



## PLANT QUARANTINE TODAY

**I.M.Smith**

*Director-General, OEPP/EPPO, 1 rue Le Nôtre, 75016 PARIS, France*

Some of the most serious plant diseases are caused by pathogens which are introduced from other continents. Such pathogens may cause devastating epidemics initially and, when they are brought under control, become major targets for plant protection measures. Plant quarantine has been the classical means of preventing introduction, either by prohibition of international movement of host plants or by the imposition of more or less severe restrictions. However, such measures are barriers to international trade and therefore conflict with the needs of the international market in plants and plant products, and with the objectives of the World Trade Organization. The WTO recognizes that phytosanitary barriers are justified in many cases, but in the establishment of its recent SPS agreement (agreement on sanitary and phytosanitary measures) lays down rules for such justification. The International Plant Protection Convention (IPPC) provides the basis for cooperation between countries in preventing the spread of plant pests, especially through the system of phytosanitary certificates delivered by exporting countries. The IPPC also tries to avoid the imposition of unjustified barriers by requiring that measures should be based on phytosanitary considerations (but without specifying any criteria). The SPS agreement and the latest revision of the IPPC now provide the system of "pest risk analysis" (PRA). Exotic pathogens are evaluated for the risk which they present to an importing country: whether host plants are present, whether the climate is suitable for establishment, whether the amount of damage could be expected to be significant. Any measures taken to prevent entry should then be commensurate with the risk arising from specific pathogens ("quarantine pests"). In other words, measures should be no more stringent than is necessary. If appropriate, the measures should follow requirements international standards (which, according to the SPS agreement, have to be developed by the IPPC Secretariat of FAO, in cooperation with the regional plant protection organizations such as EPPO). The SPS agreement also seeks to avoid measures which discriminate between exporting countries: if the risk is the same, the measures should be the same. Many of the quarantine requirements which are currently in place do not meet these standards, and the plant quarantine authorities of countries around the world are actively considering how the new standards can be applied in practice.

Greater freedom in international trade has had other consequences. Groups of countries around the world, like in particular the European Union, have established common markets, requiring common phytosanitary systems. In the case of the EU, the "single market" sets special constraints on the possibilities for plant quarantine: free movement of commodities throughout the EU with no barriers at frontiers. As a result, EU countries have to cooperate in protecting the EU as a whole, while losing some of the possibilities which previously existed for their individual protection. Increased international trade also means that much larger quantities of plants are now being traded between continents, including species which previously were hardly traded at all. Not all the pests which they carry are quarantine pests but, especially in the case of valuable planting material, high standards may be required for general phytosanitary condition. The SPS agreement allows for the fact that, if a country fixes certain standards for nationally produced planting material (e.g. through a certification scheme for virus-tested material), it should be able to apply the same standard for imported material. This opens up new possibilities for unjustified trade barriers, and the revised IPPC has created a new concept of the "regulated non-quarantine pest", which also has to be justified by PRA. Thus, modern plant quarantine has moved away from the old philosophy of preventing catastrophic introductions, to one of ensuring that plants moving in international trade are healthy and safe, according to international standards.

## **ALTERNATIVES TO METHYL BROMIDE FOR THE CONTROL OF PLANT DISEASES: HYPOTHESIS AND IMPLEMENTATION.**

**James J. Stapleton**

*Statewide Integrated Pest Management Project, University of California, Kearney Agricultural Center, Parlier, CA 93648, USA*

With the impending phase-out of methyl bromide (MB) as a soil fumigant, intensive efforts are underway around the world to develop and implement suitable replacement strategies. One of the difficulties in replacing MB is that the compound is a very effective, broad-spectrum biocide useful for control of many fungal, nematode, insect, and weed pests in field, greenhouse, nursery seedbed, and other operations. In addition to controlling major soilborne pathogens and pests, soil fumigation with MB frequently provides increased crop growth and yield response. Although the bases for these increases remain unclear, control of minor pathogens and liberation of soluble mineral nutrients are among mechanisms thought to be involved.

Because of the advantageous properties and near-universal efficacy of MB, it is becoming clear that there are few, if any, alternatives that can directly replace it for soil fumigation under a wide variety of environmental conditions and for a broad spectrum of pathogens. There are a few proven and currently available, broad-spectrum, soil disinfection strategies which, when used under optimal conditions, can provide pathogen control efficacy similar to that of MB. These alternatives include fumigant chemicals such as metam sodium, and physical methods including soil steaming and solarization. Other alternatives are available which have a more narrow range of application conditions, or of target organisms controlled. These include many fungicides, bactericides, and nematicides; host plant resistance or plant grafting; certain antagonistic microorganisms, botanical extracts, and other soil amendments for biological control; and physical and cultural control practices such as crop rotation, fallow, flooding, hot water, etc.

Many other possible alternatives have been proposed or are being investigated, including new fumigant chemicals (e.g. methyl iodide), and other physical, cultural, and biological strategies. However, most of these do not provide consistent or adequate pathogen control, have excessively narrow ranges of application, have not been thoroughly tested, are not feasible or economical for commercial use, or otherwise are not currently useful.

Although new products and techniques for managing soilborne pathogens will be developed, under many circumstances, it will be necessary to adopt an integrated approach, consisting of an arsenal of diverse physical, chemical, and biological control strategies. Such an IPM approach will require growers and pest control specialists to have increased knowledge of damage thresholds levels and of their particular agroecosystem. Current and developing alternatives will be discussed.

## **SYSTEMIC ACQUIRED RESISTANCE OF PLANTS: A NEW DISEASE CONTROL TECHNOLOGY BETWEEN GENETIC RESISTANCE AND FUNGICIDES**

**T. Staub, M. Oostendorp, U. Neuenschwander and W. Ruess**

*Novartis Crop Protection AG, Basel, Switzerland*

Plants can be induced to become more resistant to diseases by prior localized infections by necrotizing pathogens or non-pathogens. This process of systemic acquired or activated resistance (SAR) occurs in nature often but sporadically whenever plants are infected with certain pathogens. It complements the preformed and localized active defense mechanisms that make plants resistant against most pathogens. The characteristics of SAR are a lasting protection against a wide spectrum of pathogens that includes fungi, bacteria and viruses. The protection is accompanied by the appearance of plant-species-specific PR proteins in the protected parts. At Ciba (now Novartis), derivatives of isonicotinic acid (INAs) and of benzthiadiazoles (BTHs) were identified that at very low rates, mimic the biological activation of SAR. These activators show the same wide spectrum of protection and cause the same biochemical changes in the protected parts as the biological activation. In addition, they show no direct activity against the pathogens themselves.

Experiments with tobacco and *Arabidopsis* indicated that salicylic acid (SA) plays a central role in the expression of SAR in the protected leaves. In plants that are unable to accumulate SA, SAR cannot be induced biologically and normally resistant plants become more susceptible. They do however, still respond to treatments with the INAs and BTHs. Grafting experiments showed that SA is most likely not the systemic signal, but that it is necessary to initiate the induced state in the protected leaves and for genetic resistance to be expressed. *Arabidopsis* mutants were found that lost the ability to be induced by biological and chemical inducers. These results indicate that the BTHs and the INAs mimic biologically induced SAR as functional analogues of SA.

In field trials, treatments with the BTH compound CGA 245704 resulted in activated resistance at very low rates of 10 to 50 gr. ai / ha against fungal, bacterial and viral pathogens. Best results under field conditions have been achieved on wheat, rice tobacco and some vegetables and fruits. While 7-10 day intervals gave best results on dicots, on monocots long-lasting protection of 6-8 weeks is possible with single treatments at the same low rates. Treatments with CGA 245704 have to be applied protectively to allow time for the activation process. Where short term or kickback action is required, CGA 245704 can be mixed with fungicides.

CGA 245704 offers an additional option for the farmer to protect his crops against diseases, an option between genetic resistance and the use of fungicides. If integrated properly in plant health management programs, it can prolong the useful life of both the resistance genes and the fungicides presently used. CGA 245704 activates the SAR process in a more controlled way regarding the level and the timing than the sporadic biological activation in nature. It helps the plants to respond more quickly to pathogen attack, very much like resistance genes do. But unlike resistance genes it does so not only against single pathogen races, but to a higher or lower degree against most pathogens attacking a certain crop.

## **VIRUS-RESISTANT TRANSGENIC PLANTS: BENEFITS AND POTENTIAL RISKS**

**Marc Fuchs**

*Department of Plant Pathology, Correll University, NYSAES, Geneva, NY 14456, USA. Present address: INRA, Laboratoire de Pathologie Végétale, 28 rue de Herrlisheim, 68021 Colmar, France.*

The concept of pathogen-derived resistance (Sanford and Johnston, 1985) has recently opened new avenues for the development of virus-resistant plants. Since the first report of Powell-Abel et al. (1986) who showed that transgenic tobacco plants expressing the coat protein (CP) gene of tobacco mosaic tobamovirus (TMV) were protected from infections by TMV, pathogen-derived resistance has been applied to numerous viruses and a range of crop plants (Fuchs and Gonsalves 1997).

Virus-resistant transgenic cucurbits (squash) (Tricoli et. al., 1995) and fruit trees (papaya) (Lius et. al., 1997) have been deregulated and commercially released in the United States. These transgenic crop plants express single (papaya) or multiple CP genes (squash), and are resistant to single and mixed virus infections, respectively. The field performance of commercial virus-resistant transgenic plants will be presented and discussed.

Environmental safety issues associated with the commercial release of virus-resistant transgenic crop plants have been expressed (Tepfer 1993). These issues are currently extensively debated, however, very limited information on risk assessment is available from field studies. We evaluated under field conditions the potential environmental impact of heterologous encapsidation, recombination, and gene flow associated with virus-resistant transgenic squash. Our results will be presented and discussed in relation to balancing benefits and risks.

### References

- Fuchs, M. and Gonsalves, D. 1997. Genetic engineering. In: Environmentally Safe Approaches to Crop Disease Control. Rechcigl, N.A. and Rechcigl, J.E. (eds), CRC Lewis Publishers, Boca Raton, pp. 333-368.
- Lius, S., Manshardt, R.M., Fitch, M.M.M., Slightom, J.L., Sanford, J.C. and Gonsalves, D. 1997. Pathogen-derived resistance provides papaya with effective protection against papaya ringspot virus. *Molecular Breeding* 3:161-168.
- Powell-Abel, P., Nelson, R., S., De, B., Hoffmann, N., Rogers, S.G., Fraley, R.T. and Beachy, R.N. 1986. Delay of disease development in transgenic plants that express the tobacco mosaic virus coat protein gene. *Science* 232:738-743.
- Sanford, J.C. and Johnston, S.A. 1985. The concept of pathogen-derived resistance – Deriving resistance genes from the parasite's own genome. *Journal of Theoretical Biology* 113:395-405.
- Tepfer, M. 1993. Viral genes and transgenic plants. What are the potential environmental risks? *Bio/Technology* 11:1125-1129.
- Tricoli, D., Carney, K.J., Russell, P. F., McMaster, J.R., Groff, D.W., Hadden, K.C., Himmell, P.T., Hubbard, J.P., Boeshore, M.L., Reynolds, J.F. and Quemada, H.D. 1995. Field evaluation of transgenic squash containing single or multiple virus coat protein gene constructs for resistance to cucumber mosaic virus, watermelon mosaic virus 2, and zucchini yellow mosaic virus. *Bio/Technology* 13:1458-1465.

## **A1.1 DETECCIÓN DE “PEACH LATENT MOSAIC VIROID” EN NUEVAS INTRODUCCIONES DE MATERIALES EXTRANJEROS DE MELOCOTONERO**

Badenes M.L., Martínez-Calvo J., Llácer G.

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

En los últimos años, los diversos sectores valencianos implicados en la producción y comercialización de fruta dulce (viveristas, fruticultores cooperativas) han sentido la necesidad de renovar la estructura varietal de los cultivos frutales, lo que ha creado una gran demanda de nuevos cultivares que, en la actualidad, sólo los obtentores extranjeros pueden satisfacer. Por otra parte, el movimiento de plantas de unos países a otros implica siempre el riesgo de introducir nuevas enfermedades. En particular, los patógenos que pueden viajar dentro del material vegetal sin síntomas externos, como los virus y patógenos similares, plantean riesgos especialmente importantes.

Para poner de manifiesto la necesidad de establecer controles adecuados, tanto de los materiales introducidos del extranjero como de la producción viverística autóctona, se analizaron sucesivamente dos colecciones de melocotoneros, la primera formada por 129 variedades importadas por viveristas en los últimos 10 años y la segunda integrada por 34 cultivares directamente importados por nosotros en 1997. En ambos casos, la procedencia de las variedades era Estados Unidos e Italia, con gran predominio del primer país, y el patógeno buscado era el viroide causante del mosaico latente del melocotonero (“peach latent mosaic viroid” o PLMVd). Los síntomas de esta enfermedad en las variedades comerciales son retrasos en la brotación, floración y maduración (de 4 a 6 días), frutos algo deformados, con grietas en la sutura y menos coloreados en algunos cultivares y, de modo más general, un envejecimiento prematuro de los árboles, a partir del 5º año, con necrosis de muchas yemas vegetativas que producen defoliaciones importantes. El nombre de mosaico latente del melocotonero se refiere a la ausencia o rareza de síntomas en hojas, especialmente en los ensayos de transmisión por injerto en invernadero utilizados para el diagnóstico de virus de frutales. La metodología utilizada en este trabajo para la detección del PLMVd fue una hibridación molecular no isotópica recientemente descrita.

Los porcentajes de infección encontrados fueron del 85 % y el 26,5 % respectivamente. Al investigar la causa de cifras tan dispares, uno de los factores que apareció como más importante fue la práctica habitual entre los viveristas que, para ganar tiempo, injertan yemas de varios cultivares recién introducidos sobre un árbol adulto, con lo cual basta que uno sólo de los cultivares (o el árbol utilizado como patrón) esté infectado para que todos ellos se contaminen.

## **A1.2 INCIDENCIA DEL CLOSTEROVIRUS CYSDV EN CULTIVOS DE PEPINO Y MELON DE INVERNADERO Y TRANSMISION POR DISTINTOS BIOTIPOS DE *BEMISIA TABACI***

Benjamín Berdiales (1), Juan José Bernal (1), Ana Célix (1), Francisco Beitia (2) y Emilio Rodríguez-Cerezo (1).

(1) *Centro Nacional de Biotecnología (CSIC) Cantoblanco, 28049 Madrid (Tel. 5854534).* (2) *CIT-INIA, Area de Protección Vegetal, Ctra. Coruña km 7, 28040 Madrid.*

Los cultivos protegidos de pepino y melón del sudeste español están afectados por la enfermedad del amarilleo. Dos closterovirus transmitidos por mosca blanca se han asociado a esta enfermedad en España: cucurbit yellow stunting disorder virus (CYSDV), transmitido por la mosca blanca del tabaco (*Bemisia tabaci* Genn), y un virus relacionado con beet pseudo-yellows virus (BPYV), transmitido por la mosca blanca de los invernaderos (*Trialeurodes vaporariorum* Westwood). La resistencia genética descrita en cucurbitáceas para la enfermedad del amarilleo es específica de virus, por lo que se hace necesario el conocimiento de la incidencia relativa de estos closterovirus en cada zona de cultivo. Hemos desarrollado un ensayo basado en la técnica de RT-PCR capaz de detectar específicamente CYSDV y BPYV en muestras de hojas infectadas. Esta técnica se ha usado para realizar un diagnóstico de muestras de cucurbitáceas con síntomas de amarilleo obtenidas de invernaderos entre los años 1994 y 1997. Los resultados muestran que BPYV, presente en la zona desde finales de la década de los 70, ha sido desplazado casi por completo por CYSDV. Este resultado concuerda con la presencia de *B. tabaci* como la mosca blanca predominante en los invernaderos españoles. Se muestra, asimismo, que más de la mitad de las plantas de melón recogidas no estaban infectadas con ninguno de los dos virus, lo que sugiere una alta incidencia de carencias nutricionales u otros desórdenes fisiológicos en este cultivo. Para comprobar la posible presencia de otros virus causantes de amarilleo en cucurbitáceas, en las muestras de melón se realizaron ensayos de western blot contra el closterovirus lettuce infectious yellows virus (LIYV) y el luteovirus cucurbit aphid-borne yellows virus (CABYV), siempre con resultados negativos. CYSDV ha sido detectado también por primera vez en una muestra de calabacín y en muestras de pepino de otros países mediterráneos. Se ha estudiado también la capacidad de transmitir CYSDV de dos biotipos de *B. tabaci* presentes en España. Los resultados han mostrado que tanto el biotipo "B", presente en todo el mundo, como el biotipo "Q", específico de España y Portugal, son capaces de transmitir CYSDV con la misma eficiencia.

### **A1.3 DETECCIÓN SIMULTANEA DE CINCO VIRUS DIFERENTES DEL CLAVEL MEDIANTE HIBRIDACION MOLECULAR NO RADIOACTIVA.**

J.A. Sánchez-Navarro<sup>1</sup>, M.C. Cañizares<sup>1,2</sup>, E. Cano<sup>2</sup> y V. Pallás<sup>1</sup>

(1) *Departamento de Mejora y Patología Vegetal, CEBAS (CSIC), Apartado Correos 4195, 30080 Murcia* y (2) *Barberet y Blanc S.A., Apartado Correos 38, 30890 Puerto Lumbreras (Murcia)*

El clavel es uno de los principales contribuidores al mercado de la flor cortada en todo el mundo, multiplicándose normalmente mediante propagación vegetativa. Su cultivo se ve particularmente afectado por una serie de enfermedades de etiología viral que limitan de manera muy significativa su comercialización. Estas enfermedades se caracterizan por ocasionar síntomas muy diversos que van desde moteados, mosaicos, anillos cloróticos y estrías en hojas hasta malformación y rotura del color de las flores. Las virosis más comunes que afectan a dicho cultivo están ocasionadas por los siguientes virus: virus del moteado (CarMV), del anillo grabado (CERV), del moteado de la vena (CVMV), de las manchas en anillo (CRSV), de las manchas en anillo italiano (CIRSV) y latente (CLV).

En la detección de los virus anteriormente mencionados se han venido utilizando procedimientos tanto biológicos como serológicos. Los primeros requieren una extraordinaria inversión en términos de espacio-tiempo mientras los segundos adolecen en ocasiones de una baja sensibilidad y/o limitado espectro de detección de distintos aislados. Nuevas técnicas, especialmente aquellas basadas en la hibridación molecular que utilizan precursores marcados con compuestos no radioactivos se han implementando en los últimos años (ver Pallás y col. 1998 para una revisión). Recientemente hemos puesto a punto un método rápido y fiable basado en la hibridación molecular no radioactiva para la diagnosis rutinaria del CarMV en plantas de clavel (Sánchez-Navarro y col. 1996). Esta metodología se ha extendido a los cinco virus restantes anteriormente descritos y se ha obtenido entre 25-125 veces mayor sensibilidad que los métodos serológicos correspondientes. Además, se han establecido las condiciones para la detección simultánea de los cinco virus que poseen genoma de RNA (todos excepto el CERV) y se ha observado que utilizando este ensayo no disminuye el límite de sensibilidad con relación a la detección individualizada.

PALLAS, V., MAS, P. y SANCHEZ-NAVARRO, J.A. (1998). In: *Plant virology protocols: from virus isolation to transgenic resistance*. Humana Press Inc.G. Foster & S. Taylor eds pp. 461-468.  
SANCHEZ-NAVARRO, J.A., CANO,E. y PALLAS, V. (1996). *Plant Pathology* 45, 375-382.

Trabajo financiado por Proyecto BIO96-0459 de la DGICYT.

#### **A1.4 VARIABILIDAD MOLECULAR DEL VIRUS DE LOS ANILLOS NECROTICOS DE LOS PRUNUS (PNRSV) Y DISCRIMINACION DE AISLADOS MEDIANTE ANALISIS DEL TIPO RT-PCR-RFLP.**

F. Aparicio<sup>1</sup>, M. Arben<sup>2</sup>, B. di Terlizzi<sup>2</sup> y V. Pallás<sup>1</sup>

(1) *Dept. Mejora y Patología Vegetal, CEBAS-CSIC, Apdo. Correos 4195, 30080 Murcia.* (2) *Instituto Agronómico Mediterraneo, Bari (Italia).*

El PNRSV es un virus distribuido por todo el mundo que afecta a la mayoría de los frutales de hueso cultivados. Las pérdidas causadas por el virus varían en función de la especie/variedad de *Prunus* afectada y del tiempo transcurrido desde la infección, pero en general el crecimiento de árboles infectados por el PNRSV se ve reducido aproximadamente en un 30% y el rendimiento entre un 20-56%. El PNRSV es un virus de RNA de cadena positiva con genoma tripartito que pertenece al grupo de los Ilarvirus. Este grupo de virus posee la propiedad exclusiva en la Virología Vegetal de presentar el fenómeno de activación genómica por el cual su genoma necesita de su proteína de cubierta (CP) para ser infeccioso. Este fenómeno esta mediado por interacciones RNA-proteína entre el extremo 3' del genoma y el extremo N-terminal altamente básico de la CP. En el PNRSV y otros ilarvirus existe un dedo de zinc adyacente al motivo rico en aminoácidos básicos (Sanchez-Navarro y Pallás, 1994, J. Gen. Virol.75, 1441-5; Sanchez-Navarro y Pallás, 1997, Arch. Virol. 142, 749-63) para el que se ha postulado también un papel relevante en esta interacción. Hasta la fecha no se ha realizado ningún estudio sobre la variabilidad molecular en este grupo de virus.

En este trabajo se presenta un estudio sobre la variabilidad molecular del RNA 4 subgenómico del PNRSV y de la CP codificada por dicho RNA. Para ello se han obtenido, mediante RT-PCR, los cDNAs correspondientes al RNA 4 de 24 aislados del virus provenientes de distintos cultivares de melocotón, ciruelo, albaricoque, cerezo y nectarina. Estos cDNAs se digirieron con diferentes enzimas de restricción y, mediante el análisis de distancias genéticas, se generó el agrupamiento de los aislados en 3 restrictotipos. Es de destacar que el enzima de restricción Eco RI permitió diferenciar de manera inequívoca a los aislados americanos de los europeos. Posteriormente se eligieron 12 aislados representantes de estos restrictotipos para la determinación de la secuencia completa de su RNA 4. El análisis de dichas secuencias puso de manifiesto una mayor variabilidad en el extremo 5' del RNA y en el N-terminal de la CP. Sin embargo, el motivo rico en aminoácidos básicos así como el dedo de zinc permanecen estrictamente conservados reforzando su papel esencial en el proceso de activación genómica. Por otra parte, el extremo 3' del RNA está altamente conservado sugiriendo un requerimiento específico de la estructura primaria en las interacciones RNA-proteína anteriormente descritas. (Financiado por BIO96-0459).



## **A1.5 PROSPECCIÓN DE NEPOVIRUS EN FRAMBUESO (*Rubus idaeus L.*) EN LA PROVINCIA DE HUELVA.**

Solís Martel, I.

*Centro de Investigación y Formación Agraria "Las Torres- Tomejil".  
Apdo. Oficial. 41200 Alcalá del Río (Sevilla).*

Dentro del género de los Nepovirus existen al menos 5 especies que causan enfermedades de importancia económica en frambueso en diferentes países del mundo. RRV (Raspberry Ringspot Virus) y TBRV (Tomato Black Ring Virus) tienen como vectores a nematodos del género *Longidorus*, mientras que ArMV (Arabis Mosaic Virus), SLRV (Strawberry Latent Ringspot Virus) y ToRSV (Tomato Ringspot Virus) son transmitidos por especies del género *Xiphinema*.

Durante los meses de enero a mayo de 1998 se realizó una prospección para determinar la presencia de estos nepovirus en plantaciones comerciales de frambueso de la provincia de Huelva, principalmente en fincas dentro del triángulo delimitado por las localidades de Moguer, Mazagón y Almonte. El método de diagnóstico utilizado fue la realización del test DAS-ELISA, con anticuerpos policlonales, frente a extractos de hojas de arbustos con y sin síntomas. Los síntomas observados en campo fueron muy variados: enanismos, enrollamientos, abullonados, reticulados, amarillos, moteados, etc, no habiéndose podido relacionar de forma concluyente algún tipo de síntoma con la presencia de una determinada virosis.

Se analizaron 304 muestras recolectadas en 14 fechas diferentes y en ellas se ha detectado la presencia de RRV, ArMV y ToRSV en plantas de las variedades Tulameen y Glen Moy de tres fincas diferentes. En la variedad Glen Prosen se ha detectado la presencia de ArMV y ToRSV, mientras que en Glen Lion sólo se ha encontrado el ArMV. En todos los casos las plantas infectadas mostraban síntomas viróticos y pérdidas de producción de importancia económica, pero falta por demostrar la implicación de los Nepovirus en dichos daños.

