UE es el año 2005. El Comité Técnico para las Alternativas al Bromuro de Metilo (*Methyl Bromide Technical Option Committee*, MBTOC) se creó con el fin de encontrar alternativas a su uso, viables técnica, ambiental y económicamente.

La biofumigación es una alternativa biológica respetuosa con el medio ambiente y una viabilidad económica muy interesante, tiene su fundamento en la acción de las sustancias volátiles producidas en la biodescomposición de la materia orgánica en el control de los patógenos de las plantas; cualquier tipo de materia orgánica puede actuar como biofumigante, dependiendo su eficacia de la dosis y del método de aplicación. La biofumigación por si sola produce un aumento de la variabilidad de la microbiota telúrica. La solarización es un método que, por si solo, no es eficaz en el control de los patógenos vegetales, especialmente cuando se trata de controlar organismos móviles, como nematodos que por acción del calor se desplazan a zonas más profundas. La adición de residuos orgánicos al suelo puede incrementar la eficacia de la solarización. Se ha observado que la solarización combinada con la biofumigación produce una pérdida en la biodiversidad del suelo.

El objetivo de este trabajo es ver el efecto de diferentes tratamientos de desinfección del suelo en un monocultivo de pimiento bajo invernadero, realizado en el Campo de Cartagena (Murcia), con biofumigación combinada con solarización durante tres años consecutivos sobre las microbiotas fúngica, actinomicética y bacteriana.

Las microbiotas fúngica, actinomicética y bacteriana se ven reducidas por los tratamientos de desinfección ensayados, manteniéndose de manera comparable los niveles poblacionales durante cada año de ensayo. La microbiota fúngica encontrada pertenece a los géneros, *Aspergillus*, *Penicillium*, mucorales como *Rhizopus* y a otros géneros como *Trichoderma*, *Cladosporium*, *Stemphylium*, *Alternaria* así como a las especies de *Fusarium solani*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium roseum*.

La biofumigación acompañada de solarización provoca en las microbiotas estudiadas el mismo efecto que el bromuro de metilo, drástica disminución de los microorganismos presentes en el suelo.

## EVALUACIÓN DE BACTERIAS ANTAGONISTAS DE *Spilocaea oleagina*

SEGURA, R. Y TRAPERO, A.

Dpto. Agronomía, E.T.S.I.A.M., Universidad de Córdoba. Avda. Menéndez Pidal s/n, 14071 Córdoba.

*Spilocaea oleagina*, agente causal del Repilo del olivo, es un patógeno que se desarrolla en la cutícula de los tejidos infectados. Este hábitat subcuticular podría favorecer la acción antagonista de ciertos microorganismos o de productos de dichos organismos que presenten una fácil difusión en la cutícula foliar.

Se han evaluado un total de 61 aislados bacterianos procedentes de hojas de olivo de diferentes comarcas olivareras. 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 ml de una suspensión formada por  $10^5$  conidias/ml de *S. oleagina* y  $10^9$  ufc/ml del aislado bacteriano sobre cubres en cámara húmeda. Los cubres se incubaron a 15°C en oscuridad durante 48 h 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 h 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 61 aislados, 5 de ellos inhibieron la germinación en más del 70% de la observada en el testigo. En los restantes aislados los resultados de la IRG fueron: 6 aislados con 50-70%, 7 aislados con 30-45%, 6 aislados con 20-30%, 9 aislados con 10-20%, 10 aislados con 1-10% y 16 aislados con 0%. Resultados similares se obtuvieron cuando la variable analizada fue IRT, si bien en uno de los aislados no hubo correspondencia entre ambos parámetros.

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 dos de ellos se observó una disminución marcada (80%) en el tamaño de la lesión latente respecto a la de su testigo correspondiente. En las plántulas tratadas con cuatro de los aislados la severidad de los síntomas disminuyó en un 50% la superficie foliar afectada con respecto a las plántulas testigo. En general, los aislados no se comportaron igual *in vivo* que *in vitro*, lo que concuerda con lo observado en un patosistema similar como es *Venturia inaequalis*/manzano. blanco

# CUCUMBER VEIN YELLOWING VIRUS : AN 'OLD' VIRUS THAT CAUSES NEW PROBLEMS

HERVÉ LECOQ AND CÉCILE DESBIEZ

INRA, Station de Pathologie Végétale, Domaine Saint Maurice, BP94, 84143 Montfavet, France.