Los arbustos que dieron lecturas positivas para alguno de los Nepovirus se han identificado para realizar un seguimiento en el tiempo y en el espacio de la presencia de estas virosis. Resultados preliminares indican que en general la distribución de los virus en los distintos órganos de la planta y en los distintos estados fenológicos es muy irregular.

## **A1.6 PRIMERA DETECCIÓN DEL VIRUS DEL ENANISMO DEL FRAMBUESO (RBDV) EN LA PROVINCIA DE HUELVA.**

Muñoz Noguera C.<sup>1</sup> y Solís Martel I.<sup>2</sup>.

1. *Laboratorio de Sanidad de Vegetal de Sevilla.*

*Crtra. de Utrera nº 9. 41013 Sevilla.*

2. *Centro de Investigación y Formación Agraria “Las Torres-Tomejil”.*

*Apdo. Oficial. 41200 Alcalá del Río (Sevilla).*

El RBDV (Raspberry Bushy Dwarf Virus) es el miembro tipo de la familia de los Idaeovirus, y se encuentra presente probablemente en todos los países del mundo en los que se cultivan especies susceptibles del género *Rubus* (frambueso, frambueso negro, zarzamora). En la provincia de Huelva, donde el cultivo del frambueso se encuentra en expansión con más de 150 Has., no se había realizado ninguna prospección hasta el momento para comprobar la presencia de éste patógeno.

Durante la prospección realizada en la primavera de 1998 para determinar la presencia de nepovirus en plantaciones de frambueso de la provincia de Huelva se observaron plantas de la variedad Tulameen con síntomas de amarilleo en las nerviaciones y reticulado amarillo en las hojas similares a los descritos para RBDV en la bibliografía disponible. La realización del test DAS-ELISA con extractos de dichas hojas ha confirmado la presencia de RBDV en plantas de la variedad Tulameen de tres fincas diferentes. También se ha encontrado RBDV en hojas con síntomas diferentes de las variedades Glen Prosen y Glen Moy. Normalmente RBDV se ha encontrado en infecciones mixtas con otros virus como ArMV y ToRSV.

En las mismas fechas en que se detectaba la presencia de RBDV en frambueso (*Rubus idaeus* L.) se recibieron en el Laboratorio de Sanidad Vegetal de Sevilla muestras de mora (*Rubus spp.*) de la variedad Adrienne, procedentes de Lucena del Puerto (Huelva) con síntomas de virosis. El test DAS-ELISA realizado con anticuerpos comerciales de dos empresas diferentes tanto en el Laboratorio de Sanidad Vegetal como en el del C.I.F.A.. Las Torres-Tomejil han confirmado también la presencia de RBDV en dichas plantas.

## **A1.7 EL GEMINIVIRUS “TOMATO YELLOW LEAF CURL VIRUS-Is” ES EL CAUSANTE DE UNA NUEVA ENFERMEDAD DE JUDÍA Y DE GRAVES EPIDEMIAS EN TOMATE**

Sánchez-Campos, S.<sup>1</sup>, Navas-Castillo, J.<sup>1</sup>, Díaz, J. A.<sup>1</sup>, Sáez-Alonso, E.<sup>2</sup>, Moriones, E.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> *Estación Experimental “La Mayora”, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, 29750 Algarrobo-Costa, Málaga.*

<sup>2</sup> *Departamento de Sanidad Vegetal, Consejería de Agricultura y Pesca, Almería.*

En otoño de 1997 se detectaron graves infecciones de tipo viral en cultivos protegidos (Almería) y al aire libre (Málaga) de judía. Los síntomas observados eran diferentes a los causados por virus descritos previamente en este cultivo en España y consistían en un fruncido, endurecimiento y deformación de las hojas, que en ocasiones presentaban un abarquillado hacia el haz de sus márgenes. Las plantas manifestaban una proliferación anormal, acortamiento de entrenudos y reducción del tamaño de las hojas en los brotes apicales. Se detectaron incidencias superiores al 80% en algunas parcelas, con reducciones de cosecha importantes. En este trabajo se demuestra la implicación en este nuevo problema viral de la nueva especie del virus del rizado amarillo del tomate, el tomato yellow leaf curl virus-Is (TYLCV-Is), recientemente detectada en España (Navas-Castillo y col., 1997). Se ha encontrado una asociación significativa entre la manifestación de los síntomas indicados y la presencia en la planta del TYLCV-Is. La implicación directa del TYLCV-Is como agente inductor del síndrome mencionado se ha demostrado reproduciendo en laboratorio los síntomas observados en campo mediante la inoculación experimental de judías sanas. La infección se ha llevado a cabo con clones infectivos del TYLCV-Is obtenidos a partir de aislados recogidos en tomate durante el primer brote epidémico del TYLCV-Is en España, en junio de 1997. Se presentan datos de la rápida dispersión del TYLCV-Is en las principales regiones hortícolas del sur peninsular así como de la mayor gravedad de los daños causados en las plantas de tomate respecto a los ocasionados por el tipo de TYLCV previamente descrito.

### LITERATURA CITADA

Navas-Castillo, J., Sánchez-Campos, S., Díaz, J. A., Sáez-Alonso, E., and Moriones, E. 1997. First report of tomato yellow leaf curl virus-Is in Spain: coexistence of two different geminiviruses in the same epidemic outbreak. *Plant Dis.* 81:1461.

## A1.8 CARACTERIZACIÓN DE AISLADOS DE PVY<sub>N</sub> Y PVY<sub>0</sub> DE TOMATE DE LAS ISLAS CANARIAS

Jordá C.<sup>1</sup>, Esteban B.<sup>1</sup>, Martín M.<sup>1</sup>, Espino A.I.<sup>2</sup>, Otazo C.<sup>2</sup> y Abad P.<sup>1</sup>

1. *Producción Vegetal. Patología Vegetal. Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos. Universidad Politécnica. Camino de Vera nº14. 46022 - Valencia.*

2. *Laboratorio de Sanidad Vegetal. Consejería de Agricultura, Pesca y Alimentación del Gobierno Canario.*

Dada la importancia adquirida por la presencia del virus Y de la patata (PVY) en las Islas Canarias, y la detección de dos tipos de aislados PVY<sub>N</sub> y PVY<sub>0</sub> conviviendo conjuntamente en los campos de tomate para exportación del cultivo de otoño, causando importantes pérdidas económicas, se planteó la realización de un estudio para el conocimiento de dichos aislados en cuanto a su comportamiento biológico y molecular, así como el papel desarrollado por otros cultivos que servían de puente entre el cultivo de un año y del siguiente y que a su vez eran sensibles a este virus.

Dentro de esta línea se recolectaron diferentes muestras con síntomas típicos de esta enfermedad de diferentes zonas y cultivos. Se diagnosticaron mediante técnica serológica E.L.I.S.A. utilizando los antisueros comerciales del PVY (Ingenasa y Loewe-Biochemica, nº. 07038), PVY-C/0 (Adgen.Auchincruise, U.K) y PVY-N (Bioreba. Reichnach, Sw).

Se realizó el estudio del comportamiento biológico mediante inoculación a diferentes plantas hospedadoras entre las que cabe citar pimiento, patata, tomate entre las cultivadas y *Chenopodium album* y *amaranticolor*, *Datura stramonium*, *Nicotiana tabacum*, "Samsun", *N. glutinosa*, *Petunia hybrida*, *Physalis floridana*, etc...

La caracterización molecular se realizó mediante técnica de PCR y endonucleasas de restricción, utilizando la variante PCR-INIA con inmunocaptura del virus y transcripción inversa sobre la propia placa de poliestireno utilizada en la serología. Se utilizó una pareja de cebadores de secuencia 5'-AAATGACACAATTGATGCAGGAG, correspondiente a los nucleótidos 3869-3891 de la secuencia publicada del PVY-O4, y 5'TAAAAGTAGTACAGGAAAAGCCA correspondiente a los nucleótidos 4723-4745 de la misma secuencia, diseñados para amplificar un fragmento de ADNc del gen de la proteína de cubierta del virus. La digestión del producto de amplificación con las endonucleasas *DdeI*, *EcoRV*, *HinfI*, *RsaI* y *TaqI* ha puesto de manifiesto la existencia de diversos patrones RFLP en los aislados de PVY estudiados.

La patata cultivada en pequeños campos familiares se muestra como reservorio del aislado PVY<sub>N</sub> de forma bastante frecuente, siendo este coincidente con el aislado del cultivo del tomate.

## **A1.9 LA HIBRIDACIÓN MOLECULAR CON IMPRONTAS DE TEJIDO. UN MÉTODO RÁPIDO PARA EL ESTUDIO DE LA VARIABILIDAD DEL VIRUS DE LA TRISTEZA DE LOS CÍTRICOS EN CAMPO**

Narváez, V.G., Martínez, M.E., Guerri, J., Moreno, P.

*Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias, Moncada, Valencia*

El virus de la tristeza de los cítricos (CTV) causa daños variables dependiendo de las estirpes del virus presentes en cada caso. Para controlar los daños causados por CTV hay que evitar la propagación de plantas infectadas, y si CTV es endémico hay que evitar la dispersión de los aislados más virulentos. Ello requiere disponer de métodos rápidos y sensibles de identificación de aislados que puedan ser utilizados en prospecciones masivas. Una técnica sensible que permite comparar distintas zonas del genoma del virus es la hibridación molecular con sondas de cDNA. En este trabajo se prepararon y marcaron con digoxigenina sondas de cDNA de los 300 últimos nucleótidos del extremo 3' del genoma, del gen p20 y del gen p25. La primera región está relativamente conservada en distintos aislados. Para las otras dos, se seleccionaron secuencias de un aislado muy virulento y de otro prácticamente asintomático en las mismas especies, siendo la identidad nucleotídica entre sondas de un mismo gen alrededor del 90%. Como diana se utilizaron improntas de brotes jóvenes de plantas infectadas y sanas y la hibridación se efectuó en condiciones estrictas (60 °C en presencia de 50% de formamida). Como control de la presencia de CTV se utilizó improntas de los mismos brotes incubadas los anticuerpos monoclonales 3DF1 y 3CA5. Los grupos de muestras analizadas incluían 21 aislados de la colección del IVIA, 30 muestras de campo de la provincia de Valencia, 28 recogidas en varias localidades de Uruguay, Argentina y Brasil y 14 procedentes de República Dominicana y Florida.

La reacción en ELISA-inmunoimpresión fue similar para la mayoría de los aislados, mientras que la intensidad de hibridación fue diferente dependiendo de la sonda y del aislado, lo que permitió la diferenciación de los mismos. La sonda del extremo 3' hibridó con la gran mayoría de los aislados, mientras que alguna de las otras sondas hibridó con muy pocos de ellos. En general, las sondas con secuencias del aislado avirulento hibridaron más con los aislados españoles y dominicanos, que no causan síntomas en pomelo o naranjo dulce, mientras que las del aislado virulento lo hicieron con los de Uruguay y Brasil, que causan síntomas en pomelo y/o naranjo dulce. Los aislados argentinos dieron escasa señal con la mayoría de las sondas. Los resultados obtenidos indican que la hibridación con improntas puede ser una técnica adecuada para estudios de identificación y dispersión de estirpes de CTV en campo.

## **A1.10 CLASIFICACION DE AISLADOS DEL VIRUS DE LA TRISTEZA DE LOS CITRICOS UTILIZANDO EL POLIMORFISMO DE SECUENCIA DEL EXTREMO 5' DEL RNA GENOMICO**

Ayllón, M.A<sup>1</sup>., López, C<sup>2</sup>., Navas-Castillo, J<sup>3</sup>., Guerri, J<sup>1</sup>., Flores, R<sup>2</sup>., Moreno, P<sup>1</sup>.

1. *Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias, Apdo Oficial, Moncada, Valencia*
2. *Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas (UPV-CSIC), Universidad Politécnica de Valencia, Camino de Vera, 14, 46022 Valencia.*
3. *Estación Experimental La Mayora, CSIC, Algarrobo-Costa, Málaga*

La comparación de las secuencias nucleotídicas de la región no codificante del extremo 5' de 38 clones de 5 aislados de CTV permitió clasificar las secuencias en tres grupos representados por las secuencias de los aislados T36 (grupo I), VT (grupo II) y un clon de T317 (grupo III), respectivamente. La identidad nucleotídica entre clones dentro de cada grupo fue superior al 88%, mientras que entre grupos varió entre el 44 y 63%. Para amplificar por RT-PCR secuencias de los tres grupos se usó un cebador común y tres específicos de cada uno de los grupos de secuencia establecidos, seleccionándose para el diseño de éstos zonas con secuencia conservada dentro de cada grupo y con la mayor divergencia posible con los otros dos grupos. Con estos cebadores se analizó la presencia de cada uno de los tipos de secuencia en la población de 33 aislados de CTV de 10 orígenes geográficos distintos (España, Japón, Sudáfrica, República Dominicana, Brasil, Costa Rica, Florida, California, Israel y Córcega).

El cebador específico del grupo III permitió amplificar secuencias de todos los aislados, mientras que los de los grupos II y I permitieron amplificar sólo de 16 y 17 aislados, respectivamente. De ninguno de dichos aislados se pudo amplificar secuencias de los grupos I o II exclusivamente.

Los aislados con secuencias del grupo III exclusivamente, sólo indujeron síntomas en lima. Aquellos con secuencias de los grupos II y III produjeron síntomas intensos en todos los huéspedes ensayados así como la reacción de 'seedling yellows'. Los que contenían secuencias de los grupos I y III, o de los tres grupos, mostraron una pauta de comportamiento más variable.

Los resultados de este estudio confirman que muchos aislados están compuestos por secuencias de más de un grupo e indican que el grupo más común es el III. Por el momento no puede establecerse una correlación directa entre la secuencia del extremo 5' y las características patogénicas, sin embargo, la capacidad de causar daños en pomelo o naranjo dulce parece asociada a la presencia de secuencias del tipo I o II.

#### **A1.11 LOS GENOMAS DE DOS AISLADOS ASINTOMÁTICOS DEL VIRUS DE LA TRISTEZA DE LOS CÍTRICOS DE ORÍGENES DISTANTES TIENEN UNA SECUENCIA NUCLEOTÍDICA CASI IDÉNTICA.**

Vives García, M.C.<sup>1</sup>, Albiach-Martí, M.R.<sup>2</sup>, Rubio, L.<sup>1</sup>, López, C.<sup>3</sup>, Navas-Castillo, J.<sup>4</sup>, Mawassi, M.<sup>2</sup>, Gowda, S.<sup>2</sup>, Garnsey, S.<sup>5</sup>, Dawson, W.O.<sup>2</sup>, Flores, R.<sup>3</sup>, Guerri, J.<sup>1</sup>, Moreno, P.<sup>1</sup>

*1) IVIA, Apdo Oficial, Moncada. Valencia. 2) Universidad de Florida-CREC, Lake Alfred, Florida (EEUU). 3) IBMCP, UPV-CSIC, Valencia. 4) EE La Mayora, CSIC, Algarrobo-Costa, Málaga. 5) USDA-ARS, Orlando, Florida 32803.*

El closterovirus de la tristeza de los cítricos (CTV) presenta gran diversidad biológica y los síntomas producidos difieren considerablemente entre aislados, pero se desconocen las secuencias genómicas responsables de estos síntomas. Se ha publicado la secuencia completa de dos aislados de Florida (T36) e Israel (VT) que causan síntomas intensos en varios huéspedes. En este estudio se ha secuenciado independientemente en dos laboratorios el genoma de dos aislados que son avirulentos en la mayoría de los huéspedes ensayados: T385 (España) y T30 (Florida). La estrategia de clonado y los cebadores utilizados en cada caso fueron diferentes.

Tanto T385 como T30 tienen un genoma de 19259 nucleótidos, 37 nt menos que T36 y 32 nt más que VT. La organización genómica de ambos aislados coincide con la propuesta para T36 y VT: 12 marcos de lectura abierta (ORF) y dos regiones no traducibles (UTR) en los extremos 5' y 3' del genoma. Globalmente, los genomas de T385 y T30 muestran una identidad nucleotídica del 99.3%. La identidad en los diferentes ORFs está comprendida entre el 98.7% y el 100% y en las regiones 5' y 3' UTR es del 99.3% y 99.6%, respectivamente. Esta elevada identidad de secuencia contrasta con la encontrada al comparar T385/T30 con las secuencias de CTV previamente publicadas. La identidad media con VT fue del 89%, con un máximo del 99.3 en el extremo 3' UTR y un mínimo del 67% en el extremo 5' UTR. La identidad media con T36 fue del 81%, con valores del 97.4 y 42.5% en los extremos 3' y 5' UTR, respectivamente.

Es improbable que T385 y T30 tengan un origen común, y si ese fuera el caso habrían estado separados al menos 20-30 años en huéspedes y condiciones diferentes. La conservación de la secuencia consenso en T385 y T30 parece indicar que la presión evolutiva habría favorecido esta secuencia, o que el período necesario para aumentar significativamente la divergencia tendría que ser muy superior al indicado.

## A1.12 EFECTO DEL CAMBIO DE HUÉSPED SOBRE LA VARIABILIDAD GENÉTICA DE POBLACIONES DEL VIRUS DE LA TRISTEZA DE LOS CÍTRICOS.

Ayllón, M.A<sup>1</sup>., Rubio, L<sup>1</sup>., Moya, A<sup>2</sup>., Guerri, J<sup>1</sup>., Moreno, P<sup>1</sup>.

1. *Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias, Apdo Oficial, 46113 Moncada, Valencia.*

2. *Departamento de Genética, Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad de Valencia, Burjasot, Valencia.*

La variabilidad genética de dos grupos de poblaciones del virus de la tristeza de los cítricos (CTV) se estudió usando los haplotipos detectados por análisis del polimorfismo conformacional de DNA monocatenario (single strand conformation polymorphism, SSCP) de los genes p18 y p20. Uno de los grupos incluye un aislado de campo español y tres subaislados de éste obtenidos mediante transmisión por injerto a diferentes huéspedes. El otro grupo incluye dos aislados obtenidos mediante transmisión por áfidos de un aislado japonés.

Se detectaron 26 haplotipos diferentes para el gen p18 y 100 para el p20, indicando gran variabilidad genética de las poblaciones de CTV para estos dos genes. En todas las poblaciones, la homocigosidad observada para el gen p20 fue significativamente mayor que la esperada bajo un modelo de evolución neutral, mientras que para el gen p18, solo tres de las poblaciones mostraban alta homocigosidad, sugiriendo que el gen p20 está sometido a restricciones evolutivas más fuertes que el p18. La comparación mediante el estadístico F mostró que todos los pares de poblaciones excepto uno eran significativamente diferentes para ambos genes. Las diferencias entre las poblaciones de origen japonés y español fueron generalmente altas, como era de esperar para poblaciones de orígenes distantes. En el caso del gen p18, las transmisiones secuenciales de un aislado español a nuevos huéspedes aumentó la diferencia entre la población de este aislado y la de los sucesivos subaislados. Las poblaciones de los tres aislados más virulentos mostraron escasas diferencias para el gen p18. El análisis de la varianza molecular indicó que la variación entre ambos grupos de poblaciones no era estadísticamente significativa, mientras que las variaciones entre poblaciones del mismo grupo o incluso dentro de cada población eran significativas para ambos genes.

Nuestros datos indican que la selección juega un papel en la distribución de haplotipos, y que la adaptación a nuevos huéspedes puede ser tanto o más importante que el origen geográfico. Las variaciones de las poblaciones de CTV después de un cambio de huésped o de una transmisión por áfido pueden explicar en parte la gran variabilidad biológica observada entre aislados de CTV.



### **A1.13 DIAGNÓSTICO MEDIANTE RT-PCR DE UN VIRUS PURIFICADO A PARTIR DE UN KUMQUAT NAGAMI**

Galipienso, L., Moreno, P., Navarro, L., Guerri, J.

*Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias. Apdo. Oficial , Moncada, Valencia.*

La línea de kumquat Nagami SRA-153, procedente de Córcega, contiene un patógeno transmisible por injerto que induce entre otros síntomas la incompatibilidad de algunas variedades comerciales de cítricos sobre el patrón citrange. Se desconocía si este patógeno estaba presente en plantaciones comerciales de cítricos y si podía estar relacionado con la mala unión detectada en campo entre algunas variedades y los patrones citrange y citrumelo, tanto en España como en otros países. La dispersión de un patógeno que indujera la incompatibilidad sobre citrange sería de consecuencias graves para la citricultura española, ya que actualmente éste es el patrón tolerante a tristeza mas utilizado.

A partir del kumquat SRA-153 purificamos un virus flexuoso de 960 nm de longitud y 14 nm de diámetro, con RNA monocatenario de  $4 \times 10^6$  Mr y una proteína de unos 42 kDa. A partir de RNA bicatenario preparamos una genoteca de cDNA. Dos de los clones (LG 17 y LG 70) se marcaron con digoxigenina y se utilizaron como sonda para la detección del virus mediante hibridación molecular. Utilizando esta técnica sólo se consiguió detectar el virus en el kumquat SRA-153 pero no en otros huéspedes inoculados a partir de éste, probablemente debido al bajo título que alcanza el virus en especies distintas al kumquat.

Los clones LG17 y LG70 fueron secuenciados y en base a la secuencia obtenida se diseñaron cebadores para la detección del virus mediante RT-PCR. Esta técnica permitió la detección del virus tanto en kumquat SRA-153 como en otras especies inoculadas con este aislado. También se obtuvo amplificación de DNA con estos cebadores a partir de kumquats de varios orígenes, de dos variedades de satsuma procedentes de Japón y de algunos árboles de plantaciones comerciales con síntomas de mala unión con citrange o citrumelo, procedentes de España y de Florida (EEUU). Sin embargo, no fue posible detectar el virus a partir de otros árboles con síntomas similares.

Estos resultados indican que el virus asociado a la enfermedad del kumquat está presente en especies y variedades de cítricos distintas al kumquat y de origen geográfico diverso, pero no nos permite asegurar que sea el causante de los síntomas de incompatibilidad sobre citrange o citrumelo observados en plantaciones comerciales.

#### **A1.14 CARACTERIZACIÓN BIOLÓGICA DE UNA ENFERMEDAD TRANSMISIBLE POR INJERTO DE KUMQUAT**

Galipienso, L., Moreno, P., Navarro, L., Pina, J.A., Ballester-Olmos, J.F. y Guerri, J.

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

Dentro del Programa Nacional de Mejora de Variedades de Cítricos se detectó una nueva enfermedad transmisible por injerto en un kumquat Nagami clon SRA-153 procedente de Córcega. Este clon resultaba incompatible al ser propagado sobre citrange Troyer, pero no se sabía si inducía incompatibilidad de este patrón con otras especies comerciales de cítricos. Dado que el patrón citrange es el más utilizado en la citricultura española por su tolerancia al virus de la tristeza, resultaba de gran interés caracterizar biológicamente el patógeno o patógenos presentes en el kumquat y desarrollar un método de diagnóstico precoz de la enfermedad.

A partir del aislado SRA-153 se inocularon mediante injerto plantas de clementino de Nules, limonero Eureka, Pomelo Marsh y naranjo dulce Pineapple. Al propagar yemas de estas plantas sobre citrange, el clementino y el limonero mostraron mala unión patrón/injerto a los seis meses, mientras que el pomelo y el naranjo dulce mostraban buena unión dos años después de la propagación.

En pruebas de infectividad realizadas sobre distintas especies indicadoras se observó que las plantas que presentaban mala unión sobre citrange (kumquat, clementino de Nules y limonero Eureka) inducían clorosis nervial en naranjo dulce Pineapple, moteado en tangor Dweet y acanaladuras en la madera en cidro Etrog. Las plantas que no mostraron incompatibilidad (pomelo Marsh y naranjo dulce Pineapple) sólo indujeron moteado en tangor Dweet y acanaladuras en la madera en cidro Etrog. Estos resultados sugieren la presencia de más de un patógeno o de varias estirpes de un mismo patógeno en el kumquat Nagami SRA-153 y una asociación entre el componente inductor del síntoma de clorosis nervial en Naranjo dulce Pineapple y el que induce la incompatibilidad con el citrange Troyer. Esta asociación permitiría utilizar la inoculación de plantas de semilla de naranjo dulce Pineapple para la detección precoz del patógeno inductor de la incompatibilidad.

## **A1.15 DETECCIÓN DEL VIRUS DEL MOTEADO VERDE ATENUADO DEL TABACO (TMGMV) EN CULTIVOS DE BERENJENA Y PIMIENTO EN ALMERIA.**

Luis - Arteaga, M.<sup>1</sup>, Saez, E.<sup>2</sup>, Berdiales, B.<sup>3</sup>, Rodriguez - Cerezo, E.<sup>3</sup>

1. *Servicio de Investigación Agroalimentaria - Diputación General de Aragón.*

*Apartado 727. 50080 Zaragoza.*

2. *Servicio de Protección de los Vegetales. 04700 El Ejido. Almería.*

3. *Centro Nacional de Biotecnología (CNB-CSIC), Campus de Cantoblanco. 28049 Madrid.*

En la primavera de 1996 se recogieron, en invernaderos de Almería, muestras de berenjena (*Solanum melongena* L.) con síntomas de enanismo, mosaico foliar y deformación de los frutos. Tinciones negativas de extractos de estas muestras revelaron, en el microscopio electrónico, la presencia de partículas de tobamovirus. Un aislado de este tobamovirus (96/21) se purificó tras multiplicarlo en plantas de *Nicotiana clevelandii*. La inoculación de plantas de berenjena con este aislado reprodujo en éstas los síntomas encontrados en campo. El rango de huéspedes del aislado 96/21 resultó ser muy similar al del tobamovirus del mosaico verde atenuado del tabaco (tobacco mild green mosaic virus, TMGMV). La relación entre el aislado 96/21 y TMGMV se confirmó mediante la secuenciación de clones de una biblioteca de cDNA obtenida al azar a partir del RNA viral. La homología de secuencia entre 96/21 y TMGMV es de alrededor del 98% en los clones analizados. La caracterización serológica del aislado 96/21 está en curso, pero análisis preliminares con una batería de antisueros específicos para distintos tobamovirus mostró reacción únicamente con el suero anti-TMGMV. Los resultados suponen el primer caso de infección natural de TMGMV en cultivos de berenjena. En invierno de 1997 se recogieron en la misma zona muestras de pimiento (*Capsicum annuum* L.) de invernadero. En estas muestras se detectó la presencia de TMGMV y, en algunos casos, de TMGMV en infecciones mixtas con el tobamovirus del mosaico atenuado del pimiento (pepper mild mottle virus, PMMoV). TMGMV ya había sido descrito en infecciones en pimiento en otros países, pero esta es la primera vez que se detecta infectando pimiento en España.

## **A1.16 DETECCION DE UN RHABDOVIRUS EN PIMIENTO. RESULTADOS PRELIMINARES**

Luis - Arteaga, M.<sup>1</sup>, Rodriguez - Cerezo, E.<sup>2</sup>

1. *Servicio de Investigación Agroalimentaria. Diputación General de Aragón. Apartado 727, 50080 Zaragoza.*
2. *Centro Nacional de Biotecnología. Consejo Superior de Investigaciones Científicas. Campus de Cantoblanco. 28049 Madrid.*

En 1995 y 1997 se observaron, en frutos maduros de pimiento var. Morrón, procedentes de cultivos comerciales de Fresno de la Vega (León), síntomas sospechosos de virosis, consistentes en pequeñas áreas irregulares deprimidas y decoloradas, diferentes a los producidos por otros virus descritos sobre esta especie. Las plantas presentaban una apariencia y desarrollo normal sin síntomas foliares evidentes.

Se hicieron transmisiones por inoculación mecánica sobre una gama amplia de especies indicadoras. Se obtuvieron reacciones locales y/o sistémicas en la mayoría de las especies Solanáceas inoculadas, a partir de los treinta días de la inoculación. Por microscopía electrónica, a partir de la savia de las especies indicadoras con infección sistémica, se observaron partículas virales baciliformes con envuelta características de los rhabdovirus. En plantas de pimiento inoculadas mecánicamente se obtuvieron síntomas locales, en forma de lesiones cloro-necróticas, y síntomas sistémicos consistentes en clareamiento de nervios que evolucionaba a necrosis y defoliación, en la variedad "Doux des Landes", y, en la variedad "Yolo Wonder", síntomas en frutos similares a los observados en infección natural.

Recientemente (1) se ha descrito la presencia, en cultivos de pimiento en Italia, de un rhabdovirus endémico de ciertos países mediterráneos, el virus del enanismo moteado de la berenjena (eggplant mottled dwarf virus, EMDV). Los síntomas obtenidos sobre las especies indicadoras inoculadas con el rhabdovirus encontrado en pimiento en León son similares a los producidos por el EMDV. La comparación serológica de EMDV con el aislado español es el próximo objetivo de este trabajo.

(1) Roggero *et al.* (1995). *Plant Disease*, 79, 321

## **A1.17 TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO PARA LA DETECCIÓN DEL TYLCV**

Picó, B., Díez, M.J., Nuez, F.

*Departamento de Biotecnología (Genética). Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos. Universidad Politécnica de Valencia. Camino de Vera, 14. 46022.*

El rizado amarillo del tomate causa pérdidas económicas de importancia que limitan el cultivo de esta hortaliza en España. El agente causal de esta enfermedad es el Tomato Yellow Leaf Curl Virus (TYLCV), un geminivirus transmitido por la mosca blanca del tabaco *Bemisia tabaci*. Aunque la sintomatología causada por este virus es muy característica, su expresión está fuertemente influenciada por factores ambientales, estado de desarrollo de la planta, posibilidad de infecciones múltiples, fondo genético etc. Todos estos factores han limitado el avance de los programas de mejora cuando la sintomatología se ha empleado como criterio único de selección. El diagnóstico inicial basado en la sintomatología y la inoculación recíproca sobre plantas indicadoras ha dado paso al desarrollo de nuevas técnicas de diagnóstico que permiten detectar y cuantificar la presencia de virus en los distintos tejidos de la planta. El empleo de la serología, frecuente en otras virosis, se ha visto seriamente limitado por la existencia de reacciones cruzadas y la dificultad para obtener sueros específicos. En la actualidad se dispone de un antisuero comercial específico contra TYLCV. Además de las técnicas serológicas, se emplean sondas de ADN para la detección del TYLCV mediante técnicas de hibridación en membrana. Así mismo, la secuenciación de los distintos aislados del virus ha permitido la síntesis de cebadores específicos para la amplificación del TYLCV mediante la reacción en cadena de la polimerasa. En este trabajo se compara la eficacia de distintas técnicas de detección del TYLCV (TAS-ELISA-Tissue Blotting; Squash-Dot blotting; PCR) para su empleo en programas de mejora. Para ello, se determinó la presencia de TYLCV en muestras procedentes de materiales cultivados y silvestres con distintos niveles de resistencia. La concentración de TYLCV en los distintos tejidos se cuantificó mediante Dot-Blot empleando una curva patrón ajustada con concentraciones conocidas de ADN viral.

La técnica TAS-ELISA permitió la detección de TYLCV en muestras con concentraciones de Ingr-100pgr. La sensibilidad de esta técnica fue similar a la del Tissue Blotting, aunque la primera resulta de mayor utilidad al permitir la cuantificación. En ambos casos, se observó un número elevado de falsos negativos y un fondo importante, sobre todo en la evaluación de tejido procedente de raíz. Ninguna de las dos técnicas fue eficaz para la detección de bajas concentraciones virales (<100pgr) encontradas en especies silvestres y material resistente derivado de las mismas. La sensibilidad fue mayor (>1pgr) mediante las técnicas de hibridación en membrana, Squash y Dot Blotting. El Squash blot presenta una gran sencillez de aplicación, permitiendo el análisis de un gran número de muestras en campo. El Dot blot permite además la cuantificación precisa del mismo. Concentraciones virales menores solamente se detectaron mediante PCR. El empleo de esta técnica permite un diagnóstico precoz, identificando el virus en tejidos infectados tan solo 4 días tras la infección. Sin embargo, se obtuvieron algunos falsos negativos principalmente en muestras de plantas severamente afectadas procedentes de campo y en extracciones de raíz. Los falsos negativos debido a la contaminación de la muestra y el alto coste de esta técnica limita su aplicación para la determinación a gran escala del TYLCV a partir de muestras de campo, aunque sigue siendo de gran utilidad como complemento para determinar los casos dudosos obtenidos mediante alguna de las otras dos técnicas.

## **A1.18 APLICACION DE ANTICUERPOS RECOMBINANTES EN LA DETECCIÓN RUTINARIA DEL LUTEOVIRUS DEL ENROLLADO DE LA PATATA (PLRV).**

Legorburu, F. J.<sup>1</sup>, Harper, K.<sup>2</sup>, Toth, R.<sup>2</sup>, Torrance, L.<sup>2</sup>.

<sup>1</sup> AZTI-CIMA, Apartado 46, 01080 Vitoria/Gasteiz.

<sup>2</sup> SCRI, Invergowrie, Dundee DD2 5DA, Reino Unido.

Los anticuerpos clonados en bacterias constituyen una fuente alternativa a los anticuerpos, policlonales o monoclonales, producidos en animales. Los fragmentos variables de cadena simple (scFv) pueden ser clonados a partir de una línea celular preexistente, secretora de anticuerpos monoclonales, o seleccionados de una biblioteca génica. Los constructos obtenidos pueden ser manipulados genéticamente para incorporar moléculas marcadoras (fosfatasa alcalina) o mejorar su adsorción a placas de microtitulación.

Se han ensayado dos anticuerpos recombinantes obtenidos a partir de librerías génicas. El primero (32AP) fue manipulado para incorporarle fosfatasa alcalina. El segundo (C<sub>L</sub> 3D3) fue manipulado para incorporarle la región constante C<sub>L</sub> de la cadena ligera kappa de inmunoglobulina humana, de manera que forma dímeros que pueden ser detectados por un conjugado comercial anti-kappa.

Estos anticuerpos recombinantes se han ensayado en la técnica ELISA. El 32AP fue utilizado como conjugado en un formato DAS y el C<sub>L</sub> 3D3 como anticuerpo detector en un formato indirecto. En ambos casos el antígeno fue capturado por un tapizado policlonal. Como término de comparación se utilizaron anticuerpos policlonales (BIOREBA) en formato DAS y un anticuerpo monoclonal detector (SCRI) en formato indirecto.

El anticuerpo 32AP dió reacciones más débiles que los convencionales y discriminó peor los tubérculos positivos y negativos de dos lotes de tubérculos con infección primaria. El anticuerpo C<sub>L</sub> 3D3 ha dado buenos resultados con los controles (planta de invernadero) y está pendiente de ser ensayado con lotes de tubérculos:

| <b>A<sub>405</sub></b> | <b>Policlonal</b> | <b>Monoclonal</b> | <b>C<sub>L</sub> 3D3</b> |
|------------------------|-------------------|-------------------|--------------------------|
| <b>Tampón</b>          | 0,077             | 0,077             | 0,120                    |
| <b>Negativo</b>        | 0,075             | 0,077             | 0,116                    |
| <b>Positivo</b>        | 0,648             | 0,151             | 1,75                     |

Este trabajo está financiado por el proyecto AIR3 CT94-1046, del III Programa Marco Europeo y por el Departamento de Agricultura, Medio Ambiente y Pesca del Ministerio para Escocia (SOFAD).

## **A1.19 UN VIRUS DE ARN BICATENARIO EN EL ENDOFITO DE GRAMÍNEAS *Epichloë festucae***

Zabalgogezcoa, I.<sup>1</sup>, Benito, E.P.<sup>2</sup>, García Ciudad, A.<sup>1</sup>, García Criado B.<sup>1</sup>, Eslava, A.P.<sup>2</sup>

1. Departamento de Producción Vegetal. Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología, CSIC. Apartado 257. 37071 Salamanca.

2. Area de Genética. Plaza de los Doctores de la Reina s/n. Universidad de Salamanca. 37007 Salamanca.

El ascomiceto *Epichloë festucae* infecta a varias especies de gramíneas del género *Festuca*. Algunas de estas especies son de importancia económica debido a su utilización en pastos y céspedes (ej: *Festuca rubra* y *Festuca ovina*). Las plantas de *F. rubra* infectadas por *E. festucae* contienen varios tipos de alcaloides que las hacen más resistentes a herbívoros, sin embargo, la infección de *E. festucae* en estas especies es críptica en la mayor parte de los casos y el hongo se transmite verticalmente por semilla con una eficiencia cercana al 100%. En algunos casos, las plantas infectadas por *E. festucae* pueden desarrollar un estroma fúngico externo que impide la emergencia de la inflorescencia y de esta manera el hongo esteriliza a las plantas.

En el aislado VIT-5 de *E. festucae*, obtenido de una planta de *F. rubra*, se detectó la presencia de dos segmentos de ARN bicatenario (5,2 y 3,2 kb). Mediante hibridación utilizando como sonda cDNA derivado del segmento de mayor tamaño, se ha demostrado que no existe homología significativa entre las secuencias nucleotídicas de ambos segmentos de ARNbc. Aplicando diversos métodos de purificación de virus, se ha observado la presencia de partículas de virus isométricas de aproximadamente 50 nm de diámetro en extractos de VIT-5. Al tratar con fenol las fracciones que contienen partículas de virus, se detecta la presencia del ARNbc de 5,2 kb pero no la del de 3,2 kb. Este resultado implica que el segmento mayor podría estar encapsidado en las partículas de 50 nm, pero el fragmento menor es encapsidado independientemente, o no es encapsidado. El crecimiento radial *in vitro* del aislado VIT-5 no difiere de otros aislados libres de virus; tampoco se han detectado otros fenotipos asociados a la presencia de los dos segmentos de ARNbc en este aislado.

## **A1.20 DETECCIÓN EN SEMILLA DE LOS POTYVIRUS MOSAICO COMÚN Y MOSAICO COMÚN NECRÓTICO DE LA JUDÍA (BCMV Y BCMNV).**

Cifuentes Gabriela, Castro Serafina, Ortiz Vilma, Romero Javier.

*Departamento de Protección Vegetal. INIA. Autopista A – 6 Km. 7,5. 28040-Madrid.*

La detección de los parásitos intracelulares en semilla ofrece ciertos problemas debido principalmente a la poca cantidad de inóculo inicial del patógeno y a la presencia de sustancias de reserva que muchas veces inhiben las reacciones enzimáticas de los métodos bioquímicos de detección. Los potyvirus del mosaico común y del mosaico común necrótico de la judía (BCMV y BCMNV) son los patógenos más importantes en el ámbito mundial, debido a su fácil transmisión por semilla y a su dispersión por pulgones. La propiedad de transmitirse por semilla en altos porcentajes (80 %) hace posible que las diversas razas y variantes de estos virus, puedan ser transportados en las importaciones y exportaciones de este grano a través del mundo, por lo que es necesario contar con métodos adecuados de detección de estas virosis en semilla para evitar la introducción del virus o sus razas a países o regiones que normalmente no lo poseen. En nuestro laboratorio hemos descrito el uso de ELISA, RT-PCR e IC-RT-PCR en la detección de BCMV y BCMNV en semilla de judía (Sáiz et. al., 1994. J. Virol. Methd. 50, 145) y en este trabajo presentamos ciertas mejoras en la metodología usada para poder realizar estos ensayos de forma rutinaria. La comparación de estos métodos usando como material de partida semillas en seco o maceradas en agua durante una noche, nos permitió apreciar que las semillas húmedas además de facilitar de forma considerable la homogeneización aumentaron la sensibilidad de los Elisás disminuyendo el ruido de fondo, probablemente por la acción de diversas enzimas que estaban latentes en las semillas secas. Se discutirá la facilidad de usar mortero, polytron u otros accesorios en la homogeneización del material vegetal en los ensayos de rutina de estos virus en semilla.



## **A1.21 "ELISA RECOMBINANTE" PARA EL DIAGNÓSTICO DEL VIRUS DE LA TRISTEZA DE LOS CÍTRICOS (CTV).**

Terrada, E<sup>1</sup>., Kerschbaumer, R<sup>2</sup>., Himmler, G<sup>2</sup>., Gorris, M.T<sup>1</sup>., Cambra, M<sup>1</sup>.

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

2. *Institut für Angewandte Mikrobiologie. Universität für Bodenkultur, Wien. A-1190 Wien, Nussdorfer Lände 11.*

Los sistemas ELISA basados en anticuerpos policlonales y monoclonales (MCAs) específicos son muy útiles para la detección y control de virus fitopatógenos. Avances recientes han permitido la producción de fragmentos de anticuerpos (scFv) expresados en bacterias y se han desarrollado algunos sistemas de ELISA basados en el uso de estos scFv capaces de tapizar inmunoplasmas o de ser utilizados como conjugados para la detección. Ello minimiza el uso de animales y evita la necesidad de la tecnología de hibridomas y conjugación de anticuerpos con enzimas.

La detección rutinaria de CTV por ELISA se basa en el uso de dos MCAs específicos: 3DF1 y 3CA5, los cuales al ser usados conjuntamente son capaces de reconocer todos los aislados de CTV conocidos. Los genes de estos anticuerpos han sido clonados como scFv en distintos vectores de expresión y expresados en *E. coli* como proteínas de fusión con motivos ZIP para ser utilizados en el tapizado, o con fosfatasa alcalina para utilizarse como conjugados. Estos anticuerpos recombinantes fueron utilizados en ELISA-DAS e Inmunoimpresión-ELISA comparándose con los MCAs convencionales. Se ha logrado, por vez primera, que con estos scFv obtenidos los métodos ELISA recombinantes sean tan específicos y sensibles como los ELISA convencionales utilizados con MCAs. Con ello se demuestra que se ha conseguido un sistema de diagnóstico y detección de CTV basado únicamente en fragmentos de anticuerpos obtenidos por ingeniería genética, lo que abre nuevas posibilidades en Patología Vegetal, como su expresión en plantas para conseguir resistencia a patógenos, habiéndose obtenido plantas de *Nicotiana tabacum* transgénicas con estos fragmentos de anticuerpos.

## **A1.22 NUEVO DISPOSITIVO Y MÉTODO DE CAPTURA DE DIANAS AMPLIFICABLES, TRANSCRIPCIÓN REVERSA Y NESTED-PCR EN UN SOLO TUBO CERRADO.**

Olmos, A., Esteban, O., Terrada, E., Gorris, M.T., Román, M.P., Marroquín, C., Hermoso de Mendoza, A., Cambra, M.

*Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias. Departamento de Protección Vegetal y Biotecnología. Apartado Oficial, 46113, Moncada, Valencia.*

Se ha desarrollado un dispositivo y método para la realización de captura de dianas amplificables, retrotranscripción y nested PCR en un solo tubo, sin necesidad de abrirlo una vez iniciado el proceso de retrotranscripción, anulando los riesgos de contaminación.

El procedimiento descrito, se basa en la separación física de las mezclas que intervienen en la RT-nested-PCR: la primera (cóctel de retrotranscripción y amplificación externa - RT-PCR) y la segunda (cóctel de amplificación interna - nested-PCR), de modo que en la primera fase, los iniciadores internos (nested) no accedan a la reacción con los enzimas. Una vez finalizada la RT-PCR, el cóctel con los iniciadores internos se mezcla con el resto y se procede a completar la reacción (nested-PCR).

La separación física de la mezcla externa y de la interna se puede realizar de forma sencilla mediante un dispositivo patentado, de modo que el cóctel con los iniciadores internos se dispensen en su interior, permaneciendo ajenos al exterior dentro del tubo eppendorf. Además, se diseñan iniciadores externos con baja temperatura de anillamiento e internos con elevada temperatura, para facilitar un nested con menor ruido de fondo.

Este protocolo se ha ensayado con éxito para la detección del virus de la tristeza de los cítricos (CTV), alcanzando una sensibilidad 100 veces mayor que la obtenida con la convencional Inmuncaptura-RT-PCR. También se ha ensayado con el Plum Pox Potyvirus (PPV) lográndose una simultánea detección y tipificación al utilizar iniciadores internos específicos de serogrupo. El método se ha validado mediante la sensible amplificación de transgenes de scFv en *Nicotiana tabacum*.

La aplicación conjunta de este método con dianas inmovilizadas en papel ya sean de material vegetal (Print capture - PC) o de pulgones individuales (Squash capture - SC), permite simplificar el método de análisis por PCR y aumentar la sensibilidad al disminuir inhibidores. La posibilidad de conjugar PC-RT-nested-PCR abre nuevas posibilidades en el campo del diagnóstico vegetal.

### **A1.23 COMPARACIÓN DE TÉCNICAS SEROLÓGICAS Y MOLECULARES PARA DETECCIÓN RUTINARIA DEL VIRUS DE LA TRISTEZA (CTV).**

Gorris, M.T., Martínez, M.C., Olmos, A. y Cambra, M.

*Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias. Departamento de Protección Vegetal y Biotecnología. Apartado Oficial, 46113 Moncada, Valencia.*

Se han comparado en condiciones estándar diferentes técnicas serológicas (ELISA-DAS, DASi e Inmunoimpresión directa-ELISA) con Inmuncaptura-PCR (IC-PCR) para detección rutinaria del CTV en 65 árboles de clementino de Nules sobre Citrange Troyer. Los árboles fueron seleccionados en una zona de alta densidad de inóculo por no estar infectados según análisis efectuado en noviembre de 1996.

Un año más tarde se tomaron 5 brotes jóvenes y 10 hojas a 1,80-2,00 m del suelo, alrededor de la copa del árbol. Del material recolectado se hicieron 2 impresiones/brote y 1 impresión/hoja en membranas de ester de celulosa. El mismo material fue empleado para realizar por una parte extractos mediante homogeneizador de vástago (técnicas ELISA-DAS y DASi) y por la otra extractos en bolsa de trituración (técnica IC-PCR). Se realizaron las técnicas ELISA con extractos e Inmunoimpresión según protocolos comerciales (Ingenasa y Plant Print Diagnostics, respectivamente). La técnica de IC-PCR se realizó con los mismos AMC (3DF1+ 3CA5) y con iniciadores específicos de CTV.

Los resultados obtenidos muestran una total coincidencia en el diagnóstico entre las distintas técnicas serológicas. En la comparación Inmunoimpresión-ELISA/ IC-PCR se encontraron 12 divergencias. En un segundo análisis de los árboles divergentes (tomando de nuevo muestras) se encontraron sólo 4 que resultaron ser únicamente positivos por IC-PCR. El mismo material se injertó en lima mexicana, resultando negativas. Posteriormente un tercer análisis de los mismos árboles, antes de la aparición de pulgones, confirmó la ausencia de CTV por todas las técnicas.

La técnica de Inmunoimpresión parece la más conveniente por el coste del análisis por muestra (28,75 ptas.) frente a ELISA con extractos (73,15 ptas.) e IC-PCR (140,16 ptas.) y también por su sensibilidad (similar al resto de técnicas) y no poseer riesgo de contaminación, siendo además la más sencilla ya que no requiere personal especializado

#### **A1.24 DETECCIÓN DE DIANAS DE PLUM POX POTYVIRUS (PPV) EN PULGONES INDIVIDUALES MEDIANTE ESCACHADO CAPTURA-PCR (SQUASH CAPTURE-PCR).**

Esteban, O., Olmos, A., Marroquín, C., Hermoso de Mendoza, A., Gorris, M. T., Martínez, M.C., Cambra, M.

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

Plum pox virus, agente causante de la enfermedad de la Sharka, es el único virus de frutales de hueso que es transmitido por pulgones. Al igual que otros virus de ARN no persistentes, la detección en su vector resulta problemática, debido a la reducida carga viral en el mismo.

La técnica de escachado captura-RT-PCR (SC-RT-PCR) ha sido aplicada con éxito a la detección de dianas de PPV en un solo pulgón. Diferentes variantes de esta técnica (SC-RT-heminested-PCR, SC-RT-nested-PCR), así como diversas parejas de iniciadores específicos del genoma de PPV, han sido empleadas para estudiar la capacidad de adquisición de PPV por diferentes especies de pulgones mediante la amplificación específica del ARN viral.

Se ha evaluado la capacidad de adquisición en las especies *Myzus persicae*, *Aphis gossypii*, *Aphis nerii* y *Hyalopterus pruni*, sin encontrarse una correlación entre eficiencia de adquisición y de transmisión. Así, especies consideradas pobres vectores de PPV como *Aphis gossypii* o *H. pruni* han mostrado una elevada eficiencia de adquisición, tanto de aislados D como M. Además, en *A.gossypii* se han detectado aislados de PPV no transmisibles por pulgón (3.3RB/Nb). Por otra parte, otras especies no colonizadores de frutales de hueso como *A. nerii* también han exhibido capacidad por adquirir PPV.

Mediante esta técnica también se ha demostrado la capacidad por un pulgón de portar simultáneamente diferentes aislados de PPV (D y M), así como la segregación de dichos aislados a partir de una población de pulgones alimentados sobre plantas con infecciones mixtas.

Los resultados obtenidos demuestran la gran aplicabilidad del método para determinados estudios epidemiológicos y para el estudio del mecanismo de adquisición y localización de virus no persistentes en su vector.

## **A1.25 DIAGNOSTICO DE VIROSIS EN LA VID. DISCREPANCIAS ENTRE INDEXAGES BIOLÓGICOS Y TÉCNICAS SEROLÓGICAS.**

Padilla Villalba, I.<sup>1</sup>, Hita Gambin , I.<sup>1</sup>, Benayas Sainz de Rozas, F.<sup>2</sup>

*1. Centro de Investigación y Desarrollo Agroalimentario (CIDA), La Alberca, Murcia.*

*2. Subdirección General de Semillas y Plantas de Vivero, La Alberca, Murcia.*

A pesar de que ambos métodos de diagnóstico se consideran bastante efectivos, a la hora de establecer la presencia o no de virosis en la vid: hemos venido comprobando, a lo largo de los años, que se producen diferencias de resultados -en algunos casos notables- entre las observaciones de los indexages biológicos en campo, y las lecturas obtenidas mediante la técnica ELISA.