Cucumber vein yellowing virus (CVYV) has been described infecting cucumbers and other cucurbits in Israel in the late 50's. However, at that time CVYV was not considered as causing a major viral disease and it was mostly observed affecting autumn crops. Subsequently, the virus was described in several countries of the Oriental Mediterranean Basin (Jordan, Lebanon, Turkey), in Africa (Sudan) and only two years ago in Spain. Now, CVYV is responsible for serious yield losses in Spain but also in Israel and Jordan, probably due to the occurrence of more severe strains than the original one.

CVYV has filamentous particles 740-800 nm long with a diameter of 15-18 nm. The virus is transmitted mechanically and by the whitefly *Bemisia tabaci* on the semi-persistent mode. For years, CVYV was not assigned to a specific virus genus or family and it is only recently that it has been included in the genus *Ipomovirus*, family *Potyviridae*. Indeed, ultramicroscopic observations of infected cells revealed numerous cylindrical cytoplasmic inclusions, typical of *Potyviridae*. Also, the coat protein gene sequence clearly revealed that CVYV is related to *Sweet potato mild mottle mosaic virus*, the type member of the genus *Ipomovirus*.

Due to the unstability of CVYV particles, difficulties are encountered in obtaining purified virus preparations. Therefore we are still lacking a good antiserum that could be used in DAS-ELISA for simple and rapid diagnosis. Presently, CVYV detection mostly rely on RT-PCR reactions using specific primers or on nucleic acid hybridisation using digoxigenin-labelled RNA probes.

Control methods include techniques that reduce the vector *Bemisia tabaci* populations (physical, biological or chemical) and the use of virus resistant cultivars. Resistance has already been described in cucumber and is looked for in melon and watermelon. A recent report indicates that CVYV can infect weeds outside the *Cucurbitaceae*. This suggests that CVYV is able to overwinter in non-cucurbit hosts and could spread and survive in more northern European countries.

# WHITEFLY-TRANSMITTED CRINIVIRUSES IN LETTUCE AND TOMATO

HSING-YEH LIU

USDA-ARS, 1636 E. Alisal St, Salinas, CA 93905, USA. [hliu@pw.ars.usda.gov](mailto:hliu@pw.ars.usda.gov)

Whitefly-transmitted criniviruses are an expanding group of plant viruses. *Crinivirus* is a new genus belongs to *Closteroviridae* family. The criniviruses have been characterized by a number of features including particle morphology, cytopathology, mode of transmission, and bipartite single stranded RNA genome.

In 1981, lettuce, cucurbits, and sugar beet crops in the southwestern United States were ubiquitously infected with *Lettuce infectious yellows virus* (LIYV), resulting in losses exceeding \$20 million in one growing season. The cucurbits appear to play an important role in the epidemiology of LIYV. The cucurbits are a breeding host of the whitefly and also serve as a source of LIYV for newly emerging crops in early September. In 1990-1991 the incidence of LIYV in the desert areas were reduced from 70% to 1% in spite of the record high population of its insect vector, the sweetpotato whitefly (*Bemisia tabaci*). With a hypothesis of the vector population shifting to a new biotype with no or low efficiency of virus transmission, we surveyed the desert areas for whitefly and found a new biotype: "B". This biotype "B" is different from the original biotype "A" in host preference, larval development, transmission efficiency of LIYV, and the induction of silverleaf symptom on squash, but is indistinguishable morphologically from biotype "A". We developed an isozyme pattern technique to differentiate biotype "B" from biotype "A". Since 1991, a mixture of viruses including LIYV and a newly described clostero-like virus termed *Lettuce chlorosis virus* (LCV) have been isolated from sugar beet and lettuce plants in the desert regions. B-biotype whitefly can transmit LCV efficiently. However, because cucurbits are not LCV hosts, the only known virus source in the field is from the weed hosts. Therefore, so far LCV has not caused severe losses to crops.

Since 1993, we have discovered at least two distinct tomato-infecting criniviruses, *Tomato infectious chlorosis virus* (TICV) and *Tomato chlorosis virus* (ToCV), both in field and greenhouse grown tomatoes. These viruses have wide host ranges and include ornamentals, weeds, and agronomic crops. TICV has been identified in limited locations within the U.S., as well as in Europe and Taiwan, while the distribution of ToCV appeared to be considerably broader. ToCV has been identified in North America, Europe, Taiwan, South America, and most recently the Caribbean. Although TICV is only transmitted by the greenhouse whitefly (*Trialeuordes vaporariorum*), four whitefly vectors transmit ToCV, including *T. vaporariorum*, *B. tabaci* A and B biotypes, and the banded wing whitefly (*T. abutilone*). Both TICV and ToCV are considered to be semi-persistent in their vectors. TICV persists in the whitefly for four days, whereas ToCV persists one day in the vector. Movement of these viruses in breeding material and increases in both international trade and greenhouse vegetable culture contributes to the expansion of the natural range of these viruses.

# DECISION SUPPORT SYSTEM FOR THE MANAGEMENT OF HUMIDITY PROMOTED DISEASES

YIGAL ELAD

*Department of Plant Pathology, The Volcani Center, Bet Dagan 50250, Israel*

Fungi that cause gray mold (*Botrytis cinerea*), leaf mold (*Cladosporium fulvum*), white mold (*Sclerotinia sclerotiorum*) and downy mildew (*Pseudoperonospora cubensis*) are examples of pathogens that are promoted in high relative humidity. These pathogens need in many cases free moisture on plant surfaces for infection. Prevention of such conditions can limit epidemics development. Taking in account the most promotive microclimate and other conditions in decision making before administrating protective measures can assist with the protection of susceptible hosts from attacks by such pathogens. In the process of development of a decision support system for integrated disease management we developed a system to predict the relative favorability of the environment for infection. Future weather forecast was found useful for prediction of epidemics out breaks. A framework based on weather forecast, crop, pathogen, environment parameters and available means of control was developed in order to provide indices for disease risks. Decisions whether to apply biocontrol agent or chemical fungicides and when to apply the right agent are taken before each potential application time, i.e. several times a week during the season of risk. In sweet basil the right timing of a chemical spray result in excellent stem wound gray mold. In tomato and cucumber the right timing of biological (*Trichoderma harzianum* T39 = TRICHODEX) and chemical fungicides according to the BOTMAN (for *B. cinerea*) and GREENMAN (for all diseases) systems resulted in good and consistent suppression of epidemics and in ca 70% reduction of chemical fungicides use. The decision support systems are tailored to the special conditions of the region in which they were developed and tested. It is expected that for use of such systems in other regions there is a need for a thorough study of the key conditions that are responsible for epidemic outbreaks and for fine-tuning of indices, which the systems rely on. Decision support system can serve the farmer or farm advisors with knowledge necessary for implementation of the right control measures and focusing the use of chemical fungicides only when needed. The outcome is a significant reduction of chemical use.

# BIOLOGICAL CONTROL OF SOILBORNE PATHOGENS IN GREENHOUSE CROPS

TIMOTHY C. PAULITZ

USDA-ARS, Root Disease and Biological Control Lab, Washington State University,  
Pullman, WA 99164-6430

As of 2000, over 80 biocontrol products were marketed world-wide, but these represented less than 1% of the total sales of fungicides. Many of these were developed for control of soilborne pathogens in greenhouses and covered structures. Greenhouse systems offer several advantages for the adoption of biocontrol strategies, including controlled environments, high value crops, limited amount of growing substrate to be treated, and limited number of fungicides. Unlike with foliar pathogens, there are few chemical controls for soilborne pathogens and biocontrol agents can fill these niches where few disease management tools are available. Soilborne pathogens can be managed through three biocontrol strategies- destruction of inoculum in the soil with mycoparasites, protection of the infection court (roots, seeds, bulbs) with antagonistic bacteria or fungi, or induction of resistance. *Coniothyrium minitans*, *Trichoderma* spp., and *Gliocladium* spp. are examples of the first strategy. Root surfaces can be protected with *Pseudomonas*, *Bacillus* and *Streptomyces* spp, which produce antifungal metabolites. Strains of *Pseudomonas* and *Bacillus* can induce systemic resistance in plants. Biocontrol agents face many economic, regulatory, and formulation barriers to commercialization, but greenhouse applications may offer the best opportunities. In the UK and Europe, the use of insect biocontrol agents and natural enemies in greenhouses has become dominant over insecticides, and this same trend may occur with biological disease control.