Además, y por lo que respecta al virus del entrenudo corto infeccioso, algunos cultivares -tanto de patrones como de viíferas- presentan síntomas bastante llamativos, que sin embargo, al someterlos al diagnóstico serológico mediante ELISA, proporcionan resultados negativos.

Ambas situaciones conducen, o pueden conducir, a decisiones de calificación del material vegetal que podemos considerar como erróneas, que en algunos casos puede suponer la eliminación del circuito comercial de plantas, cuyo único problema reside en que en ciertas circunstancias, presentan síntomas en principio relacionados con alguna virosis, pero que en realidad están exentas de tal virosis.

Con todo, y ante la posibilidad de la existencia de algún virus de carácter grave en el material vegetal destinado a la certificación, es preferible cometer el error por excesivo celo, o al menos por una cierta sospecha, que dejar circular planta afectada por dicha posible virosis.

En este trabajo se presentan algunos casos, que hacen referencia a lo antedicho, y que no hacen sino confirmar el hecho de que en el tema de diagnóstico de virus, es necesario estar continuamente controlando síntomas, y haciendo los correspondientes tests.

## A1.26 PROSPECCIÓN DE VIRUS Y SIMILARES EN PLANTAS DE OLIVO CULTIVADAS EN ESPAÑA.

Bertolini, E.<sup>1</sup>, Fadda, Z.<sup>1</sup>, García, F.<sup>2</sup>, Celada, B.<sup>2</sup>, Olmos, A.<sup>1</sup>, Gorris, M.T.<sup>1</sup>, Del Río, C.<sup>3</sup>, Caballero, J.<sup>3</sup>, Duran-Vila, N.<sup>1</sup>, Cambra, M.<sup>1</sup>

1. *Departamento de Protección Vegetal y Biotecnología. Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias. Apartado Oficial. 46113 Moncada. Valencia.*
2. *Unitat de Sanitat Vegetal. Departament d'Agricultura, Ramaderia i Pesca de Catalunya.*
3. *Centro de Investigación y Formación Agraria "Alameda del Obispo". Córdoba.*

Se desconoce el estado sanitario del olivo en España. Con el fin de determinar las posibles enfermedades producidas por virus y similares, se ha iniciado una prospección de diversos cultivares procedentes del Banco Mundial de Germoplasma de Olivo de Córdoba, así como de diversas selecciones y muestras de campo de Catalunya y la Comunidad Valenciana.

Las plantas se han analizado por ELISA empleando antisueros comerciales de CMV, CLRV y SLRV. También se han efectuado análisis de dsRNA y de RT-PCR empleando iniciadores específicos para CMV, CLRV, SLRV, ArMV, OLV1 y OLV2. Mediante ELISA se han encontrado reacciones positivas frente a CMV, CLRV o SLRV en el 60% de las plantas analizadas. En la mayoría de los casos las plantas dieron reacciones positivas frente a los tres virus. Sin embargo, únicamente en un caso se ha confirmado mediante el análisis de dsRNA y RT-PCR la presencia de CMV. La fiabilidad de los resultados positivos obtenidos mediante la técnica ELISA debería ser contrastada mediante otras tecnologías ya que los extractos de olivo parecen inducir falsos positivos.

Las plantas se han analizado para determinar la presencia de agentes tipo viroide mediante análisis de ácidos nucleicos en electroforesis secuencial (sPAGE). En la fracción sobrenadante de la partición con LiCl 2M se ha identificado una banda con una movilidad electroforética característica de RNAs circulares. Esta banda alcanzaba títulos importantes en al menos tres de los cultivares analizados, los cuales han sido seleccionados para proseguir su caracterización molecular.

Este tipo de actividades permitirán conocer el estado sanitario de olivo como base para el desarrollo de futuros programas de certificación y para la puesta a punto de métodos de diagnóstico.

## **A2.1 BACTERIOSIS DE MAYOR INCIDENCIA EN EL CULTIVO DE LA JUDÍA (*PHASEOLUS VULGARIS*, L.) EN LA ZONA NORTE DE LA PENÍNSULA IBÉRICA.**

González Fdez.<sup>1</sup>, A.J., Asensio Vegas, C<sup>2</sup>, Ferreira Fdez, J.J.<sup>1</sup>, Fueyo Olmo M.A.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Centro de Investigación Aplicada y Tecnología Agroalimentaria, Consejería de Agricultura, Principado de Asturias. Apdo 13, 33300, Villaviciosa, Asturias. E-mail: ciatavilla@princast.es

<sup>2</sup> Servicio de Investigación Agraria. Consejería de Agricultura y Ganadería, Junta de Castilla y León. Apdo 172, 48080, Valladolid, España.

Las enfermedades bacterianas descritas en judía son producidas fundamentalmente por *Pseudomonas syringae* pv *phaseolicola* (grasa de la judía), *Pseudomonas syringae* pv *syringae* y *Xanthomonas campestris* pv *phaseoli* (quemadura bacteriana). Estos patógenos pueden ocasionar graves pérdidas en la producción y son capaces de transmitirse por semilla. El objeto de este trabajo fue identificar los patógenos responsables de bacteriosis en el cultivo de judía tipo granja asturiana en Asturias y zonas limítrofes, así como en otras variedades cultivadas en Castilla y León.

El aislamiento del patógeno se realizó siguiendo el método descrito por Taylor (1979) y posteriormente el descrito por Jansing y Rudolph (1990) a partir de lotes de semilla recolectados en el periodo 1990-1997 en el Norte de la Península Ibérica. Los aislamientos realizados a partir de hojas y vainas se realizaron mediante siembra en medios generales y semiselectivos. La identificación de las bacterias se realizó sometiendo los aislamientos a las pruebas LOPAT complementadas con otras pruebas bioquímicas. La determinación de las razas de *Pseudomonas syringae* pv *phaseolicola* (Psp) se realizó evaluando las respuestas de diferentes genotipos de judía a los aislamientos según describe Taylor et al. (1996).

En un total de 50 lotes de semillas (tipo faba granja asturiana) no fue posible detectar Psp y si en cambio, en cuatro de estos lotes se aisló *Pseudomonas syringae* pv *syringae* (Pss). Sin embargo, en análisis realizados sobre hoja y vaina de plantas que mostraban síntomas de grasa se pudieron aislar ambos patógenos incluso en la misma muestra. En 131 muestras de hoja y vaina de diferentes variedades con síntomas de bacteriosis recolectadas durante 1995 en Castilla y León se detectó la presencia de Psp en 49 de ellas y de Pss sólo en cuatro.

La determinación de las razas en aislados de Psp mostró que, en Castilla y León se detectaron 6 razas en 41 aislamientos (razas 7, 6, 5, 0, 9 y 2) siendo la más frecuente la raza 7; mientras que en seis aislados procedentes de Asturias sólo se detectaron dos razas (razas 0 y 5) con la raza 0 como mayoritaria.

Estos datos sugieren que el control de la enfermedad debe realizarse durante el cultivo, puesto que sobre muestras de hojas y vainas no hay ninguna dificultad para aislar e identificar las bacterias patógenas, mientras que, los análisis de lotes de semilla tienen una eficacia dudosa. En cualquier caso el mejor método para analizar semilla fue el descrito por Jansing y Rudolph que mejora considerablemente la recuperación del patógeno. Hasta el momento la variación patogénica y la virulencia de los aislamientos asturianos de Psp parece ser menor que la mostrada por los de Castilla y León.

## **A2.2 SINTOMATOLOGÍA ASOCIADA A FITOPLASMAS EN FEIJOA (*Feijoa sellowiana* Berg)**

Mansilla J.P.<sup>1</sup>, Abelleira A.<sup>1</sup>, Salinero M.C.<sup>1</sup>, Abad P.<sup>2</sup>, Font I.<sup>2</sup> y Jordá C.<sup>2</sup>

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

2. *Dpto. Producción Vegetal. Patología Vegetal. Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos. Universidad Politécnica. Cno. de Vera 14. 46020-Valencia.*

El estudio del cultivo de la feijoa (*Feijoa sellowiana* Berg) y su problemática fitosanitaria se inició en Galicia en el año 1986. Se estableció una plantación experimental en la Estación Fitopatológica "Do Areeiro" (Pontevedra), inicialmente formada por cultivares locales (Alpe, Castroviejo y Vilagarcía), obtenidos por estaquillado de plantas antiguas distribuidas por la provincia de Pontevedra. Posteriormente se añadieron nuevas variedades seleccionadas en Nueva Zelanda, completándose hasta un total de 10 variedades, con 18 pies por variedad.

Se ha observado una sintomatología muy característica que consiste en una fasciación muy acusada de la parte terminal de las ramas, tanto en la plantación experimental citada como en plantaciones de otras Comunidades (Canarias y País Vasco, año 1988 y 1990 respectivamente). Esta fasciación se detectó inicialmente, de forma puntual, en alguna de las variedades cultivadas en esta parcela, no obstante, en la actualidad esta alteración se ha hecho patente y muy extendida, en la variedad ALPE, estando afectadas el 100% de las plantas con una media de 4-6 ramas por árbol.

Para su análisis e identificación de agente causal se recogieron muestras de ramas con los síntomas anteriormente descritos y se analizaron mediante amplificación por PCR del ADN extraído de dichas plantas afectadas, usando primers universales de la fracción 16S del ADN ribosómico (mF2/R1F2n/R2) El producto de la amplificación se ha digerido con los enzimas de restricción Alu I, Mse I, HPA I, Kpn I y Taq I. Los resultados de los análisis RFLP indican que se trata de un fitoplasma incluido dentro del grupo Stolbur.



## **A2 .3 EVALUACIÓN DE LOS MÉTODOS DE EXTRACCIÓN Y AMPLIFICACIÓN DEL DNA POR PCR PARA LA DETECCIÓN DE FITOPLASMAS EN VIÑA.**

**Martin Esteban. M P. y Torres Güell, E.**

*Unitat Sanitat Vegetal, Servei de Sanitat Agraria. Via Circulació Nord, Tram VI, Cant. C/3, Zona Franca, 08040 Barcelona. E-mail: 1.- maripaz@porthos.bio.ub.es 2.- ssausv@lander.es*

Desde hace unos años, para la detección de los fitoplasmas de la viña se ha aplicado con éxito la técnica de amplificación del DNA por PCR. En general, una vez obtenido el producto mediante iniciadores universales, los distintos patógenos se identifican por comparación de los patrones generados mediante la digestión enzimática del amplímero (RFLP: Polimorfismo de la Longitud de los Fragmentos de Restricción). También se han ensayado iniciadores específicos para distintos fitoplasmas.

A pesar de los buenos resultados conseguidos, los métodos de extracción actuales requieren una gran cantidad de material de partida (0.5-2 g de nervios centrales), para poder obtener una concentración de DNA del fitoplasma suficiente que permita, tras la amplificación, ser visualizado en los geles de agarosa.

Nuestro objetivo ha sido tratar de seleccionar un protocolo rápido y de bajo coste que permita partir de pequeñas cantidades de material (0.02-0.03 g). Se ensayaron tres protocolos de extracción en hojas de viñas, con o sin síntomas de Flavesencia dorada (FD), así como en hojas de *Vinca* sp., inoculadas con "stolbur".

Para comprobar la calidad del DNA obtenido se llevaron a cabo reacciones de amplificación por PCR, mediante una pareja de iniciadores universales de fitoplasmas (U5IU3). Las reacciones de amplificación se realizaron mediante dos protocolos, ajustándose la concentración del ion magnesio y parámetros de la PCR (temperatura y número de ciclos).

Se han obtenido diferentes grados de eficiencia con cada uno de los métodos de extracción, así como con las diferentes polimerasas utilizadas en las amplificaciones. Para confirmar la presencia de FD en las hojas de viñas analizadas, se efectuó el análisis por RFLP de todos los amplímeros obtenidos. Este análisis permitió confirmar la presencia de FD en las hojas de viña con síntomas, y "stolbur" en las de *Vinca*.

Para aplicar de forma rutinaria en nuestro laboratorio, hemos seleccionado un método que permite obtener muy buenas amplificaciones de las extracciones efectuadas a partir de un único nervio de 30 x 1 mm (0.02 gr), independientemente del tipo de hoja. El método de extracción de DNA requiere un tiempo aproximado de 30 minutos.

## **A2.4 CARACTERIZACION DE CEPAS DE *Agrobacterium* spp. AISLADAS DE TUMORES DE VID EN GALICIA.**

**Lastra, Beatriz', López, Maria Milagros 1.**

1. *Departamento de Biología Vexetal. Facultade de Biología. Universidade de Santiago de Compostela. Campus Sur s/n. 15705 Santiago.*
2. *Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias. Apdo. Oficial. 461 13 Moncada, Valencia.*

Los tumores de la vid, causados por las especies *Agrobacterium vitis* y *A. tumefaciens*, son frecuentemente observados en viñedos viejos de la mayoría de las comarcas vitícolas gallegas pero, hasta el momento no se había abordado el estudio de su distribución. Por ello, los objetivos de este trabajo fueron conocer la extensión de esta enfermedad y caracterizar los aislados obtenidos.

Se escogieron 88 parcelas situadas en las diferentes Denominaciones de Origen y se determinó la presencia de síntomas de *Agrobacterium*. Se recogieron los tumores de cinco plantas de cada parcela para realizar el aislamiento y caracterización de las bacterias patógenas presentes. Se estudiaron 145 aislados a los que se determinó su biovar y especie. También se estudió el catabolismo de opinas y la sensibilidad a agrocina 84 y ALS84 producidas por la cepa K84 de *Agrobacterium*. En una selección de 33 cepas se analizó el rango de huéspedes, la reacción frente al anticuerpo monoclonal de *A. vitis* AbF21-1D3G7C8 en ELISA-i y la presencia de secuencias complementarias a tres parejas de cebadores que amplifican la región intercistronica entre el virB y virG, un fragmento del gen ipt y otro del operón virC.

Se constató la presencia de tumores de la vid en todas las zonas de Galicia visitadas, siendo la D.O. Ribeiro la que presentó una mayor incidencia de la enfermedad y la D.O. Rías Baixas la menos afectada. En los cultivares Alicante Bouschet, Godello y Jerez aparecieron tumores con mayor frecuencia, siendo escasos en el cv. Albariño.

Las cepas de *Agrobacterium* aisladas pertenecían mayoritariamente al biovar 3 y, por ello, corresponden a la especie *A. vitis* y se caracterizaban por catabolizar la octopina, ser resistentes a los antibióticos producidos por la cepa K84 y tener un amplio rango de huéspedes. El anticuerpo monoclonal reconoció la mayor parte de las cepas de *A. vitis* ensayadas y señaló la existencia de una elevada relación serológica entre los aislados gallegos. Los cebadores del gen ipt reconocieron la mayor parte de las cepas de *Agrobacterium*, pero dichas cepas no amplificaron con los otros cebadores. La utilización para el diagnóstico de la enfermedad de dicho monoclonal y de los cebadores del gen ipt parece prometedora, según los resultados obtenidos, aunque debe ser optimizada con el fin de identificar un mayor todos los aislados presentes en Galicia.

## A2.5 NUEVOS CASOS DE FITOPLASMAS DIAGNOSTICADOS EN ESPAÑA

Abad P.<sup>1</sup>, Font I.<sup>1</sup>, Espino A.I.<sup>2</sup>, González A.<sup>2</sup>, Santiago R.<sup>3</sup>, Pérez J.L.<sup>4</sup>, Serra J.<sup>5</sup>, Torres E.<sup>6</sup>, Dally E.L.<sup>7</sup>, Davis R.E.<sup>7</sup> y Jordá C.<sup>1</sup>

1. *Producción Vegetal. Patología Vegetal. Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos. Universidad Politécnica. Camino de Vera nº14. 46022 - Valencia.*
2. *Laboratorio de Sanidad Vegetal. Consejería de Agricultura, Pesca y Alimentación del Gobierno Canario.*
3. *Laboratorio de Sanidad Vegetal. Badajoz .*
4. *Laboratorio de Sanidad Vegetal. La Rioja.*
5. *Laboratorio de Sanidad Vegetal. Valencia.*
6. *Laboratorio de Sanidad Vegetal. Barcelona.*
7. *USDA. A.R.S. Molecular Plant Pathology Laboratory. Beltsville. Maryland 20705*

En el transcurso del año pasado se han analizado diferentes muestras vegetales procedentes de distintas zonas geográficas españolas, diagnosticándose en ellas diversos fitoplasmas como agentes causales de estas enfermedades.

Para comprobar la presencia de fitoplasmas en dichas muestras se realizó la extracción de DNA de las mismas y posteriormente se aplicó la técnica de amplificación de ácidos nucleicos (PCR), usando tres parejas de primers universales de la fracción 16S del DNA ribosómico (R16mF2/R1, R16F2n/R2 y P1/P7). El producto de la amplificación fué digerido con los enzimas de restricción *AluI*, *MseI*, *KpnI*, *RsaI*, *TaqI*, *BfaI*, *DdeI*, *EcoRII*, *HpaI*, *HpaII*, *ThaI* y *HaeIII*, aplicando cada uno de ellos según el caso.

Fitoplasmas pertenecientes al grupo “Stolbur”(16SrXII), han sido identificados en muestras de *Daucus carota* procedentes de Tenerife y Las Palmas; *Pyrus communis* procedente de Badajoz; *Feioja sellowiana* Berg. procedente de Pontevedra; *Vitis vinifera* procedente de Tenerife, La Rioja, Valencia y Gerona; *Salix babilonica* procedente de Valencia; *Lycopersicon sculentum* procedente de Castellón y *Olea europaea* procedente de Badajoz.

Fitoplasmas perteneciente al grupo del “Apple proliferation” (16SrX), han sido identificados en muestras de *Pyrus communis* procedentes de Valencia y Badajoz.

Fitoplasmas pertenecientes al grupo del “Elm yellows” (16SrV), han sido identificados en muestras de *Vitis vinifera* procedentes de Gerona y de La Rioja; denominándose a la enfermedad causada por éste Flavesencia dorada de la vid.

## A2.6 ANALISIS DE LOS PERFILES DE SCE LMW RNA (RNA ESTABLES DE BAJO PESO MOLECULAR) DE CEPAS DE *CLAVIBACTER MICHIGANENSIS* SUBSP. *SEPEDONICUS*.

José Luis Palomo<sup>2</sup>, Encarna Velázquez<sup>1</sup>, Pedro F. Mateos<sup>1</sup>, Pablo García-Benavides<sup>2</sup> y Eustoquio Martínez-Molina<sup>1</sup>.

1. Departamento de Microbiología y Genética. Ed. Departamental. Universidad de Salamanca.

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

La podredumbre anular es una enfermedad que afecta al cultivo de la patata, producida por una bacteria Gram positiva clasificada actualmente en la subespecie *sepedonicus* de la especie *Clavibacter michiganensis*. El mayor inconveniente que presenta la identificación de esta bacteria es el tiempo que transcurre antes de dar un resultado definitivo.

Los perfiles de LMW RNA han mostrado su utilidad en la identificación de bacterias. Géneros distintos difieren en la zona de los 5S rRNA, mientras que las diferentes especies pueden distinguirse en las zonas de los tRNA de clase 2 y clase 1.

En este trabajo se han estudiado los perfiles de SCE LMW RNA (RNA estables de bajo peso molecular obtenidos mediante Staircase electroforesis) de 53 cepas de *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* de diferentes procedencias geográficas, otras subespecies de *C. michiganensis* patógenas de otros cultivos, y otras especies patógenas o saprófitas de patata. Las especies incluídas fueron: *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus*, *insidiosus*, *nebraskense*, *michiganense* y *tesselarius*, *Curtobacterium flaccumfaciens* pvs. *betae* y *flaccumfaciens*, *Erwinia carotovora* ssps. *atroseptica* y *carotovora*, *Erwinia chrysanthemi*, *Pseudomonas solanacearum*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas chlororaphis* y *Rhodococcus fascians*.

Los análisis de SCE LMW RNA de las cepas estudiadas mostraron las tres zonas típicas de los perfiles de procariotas: 5S rRNA, tRNA de clase 1 y tRNA de clase 2. Todas las bacterias pertenecientes al mismo género presentaron idéntico perfil en la zona 5S rRNA. Las distintas especies de cada género se diferenciaron a nivel de los tRNA. Todas las cepas de *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*, independientemente de su procedencia, mostraron idéntico perfil. Las otras subespecies mostraron un perfil idéntico entre ellas pero diferente al de la subespecie *sepedonicus*. De acuerdo con estos resultados podría considerarse *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* como una especie diferente, para la que se propone el nombre de *Clavibacter sepedonicus*.

Los perfiles de SCE LMW RNA proporcionan una identificación rápida y segura de *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* disminuyendo considerablemente el tiempo necesario para la identificación de este patógeno.

## A2.7 DIAGNÓSTICO DE UNA NUEVA ENFERMEDAD EN ZANAHORIA

Font I.<sup>1</sup>, Abad P.<sup>1</sup>, Albiñana M.<sup>1</sup>, Espino A.I.<sup>3</sup>, Dally E.L.<sup>2</sup>, Davis R.E.<sup>2</sup> y Jordá C.<sup>1</sup>

1. *Producción Vegetal. Patología Vegetal. Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos. Universidad Politécnica. Camino de Vera nº14. 46022 - Valencia.*

2. *USDA. A.R.S. Molecular Plant Pathology Laboratory. Beltsville. Maryland 20705*

3. *Laboratorio de Sanidad Vegetal. Consejería de Agricultura Pesca y Alimentación del Gobierno Canario.*

En los últimos 15 años se ha observado en el cultivo de la zanahoria (*Daucus carota* L) sintomatologías anómalas que cursan como amarilleamientos y enrojecimientos en hojas adultas, proliferación de hojas, así como deformación de raíces, reducción del tamaño y envejecimiento prematuro de las mismas.

Las áreas productoras más afectadas son Tenerife y Las Palmas, diagnosticándose algún caso en la España peninsular.

En la mayoría de las zanahorias enfermas se encontraron pulgones de la especie *Cavariella aegopodii* y psilas especie *Bactericera trigonica*, anteriormente nombrada como *Tryza nigricornis*, encontrándose las psilas siempre en mayor número que los pulgones.

La sintomatología descrita podría corresponder con la infección de algunos de los virus descritos en zanahoria como Carrot red leaf virus, Carrot thin leaf virus y Carrot mottle virus; por lo que se intentó la transmisión de la enfermedad a través de los pulgones traídos en las mismas muestras, como posibles vectores, y paralelamente se realizaron inoculaciones mecánicas a diferentes plantas test para así comprobar la transmisión y por lo tanto un posible agente causal. Entre las plantas test que se ensayaron podemos citar: *Chenopodium quinoa*, *Coriandrum sativum*, *Nicotiana clevelandii*, *Nicotiana tabacum*, *Phaseolus vulgaris*, *Anthriscus cerefolium*, *Apium graveolens*, *Petroselinum crispum*, *Daucus carota*; las cuales fueron seleccionadas de las descritas como plantas indicadoras de los virus anteriormente citados. Los resultados de la transmisión tanto a través de los pulgones como por inoculación mecánica fueron negativos, no dando las plantas test utilizadas respuesta alguna.

Las zanahorias enfermas se transplantaron para seguir la evolución de la enfermedad, observándose diferencias en el momento de aparición de los síntomas entre aquellas que se pusieron en fitotrón en condiciones estivales de las que se pusieron en lugar menos templado. Las hojas nuevas que brotaron de las zanahorias en el fitotrón presentaban los mismos síntomas de la enfermedad antes que las zanahorias colocadas en lugar menos templado.

Se barajó la posibilidad de la presencia de fitoplasmas en dichas muestras y de su posible transmisión por la psila *Bactericera trigonica*. Se realizó extracción de DNA de las plantas afectadas y posteriormente se aplicó la técnica de amplificación de ácidos nucleicos (PCR), usando dos parejas de primers universales de la fracción 16S del DNA ribosómico (R16mF2/R1 y R16F2n/R2). El producto de la amplificación ha sido digerida con los enzimas de restricción *AluI*, *MseI*, *KpnI* y *RsaI*. Así se diagnosticó que en la mayoría de las muestras analizadas el agente causal se trataba de un fitoplasma incluido dentro del grupo Stolbur. Encontrándose en estudio la implicación de la psila como posible transmisor de la enfermedad.

## A2.8 PRODUCCIÓN DE ANTISUEROS PARA LA DETECCIÓN DE PATOGENOS DE ALUBIA TRANSMITIDOS POR SEMILLA

Díez Navajas, A. M.<sup>1</sup>, Marquínez, R.<sup>2</sup>, García-Pérez, A.<sup>3</sup> y Legorburu, F. J.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> AZTI-CIMA, Apartado 46, 01080 VITORIA/GASTEIZ.