Abad-Campos, P.133  
Abadías, M. 22  
Abelleira, A.154  
Achón, M.A. 85, 113, 203  
    Agiño, L.68  
    Aguilar, J.M.62, 193  
Aguilar, M.I.36, 120, 139, 217  
    Aguilera A. 100  
    Aguín, O.80, 121, 257  
    Aizpún M.T.153  
    Akhtouch, B.239  
Al salimiya, M.188, 189  
    Alcántara, E.188  
Alcázar, A.41, 169, 204, 207  
    Alcoverro, T. 273  
    Alemany, A.235  
    Alemany, J.19  
    Aleza, P.91  
    Alioto, D.105, 115  
    Alonso, M.64, 98  
    Alonso, R.235  
    Altabella, N.213  
    Álvarez, A.36, 120, 260  
    Álvarez, B.38  
    Álvarez, J.M.170  
    Alvarez, S.237  
    Alves, F296  
    Amari, K.195  
Andrés, M.F.191, 235, 236  
    Aparicio, F.97  
    Aramburu, J.87, 164  
    Aranda, J.M.285  
Aranda, M.A62, 74, 116, 166,193, 207  
    Ariño, J.87  
Armengol, J.26, 35, 122, 124, 141,  
    187, 220, 221, 222, 232  
    Arnedo M.S.101, 196  
    Arquero, O.144  
    Arrebola, E.177  
    Arroyo, R.9, 198  
    Asensi, M.J.141  
Asensio C. 153, 161  
    Ávila, A.123  
Avilés M.53, 218, 262,264, 276  
    Ayala, J290  
    Azcón-Aguilar, C.58  
    Azpilicueta, A.258  
Badal, J.35, 141, 187, 232  
    Badosa, E.19

Bajo, J.127  
Ballester, A.R.76  
Ballester-Olmos, J.F.91  
Barberá, S85, 113  
Barbosa, C.J.165  
Barceló Muñoz, A.118, 279  
Barceló, N.131, 134, 169, 208, 209, 245, 275  
Barea, J.M. 58  
Barrau, C.259, 286, 287, 293  
Barrera, C.M.139  
Barros. T. S.L.4  
Basallote Ureba M. J.57, 265, 289  
Batlle, A.150, 213, 215  
Bejarano Alcázar, J.219, 227, 229, 263  
Belmonte, A.27, 95, 100, 106, 211  
Beltrán, C.275  
Beltrán, R.26, 220, 221, 222  
Bello, A.245  
Benítez Y73  
Berdiales, B.62  
Berenguer J.J.36, 260  
Bernal Muñoz, J.J.116  
Bernardos, A.212  
Bertaccini, A.156, 157, 158  
Bertolini, E.3, 88, 91  
Bielza, P.125, 207, 208, 209, 275  
Bilotti, G.181  
Biosca, E. G.38, 151  
Blanco, C.286, 287  
Blanco, I.238  
Blanco, R.247, 262, 264, 267, 276, 301, 302  
Blanco, V. 157  
Blanco-López M. A42, 48, 132, 183, 261, 224  
Blanco-Urgoiti B. 196  
Bloemberg, G.V.69  
Bonaterra, A.68  
Bonet, A248  
Bongue, D.263  
Borja, M64, 98  
Borrero, C.53  
Botella, F.109  
Botti, S.156  
Buitrago Cobo, D.92  
Buraschi D.102  
Burón, M.283  
Cabaleiro, C.90, 94, 147, 210, 237  
Caballero JL73  
Caballero, J.M.183  
Cabrefiga, J.242