<sup>2</sup> Servicio de Semilla y Plantas de Vivero, Departamento de Industria, Agricultura y Pesca, Bizente Goikoetxea 6, 01008 VITORIA/GASTEIZ.

<sup>3</sup> AZTI-SIMA, Berreaga 1, 48160 DERIO (Bizkaia)

El mosaico común y la grasa son dos de las enfermedades más comunes en los cultivos españoles de alubia. En ambos casos, la semilla constituye la fuente primaria de inóculo. La utilización de semilla de sanidad controlada supone, por lo tanto, el método más económico de control. Los métodos serológicos (ELISA e inmunofluorescencia) tienen una relación coste/calidad conveniente para los diagnósticos de rutina. Se pretende, por tanto, obtener antisueros específicos para los agentes etiológicos del mosaico común (potyvirus del mosaico común, BCMV y del mosaico común-necrosis, BCMNV), de la grasa (*Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*) y también para *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli*, otro patógeno de transmisión por semilla.

Las partículas de virus se purificaron por centrifugación diferencial, seguida de ultracentrifugación en gradiente de densidad. El antígeno somático de las bacterias se purificó según el método de Lyons y Taylor (1989). Se inmunizaron dos conejos por antígeno y se sacrificaron al cabo de una o dos semanas.

En el momento de redactar este resumen se dispone ya de un antisuero frente a *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*, el cual presenta una buena especificidad en inmunofluorescencia:

| <b>Bacteria</b>  |     | <b>Reacción</b> |
|--|-----|-----------------|
| <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>phaseolicola</i>          | +++ |                 |
| <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i> (de manzano) |     | --              |
| <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i> (de peral)   | --  |                 |
| <i>Pseudomonas solanacearum</i>                              |     | ---             |
| <i>Erwinia carotovora</i>                                    |     | ---             |
| <i>Erwinia chrysantemi</i>                                   |     | (+)             |

La experimentación con animales se realizó al amparo de la Directiva 86/609/CEE. Esta investigación se enmarca dentro del proyecto SC95-004-C5-5, del Programa Sectorial de I+D Agrario y Alimentario del MAPA.

## A2-9 DETECCIÓN MOLECULAR Y SEROLÓGICA DE *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* EN OLIVO

Peñalver, R., Ferrer, A., Bertolini, E., García, M.A., Gorris, M.T. y López, M.M.

*Departamento de Protección Vegetal y Biotecnología. Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA). Apartado Oficial, 46113 Moncada, Valencia.*

*Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* (*P.s.s*) es la bacteria causante de la enfermedad conocida como tuberculosis del olivo. Esta bacteria induce tumores en la planta debido a la producción de la fitohormona ácido 3-indol acético (AIA). La enfermedad puede causar importantes reducciones en la cosecha y pérdidas en viveros productores de variedades. Por ello, es de gran interés la puesta a punto de métodos de detección sensibles y específicos de dicha bacteria, ya que además no están disponibles.

Se han diseñado iniciadores específicos capaces de amplificar secuencias del gene *iaaL*, que está implicado en una posterior metabolización del AIA en la bacteria. Mediante el uso de estos iniciadores se obtuvo un producto de PCR de 455 pb con el ADN de una colección de 49 cepas de *P.s.s.* y otros patovares aisladas de diversos países y hospedadores. No se obtuvo ningún producto de PCR a partir del ADN de 40 cepas de flora saprofita obtenida de muestras de olivo. Se ha puesto a punto un protocolo de PCR simple y que permite ser utilizado de forma rutinaria en el análisis de muestras vegetales. La sensibilidad en la detección de *P.s.s.* en muestras de olivo es de  $10^2$  UFC/ml.

Para la puesta a punto de métodos serológicos, se han obtenido 6 antisueros preparados con 6 cepas de *P.s.* de distintos orígenes y hospedadores. Se ha estudiado la especificidad de dichos antisueros en ELISA indirecto frente a las 49 cepas de *P.s.* y a las 40 cepas de flora saprofita. La tasa de parentesco entre las distintas cepas de *P.s.s.* fue muy similar, indicando que trata de una especie serológicamente homogénea. Se ha seleccionado uno de los antisueros para ser utilizado en la detección serológica de *P.s.* ya que no ha mostrado reacciones cruzadas con bacterias saprofitas aisladas de olivo.

Se están aplicando los reactivos moleculares y serológicos obtenidos a la detección de *P.s.s.* en muestras de olivo con tumores y sin síntomas. Con ello se pretende poner a punto métodos sensibles y específicos para el diagnóstico y la detección de esta bacteria que resultan necesarios para la puesta en marcha de un programa de certificación del olivo.

## A2.10 IDENTIFICACIÓN DE UN FITOPLASMA EN HABA

Castro Serafina, Carazo Gerardo, Romero Javier.

*Departamento de Protección Vegetal, INIA. Autopista A-6 Km 7,5 28040-Madrid.*

El haba es una leguminosa de grano importante en la cuenca mediterránea, que se utiliza en la alimentación humana y animal. En los últimos años se ha incrementado la superficie sembrada en España, especialmente en zonas donde el cultivo era solamente marginal debido a la demanda de la industria procesadora de alimentos establecidas en estas zonas. Esta colonización de nuevas tierras de cultivo ha llevado a la aparición de nuevas enfermedades no existentes en las zonas tradicionales de cultivo. En Antequera (Málaga) hemos observado la presencia de plantas de habas con un marcado enanismo y hojas filiformes, filodia y aborto de flores, las cuales fueron analizadas en el laboratorio para determinar el agente causal de este síndrome. Para asociar la presencia de fitoplasmas con esta sintomatología usamos: i) La tinción mediante el fluorocromo 4-6 diamidino 2-fenil indol "DAPI" observando la presencia de fluorescencia en el floema. ii) El injerto en verde en plantas de *Catharantus roseous* (planta indicadora para los fitoplasmas) y iii) Amplificación por PCR de la región conservada del gen 16 SrRNA de los fitoplasmas. Tres tipos de cebadores fueron usados: R16F2N/R16R2 el FU5/RU3 y el universal que amplificaban bandas de 1,4, 0,9 y 0,5 Kb. Combinaciones de estos cebadores fueron usadas en experimentos de PCR-nido. Mediante cortes por enzimas de restricción de las bandas de DNA amplificadas y su posterior análisis en geles de poliacrilamida hemos podido asociar a este fitoplasma del haba con un determinado grupo taxonómico de fitoplasmas. Es la primera vez que se describe la presencia de fitoplasmas asociado con este cultivo



## A2.11 INCIDENCIA Y DETECCIÓN DEL FITOPLASMA ASOCIADO AL DECAIMIENTO DEL PERAL EN CATALUÑA

Batlle,A.<sup>1</sup>, Laviña,A.<sup>1</sup>, Marta,F.<sup>2</sup> y Medina,V.<sup>2</sup>

1.-IRTA, Departament de Patologia Vegetal, Ctra. Cabrils s/n. 08348 CABRILS (Barcelona)

2.-Universitat de Lleida-IRTA, Rovira Roure177, 25006-LLEIDA

La enfermedad conocida como *Pear decline* (PD), transmitida por insectos homópteros del genero *Psylla* y asociada a la presencia de fitoplasmas, parece ser la enfermedad causante de la mayor parte de síntomas de decaimiento que se están observando en plantaciones de peral de nuestro país. La sintomatología de la enfermedad es variable dependiendo de la variedad y de la estación. Los más patentes son, menor desarrollo vegetativo, necrosis de botones florales y yemas terminales, enrojecimiento y caída prematura de hojas. En el caso del decaimiento lento que es el observado hasta el momento en nuestro país, la muerte del árbol se produce a partir de los dos años desde el inicio de la enfermedad, sin embargo en algunos casos se puede producir una recuperación temporal del mismo.

El objetivo de este trabajo ha sido determinar la correlación entre las sintomatologías de decaimiento observadas en plantaciones de peral de Cataluña y la presencia del fitoplasma del PD, así como determinar la mejor técnica de detección. Para ello se escogieron 10 parcelas de la provincia de Lleida que presentaban los síntomas descritos anteriormente y se tomaron muestras de 25 árboles de cada una de ellas, las cuales fueron analizadas mediante PCR, para determinar la presencia de fitoplasmas. Se comparó la sensibilidad de diferentes metodologías: Tres métodos de extracción y realización del PCR con iniciadores universales y específicos, utilizando amplificación simple y nested PCR. También se ha realizado una prospección para determinar los posibles vectores de la enfermedad.

Los resultados obtenidos hasta el momento indican que la incidencia de plantas con síntomas de decaimiento en 10 parcelas afectadas de la provincia de Lleida oscila entre el 8,3% y el 23%. Las incidencias más altas se encuentran en parcelas de la variedad Llimonera. En todas las parcelas afectadas se detectó el fitoplasma asociado al PD, si bien el porcentaje de muestras con síntomas que fue positivo para PD osciló entre el 50 y el 60%. Esto puede ser debido a la distribución irregular del fitoplasma en el árbol, lo que impide muchas veces su detección. Las muestras de árboles afectados pertenecían a las variedades Blanquilla, Barlett, Llimonera y Williams. Se han capturado insectos pertenecientes a las familias *Typhocybidae*, *Jassidae*, *Fulgoroidea* y *Psylloidea*, determinándose cinco especies del genero *Cacopsylla*. La técnica más sensible hasta el momento ha sido la purificación del DNA a partir de una fracción enriquecida de fitoplasmas y la realización de nested PCR mediante una doble amplificación del DNA obtenido. Para la realización de esta técnica se realizó en primer lugar la amplificación de un fragmento de 1700 pb del gen 16S rRNA común a la mayoría de fitoplasmas conocidos, utilizando los iniciadores P1 y P7. Para la segunda amplificación se utilizaron los iniciadores fU5/rU3 que amplificaron un fragmento de 880 pb. 10 ul del DNA amplificado fue digerido con diferentes enzimas de restricción con el fin de clasificar el fitoplasma. Con la utilización del iniciador específico PYLR también se obtuvo la detección del fitoplasma.

## **A2.12 CARACTERIZACIÓN DE *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* MEDIANTE LOS SISTEMAS API-50CH Y API-ZYM. UTILIDAD PARA UN DIAGNÓSTICO RÁPIDO.**

Palomo Gómez, J. L.<sup>1</sup>, Martínez Molina, E.<sup>2</sup>, Velázquez Pérez, E.<sup>2</sup>

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

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

*Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* (Cms), causante de la podredumbre anular de la patata, es una bacteria de cuarentena contemplada en la Directiva 77/93/CEE, cuya metodología oficial de análisis se describe en la Orden 7591 de 1994.

El análisis de la bacteria en tubérculos con infecciones latentes es complejo y requiere inoculaciones en planta de berenjena para permitir su aislamiento y la realización de una serie de pruebas fisiológicas y bioquímicas. El proceso completo tiene una duración mínima de 75 días. Para reducir este periodo, disminuyendo las pérdidas ocasionadas a los almacenistas y facilitar el trabajo de los laboratorios de diagnóstico, se ha caracterizado bioquímicamente y enzimáticamente la bacteria mediante sistemas API, estudiando la posibilidad de su utilización como sistema de identificación rápido.

Se han utilizado 53 cepas de Cms de diversas procedencias, así como otras 27 cepas de otros microorganismos relacionados taxonómicamente, otros patógenos de patata y bacterias no patógenas aisladas de patata. Para la caracterización bioquímica se ha utilizado el sistema API-50CH, optimizado con la utilización de un medio base con Azul de bromotimol como indicador. La caracterización enzimática se realizó mediante el sistema API-ZYM, con una incubación de 4 horas a 32 ° C.

Las cepas de Cms estudiadas mostraron una gran homogeneidad tanto en la caracterización bioquímica como en la enzimática, probablemente debido a su baja persistencia en el suelo y a su falta de adaptación a este hábitat. Se han encontrado pocas diferencias con las otras subespecies de *Clavibacter michiganensis*, sin embargo al ser patógenas de otros cultivos es difícil que interfieran en el proceso de análisis. Con el resto de microorganismos estudiados, los perfiles API han mostrado diferencias claras. Estos resultados hacen posible la utilización de los sistemas API-50CH y API-ZYM para una rápida caracterización de la bacteria, disminuyendo así la duración de los análisis y simplificando el proceso.

## A2.13 DETECCIÓN DE *Erwinia amylovora*, CAUSANTE DEL FUEGO BACTERIANO DE LAS ROSÁCEAS, EN ESPAÑA. DISTRIBUCIÓN Y EVOLUCIÓN DE LA ENFERMEDAD.

Palomo Gómez, J.L.<sup>1</sup>; García Benavides, P.<sup>1</sup>; Borrueal Olano, M.L.<sup>2</sup>; Berra Lerchundi, D.<sup>3</sup>

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

2.- Laboratorio Agrario. Gobierno de Navarra. Avda. Serapio Huici, s/n. 31610 Villava (Navarra)

3.- Laboratorio de Sanidad Vegetal. Diputación Foral de Guipúzcoa. 20150 Zizurkil (Guipúzcoa)

El Fuego bacteriano, *Erwinia amylovora* (Burril) Winslow et al., es un organismo nocivo contemplado en el anexo II-B de la Directiva 77/93, que causa daños graves en frutales de pepita y rosáceas ornamentales. Conocida en Estados Unidos desde 1780, se detecta por primera vez en Europa en Inglaterra (1957), extendiéndose rápidamente hasta llegar al sur de Francia en 1978. España es declarada como zona protegida dentro de la Unión Europea en 1993, intensificándose las medidas de vigilancia y los análisis en los laboratorios de sanidad vegetal de las Comunidades Autónomas.

La metodología de análisis empleada se basa en el aislamiento de la bacteria en medios de cultivo (CCT, King B y Levano), comprobación del poder patógeno por inoculación en peras inmaduras, caracterización mediante pruebas bioquímicas y fisiológicas, así como utilización de ELISA-DASI enriquecimiento y PCR.

Como resultado de estos análisis se detecta en Guipúzcoa en 1995, el primer caso de fuego bacteriano, sobre manzano de sidra, en las proximidades de la frontera francesa. En 1996 y 1997 se extiende por el nordeste de Guipúzcoa, con 25 y 66 casos respectivamente. La mayor parte de las infecciones se produjeron sobre el género *Malus*, y en menor medida en *Pyrus*, *Pyracantha*, *Crataegus*, *Cotoneaster* y *Sorbus*.

En 1996 aparece un foco en un vivero de la provincia de Segovia, sobre planta de *Crataegus monogyna* procedente de Bélgica. Analizadas 102 muestras en Castilla y León se detectaron 10 casos positivos, todos ellos en la provincia de Segovia, correspondientes a los géneros *Crataegus*, *Pyracantha*, *Pyrus* y *Sorbus*. Durante el año siguiente no se detectó ningún caso más en la región, por lo que puede considerarse erradicado.

En Navarra el primer foco aparece en 1996 en la localidad de Eratsun en una plantación de manzano de sidra. En 1997 aparecieron varios focos en la zona norte de la región, alejados de la zona de producción frutícola de la Comunidad, sobre los géneros *Malus*, *Pyracantha*, *Pyrus*, *Mespilus* y *Cydonia*. En todos los casos se aplicaron medidas de erradicación con arranque y destrucción del material contaminado.

## A2.14 DETECCIÓN DE *Pseudomonas syringae* pv. *aptata* EN REMOLACHA AZUCARERA Y DE MESA EN CASTILLA Y LEÓN.

Palomo Gómez, J.L., García Benavides, P.

*Centro Regional de Diagnóstico. Consejería de Agricultura y Ganadería. Junta de Castilla y León. Apdo. 61, 37080 Salamanca.*

*Pseudomonas syringae* pv. *aptata* es una bacteria que puede causar daños en el cultivo de la remolacha azucarera y de mesa. Originaria de América del Norte, existe en Europa Central desde hace algunas decenas de años y es cada vez más frecuente en Europa Occidental. Se desarrolla en condiciones de elevada humedad y generalmente después de daños por helada. Los síntomas que produce son amarilleamiento del borde de las hojas, con necrosis que avanza a lo largo de las nervaduras, formando manchas negras, que se disgregan, dividiendo la hoja. Los daños suelen desaparecer al cambiar las condiciones ambientales.

En España, hasta ahora, la bacteria no había sido identificada. En junio de 1997, y coincidiendo con un período de bajas temperaturas seguido de precipitaciones continuadas, se detectaron algunos casos con sintomatología clara de *P.s.* pv. *aptata* sobre remolacha azucarera en las provincias de Valladolid, Segovia y Zamora. En 1998, con una climatología muy similar, se han detectado varios casos en remolacha azucarera en la provincia de Salamanca, y sobre remolacha de mesa en la provincia de Segovia.

En todas las plantas con síntomas se aisló una bacteria, confirmándose que se trataba de *Pseudomonas syringae*. Existen dos patovares de *Pseudomonas syringae* descritos como patógenos en remolacha, *aptata* y *syringae*. Se realizaron pruebas bioquímicas para determinación del patovar, sin embargo el perfil obtenido resultó ser común a *P.s.* pv. *aptata* y a *P.s.* pv. *syringae*. Mediante inoculación en planta de remolacha se reprodujeron los síntomas típicos del patovar *aptata*. Reaislada la bacteria de las plantas inoculadas se realizaron las pruebas bioquímicas anteriores, obteniéndose el mismo perfil que la bacteria inoculada.

## A2.15 ANALISIS DE LOS PERFILES DE SCE LMW RNA (RNA ESTABLES DE BAJO PESO MOLECULAR) DE CEPAS DE *AGROBACTERIUM* AISLADAS A PARTIR DE TUMORES DE ALUBIA Y REMOLACHA.

Encarna Velázquez<sup>1</sup>, José Luis Palomo<sup>2</sup>, Pedro F. Mateos<sup>1</sup>, Pablo García-Benavides<sup>2</sup> y Eustoquio Martínez-Molina<sup>1</sup>.

1. Departamento de Microbiología y Genética. Ed. Departamental. Universidad de Salamanca.

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

El Género *Agrobacterium* incluye especies patógenas de plantas, *A. tumefaciens*, *A. rubi*, *A. vitis* y *A. rhizogenes*, junto a una especie no patógena, *A. radiobacter*. La patogenicidad de estas especies está mediada por plásmidos (pTi y pRi) que contienen los genes de la virulencia. Esta circunstancia conduce a la necesidad de reproducir los síntomas en plantas antes de considerar definitiva la identificación de un aislado ya que algunas biovariedades de las especies patógenas no se distinguen bioquímicamente de otras biovariedades de especies no patógenas.

En la presente comunicación se presentan los perfiles de SCE LMW RNA (RNA estables de bajo peso molecular obtenidos mediante Staircase electroforesis) de 15 cepas aisladas a partir de tumores formados en alubia y en remolacha así como 14 cepas de referencia de *A. tumefaciens*, *A. rubi*, *A. vitis*, *A. rhizogenes* y *A. radiobacter*.

Los análisis bioquímicos de las cepas aisladas permitieron asignarlas a las biovariedades 1 de *A. tumefaciens* y *A. radiobacter*. Sin embargo, cuando se inocularon en planta de tomate y tabaco no se indujo la producción de tumores. Teniendo en cuenta estas características y siguiendo los criterios del Manual de Bergey de Bacteriología Sistemática no es posible la asignación de estas cepas a una especie patógena. Todas las cepas, no obstante, portaban plásmidos de tamaños diversos que se pusieron de manifiesto en geles horizontales de agarosa al 0,7%.

Los perfiles de SCE LMW RNA de todas las cepas aisladas presentaron las tres zonas descritas para procariotas: 5S rRNA, tRNA de clase 1 y tRNA de clase 2. El análisis de los SCE LMW RNA de las cepas estudiadas permiten distribuir las cepas en cuatro grupos, incluyendo las cepas de referencia.

Algunas cepas de referencia de la misma especie incluidas en el estudio han mostrado perfiles diferentes entre sí y coincidentes con cepas de otra especie, lo que demuestra la necesidad de profundizar en los estudios taxonómicos de este grupo.

## **A2.16 UNA NUEVA TOXINA ANTIMETABOLITO PRODUCIDA POR CEPAS DE *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* AISLADAS DE MANGO.**

Durán, V.E.; Arrebola, E.; Olea, F.; Pérez-García, A.; Cazorla, F.M. y de Vicente, A.

*Departamento de Microbiología, Facultad de Ciencias, Universidad de Málaga 29071, Málaga.*

*Pseudomonas syringae* pv. *syringae* es el agente causal de la necrosis apical del mango, una enfermedad bacteriana que produce importantes daños en los cultivos de este árbol tropical en el sur de la Península Ibérica. Esta bacteria se ha descrito como productora de varias fitotoxinas como las siringomicinas, siringotoxinas, siringopeptinas o siringoestatinas, cuyo nivel de actuación se sitúa en la membrana celular, provocando necrosis en las zonas afectadas. Otro grupo de toxinas descritas en distintas cepas de *P. syringae* son las toxinas antimetabolitos, cuya diana son diferentes puntos del metabolismo del nitrógeno, especialmente en la ruta de biosíntesis de aminoácidos; de este último grupo se han estudiado en profundidad, la tabtoxina, producida por *P. syringae* pv. *tabaci*, pv. *coronafeciens* y pv. *garcae*, e inhibidor irreversible de la Glutamina sintetasa (GS); y la faseolotoxina, producida por *P. syringae* pv. *phaseolicola* y que inhibe la Ornitinatranscarbamilasa (OCT). Hasta ahora no se había descrito ninguna toxina de este tipo producida por cepas de *P. syringae* pv. *syringae*.

En nuestro laboratorio, mediante ensayos microbiológicos de inhibición del crecimiento de *Escherichia coli* en medio mínimo y de reversión de la misma en presencia de distintos aminoácidos, se puso de manifiesto en cepas de *P. syringae* pv. *syringae*, patógenas de mango, la producción de sustancias antimetabolito excretadas al medio de cultivo; cuyo punto de actuación se ha sugerido sea la enzima Ornitina-acetiltransferasa (OAT), perteneciente a la ruta biosintética de la arginina. Actualmente se están realizando estudios a nivel bioquímico de inhibición de la actividad enzimática de la OAT de tejidos vegetales en presencia de filtrados de cultivos de *P. syringae* pv. *syringae* con actividad toxigénica. También se han aislado cepas de *P. syringae* pv. *tomato* que producen toxinas antimetabolito, en este caso las dianas posibles son las enzimas N-acetilglutamilfosfato y/o N-acetilglutamilsemialdehído, pertenecientes también a la ruta biosintética de la arginina, aunque este aspecto todavía permanece por dilucidar. Por otra parte, varias cepas de *P. syringae* pv. *syringae* aisladas de mango, se están utilizando en ensayos de mutagénesis con el transposón Mini-Tn5Km2 mediante conjugación biparental con la cepa donadora *Escherichia coli* S17 $\lambda$ pir que porta el plásmido pUT:Mini-Tn5Km2 (Cedido amablemente por V. de Lorenzo, C.N.B.). En estos momentos ya disponemos de mutantes que no manifiestan actividad tóxica, y nuestro objetivo es identificar los genes implicados en la producción de esta toxina tras la clonación de las secuencias génicas que flanquean al transposón insertado.

## A2.17 DIFERENCIACIÓN DE AISLADOS DEL FITOPLASMA DEL STOLBUR MEDIANTE ANÁLISIS DEL POLIMORFISMO CONFORMACIONAL DEL DNA MONOCATENARIO (SSCP)

Batlle,A<sup>1</sup>, Rubio,L<sup>2</sup>, Laviña,A<sup>1</sup>.

1. Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentàries (IRTA), Ctra. cabrils s/n. 08348 Cabrils (Barcelona). 2. Department of Plant Pathology. University of California, Davis, California 95616, USA.

Los estudios filogenéticos de los fitoplasmas realizados en estos últimos años se han basado principalmente en la utilización de la técnica de la PCR para la amplificación de un fragmento del gen 16S ribosómico y la realización de posteriores análisis de restricción. Sin embargo este gen presenta una secuencia muy conservada y en la mayoría de casos su grado de polimorfismo no es suficiente para diferenciar aislados de un mismo grupo. Otra alternativa es diseñar iniciadores específicos para fragmentos de DNA no ribosómico. Pero este método no es fácilmente aplicable ya que es necesario conocer previamente un fragmento de la secuencia nucleotídica específica de cada fitoplasma lo que encarece el proceso y por otro lado tampoco es suficientemente específica para la diferenciación de aislados.

La técnica del análisis del polimorfismo conformacional de ADN monocatenario (SSCP, "Single-Strand Conformation Polymorphism"), que permite detectar pequeñas variaciones en la secuencia nucleotídica de fragmentos de DNA, puede ser adecuada para la clasificación y diferenciación de aislados de fitoplasmas.

Los análisis de SSCP realizados en este trabajo se han hecho con fragmentos de DNA amplificados con iniciadores específicos para un fragmento no ribosómico del fitoplasma del stolbur. El producto del PCR fue desnaturalizado y comparado por SSCP mediante electroforesis en gel de poliacrilamida al 8%.

En los análisis realizados con varios aislados de stolbur procedentes de vinca e insectos infectados por stolbur y procedentes de distintas zonas geográficas se han obtenido cuatro perfiles distintos. Se encontraron diferencias entre un aislado procedente de Francia y un aislado procedente de España. Así mismo se obtuvo el mismo perfil de SSCP para stolbur procedente de *Cicadula divariaca* y *Hardya tenuis*, mientras que los procedentes de *Psamotettix striatus* y *Zyginidia scutellaris* presentaron perfiles individuales.

### A3.1 INVENTARIO FÚNGICO DE LAS SEMILLAS DE CARDO (*Cynara cardunculus* L.)

Sinobas Alonso, J. , Iglesias González, C. , Varés Megino, L.

**Dpto. de Producción Vegetal: Botánica y Protección Vegetal. Universidad Politécnica de Madrid.**

Se analizaron 37 muestras de semillas de cardo sobre medio PDA y K de las cuales, 28 procedían de la U. D. de Botánica de la Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos de Madrid, 6 correspondían al Servicio de Investigación Agraria, finca “La Orden” (Badajoz) y 3 procedían del Departamento de Tecnología en Producción Vegetal, CSIC (Zaragoza).

La analítica realizada evidencia que las semillas de cardo son portadoras de una serie de hongos comunes, tales como: *Alternaria*, *Cladosporium*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Rhizopus*, *Nigrospora*, *Drechslera*, *Aureobasidium*, *Ascochyta* y *Fusarium*. Destacan por su potencial patogenicidad, especies de los géneros *Ascochyta* y *Fusarium*.

En las muestras procedentes de Madrid, predominaron las especies de *Alternaria* y *Cladosporium*. Sin embargo, en las procedentes de Badajoz y Zaragoza predominaban las de *Fusarium* y *Alternaria*.



### A3.2 IDENTIFICACION DE ESPECIES DE *Monilinia*

Corazza, L.<sup>1</sup>, Cook, R.T.A.<sup>2</sup>, Lane, C.R.<sup>2</sup>, Brown, A.<sup>3</sup>, Fulton, C.E.<sup>3</sup>, Van Leeuwen, G.C.M.<sup>4</sup>, Van Kesteren H.A.<sup>4</sup>, Pereira, A.M.<sup>5</sup>, Nazare-Pereira<sup>5</sup>, A., De Cal, A.<sup>6</sup>, Melgarejo, P.<sup>6</sup>

<sup>1</sup>ISPV, 00156 Roma, Italia.

<sup>2</sup>CSL, York, YO4 ILZ, Gran Bretaña.

<sup>3</sup>QUB, Belfast, BT9 5PX, Gran Bretaña.

<sup>4</sup>PD, 6700HC Wageningen, Holanda.

<sup>5</sup>UTAD, 5000 Vila Real, Portugal.

<sup>6</sup>INIA, 28040 Madrid, España.

De las tres especies de *Monilinia* que causan la podredumbre parda y el momificado de los frutos, *M. fructicola* es la que produce mayores daños en frutales de hueso. Esta especie está presente en América y Australia, pero no en Europa, y es uno de los organismos de cuarentena de la Unión Europea. Su morfología y biología son muy similares a las de las otras dos especies que sí están presentes en Europa, *M. fructigena* y *M. laxa*. Uno de los objetivos del proyecto FAIR1-0725 es el desarrollo de un método fiable y rápido que diferencie las tres especies. Aquí se presenta un método de identificación basado en caracteres morfológicos, que tiene valor por sí mismo y además sirve de referencia para el desarrollo de métodos de PCR y serológicos.

Se recogieron aislados de las tres especies en todos los continentes. Se incubaron seis aislados representativos de cada especie en placas de Petri con agar de patata dextrosa (APD) ó con agar de avena (OA) a 22 °C en la oscuridad (O) ó en 12 h de luz/12 h de oscuridad (O/L) midiéndose diferentes caracteres morfológicos a los 5 días. Se determinó asimismo la distancia del tubo germinativo hasta su primera ramificación en agar agua durante 24 h (considerándose largo >100 µm).

*M. laxa* mostró poca o moderada esporulación, sin anillos concéntricos ni colores amarillo miel, crecimiento en forma de roseta, y una fuerte línea de interacción con *M. fructigena* en OA. El tubo germinativo era corto. *M. fructigena* presentó una pobre a moderada esporulación, con frecuentes anillos concéntricos generalmente de color amarillo miel. No suele crecer en forma de roseta. Los tubos germinativos eran generalmente largos hasta la primera ramificación. *M. fructicola* produce abundante esporulación, formando generalmente anillos concéntricos en O/L, que nunca se tornan amarillo miel en O. El crecimiento fue rápido, nunca en forma de roseta y con una fuerte línea de interacción con *M. fructigena*. Los tubos germinativos eran largos.

Los datos de la secuencia de nucleótidos de las regiones ITS1 y 2 separan los aislados en tres líneas que se asocian a las tres especies que se han separado morfológicamente. Se ha diseñado un cebador específico del gen 18S que diferencia rápidamente *M. fructicola* de las otras dos especies. El desarrollo de un test serológico rápido usando anticuerpos monoclonales está también en marcha.

Este trabajo se ha desarrollado gracias a la financiación de la Commission of the EC Agriculture and Fisheries programme (FAIR CT95-0725).

### A3.3 EFECTO DE LA LUZ NEGRA SOBRE EL CRECIMIENTO DE *Monilinia* Y SU RELACION CON LA IDENTIFICACION DE LAS ESPECIES

De Cal, A., Melgarejo, P.

*Departamento de Protección Vegetal. INIA. Carretera de La Coruña km 7. 28040 Madrid.*

La podredumbre parda y el momificado de los frutos es una enfermedad causada por tres especies del género *Monilinia*: *M. laxa*, *M. fructigena* y *M. fructicola*. La identificación de estas especies está basada en caracteres morfológicos y culturales que permiten la determinación de la mayoría de los aislados. Sin embargo, estos caracteres son variables y no son útiles con aislados atípicos o con organismos de cuarentena como *M. fructicola*.

Para establecer un criterio de diferenciación para cualquier aislado de *Monilinia* se ha estudiado el efecto de la luz negra (320-380nm) sobre el crecimiento miceliar de las tres especies, puesto que la luz es uno de los factores que más afecta al crecimiento y esporulación de este género. Se utilizaron 46 aislados recogidos de diferentes zonas de España y 16 aislados de otras partes del mundo.

La mayoría de los aislados fueron identificados como *M. laxa*, *M. fructigena* o *M. fructicola* por las características morfológicas del cultivo cuando crecía sobre APD (agar patata dextrosa) a 20-25°C en la oscuridad (observando durante 10 días el crecimiento, la esporulación, los márgenes de las colonias...) o por la longitud de los tubos germinativos de sus conidias hasta la primera ramificación. Los aislados de *M. laxa* se diferenciaban claramente por este último carácter, puesto que en esta especie era <60µm, mientras que para las otras dos especies superaba 200µm.

Para poder diferenciar los aislados atípicos de *M. fructigena* y *M. fructicola*, todos los aislados se incubaron en APD bajo luz negra con un fotoperiodo de 16h luz/8h oscuridad durante 5 días. Los cultivos se sitúan a 15 cm de la luz a una temperatura de 18°C (oscuridad)-22°C (luz). La luz negra redujo el crecimiento miceliar de *Monilinia*. Sin embargo todos los aislados de *M. fructigena* presentaban un crecimiento significativamente menor que los de *M. fructicola*, no llegando a alcanzar las colonias de *M. fructigena* más de 4 mm de diámetro. De esta forma todos los aislados de estas dos especies pueden ser identificados fácilmente por su crecimiento miceliar bajo luz negra. El diferente comportamiento de estas dos especies frente a la luz negra hace suponer que tienen fotoreceptores distintos para este tipo de luz.

#### A3.4 COMPARACIÓN ENTRE EL MÉTODO DE COMPATIBILIDAD, TÉCNICA ELISA Y PCR COMO BASE PARA LA IDENTIFICACIÓN DE LAS ESPECIES DE *Armillaria*

Aguín Casal, O.; Mansilla Vázquez J.P.; Abelleira Argibay, A.

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

*Armillaria mellea* es uno de los patógenos más importantes que afectan al sistema radicular de las plantas provocando la enfermedad conocida como Podredumbre blanca de la raíz. Hasta 1970 se creía en la existencia de una única y variable especie denominada *Armillaria mellea* (Vahl) Kummer pero, estudios posteriores sobre su ciclo biológico revelaron un modelo heterotálico y tetrapolar lo que posibilitó el establecimiento de grupos de incompatibilidad. Korhonen (1978) demostró que las cepas existentes en Europa se podían dividir en cinco grupos que mostraban diferencias a nivel morfológico, biológico y patológico. En la actualidad se reconoce la presencia de 6 especies de las cuales 2 se definen como patógenos altamente agresivos es el caso de *A. mellea sensu stricto* y *A. ostoyae* (Romagnesi) Henrik mientras que el resto se consideran como saprófitos o parásitos de debilidad: *A. borealis* Marxmuller and Korhonen, *A. gállica* Marxmuller, *A. cepistipes* Velenousky y *A. tabescens* (Scop:Fr) Emel.

La alta incidencia y las graves pérdidas económicas que este hongo está ocasionando en la provincia de Pontevedra, sobre todo, en comarcas vitivinícolas justifica la puesta a punto de una metodología que permita determinar, en el menor tiempo posible, las especies existentes en la zona. De las muchas técnicas desarrolladas para *Armillaria* por diferentes autores hemos seleccionado y comparado tres: Compatibilidad (Korkonen, 1978), ELISA (Priestley et al,1994) y PCR (Harrington &Wingfield, 1995). Las muestras analizadas se tomaron de material vegetal infectado, micelio y rizomorfos.

La técnica de compatibilidad, que exige el aislamiento adecuado del hongo en cultivo, es viable en las confrontaciones haploide-haploide pero en el caso de haploide-diploide las interpretaciones pueden ser muy ambiguas, subjetivas y confusas, además el tiempo empleado durante el proceso que puede oscilar entre 5-6 semanas resulta excesivo para un análisis de diagnóstico rutinario. La técnica Elisa no necesita el aislamiento del hongo, la muestra se puede coger directamente de la madera infectada o de rizomorfos obteniéndose los resultados en dos días pero la necesidad de disponer de anticuerpos monoclonales bien caracterizados limita su utilización. El material de partida en la técnica PCR es el mismo que en el método de compatibilidad, aunque algunos laboratorios ya han conseguido realizar el proceso a partir de madera afectada; la ventaja que presenta, además de ser un método rápido y efectivo, es que no necesita la extracción del ADN.

### A3.5 DETECCIÓN DE *Colletotrichum acutatum* EN PLANTAS DE ARÁNDANO *Vaccinium corymbosum* EN EL S.O. DE ANDALUCIA.

Barrau García, C. , De los Santos García, Berta., Romero Muñoz, F.

*Centro de Investigación y Formación Agraria "Las Torres-Tomejil". Apdo. Oficial, 41200 Alcalá del Río, Sevilla.*

*Colletotrichum*, causante de antracnósis en arándano, ha sido aislado de hojas en plantas de parcelas prospectadas en el término de Almonte (Huelva). Los síntomas, observados en la primavera tardía, de manera esporádica, se presentaron como lesiones iniciales de forma circular y color rojo-asalmonado que evolucionaron incrementando su tamaño y presentando un halo de color rojo más oscuro e intenso y asalmonado hacia el centro.

La identificación morfológica de *Colletotrichum* se realizó mediante crecimiento del hongo en PDA-Y observándose colonias densas con micelio aéreo blanco que se tornan gris y el reverso de color rosa asalmonado; conidias fusiformes; setas color marrón, generalmente aseptadas y ocasionalmente con un septo. En hifas indiferenciadas se forman numerosos apresorios marrones con bordes lisos.

Estudios de caracterización isoenzimática utilizando anticuerpos monoclonales específicos (MAFF 27 para *Colletotrichum* spp. y MAFT 26 para *C. acutatum*) llevados a cabo con los aislados obtenidos de hojas de arándano con síntomas de antracnósis, concluyeron positivamente que el hongo objeto de estudio era *Colletotrichum acutatum*.

Las inoculaciones realizadas con el hongo aislado, reprodujeron pudrición por antracnósis en frutos de fresa y arándanos de las variedades "Oso Grande" y "Misty" respectivamente.

La frecuencia de este patógeno en plantas de fresa y la proximidad de grandes extensiones de dicho cultivo en la zona, nos llevó a abordar el estudio del hongo y su patogenicidad.

### A3.6 PRIMER INFORME SOBRE *Colletotricum\_gloeosporioides* EN PLANTAS DE ARÁNDANO (*Vaccinium\_corymbosum*) EN EL S.O. DE ANDALUCIA.

Barrau García, C. y Romero Muñoz, F.

C.I.F.A "Las Torres y Tomejil" .Apdo. Oficial, 41200 Alcalá del Rio, Sevilla.

En Moguer (Huelva) y en plantas de arándanos "highbush" de las variedades "Sharp blue" y "Misty" cultivadas bajo condiciones de invernadero, se observaron lesiones secas marrón oscuro casi negras, en los ápices de las hojas que evolucionaron hacia la base y de las que se aisló *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz & Sacc.(=*Glomerella cingulata* (Stonem.) Spauld. & Schrenk).

La identificación morfológica del hongo se realizó mediante crecimiento en PDA-Y, observándose colonias densas de color grisáceo con escaso micelio aéreo. conidias cilíndricas con un extremo obtuso, hialinas y aseptadas. En cultivos de más de una semana se formaron, sobre hifas indiferenciadas, numerosos apresorios de color sepia con bordes irregulares, lobulados, con marcada pared externa. Setas color marrón con 1-4 septos. Ascas cilíndricas alargadas con 8 ascosporas fusiformes.

*C. gloeosporioides* se considera causante de pudrición por antracnósis en frutos de arándano "highbush" y "rabbiteye". Aunque la mayor incidencia económica de la enfermedad se cifra en la pérdida de frutos en postcosecha, el hongo ha sido aislado por diferentes autores, en hojas, ramas, yemas y flores, considerándose dichas estructuras como importante fuente de inóculo primario.

Inoculaciones realizadas en frutos de fresa y arándano de las variedades "Oso grande" y "Misty" respectivamente reprodujeron a los 4 días los síntomas de pudrición de frutos por antracnósis.

La significación económica así como el desarrollo epifítico de la enfermedad en las plantaciones comerciales de arándano en Huelva está siendo determinada en la actualidad.

### A3.7 MICROFLORA ASOCIADA AL *Populus tremula*

Santamaría Becerril, O., Pajares Alonso, J.A., Diez Casero, J.J.

*Departamento de Producción Vegetal y Silvopascicultura. Universidad de Valladolid. Escuela Técnica Superior de Ingenierías Agrarias (E.T.S.I.I.A.A.). Av./ de Madrid 57. Palencia.*

El álamo temblón se encuentra en una situación bastante crítica en la provincia de Palencia, desplazado a pequeños reductos dentro de otras masas arbóreas o en terrenos marginales. Sin embargo se trata de una especie interesantísima desde un punto de vista social, económico y ecológico.

La problemática situación que presenta el “temblón” puede verse agravada, entre otras razones, por la presencia de hongos patógenos que contribuyen a un debilitamiento y en casos extremos a la muerte de las ya de por sí mermadas masas de *Populus tremula*. Por este motivo se hace necesario un estudio de las micosis que delimite el rango real de la influencia de las enfermedades fúngicas en el estado de degradación que presentan dichas masas en la actualidad.

El objetivo de este trabajo consiste precisamente en el aislamiento, identificación y evaluación de daños causados por todos aquellos hongos presentes en los rodales de *Populus tremula* de la provincia de Palencia.

Para llevar a cabo este objetivo se seleccionaron nueve rodales para la toma de muestras en base a los siguientes criterios: condiciones edafoclimáticas, diferentes estructuras de masa y representatividad de la zona de muestreo. En cada rodal se hicieron dos muestreos (uno a savia parada y otro a savia movida) de hojas, ramas y tronco (corteza). Para el análisis y posterior diagnóstico de las muestras se hizo necesario el empleo de cámaras húmedas y siembras en medios de cultivo (PDA).

En general, por los resultados obtenidos hasta el momento, se puede decir que las masas de *Populus tremula* en la provincia de Palencia presentan un estado fitosanitario respecto a las enfermedades fúngicas bastante aceptable, ya que los hongos patógenos encontrados, tales como *Cytospora nivea*, *Cytospora chrysosperma*, *Fusarium* sp., *Mellampsora* sp. se han presentado en un porcentaje muy pequeño de las muestras. Mientras que la mayor parte de la micoflora encontrada son, o bien parásitos muy secundarios o bien saprófitos, como por ejemplo *Eutypa lata*, *Leucostoma personii*, *Ulocladium atrum*, *Discosia strobilina*...

### A3.8 ESTUDIOS MOLECULARES DE LA INTERACCIÓN DEL OLIVO CON *Spilocaea oleagina* (Cast.) Huges AGENTE CAUSAL DEL REPILO

González Lamothe, R.<sup>1</sup>; Laguna, L.<sup>1</sup>; Trapero A.<sup>2</sup>; Heredia, A.<sup>1</sup>; Valpuesta, V.<sup>1</sup> y Botella, M.A.<sup>1</sup>

*1Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Universidad de Málaga.*

*2Departamento de Agronomía, Universidad de Córdoba.*

La enfermedad de la caída de las hojas del olivo o Repilo está causada por el hongo hifomiceto *Spilocaea oleagina* (Cast) Huges, patógeno específico de esta especie. Los síntomas más característicos son la aparición de unas manchas de tamaño variable en el haz de las hojas, pudiendo también aparecer infección en el envés, el peciolo, el pedúnculo del fruto y el fruto (Trapero y Blanco, 1997). El aparato vegetativo del hongo consta de un entramado de hifas de posición subcuticular, de las que emergen a la superficie foliar conidióforos, que son los que van a dar lugar a las conidias, responsables del color de las manchas del haz de la hoja (Wilson y Miller, 1949; Goidanich, 1964; Gratini y Laviola, 1981; Gratini, 1933).

Entre las variedades de olivo existen diferencias de susceptibilidad al repilo, pero se desconocen las bases moleculares de la resistencia. La información es también muy escasa sobre los aislados que existen dentro de la especie *Spilocaea oleagina*.

**Con el objeto de avanzar en el conocimiento de esta interacción se han estudiado las cutículas de variedades susceptibles y resistentes al hongo. Resultados preliminares sobre el estudio de las ceras epicuticulares de ambas variedades indican determinadas diferencias en su composición.**

La aplicación de RAPDs a diversos aislados de *Spilocaea* muestra un perfil de bandas diferentes según su procedencia. El clonaje de estas bandas permitirá diseñar un método de detección temprana de la enfermedad por PCR. Además del uso de RAPDs, se está optimizando la técnica de AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) que nos permitirá una rápida determinación del aislado del hongo con el fin de determinar la distribución del mismo en distintas zonas afectadas.

Por último se ha clonado un gen que codifica para el RNA ribosómico 18S del hongo, para analizar sus relaciones filogenéticas.

Este trabajo está financiado por el proyecto OLI96-2185-CO4-03.

### A3.9 DETECCION DE *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli* MEDIANTE PCR

Alves Santos, F.M., Eslava, A.P., Díaz Mínguez, J.M.

*Area de Genética. Departamento de Microbiología y Genética. Universidad de Salamanca. Plaza de los Doctores de la Reina s/n. 37007. Salamanca.*

La fusariosis es, con mucho, el problema fitopatológico más serio que presentan los cultivos de judía en la zona acogida a la denominación específica “Judías de El Barco de Avila”. No se trata de una enfermedad nueva, pues su importancia ya se reconoce en 1926 (Benlloch y Cañizo, 1926). Con el nombre genérico de fusariosis se ha denominado a una serie de síntomas que pueden corresponder tanto a la pudrición radicular (“root rot”) típicamente causada por *Fusarium solani* f.sp. *phaseoli*, como a la fusariosis vascular (“Fusarium wilt” o “Fusarium yellows”) producida por *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli* (FOP).

Nuestro grupo ha realizado muestreos en la zona de El Barco de Avila durante los últimos años y hemos verificado la incidencia de fusariosis vascular. Los aislados de FOP recogidos reproducen en ensayos controlados los mismos síntomas observados en el campo (Díaz-Mínguez et al., 1996). El diagnóstico tradicional de la fusariosis vascular resulta complicado, debido a la confusión de síntomas antes mencionada, difícil, debido a la semejanza morfológica entre *F. solani* y *F. oxysporum* y a la aparición de muchos aislados de *F. oxysporum* que, aun siendo saprofitos, colonizan plantas debilitadas, y lento, por la necesidad de realizar ensayos de infección. En consecuencia, sería muy ventajoso disponer de un sistema de diagnóstico de la enfermedad rápido, fiable y metodológicamente sencillo.

Se han analizado aislados de FOP españoles, procedentes de El Barco de Avila, y extranjeros, correspondientes a las diversas razas descritas de este patógeno, con el fin de determinar su variabilidad genética. Una de las metodologías empleadas ha sido el análisis de marcadores tipo RAPD. De esta forma hemos obtenido marcadores RAPD que resultan característicos de FOP. Se ha determinado la secuencia nucleotídica de uno de ellos, lo cual ha permitido diseñar oligonucleótidos específicos que permiten la amplificación mediante PCR de un segmento de ADN de secuencia conocida (SCAR). Estos oligonucleótidos actúan como cebadores específicos para amplificar un fragmento de ADN únicamente cuando se utiliza como molde ADN de aislados de FOP. La utilización de ADN de aislados no patógenos o de otras formas especiales de *F. oxysporum*, o de especies fúngicas próximas ofrece resultados negativos. La detección específica de FOP puede realizarse directamente en muestras vegetales, sin necesidad de aislar y purificar el hongo, mediante un protocolo de extracción rápida de ADN. Los ensayos realizados tanto en plantas inoculadas artificialmente como en plantas enfermas recogidas en el campo han sido positivos. La detección del patógeno y el consiguiente diagnóstico de fusariosis vascular puede realizarse en estadios tempranos de la infección, cuando los síntomas son todavía muy leves.

Benlloch, M y J.D. Cañizo. 1926. Boletín de la estación de Patología Vegetal 1: 2-7. Díaz-Mínguez, J.M.; F.M. Alves-Santos, E.P. Benito and A.P. Eslava. 1996. Plant Dis. 80: 600.



### A3.10 INCIDENCIA DE LA PODREDUMBRE DE ACEITUNAS CAUSADA POR *Colletotrichum gloeosporioides* SOBRE CULTIVARES DE OLIVO.

Trapero, A., Viruega, J.R., Luque, F.

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

La podredumbre de fruto, momificado o “aceitunas jabonosas” del olivo, enfermedad causada por *Colletotrichum gloeosporioides* (= *Gloeosporium olivarum*), se caracteriza por la gravedad y lo errático de sus ataques. En España, la enfermedad afecta exclusivamente a las aceitunas y produce pérdidas elevadas tanto en el rendimiento como en la calidad del aceite. Sin embargo, el carácter ocasional de sus ataques ha motivado que apenas existan estudios sobre esta enfermedad.

**Las observaciones sobre la enfermedad se han realizado durante 1996-98 en campos de variedades de olivo del C.I.F.A. de Córdoba y en olivares comerciales de Córdoba, Jaén y Sevilla. En 1996-97, la intensidad de los ataques fue muy baja; pero en 1997-98, las temperaturas suaves y la elevada pluviometría del otoño propiciaron una epidemia severa que ha permitido establecer diferencias marcadas de susceptibilidad o resistencia entre los cultivares de olivo. Para ello, se realizó una evaluación visual estimando la proporción de aceitunas afectadas en el árbol y entre las caídas al suelo.**

Los síntomas iniciales fueron lesiones poco definidas que se extendieron con rapidez originando la podredumbre completa, el momificado y la caída de las aceitunas. La abundante esporulación del hongo dio lugar al aspecto jabonoso característico de las aceitunas afectadas. Además de los frutos, los pedúnculos resultaron también afectados, presentando una necrosis generalizada que se extendió desde el fruto hasta el ramo, quedando los pedúnculos adheridos a los ramos después de la caída de las aceitunas. Con frecuencia, los olivos severamente afectados presentaron intensas defoliaciones, pero éstas fueron debidas al Repilo (*Spilocaea oleagina*) o al Emplomado (*Mycocentrospora cladosporioides*), no habiéndose detectado ataques de *C. gloeosporioides* en hojas ni en ramos. Asimismo, también se observaron podredumbres de aceitunas debidas a otros hongos, pero su incidencia fue mínima comparada con la de *C. gloeosporioides*. De 307 cultivares evaluados en el campo mundial de Córdoba, en el que se desarrolló una grave epidemia de aceitunas jabonosas, el 19 % resultaron altamente resistentes (incidencia < 1%), mientras que algunas de las variedades más cultivadas en España, como ‘Cornicabra’, ‘Hojiblanca’, ‘Picudo’, ‘Lechín de Sevilla’, ‘Manzanilla de Sevilla’ o ‘Verdial de Badajoz’, fueron muy susceptibles. El cultivar ‘Picual’ resultó moderadamente susceptible en dicho campo. En cambio, en olivares comerciales con menor abundancia de inóculo, la incidencia de la enfermedad en ‘Picual’ fue muy baja, manifestando esta variedad un nivel de resistencia muy superior al de otros cultivares, como ‘Hojiblanca’, ‘Picudo’ o ‘Lechín de Sevilla’, que también fueron severamente afectados en estas condiciones.