Cabrera, J.57  
Cadahía Bielza, J. I.6  
Calvet, C.248, 249  
Cambra, M.3, 21, 88, 91, 155  
Cambra, M.A.101, 112, 216  
Campelo Rodríguez, M. P.92  
Camprubí, A 248, 249  
Candela, M. E.181, 243  
Cano, A.209  
Cano, M.27, 95, 100, 106, 211  
Carazo, G.148  
Carcelén E.90  
Carrasco Ballesteros, S162  
Caruso, P.38  
Casquero, P.A.299  
Castaño, A.192  
Castellvell, D.203  
Castillo, P.56, 162, 264, 267, 276, 301, 302  
Castillo, S.218  
Castro, S.148, 173  
Cátedra M.M.298  
Cazorla, F.M.69, 75, 177, 225, 292  
Cenis, J.L.169, 193, 198, 207, 209  
Cifuentes, D. 198  
Climent, F.214  
Codina, J.C.75  
Collado Romero, M.80, 124  
Conci V.103  
Conci V.C.102  
Conde, M104  
Contreras, J.125, 208, 209  
Córdoba, M. C.93, 107  
Corpas, C.57, 265  
Cortés Barbero, J.129  
Costa, E.22  
Couceiro, C.237  
Covelli, L.79  
Crescenti, A. 164  
Cuadrado I.M.27, 86, 89, 95, 100, 106, 220, 211  
Cunha, L.C.V.172  
Chao, J.A. 94  
Chebâani, M.264, 267, 276, 301, 302  
Christen, R.155  
Dally, E.E.4  
Dapena, E.185  
Davis, R.E.4  
De Blas, C.205  
De Cal A.13, 67, 182, 272, 277, 285, 294  
De los Santos, B.259, 286, 287, 293

De Miguel, A.91  
De Oliveira, R.190  
De Vicente A.69, 75, 177, 225, 292  
Del Monte, J.P.212  
Del Moral, E.177  
Del Pino, D.225  
Del Río, C.183  
Delibes A.191  
Di Serio, F.79  
Diáñez, F.264, 267, 276, 301, 302  
Díaz Hernández, S.270  
Díaz, J.A.74, 166  
Díaz-Ruíz, J.R.40  
Dicenta F49, 174  
Díez, J.A.10  
Diez, J.J.70, 126, 127, 137, 138, 184, 268, 296  
Diez-Navajas, A.M167  
Domínguez Correa, P.128, 270, 271  
Domínguez, J.239  
Donat, V.77  
Dorado G73  
Ducasse D.102  
Duque, M.205  
Duran-Vila, N.45, 115, 165  
Egea,-Gilabert, C.181  
El Bakali, M.A.234  
Elvira-Recuenco, M.182  
Erickson, J.C. 295  
Escobar, I. 260  
Espárrago, G.238  
Espí, E.20  
Estaún, V248, 249  
Esteban, O.21  
Expósito Segovia, M.D.291  
Ezparza, M. 185  
Ezziyyani, M.243  
Farrand, S.K.244  
Fereres, A.175, 205  
Fernández, A.293  
Fernández, M.70, 268  
Fernández, P.41, 204, 245  
Fernández-Martínez, J.M.239  
Ferreira, J.J.152  
Ferrer, F.221  
Firrao, G.150  
Flores, R.79, 149  
Font, I.93, 99, 206  
Fraga, M.64  
Fraile, A.10,63, 166, 176, 212

Francés, D.125  
Francés, J.68  
Franco, M.62  
Fresno J. 103, 104  
Gaju, N.19  
Galeano, M.17, 54  
Galipienso, L.194  
Gallego, E.269, 295  
Gallo Llobet, L.128, 270, 271  
Gandía, M.45  
García Ciudad A.142, 143, 233  
García Criado B.9, 142, 243, 233  
García de Oteyza, J.88  
García Figueres, F.26, 249  
García Luque, I. 171  
García, A.214  
García, J.A.21  
García, L.58  
García, M.150, 260  
García-Andrés, S.11, 20, 96, 227  
García-Arenal F.10, 63, 176, 212  
García-Benavides, P37, 129, 154  
García-Calvo, L.147, 237  
García-Jiménez, J.26, 35, 122, 124,133, 141, 187, 220, 221, 222, 232  
García-Rellán, D.35  
Gardan, L.. 155  
Gea, F.J. 262, 264, 297, 301  
Gell I.13  
Gil Ortega R.101, 196  
Gil, L.46, 283  
Gilberstson, R.L.161  
Giménez-Jaime, A.124, 220  
Gómez, J.36, 120, 139, 217, 260,  
Gómez, V. M<sup>a</sup>.159, 160  
Gómez-Bernardo Villar, E.92  
Gómez-Colmenarejo M191  
Gómez-Guillamón, M.L.62  
González Candelas, L.47, 76  
González González, S.271  
González Torres, R.250  
González, A.245  
González, A. J25, 152, 163  
Gorris, M.T.21, 88, 91, 155  
Gosálvez, B.168  
Grande, M. 293  
Guerrero, M.M.131, 134, 169, 207,  
208, 209, 245, 275  
Guerra, J.50, 89, 105, 112, 194, 206  
Guevara, M.A.171