### A3.11 FACTORES QUE INFLUYEN SOBRE LA GERMINACIÓN DE CONIDIAS Y EL CRECIMIENTO *IN VITRO* DE *Spilocaea oleagina*.

Segura Pérez, M.R., Trapero, A.

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

*Spilocaea oleagina*, agente del Repilo del olivo, es un hongo biotrofo difícil de cultivar *in vitro*. La falta de un medio que permita la esporulación del hongo, además de la variación en la germinabilidad de las conidias producidas en las lesiones de Repilo, nos ha llevado a estudiar los factores que influyen tanto en la germinación de las conidias como en el crecimiento *in vitro* del hongo.

El método utilizado para la germinación de las conidias fue puesto a punto en investigaciones anteriores. Básicamente, las suspensiones conidiales obtenidas de las lesiones foliares se incubaron en oscuridad durante 48 h a 15 C y 100% de HR. Los factores estudiados han sido el método de obtención de las conidias a partir de las hojas infectadas, el extracto de las hojas de olivo, el cultivar de procedencia, el pH de la suspensión conidial y la adición de diversas sustancias nutritivas, microelementos, vitaminas y antibióticos. Utilizando como medios básicos de cultivo el Czapek-Dox agar (CDA) y el medio SD, utilizado por Fothergill y Ashcroft para el cultivo de *Spilocaea pomi*, se ha estudiado el efecto de varias fuentes de carbono (glucosa, sacarosa, malta, manitol, ácido poligalacturónico y ácido oleico), así como varios compuestos nitrogenados (nitrato amónico, nitrato sódico y sulfato amónico). En ambos casos los medios se enriquecieron con vitaminas o se completaron con microelementos o con extracto de hoja de olivo (EHO). El crecimiento *in vitro* del hongo se evaluó midiendo el diámetro de la colonia mensualmente durante tres meses.

El método del baño de ultrasonidos resultó ser el más adecuado para la obtención de las conidias; mientras que el extracto de hojas de olivo no aumentó la proporción de conidias germinadas, aunque sí favoreció el crecimiento de los tubos germinativos. El cultivar de procedencia no influyó sobre la germinación de las conidias, aunque ésta sí varió significativamente con la época del año. Cuando el inóculo presentaba una germinabilidad media o baja en agua desionizada, la adición de Czapek-Dox y SD mejoró notablemente la germinación; sin embargo, este efecto favorable no se observó cuando la germinabilidad del inóculo era alta. El pH no tuvo ningún efecto sobre la germinación, aunque sí se observó una disminución de la misma en presencia de antibióticos. El medio SD resultó más favorable para el crecimiento de *S. oleagina* que el CDA y el aporte de vitaminas mejoró notablemente el crecimiento en todos los casos. Entre las fuentes de carbono utilizadas, malta y manitol mejoraron significativamente el crecimiento con respecto a la glucosa y al ácido oleico. Cuando la fuente utilizada fue el ácido poligalacturónico prácticamente no hubo crecimiento. La fuente de N más favorable resultó ser el nitrato amónico. Concentraciones elevadas 60-80 g/l de malta, glucosa y manitol favorecieron el crecimiento de *S. oleagina*, no apreciándose diferencias entre el SD suplementado con vitaminas o con EHO.

### A3.12 IDENTIFICACIÓN DE LOS AISLADOS DE *Phytophthora* spp. ASOCIADOS A PODREDUMBRES RADICULARES DEL OLIVO.

Muñoz García, M., Sánchez Hernández, M.E., Trapero, A.

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

Una de las causas más frecuentes de la muerte o “seca” de olivos jóvenes en Andalucía es la podredumbre radicular que aparece asociada al exceso de agua en el suelo. En prospecciones realizadas en los años 1996 y 1997 se obtuvieron un total de 52 aislados de *Phytophthora* a partir de raíces de olivo afectadas de podredumbre, algunos de los cuales fueron identificados provisionalmente como *P. megasperma* Drechsler. En este trabajo se ha llevado a cabo la caracterización morfológica, fisiológica y patogénica de dichos aislados.

Los aislados de *Phytophthora* spp. se cultivaron en varios medios con agar (harina de maíz, V8, zanahoria) y a diferentes temperaturas (5, 10, 15, 20, 25 y 30°C). El medio zanahoria-agar se utilizó para estudiar las estructuras sexuales (oogonios, anteridios y oosporas), mientras que se indujo la producción de esporangios y zoosporas con extracto de suelo sin esterilizar. Para la caracterización patogénica, se cultivaron plantones y estaquillas enraizadas del cultivar ‘Picual’ en macetas con suelo infestado artificialmente con diferentes aislados de olivo, así como con aislados de *P. megasperma* procedentes de otros huéspedes (alfalfa, garbanzo y melocotonero). Las plantas se incubaron a 18-24°C en condiciones de saturación hídrica del suelo.

Los resultados obtenidos han permitido establecer dos grupos morfológicos bien diferenciados respecto a la morfología de la colonia, a su patrón de crecimiento a diferentes temperaturas y al tipo y tamaño de las estructuras reproductivas producidas. Los aislados obtenidos más frecuentemente de los olivares afectados (84%) presentaron una colonia uniforme en zanahoria-agar, una temperatura óptima de crecimiento en torno a los 21°C y se correspondieron perfectamente con la descripción de *P. megasperma sensu* Hansen y Maxwell. Los aislados del segundo grupo desarrollaron una colonia tipo “roseta”, tuvieron una temperatura óptima en torno a los 26°C y, aunque podrían incluirse en el complejo *P. megasperma sensu lato*, presentaron características peculiares que no se corresponden exactamente con ninguna especie conocida del género, por lo que han sido denominados provisionalmente como *Phytophthora* sp.

En cuanto a la caracterización patogénica, se ha comprobado la elevada virulencia de todos los aislados procedentes de olivo, habiéndose observado diferencias significativas entre aislados, pero no entre los dos grupos morfológicos establecidos. Este hecho contrasta con la baja severidad de síntomas que se observó en las estaquillas inoculadas con aislados procedentes de otros huéspedes. Estos resultados, junto con la prácticamente nula patogenicidad de los aislados de olivo sobre garbanzo, sugieren cierta especialización patogénica de los aislados de olivo sobre su huésped, así como una adaptación a las diferentes temperaturas en las que se producen las condiciones de saturación de agua en el suelo que son necesarias para el desarrollo de la podredumbre radicular.

### A3.13 GAMA DE HUÉSPEDES DE *Spilocaea oleagina*, AGENTE DEL REPILO DEL OLIVO.

Navarro, N., Trapero, A.

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

Como parte de un estudio general sobre la biología y supervivencia de *Spilocaea oleagina*, agente causal del Repilo del olivo, se ha investigado la gama de huéspedes de este patógeno en inoculaciones artificiales y se han caracterizado, en condiciones naturales, las infecciones por *Spilocaea* spp. en varias oleáceas y otras especies leñosas que comparten hábitat con el olivo.

Las inoculaciones se han realizado mediante deposición de gotas de una suspensión conidial ( $10^5$  conidias/ml) de *S. oleagina* sobre las hojas separadas de las plantas. Las hojas se incubaron en cámara húmeda a 12-20 °C durante al menos 60 días, transcurridos los cuales se evaluó la severidad de las infecciones visibles desarrolladas, así como las infecciones latentes mediante inmersión de las hojas en una solución al 5% de NaOH. Las observaciones de campo se realizaron durante 1996-97 sobre 11 especies vegetales: *Olea europaea* var. *sativa* (olivo), *Olea europaea* var. *sylvestris* (acebuche), *Phillyrea angustifolia*, *Phillyrea latifolia*, *Fraxinus angustifolia* (fresno), *Jasminum fruticans* (jazmín), *Ligustrum lucidum* (aligustre), *Ligustrum ovalifolium* (aligustre), *Quercus ilex* (encina), *Arbutus unedo* (madroño) y *Eriobotrya japonica* (níspero). De ellas se tomaron al menos tres muestras de hojas sanas para las inoculaciones artificiales. En el caso de acebuche, el número de muestras fue de 47 y procedían de diferentes zonas de Andalucía.

De las 80 muestras inoculadas con *S. oleagina*, procedentes de las 11 especies estudiadas, tan sólo las hojas de olivo y acebuche resultaron severamente afectadas, aunque existieron diferencias marcadas de susceptibilidad entre las muestras según su origen. En el caso del acebuche, la reacción observada varió desde la ausencia de infección hasta lesiones muy severas que no difirieron de las que mostraron los cultivares de olivo muy susceptibles al Repilo. *P. angustifolia* también resultó infectada, pero el nivel de infección fue muy bajo y las lesiones presentaron una escasa esporulación. Las demás especies inoculadas no fueron infectadas. Asimismo, las observaciones de campo permitieron detectar infecciones por *S. oleagina* sólo en olivo, acebuche y *P. angustifolia*. También se observaron infecciones por *Spilocaea* spp. en *P. latifolia*, fresno, encina y níspero, pero sus agentes causales fueron identificados como *S. phillyreae*, *S. fraxini*, *S. quercus-ilicis* y *S. pyracanthae*, respectivamente. Estos resultados demuestran la elevada especificidad de *S. oleagina* sobre olivo y acebuche, cuyas poblaciones difieren marcadamente respecto a la susceptibilidad al patógeno. Asimismo, este estudio ha permitido caracterizar las infecciones causadas por tres patógenos, *S. phillyreae*, *S. quercus-ilicis* y *S. fraxini*, no descritos anteriormente en España.

**A3.14 PODREDUMBRE DE CUELLO Y FRUTOS DE CALABAZA CAUSADOS POR *Fusarium solani* f. sp. *cucurbitae* W. C. Snyder et H. N. Hans RAZA 1.**

García-Jiménez, J.<sup>1</sup>, Moya, M<sup>a</sup>. J.<sup>1</sup>, Armengol, J.<sup>1</sup>, Sales, R.<sup>1</sup>, Miguel, C.<sup>1</sup> y Pardo, A.<sup>2</sup>

1. *Patología Vegetal. Dpto. Producción Vegetal. Universidad Politécnica de Valencia. Camino de Vera s/n. 46022. Valencia.*
2. *Laboratori de Sanitat Agraria. Via de Circumvalació Nord. Tram 6, cantonada C/3. Zona Franca. 08004. Barcelona.*

Desde 1995 se viene detectando en distintas zonas de la Comunidad Valenciana y Cataluña una enfermedad en calabaza (*Cucurbita maxima* Duchesne) no detectada anteriormente en España: las plantas comienzan mostrando una estría necrótica longitudinal de color pardo en la zona del cuello en la que, en condiciones de humedad se puede observar crecimiento de micelio blanquecino. La lesión crece hasta afectar todo el cuello, que toma una consistencia blanda y húmeda lo que provoca una marchitez de los brotes y una muerte prematura de toda la planta.

Paralelamente, sobre los frutos, preferentemente en la zona de contacto con el suelo, aparecen pequeñas manchas de color pardo y consistencia blanda que evolucionan creciendo en extensión y profundidad tomando la piel un aspecto apergaminado y provocando una podredumbre de la pulpa que puede llegar hasta la cavidad central del fruto invadiendo las semillas que en algunos casos aparecen recubiertas de micelio blanquecino.

De ambos tipos de lesiones se aisló *Fusarium solani* (Mart.) Sacc. Inoculaciones de diversos aislados del hongo en plántulas y frutos de *C. maxima* reprodujeron los síntomas observados en campo. El hongo ha sido identificado como *F. solani* f. sp. *cucurbitae* W. C. Snyder et H. N. Hans raza 1 que causa podredumbre de tallo y frutos, mientras que la raza 2 sólo provoca podredumbre de fruto.

Ensayos preliminares de patogenicidad llevados a cabo con diversos patrones de sandía (Shintoza, Brava, RS-841, Titán, TZ-148, TW-1 y Waltham Butternut) mostraron que todos ellos eran altamente susceptibles frente a diversos aislados del hongo por lo que la diseminación de este patógeno podría tener consecuencias muy graves para el cultivo de la sandía injertada.

### A3.15 **PODREDUMBRE POST-COSECHA DE MANZANA CAUSADA POR *Seimatosporium lichenicola* (Corda) Shoemaker & E. Müller.**

Armengol J.<sup>1</sup>, Sales R.<sup>1</sup>, Ciurana N.<sup>1</sup>, Bosch S.<sup>2</sup>, Domingo T.<sup>2</sup>, García-Vidal S.<sup>2</sup>, Romero F.<sup>2</sup> y García-Jiménez J.<sup>1</sup>

1. *Patología Vegetal. Dpto. Producción Vegetal. Universidad Politécnica de Valencia. Camino de Vera s/n. 46022. Valencia.*

2. *Servicio de Certificación Vegetal. Ctra. Alicante-Valencia, km. 276,5.*

En los años 1996 y 1997 se detectó una podredumbre de manzanas en la zona del Rincón de Ademuz en Valencia. Los frutos afectados presentaban una podredumbre interna que ocupaba toda la zona central y que se extendía hacia la zona epidérmica sin llegar a alterar apenas la parte exterior de las manzanas, que parecían sanas. En campo la podredumbre se observaba al final del periodo de madurez de los frutos, antes de la recolección, y en algunos casos causaba una caída de frutos de poca importancia. Los frutos menos afectados llegaban al almacén donde la podredumbre se hacía más patente. Las variedades más afectadas eran Starking y Red Delicious, siendo muy escasos los frutos de la variedad Golden que presentaban esta problemática, no afectando al cultivar autóctono Esperiega, estimándose en un 5 % el total de la producción afectada en el año 1997.

De los frutos afectados se aisló consistentemente *Seimatosporium lichenicola* (Corda) Shoemaker & E. Müller un Coelomycete no descrito hasta la fecha causando podredumbre post-cosecha sobre manzanas en España. Este hongo produce acérvulos de aproximadamente 350 µm de diámetro en los que se forman esporas oscuras, fusiformes, con 3 tabiques y que miden 13-15 x 5,5-6,5 µm.

Para comprobar su patogenicidad aislados del hongo se inocularon en manzanas de las variedades Starking, Granny Smith y Golden Delicious con 1 ml. de una suspensión de  $3,7 \cdot 10^6$  esporas/ml. inyectándola con una jeringa por la fosa calicina, conservándose a 4 y 25 °C. Los síntomas en los frutos inoculados fueron idénticos a los observados en almacén y campo. La podredumbre progresaba mucho más lentamente a 4 °C que a 25 °C. El hongo se reaisló de los frutos inoculados.

En un estudio de crecimiento de aislados del hongo se ha obtenido desarrollo en un rango de temperaturas de 4 a 31 °C con un óptimo de crecimiento a 16 °C.

**A3.16 SECA DE ACÍCULAS Y RAMAS DE *Picea abies* (L.) H. Karst. CAUSADA POR *Rosellinia minor* (Höhnelt) Francis.**

Armengol, J. y García-Jiménez, J.

*Patología Vegetal. Dpto. Producción Vegetal. Universidad Politécnica de Valencia. Camino de Vera s/n. 46022. Valencia.*

Durante los últimos años se ha venido observando en viveros de la provincia de Bizkaia una afección de ramas de *Picea abies* (L.) H. Karst. cultivados para su uso como árboles de Navidad. Se trata de una seca de acículas y ramas que, aunque no causaba su muerte, los depreciaba comercialmente afectando a la rentabilidad del cultivo. En algunas ocasiones estos síntomas no aparecían en el campo sino que se manifestaban una vez los abetos llegaban a su destino para su comercialización después de haber sido envueltos en una malla para su transporte y distribución.

Sobre las ramas afectadas, situadas preferentemente en la zona inferior del árbol, se detectaba la presencia de un micelio blanco-grisáceo que las recubría por completo produciéndose una cierta defoliación. En su estado final toda la zona afectada quedaba recubierta de una densa placa miceliar más oscura, fuertemente adherida y que mantenía asimismo pegadas las ramas adyacentes. En algunos casos sobre este micelio era posible observar las estructuras fructíferas del hongo en forma de peritecios globosos de aproximadamente 1 mm de diámetro.

Se analizaron muestras recogidas en diferentes momentos que se sometieron en el laboratorio a cámara húmeda y al mismo tiempo se hicieron preparaciones microscópicas de las fructificaciones y esporulación del hongo.

Se observaron ascas alargadas y cilíndricas (143-180 x 8,8-10  $\mu\text{m}$ ) que presentaban un aparato apical muy desarrollado que se tiñe de azul con yodo. Las ascas contenían 8 ascosporas oscuras y ovaladas (18,8-22,5 x 7,5-8,3  $\mu\text{m}$ ) que presentaban característicamente una hendidura germinativa más corta (12,5-15  $\mu\text{m}$ ) que la longitud total de la ascospora.

El agente causal fue identificado como *Rosellinia minor* (Höhnelt) Francis un ascomiceto descrito en diversas ocasiones en Europa asociado a esta sintomatología.

### A3.17 GRUPOS DE COMPATIBILIDAD VEGETATIVA EN *Plectosporium tabacinum* (van Beyma) M. E. Palm, W. Gams et Nirenberg.

Abad, P.<sup>1</sup>, Marqués, M<sup>a</sup> C.<sup>1</sup>, Pérez, A.<sup>1</sup>, Bruton, B. D.<sup>2</sup>, Palm, M. E.<sup>3</sup> y García-Jimenez, J.<sup>1</sup>

1. *Patología Vegetal. Dpto. Producción Vegetal. Universidad Politécnica de Valencia. Camino de Vera s/n. 46022. Valencia.*

2. *USDA. Agricultural Research Service. South Central Agricultural Research Laboratory. Lane. Oklahoma 74555.*

3. *USDA. APHIS. Sitematic Botany and Mycology Laboratory. Beltsville. Maryland 20705-2350.*

*P.tabacinum* es un hongo muy común en suelo y material vegetal en putrefacción, que muestra gran adaptabilidad en diferentes ambientes, también ha sido aislado de numerosas especies vegetales, aunque la patogenicidad sólo ha sido comprobada en algunas de ellas (patata, tomate, tabaco, pepino, girasol, albahaca y pensamiento). Se trata, asimismo, de uno de los hongos implicados en el síndrome denominado "colapso" o "muerte súbita del melón", responsable de importantes pérdidas en este cultivo (*Cucumis melo* L.) en diversas zonas productoras de España y Estados Unidos.

En este trabajo se analiza la diversidad genética entre distintas poblaciones de *P.tabacinum* mediante un estudio de la compatibilidad vegetativa. Para ello se han elegido 40 cepas procedentes de España, Estados Unidos, Australia, Reino Unido, Canadá y Nueva Zelanda; aisladas de diferentes hospedantes (*Cucumis melo* L., *Lycopersicon esculentum* Mill., *Nicotiana tabacum* L., *Ambrosia artemisiifolia* L., *Asclepias* sp., *Phacelia* sp., *Panax quinquefolis* L., *Glycine max* L., *Nicotiana tabacum* L., *Solanum tuberosum* L.). Los grupos de compatibilidad vegetativa (VCGs) se han determinado empleando mutantes espontáneos obtenidos en medios con clorato potásico, basándose en la formación de heterocariontes prototróficos estables tras la anastomosis de auxótrofos complementarios del nitrato (*nit1* y *NitM*) obtenidos de cepas distintas.

**En dos de las cepas de *P.tabacinum* estudiadas no se ha obtenido ningún mutante NitM en los medios con clorato potásico. Otros dos aislados han resultado ser autoincompatibles. El resto de cepas analizadas hasta el momento, excepto en dos casos, son vegetativamente incompatibles entre sí. Únicamente se ha producido complementación vegetativa entre dos cepas españolas y dos cepas originales de Texas respectivamente (todas ellas aisladas de plantas de melón enfermas). La identificación de numerosos VCGs constituídos por una sola cepa de *P.tabacinum* sugiere que la incompatibilidad vegetativa debe ser frecuente en este hongo. Los resultados también señalan que la diversidad genética de *P.tabacinum* en la naturaleza debe ser amplia.**



**A3.18 DETECCIÓN DE *Diaporthe actinidiae* Sommer et Beraha PROVOCANDO DAÑOS EN KIWI (*Actinidia deliciosa* (A. Chev.) C. F. Liang et A. R. Ferguson ) EN GALICIA.**

García-Jiménez, J.<sup>1</sup>, Ciurana, N.<sup>1</sup>, Mansilla, J. P.<sup>2</sup>, Pintos Varela, C.<sup>2</sup>, Sales, R.<sup>1</sup> y Armengol, J.<sup>1</sup>.

1. *Patología Vegetal. Dpto. Producción Vegetal. Universidad Politécnica de Valencia. Camino de Vera s/n. 46022. Valencia.*

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

En los últimos cuatro años se ha detectado en plantaciones de kiwi de la provincia de Pontevedra una nueva enfermedad que presenta un síndrome complejo: los primeros síntomas se observaron en enero de 1995 en ramas que se descortezaban con facilidad y tenían una coloración más oscura de lo normal. En septiembre del mismo año se observaron en las hojas unas manchas necróticas de extensión variable que a la lupa presentaban unos puntos negros (picnidios).

Junto a estos síntomas, en la primavera de 1997 se observaron podredumbres de pétalos que en cámara húmeda también desarrollaban picnidios. Asimismo, cuando estos pétalos afectados caían sobre las hojas y por la humedad reinante quedaban pegados a ellas, se desarrollaban unas necrosis similares a las observadas en septiembre del 95. Otras alteraciones observadas fueron necrosis de nervios en hojas, que provocaban el curvamiento de la hoja hacia el haz y una necrosis del pedúnculo de los frutos que hacía que éstos quedaran de un tamaño no comercial.

De todas las zonas afectadas se realizaron aislamientos en medio PDAS siguiendo las técnicas habituales, aislándose en todos los casos un hongo de micelio blanquecino que esporulaba con dificultad. Para favorecer la esporulación el hongo se hizo crecer en PCA sobre trozos esterilizados de distintos vegetales produciéndose sobre granos de trigo abundantes picnidios con conidios  $\alpha$  (5,0-8,3 x 2,0-3,8  $\mu\text{m}$ ) y  $\beta$  (17,5-30,0 x 1,5  $\mu\text{m}$ ) típicos de *Phomopsis*.

El teleomorfo del hongo (*Diaporthe*) se ha detectado en ramas afectadas que tras la poda se dejaron en el suelo de las parcelas. En estas ramas se encontraban los peritecios incrustados en un estroma negro, observándose largos cuellos sinuosos, filiformes y con el extremo redondeado de color marrón. Los peritecios miden 150-460  $\mu\text{m}$  de diámetro y 470-900 x 50-120  $\mu\text{m}$  de longitud del cuello. Las ascas miden 29-40 x 5,2-7,3  $\mu\text{m}$ , siendo las ascosporas hialinas, unitabicadas, estrechándose en el tabique, de forma fusoide a elipsoide y de 8,9-9,4 x 3,1  $\mu\text{m}$ .

En ensayos de patogenicidad se desarrollaron podredumbres de frutos. También se ha observado necrosis en inoculaciones efectuadas en limbo y peciolo de hoja, pedúnculo floral y brotes.

Las características morfológicas del hongo coinciden con las de *Diaporthe actinidiae* Sommer et Beraha, que hasta el presente sólo se había descrito causando podredumbre de frutos.

### A3.19 DESARROLLO DE UN MÉTODO DE DETECCIÓN DE *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* EN SUELOS INFESTADOS BASADO EN LA TÉCNICA PCR

García Pedrajas, M.D. <sup>1</sup>, Bainbridge, B.W. <sup>2</sup>, Pérez Artés, E. <sup>1</sup>, Heale, J.B. <sup>2</sup>, Jiménez Díaz, R.M. <sup>1</sup>.

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

2. King's College London. Division of Live Sciences. Campden Hill Road, London W8 - 7AH. Reino Unido

La Fusariosis Vascular del garbanzo (FVG), causada por *Fusarium oxysporum* (*Foc*), es una de las enfermedades más importantes de este cultivo en España, la Cuenca Mediterránea, y el Subcontinente Indio. La medida de control más práctica y económicamente eficiente contra la enfermedad es la siembra de cultivares resistentes, cuya eficacia es interferida por la existencia de razas patogénicas de *Foc*. En ausencia de resistencia de interés agronómico, la lucha contra la enfermedad podría tener lugar mediante la elección de suelos libres del patógeno.