Guijarro B.67, 272  
Guío, A.78  
Guirado, M.L36, 120, 139, 217  
Guirao, P.131, 245, 275  
Gutiérrez, F.130  
Handizi, A.240  
Harper, K.99  
Hegazi, M.243  
Hernández Hernández, J.M117, 118, 273, 274  
Hernández, C.61, 79, 98, 192  
Hernández-Gallardo, M.D.169, 193, 207, 208, 209  
Herranz, M.C.97  
Herrera López, M.T140  
Herrero, J.R.50  
Hervás Vargas, A.227  
Hinarejos, C.28, 135  
Hita, I.208, 209  
Ibeas, F.268  
Iglesias, C.297  
Iglesias, I.186  
Ivars, P.98  
Jaco, R.148  
Jaizme-Vega, M.C.246, 274  
Janssen, D.27, 86, 89, 95, 100, 106, 110, 211

Jiménez Díaz, R. M.5, 12, 124, 162,  
227, 228, 229, 263

Jiménez Gasco, M. M . 12  
Jordá, M. C.93, 99,107, 108, 206, 208, 209  
Juárez, J.91  
Juárez, M.93, 113, 203  
Keller, H.99  
Lacasa, A.41, 107, 125, 131,134, 169, 193,  
204, 207, 208, 209, 245, 275, 302  
Lafuente, M.T.76  
Lanau, J.M.158  
Landa, B. B.18  
Lapeña, I.28  
Lara, A.265  
Larena I.67, 272, 277  
Larenas J.173  
Lastra, B.147  
Laviña, A.213, 215  
Ledó, C.222  
Legorburu, F. J.99, 167, 240, 241  
Lesemann D-E.106  
Liney, M. 99  
Liñán, M.67, 278  
Lopes, J.R.S.,175  
López Abella, D.40

López García, B.47  
López Herrera, C.J.279, 280, 281, 289  
López, L. 151  
López, M.113  
López, M.M.38, 77, 88, 151, 154, 155, 214, 244  
López, R.153, 161  
López, V.210  
López-Braña I 191  
López-Escudero, F. J.42, 48, 132, 183, 224  
López-Moya, J.J.40  
López-Solanilla, E.78  
Lorca, A.,168  
Lorenzana de la Varga, A.92  
Lorenzo, J. L. 186  
Lores, M.210  
Loureiro, B.121, 180, 257  
Lucas Caetano, P.C.223  
Lugtenberg, B.J.J.69  
Luis Arteaga M.101, 112, 113, 170, 196  
Lunello P.102, 103, 114  
Llácer, G.111  
LLama-Palacios, A.78  
Llinares, F.266  
Llobell A.258  
Llop, P.77, 155  
Llorente I.216, 300  
Malfitano, M.79, 115  
Malpica, J.M.10, 63  
Mallor C.101, 170  
Mansilla C.103, 104  
Mansilla, J. P. 121, 180, 257  
Maranhão, E. H.A.55  
Marco, C.F.40, 62, 116  
Marco-Noales, E.38  
Marcos J.F.47, 76  
Marhuenda, A.109  
Mari, M. 68  
Marín, A.241, 269  
Marin, M. 282  
Marquínez, R. 167  
Martí, M.164  
Martín B.210  
Martín, G89, 211  
Martín, J184  
Martín, J. A.46, 283  
Martín, M.P.156, 157, 158, 234  
Martín, P70, 184, 268  
Martín, S.105, 151  
Martin-Bretones, G.27, 86, 95, 100, 106, 110

Martínez Zapater, J.M. 9  
Martínez, A.268  
Martínez, F.218  
Martínez, J.A.125  
Martínez, M.A.131, 134, 207, 208, 209, 245, 275  
Martínez, M.C.21, 88, 91, 131, 275  
Martínez, R.120  
Martínez-Beringola, M.L.285  
Martínez-Bilbao, A.185  
Martínez-Calvo, J.111  
Martínez-Culebras, P.V.133  
Martínez-García, B.40  
Martínez-Gómez P.49, 174  
Martínez-Priego, L.I.107, 108  
Martínez-Treceño, A.285  
Martínez-Zapater, J.M. 198  
Martos-Moreno C.42, 48, 132, 183, 224  
Marzal, J.I.91  
Masalles, R.158  
Mateo-Sagasta, E.39  
Mauri, M. C.53  
Mayo, M. A.99  
Medina, V.113, 203  
Melero Vara J.M.57, 217, 239, 265, 289, 284  
Melgarejo P. 13, 67, 182, 272, 277, 278, 285, 294  
Mendoza, M.C.25  
Mercado Blanco, J.32, 80, 124  
Miguel, M.41, 169, 204  
Milne, R.G.105  
Mira, J.L.28, 135  
Molina Galdeano, M.171  
Molinero, L.57, 265  
Molowny, A F.126  
Monci, F.11, 20, 96  
Montes F.149  
Montes M.196  
Montes M.J.191  
Montesinos, E.19, 68, 179, 216, 242, 300  
Montojo, O. 179  
Montón, C.26, 151, 158  
Moragrega, C.179  
Moreno, A.205  
Moreno, C.19  
Moreno, D.125  
Moreno, I.M.10  
Moreno, P.50, 89, 105, 112, 194, 206  
Moret, A.234  
Moretti, A.122  
Moriones, E.11, 20, 96, 166



Muñoz-Blanco J73  
Murillo J. 153, 161, 178, 185  
Mwanza, C. 261  
Nadal, M.234  
Nagata, A. I. 172  
Navarro, E.29  
Navarro, J.A.109  
Navarro, L.91, 165, 194  
Navarro, M.J.262  
Navarro, R.130  
Navas Cortés, J. A.14, 55  
Navas-Castillo, J.11  
Nebreda, M.205  
Nico, A.I.56  
Nieto, C.74  
Nuñez, Y.114  
Oger, P.244  
Oguiza, J.A.178  
Olalla, L.225  
Olea, F.177  
Olivares García, C.124  
Olmos, A.3, 88  
Oltra, E.293  
Oller, J.L.293  
Oncina, M41, 131, 204, 275  
Ordovás, J.53  
Oria, JA296  
Ornat, C.17, 54  
Ortega, M. G.149  
Ortíz, V.29  
Osorno, O126  
Pajares, J.A.70, 137, 268  
Palomo, J. L37, 154  
Paltrinieri, S.156  
Pallas, V.97, 109, 168, 195  
Pando, V296  
Parrilla Araujo, S.32, 80  
Pascual, S.40  
Peña, L.21  
Peñalver, J.155  
Peñalver, R.88, 214, 244  
Pérez Jiménez, R. M.279, 280, 281  
Pérez Payá, E.47  
Pérez, C.M.125  
Pérez, F.91  
Pérez-Artés, E.31, 162, 219  
Pérez-García, A.69, 75, 177, 225, 292  
Pina, J.A.165  
Pinochet J.49, 248

Pintos, C.121, 180, 257  
Piñeiro, A.90  
Piquer, J.244  
Ponz F.103, 104, 114, 196  
Porras Alonso, R.228  
Porras Piedra, A.231, 288  
Porras Soriano, A231, 288  
Porras, M.286, 287  
Poza-Carrión, C.78  
Prados Liger A.M.57, 265, 284, 289  
Pujol, M.19  
Pulido, I. 238  
Quesada, J.M.214  
Ragozzino, A.79, 115  
Ramírez, M.C.290  
Ramon, J.113  
Raposo, R.226  
Ratti. C.85  
Raya Ortega, M.C.183, 291  
Recio D.57  
Redondo, C.39  
Reinoso, B.197  
Requena, A.243  
Resende, R.O4, 172  
Rey Feijoo, S. 140  
Rico, A.153, 178  
Rico, P.61  
Rivera, C.148  
Rivera, E.225  
Rivera, M.E.75, 292  
Roa, E.163  
Rodríguez Fernández-Alba, J.R.116  
Rodríguez Jurado, D.58, 80, 227, 228, 263  
Rodríguez- Morcillo, V.229  
Rodríguez Pérez, A.128, 270, 271  
Rodríguez Romero, A.S.246, 274  
Rodríguez, A.258  
Rodriguez, M.77  
Rodríguez-Cerezo, E.62  
Rodríguez-Palenzuela, P.78  
Roehorst JW.106  
Román F.258  
Romero A.196  
Romero MD191  
Romero, C.111  
Romero, D.225, 292  
Romero, F.259, 286, 287,293  
Romero, J. 29, 148, 173  
Romero, M.A.30, 130

Romo Vaquero M.142, 143, 233  
Ros, C.131, 245, 275  
Roselló, M.155  
Rosende O.90, 94, 237  
Ruano Rosa, D.280, 281  
Rubies-Autonell, C. 85  
Rubio M.49, 174  
Rubio, F.266  
Rubio, L.50, 89, 112, 194, 206, 243  
Rubio, V.266  
Ruiz de Galarreta, J. I.167  
Ruiz, E.185  
Ruiz-García, L.27,86, 89,95, 100, 106, 110, 211  
Ruiz-Villar, M.46  
Ruz Carrillo, A.31  
Ruz, L.179, 216  
Sabadell S.117, 118, 273  
Sabaté, J.215  
Sabuquillo, P.294  
Sacristán, S.63, 212  
Sagrario J.101  
Sáinz, M.J.257  
Salas, F.J.S.175  
Salcedo, C.I.214, 244  
Salto, T.285  
Sanchez F.103  
Sánchez Hernández, M.E.223  
Sánchez Ramírez, C.V.144, 251  
Sánchez, F.114  
Sánchez, J.269, 290, 295  
Sánchez, J.A. 41  
Sánchez, J.E.119, 130, 136, 230  
Sánchez, M.E.30, 119, 130, 136, 230  
Sánchez-Campos, S.11, 96  
Sanchez-Pina, A.109  
Sánchez-Pina, M.A.168, 195  
Sánchez-Torres P.76  
Sandoval, C.173  
Santamaría, O.137, 138, 296  
Santos, M.247, 262, 264, 267, 276, 301, 302  
Sanz, N.35, 187  
Sarrió, J, 50  
Sastre, P.109  
Schots, A.99  
Segarra, J.203  
Segundo, E.27, 86, 89, 95, 100, 106, 110, 211  
Segura, R. 303  
Serra, J.91  
Serra, M.T.171

Serrano, M.57  
Serrano, R.F. 148  
Serrano, Y.139  
Sinobas, J. 262, 264, 267, 297  
Siverio de la Rosa, F.128  
Solís I.298  
Solla, A.46, 283  
Soriano Martín M. L231, 288  
Sorribas, F.J.17, 54  
Suárez Bonnet, E. 284  
Sutra, L.178  
Tamargo, O.258  
Teixidó, N.22  
Tello, J.C.134, 159, 160, 198, 218, 247,  
262, 264, 267, 276, 297, 301, 302  
Tello, M.L.39  
Torés, J.A.225  
Torné, L.26  
Torres, E.156, 157, 158  
Torres, V.104  
Tourriño, A.114  
Trapero Casas, A.30, 73, 119, 123, 130, 136, 144, 188, 189, 190, 223, 230, 291, 303  
Trapero Casas, J. L.14, 32, 228  
Trillas, I.264, 276  
Troya, M.T.266  
Tuset, J.J.28, 135, 282  
Urrutia, M<sup>a</sup>.T.159, 160  
Usall, J.22  
Valenciano, J.B.197, 299  
Valenzuela, J.L.247  
Valverde Corredor, A.32  
Vázquez de Aldana B.R.142, 143, 233  
Vázquez Ruíz-de Ocenda, R.A.140, 186  
Velasco, L.27, 86, 89, 95, 100, 106, 110, 211  
Venegas, J.30  
Verdejo C. 57  
Verdejo-Lucas, S.17, 54  
Verhoeven JThJ.106  
Vetten, J.29  
Veyrat, A.47  
Vicent, A.26, 35, 122, 141, 187, 220, 222, 232  
Vicente, D.176  
Vila, A.158  
Vilardell P.300  
Vilarriño, A.257  
Villada, D296  
Villaescusa, J.264, 267, 276, 301, 302  
Villarreal, M.266  
Viñas, I.22

Vives, M.C.194  
Vivian, A.178  
Vivo, J.M<sup>a</sup> 181  
Yélamos, J.134, 264, 267, 276, 301, 302  
Zabalgogezcoa I.9, 142, 143, 233  
Zea Bonilla, T.279, 280, 281  
Zuriaga, P.151