En esta investigación se ha desarrollado un método rápido y simple, basado en la técnica PCR, para la detección de *Foc* en suelos infestados de forma natural o artificial, cuya simplicidad permite manejar un elevado número de muestras al mismo tiempo. El método implica la rotura de las paredes celulares del hongo para liberar el ADN, mediante el molido de suelo liofilizado aprovechando sus propiedades abrasivas. Asimismo, incluye el uso de leche en polvo descremada durante la extracción de ADN, para evitar tanto su pérdida por adsorción a partículas de suelo y degradación, como la copurificación de inhibidores de la PCR, que son los principales factores que limitan la aplicación de esta técnica a la detección de microorganismos en el suelo. Tras una extracción con fenol/cloroformo, el ADN puede ser usado directamente para amplificación. Para una detección eficiente de las pequeñas cantidades de ADN extraído de muestras de suelo, se han utilizado iniciadores anidados en dos tandas de amplificación sucesivas. El método se ha aplicado a la detección de aislados de *Foc* que inducen marchitez, en una diversidad de suelos con distintas características. Con la utilización de iniciadores específicos para cada caso, este método podría ser válido para la determinación de la estructura racial del patógeno en las distintas áreas de cultivo, y podría ser aplicado a la detección de otros hongos fitopatógenos en suelo.

Subvencionado por el proyecto CYCIT AGF95-0012

### A3.20 DIAGNÓSTICO MOLECULAR *IN PLANTA* DE PATOTIPOS DE *Verticillium dahliae* QUE INFECTAN OLIVO

Mercado Blanco, J., Pérez Artés, E., García Pedrajas, M.D., Rodríguez Jurado, D., y Jiménez Díaz, R.M.

*Dpto. de Protección de Cultivos, Instituto de Agricultura Sostenible, C.S.I.C., Apdo. 4084, 14080 Córdoba, España*

*Verticillium dahliae* infecta sistémicamente una diversidad de plantas cultivadas, incluyendo algodónero, especies hortícolas y olivo. La Verticilosis del olivo (VO) es considerada la enfermedad de etiología fúngica más amenazadora para el olivar, cuya creciente expansión en Andalucía y otras Comunidades Autónomas es debida posiblemente al establecimiento de plantaciones intensivas en suelos infestados por el patógeno y/o la utilización de material de plantación infectado. La eficacia de las diferentes medidas de lucha contra la VO depende de la correcta identificación de los patotipos defoliante (*D*) y no-defoliante (*ND*) de *V. dahliae*. Sin embargo, la caracterización patogénica de dichos patotipos es laboriosa y costosa en material, espacio y tiempo. La aplicación de métodos diagnósticos basados en el análisis de polimorfismos en el ADN (RFLPs y RAPDs) ha supuesto un gran progreso en la detección e identificación de microorganismos.

La aplicación de este tipo de metodología en nuestro laboratorio ha permitido diseñar iniciadores específicos para caracterizar molecularmente los aislados *D* y *ND* de *V. dahliae* obtenidos de algodónero en España.

El objetivo de este trabajo es el desarrollo de un método que permita diagnosticar específica y molecularmente la infección por los patotipos *D* y *ND* en plantones de olivo. Se han utilizado tallos de plantas de olivo infectados con los aislados V4 (*ND*) y V117 y V138 (*D*), así como plantas controles no infectadas. Las muestras vegetales, liofilizadas y trituradas, se sometieron a diferentes procedimientos estándar de extracción de ADN, a los que se introdujeron las modificaciones necesarias para la obtención de un ADN suficientemente puro y libre de inhibidores de la reacción PCR. En las reacciones de PCR se utilizaron las parejas de iniciadores específicos para los patotipos *D* y *ND* previamente diseñados. Los resultados obtenidos permitieron diferenciar de forma repetitiva y consistente la presencia en los tejidos vegetales de ADN perteneciente a cada uno de los dos patotipos. Para mejorar la capacidad diagnóstica, se efectuaron experimentos de “nested” - PCR mediante el uso secuencial de nuevas parejas de iniciadores específicos internos a los anteriores. Los ensayos de detección han sido igualmente realizados en plantas de algodón, demostrándose que la estrategia diseñada es eficaz en ambas especies vegetales.

Subvencionado por el Proyecto CYCIT OLI96-2131

### A3.21 ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE *Ceratocystis* sp. HONGO CAUSANTE DE AZULADO EN MADERA DE *Pinus nigra*

Troya, M.T.<sup>1</sup>, Rubio, F.<sup>2</sup>, Muñoz-Mingarro, D.<sup>2</sup>, Llinares, F.<sup>2</sup>, Rodríguez-Borrajo, C.<sup>2</sup>, Yuste, M.<sup>2</sup>, Jiménez, J.<sup>1</sup>, Fernández-Golfín, J.<sup>1</sup>

1. Centro de Investigación Forestal. I.N.I.A. Apdo. 8111, 28080- Madrid.

2. Dpto. de Biología. Facultad de C. C. Experimentales y Técnicas. Universidad San Pablo. P. Box 67, Boadilla del Monte, Madrid.

Uno de los principales problemas que plantea la explotación forestal de la madera de *Pinus nigra*, desde el apeo del árbol hasta su transformación e industrialización, es la aparición de un azulado que se propaga rápidamente y con gran intensidad, por toda la albura de esta especie. Dado que hay una falta total de información acerca del desarrollo de este tipo de daño sobre esta madera, se ha tratado de estudiar, mediante determinaciones enzimáticas de los cultivos aislados en esta madera, si estos hongos infectan de manera específica a *Pinus nigra*.

Tras las incubaciones realizadas en cámara húmeda de la madera infectada, se obtuvieron fructificaciones de la fase perfecta del género *Ceratocystis*. De los aislados obtenidos tras la siembra de la esporada de los hongos, se seleccionó un cultivo que fue sembrado en Erlenmeyers con medio base de Eggins y Plugh adicionado con serrín de *Pinus nigra*. Se aplicaron las mismas condiciones para las siembras de *Pinus sylvestris* que se utilizó como especie de referencia. A diferentes tiempos de incubación, hasta un total de seis semanas, se tomaron muestras para determinar las siguientes actividades enzimáticas: carboximetilcelulasa, xilanasas y celobiohidrolasa como representativas de actividades celulolíticas, y lacasa y manganeso peroxidasa para actividades ligninolíticas.

Los resultados obtenidos muestran que las enzimas celulolíticas ofrecen un pico mayor de actividad tras veintitrés días de incubación sobre las dos especies de pino estudiadas, si bien es mayor sobre serrín de pino laricio que sobre pino silvestre. En cuanto a la lacasa, el pico de mayor actividad se muestra tras quince días de incubación en pino silvestre, y tras treinta y siete para el laricio, si bien sigue siendo mayor en este último. Finalmente la manganeso peroxidasa empieza a mostrar actividad sobre ambos pinos desde el segundo día de incubación, siendo ligeramente mayor en este caso, sobre serrín de pino silvestre.

### A3.22 CAPACIDAD DE DECOLORACION DE COMPUESTOS FENOLICOS POR *Trametes versicolor*, *Pleurotus eringii* Y *Pleurotus ostreatus*.

Muñoz-Mingarro, D., Llinares, F., Troya, M.T., Rubio, F., Yuste, M., Rodríguez, C., Jiménez, J.

*Facultad de Ciencias Experimentales y Técnicas. Universidad San Pablo CEU. Apdo. 64. Boadilla del Monte. 28668 Madrid.*

La capacidad degradativa de hongos xilófagos puede ser evaluada de forma indirecta mediante el estudio de la decoloración que producen sobre algunas sustancias presentes en el medio de cultivo, existe por tanto una correlación entre las actividades ligninolíticas de dichos hongos y la pérdida de color observada en los medios.

En este ensayo se analizó la capacidad decolorante de *Trametes versicolor*, *Pleurotus eringii*, y *Pleurotus ostreatus* (cepas 3A INIA, 9A INIA y 12A INIA, respectivamente) sobre Azul de Metileno, Verde Malaquita, Cristal Violeta, Safranina y Eosina Amarilla. Dichos compuestos se añadieron en concentraciones de 0.001% - 0.003% (p/v) disueltos en un medio base salino, tamponado a pH 4.7 con citrato sódico, a cultivos que contenían 1% (p/v) de serrín de haya inoculados de forma independiente con las cepas, que previamente crecieron en agar malta.

Las muestras se incubaron durante 28 días a  $22^{\circ}\text{C} \pm 2$  y  $70\% \pm 5$  de humedad. A continuación se tomaron alícuotas de 3 mL con periodicidad semanal y tras centrifugar a 4000 rpm durante 5 minutos se determinó la pérdida de color mediante la disminución de absorbancia a la longitud de onda donde ésta es máxima para cada colorante. Previamente se comprobó que no se habían producido variaciones en el pH. También se obtuvieron las actividades Lacasa y Manganese peroxidasa según los métodos de Wolfender y Willson (1982) y Paszynsky et al. (1985) respectivamente.

Los porcentajes de decoloración observados ponen de manifiesto la eficacia de estos hongos sobre la mayoría de los colorantes, así como de sus actividades enzimáticas, obteniéndose correlaciones significativas ( $p < 0.05$ ) entre dichas actividades y gran parte de los colorantes utilizados. La decoloración osciló entre un 40 - 90% y se determinaron valores superiores a 2000 UI de Lacasa y 1000 UI de Mn-peroxidasa.

En conclusión, los hongos estudiados presentan capacidad degradativa sobre los compuestos de naturaleza fenólica utilizados, estando ésta, además, directamente relacionada con su capacidad ligninolítica, hecho que sería de gran utilidad como método indirecto y rápido de determinación de sus actividades enzimáticas, así como el empleo de estos hongos en la degradación de compuestos de carácter fenólico presentes en numerosos residuos con efectos tóxicos y de difícil eliminación.

### A3.23 AISLAMIENTO DE *Cylindrosporium concentricum* Grev. Y OTRAS ESPECIES FÚNGICAS EN HOJAS DE CASTAÑOS SOMETIDOS A ESTRÉS.

Vázquez-Ruiz de Ocenda, R.A.

*Departamento de Biología Vegetal. Universidad de Santiago de Compostela, Campus de Lugo. 27002 Lugo.*

Durante el año 1997 las plantaciones de castaños (*Castanea sativa* Mill.) se vieron sometidas a los efectos de un particular régimen climático: las elevadas temperaturas (>25°) que se alcanzaron desde el mes de Febrero, unidas a una fuerte sequía que se continuó hasta finales del mes de Abril, fueron seguidas de un descenso brusco a inicios de verano, acompañado de intensas lluvias. Estas condiciones ambientales fueron especialmente marcadas en el NO peninsular y provocaron la proliferación de enfermedades foliares de origen fúngico.

Los síntomas más frecuentes consistieron en la aparición, a finales de verano, de pequeñas necrosis (5-7 mm) confluyentes que ocasionaban el abarquillamiento de las hojas, las cuales se marchitaban y acababan cayendo. El aspecto de las plantaciones era de un otoño prematuro. Los efectos sobre la producción de castaña fueron devastadores y la debilidad general se manifestó en un mayor agusanado del escaso fruto.

Los aislamientos realizados a partir de hojas sintomáticas mostraron la presencia de *Cylindrosporium concentricum* Grev. en la práctica totalidad de las muestras analizadas. Asimismo fue frecuente el aislamiento de otros patógenos y saprófitos foliares pertenecientes a los géneros: *Monochaetia*, *Pestalotiopsis*, *Phoma*, *Cytospora*, *Cladosporium*, *Penicillium*, etc.

Las hojas de castaño infectadas mostraban, predominantemente, el colapso de las células del mesófilo dentro de los límites de las lesiones. El sistema vascular, aparentemente, no se vio afectado.

### A3.24 TRES SUBSTRATOS EN LA CONSERVACIÓN DE LAS ESPECIES DE *Fusarium*

Pardo Abril, G.A.,<sup>1</sup> Montón Romans, C.<sup>2</sup> y García Figueres, F.<sup>2</sup>

*Laboratorio de Sanitat Vegetal, Departament d'Agricultura Ramaderia i Pesca. Generalitat de Catalunya E-mail: 1.- [gamanda@porthos.bio.ub.es](mailto:gamanda@porthos.bio.ub.es), 2.- [ssausv@lander.es](mailto:ssausv@lander.es)*

Un buen método para conservar hongos fitopatógenos debe estar basado en la naturaleza del patógeno, verificar su morfología, estructuras que produce (esporas, clamidosporas, etc.) y las características de crecimiento. Además se ha de tener en cuenta las ventajas y desventajas de cada uno de los métodos para conservar un organismo.

En el estudio de los hongos en el laboratorio es necesario conservar las cepas viables, puras y estables, garantizando mantener las características morfológicas, fisiológicas y genéticas. Elegir un método para su conservación depende de los recursos con que cuente el laboratorio y el tiempo de que se disponga.

La sílica gel es un método simple y económico, en el cual no es posible la contaminación por ácaros por las condiciones de sequedad, y se puede obtener varias veces inóculo de un mismo vial. Está limitado para hongos que produzcan esporas, no siendo útil para conservar hongos que presenten esporas delicadas o complejas como es el caso de *Pythium* y *Phytophthora* o para hongos miceliales como el caso de *Rhizoctonia*.

Pruebas realizadas por Windles, C., et al. (1988) sobre 461 aislados de *Fusarium* spp. conservados sobre sílica gel después de 3, 4 y 5 años han presentado una viabilidad entre 94, 90 y 89 % respectivamente.

Para la realización del presente trabajo, se conservaron 65 cepas de *Fusarium* spp. en 1 gr. de sílica gel sin indicador, previamente esterilizado a 180 °C. En leche desnatada estéril al 7% se preparó una solución de esporas para inocular sobre la sílica gel, e inmediatamente refrigerar en baño maría 4 +/-1 °C. Los viales se dejan durante una semana en un desecador para eliminar el exceso de humedad y se comprueba la viabilidad de cada uno, antes de conservar en el refrigerador a 4 °C. La viabilidad fue del 100 % después de un año.

Una prueba adicional para conservar las especies de *Fusarium* fue la utilización de otros soportes inertes como son la piedra pómez y la perlita los cuales ofrecen condiciones similares a la sílica gel. Para confirmar el estado de los conidios sobre los diferentes substratos, se realizó una observación mediante un microscopio electrónico de barrido.

Se pudo concluir: 1. La sílica gel es un soporte idóneo para conservar conidios en estado latente. 2. La piedra pómez por su porosidad, permite la germinación de las esporas y crecimiento del micelio, evento no deseado en la conservación de hongos a largo plazo. 3. La perlita, es un soporte económico, que puede substituir a la sílica gel y se podría utilizar en grandes cantidades como fuente de inóculo en pruebas de patogenicidad y como soporte de inóculo de hongos biocontroladores.

### A3.25 CARACTERIZACIÓN DE ALGUNAS CEPAS DEL GÉNERO *Fusarium* MEDIANTE SU ACTIVIDAD ENZIMÁTICA.

Pardo Abril, G.A.,<sup>1</sup> Montón Romans, C.<sup>2</sup> y García Figueres, F.<sup>2</sup>

*Laboratorio de Sanitat Vegetal, Departament d'Agricultura Ramaderia y Pesca DARP Generalitat de Catalunya, E-mail: 1.- [gamanda@porthos.bio.ub.es](mailto:gamanda@porthos.bio.ub.es) 2.- [ssausv@lander.es](mailto:ssausv@lander.es)*

Las unidades fundamentales del metabolismo son las enzimas las cuales catalizan las reacciones químicas. Las enzimas de los hongos son en general como la de los demás organismos: una proteína y un cofactor asociado.

Las cepas del género *Fusarium* en el presente estudio han sido previamente clasificadas teniendo en cuenta los criterios establecidos por Nelson, P., et al (1983) y debidamente conservadas sobre sílica gel, con el objeto de reducir variaciones fenotípicas ya que las especies de éste género poseen una alta variabilidad genética.

Para determinar la actividad enzimática de los hongos, se han utilizado dos métodos, la prueba Apyzym y medios sólidos específicos. El Apyzym es una prueba útil en el estudio de hongos filamentosos, a través del cual se puede determinar la presencia de 19 enzimas diferentes (Bridge and Hawksworth, 1984; St Leger et al., 1986). La prueba consiste en una reacción colorimétrica de un sustrato con compuestos de naftil sobre la actividad de las enzimas. Por otra parte, la actividad enzimática de los hongos se ha determinado cualitativamente: actividad esterasa, actividad lipasa, actividad proteasa (hidrólisis de la caseína), actividad proteasa (hidrólisis de la gelatina), actividad celulosa, actividad amilasa y actividad ureasa sobre medios específicos sólidos.

En todas las especies estudiadas, las enzimas fosfatasa ácida, esterasa (C-4), esterasa lipasa (C-8), leucina arilamidasa, valina arilamidasa, fosfatasa ácida, naftol-AS- B1- fosfohidrolasa, y la  $\beta$ -glucosidasa presenta reacción positiva en el sistema APYZYM; al igual que en medios específicos sólidos actividad ureasa y amilasa. Por otra parte, dos enzimas cistina aril amidasa y tripsina sólo están presentes en las cepas de *F. semitectum* y la actividad proteasa es positiva para éstas especie en medio sólido. Con respecto a la  $\alpha$ -galactosidasa presentaron reacción negativa todas las cepas de *F. solani*.

Aunque algunos estudios realizados con *Fusarium oxysporum* han planteado una relación directa entre actividad celulosa y patogénesis, ninguna cepa en el presente trabajo presenta actividad celulosa en medio sólido.

Las lipasas extracelulares son glicoproteínas que catalizan la degradación de triacilglicerol a monoacilglicerol. En medio sólido un 81 % de las cepas analizadas presentó actividad lipasa positiva. Además un 73% negativas a la proteasa hidrólisis de la gelatina y un 80% positivas a la actividad proteasa, hidrólisis de la caseína.



### A3.26 POLIMORFISMO INTRAESPECÍFICO EN CEPAS DE *Colletotrichum gloeosporioides* AISLADAS DE OLIVO.

Martín Esteban, M.P.<sup>1</sup> y Garcia Figueres, F.<sup>2</sup>

Unitat Sanitat Vegetal, Servei de Sanitat Agrària. Via Circulació Nord, Tram VI, Cant. C/3, Zona Franca, 08040 Barcelona. E-mail: 1.- [maripaz@porthos.bio.ub.es](mailto:maripaz@porthos.bio.ub.es) 2.- [ssausv@lander.es](mailto:ssausv@lander.es)

La enfermedad conocida como ‘aceitunas jabonosas’ causada por *Colletotrichum gloeosporides* (Penz.) Penz. & Sacc. puede producir graves daños en la cosecha de aceitunas, dependiendo fundamentalmente de la sensibilidad varietal, la virulencia del patógeno y las condiciones climáticas.

El estudio molecular de aislados de *Colletotrichum* puede desvelar numerosas incógnitas respecto a la situación de diversas especies o cepas incluidos en *C. Gloeosporioides*. Con el objetivo de conocer mejor las posibles cepas de *C.gloeosporides* en olivo y establecer un método para su detección, se han analizado aislados de *Colletotrichum* spp. de olivo y otros huéspedes mediante la técnica combinada de PCR-RFLP (Polimorfismo de la Longitud de los Fragmentos de Restricción). Las cepas, clasificadas previamente en base a caracteres morfológicos (morfometría, aspectos de las colonias en diferentes medios de cultivo), se han contrastado con la cepa IMI 356878 (CECT 21073) de *C. gloeosporoides*.

Se han amplificado las regiones ITS1 e ITS2, incluida la subunidad 5.8S del rDNA con los iniciadores universales ITS1F (específico para hongos) e ITS4. Los amplímeros presentaron un tamaño aproximado de 680 bp y se analizaron mediante enzimas de restricción. Los patrones obtenidos por RFLP se transformaron en una matriz de caracteres binarios 0: ausencia de banda 1: presencia) que se analizó mediante el programa TREECON (Van de Peer & De Watcher, 1994): la distancia genética (GDxy) entre los OTU se calculó de acuerdo con Nei & Li (1979), el dendrograma se construyó por ‘neighborn-joining’ y la solidez de las ramas se valoró por análisis de bootstrap (1000 remuestros). Se consideró una cepa de *Fusarium oxysporum* como grupo externo.

Las cepas identificadas como *C. gloeosporoides*, presentan un polimorfismo manifiesto por RFLP. La única cepa aislada de *Dieffenbachia* sp. (Grupo I) dió un patrón diferente para el resto de cepas, tanto de *C. gloeosporoides* como de otras especies de *Colletotrichum*. En el dendrograma, la separación entre esta cepa y el resto se apoya con un valor del 84% de bootstrap. Los aislados de cítricos mostraron el mismo patrón que la cepa IMI 356878 (Grupo II), siendo diferente al de las cepas aisladas de olivos en los que ningún aislado de cítrico estaba presente (Grupo III). El resto de especies analizadas presentaron modelos de RFLP distintos al de los grupos de *C.gloeosporioides*, excepto en las cepas aisladas de fresón que fue similar al del grupo III. Los grupos II y III son consistentes con los caracteres de cultivo y tasa de crecimiento en CZAPEK, PDA e hidrólisis de la caseína.

### A3.27 *Thielaviopsis basicola* EN SUBSTRATOS UTILIZADOS EN PLANTAS DE VIVEROS

Montón Romans, C. y Garcia Figueres, F.

Unitat Sanitat Vegetal, Servei de Sanitat Agrària. Via Circulació Nord, Tram VI, Cant. C/3, Zona Franca, 08040 Barcelona. E-mail: [ssausv@lander.es](mailto:ssausv@lander.es)

Durante los últimos dos años se ha detectado una mayor presencia del hongo *Thielaviopsis basicola* (Berk. et Br.) asociado a podredumbre, total o parcial, de raíces en plantas de vivero cultivadas en sustratos comerciales.

El frecuente marchitamiento de plántulas en viveros, ya sean de material herbáceo o leñoso, junto con la constante presencia del hongo en las zonas necrosadas de las raíces y la constatación de un manejo adecuado del material utilizado en los viveros, se sospechó que la infección podía iniciarse a partir de sustratos que ya estuvieran infectados en origen.

Se conoce al hongo *Thielaviopsis basicola* como un hongo que puede conservarse en el suelo mediante la formación de clamidosporas e incluso puede desarrollarse sobre material vegetal en descomposición comportándose como saprofito, no obstante se desconocía su constante presencia en sustratos comerciales artificiales a base de turbas rubias, negras y subproductos de la corteza de coco.

Mediante el seguimiento de plantas afectadas y la siembra de plantas sanas en diferentes sustratos, se ha podido confirmar que algunos de éstos pueden contener inóculo de *T. basicola*, que debido a las condiciones extremas de los cultivos en semillero donde se controla principalmente *Pythium* y/o *Rhizoctonia* puede evolucionar como causa principal del marchitamiento y necrosis radicular.

### A3.28 INFECCIÓN DE *Neotyphodium coenophialum* EN SEMILLAS DE VARIEDADES FORRAJERAS COMERCIALES DE *Festuca arundinacea*

Zabalgogezcoa, I., García Ciudad, A., García Criado, B.

*Departamento de Producción Vegetal. Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología, CSIC. Apartado 257. 37071 Salamanca.*

El deuteromiceto *Neotyphodium coenophialum* infecta plantas de *Festuca arundinacea* sin que éstas demuestren síntomas durante su ciclo de vida. El hongo se transmite verticalmente por semilla de generación en generación de planta huésped. Las plantas infectadas contienen alcaloides tóxicos para herbívoros y el consumo de *F. arundinacea* infectada por *N. coenophialum*, está relacionado con trastornos en ganado vacuno y equino. *F. arundinacea* es una especie económicamente importante debido a su utilización en céspedes y como planta forrajera. Para este último uso, la infección de *N. coenophialum* genera inconvenientes, ya que las praderas con niveles de infección mayores del 10% pueden producir efectos negativos en la producción ganadera.

Para determinar la presencia de *N. coenophialum* en variedades forrajeras comerciales de *F. arundinacea* se analizaron lotes de semillas de 13 variedades. En semillas de cuatro de estas variedades se detectó la presencia del hongo; según la variedad, los niveles de infección son del 17 al 72%. Estos datos indican que la semilla de estas cuatro variedades ha sido producida por plantas infectadas, ya que *N. coenophialum* solo se transmite verticalmente por semilla.

### A3.29 *Rhizopus arrhizus* Fischer: AGENTE CAUSAL DE LA PODREDUMBRE BLANDA DE LA REMOLACHA AZUCARERA DE LA ZONA SUR

Ramírez de Lara, M. C. y Ayala García, J.

AIMCRA (Asociación de Investigación para la Mejora del Cultivo de la Remolacha Azucarera). Apdo. 855, 47080 VALLADOLID.

En el cultivo de la remolacha de siembra otoñal, se registra una caída de riqueza al final del ciclo, la cual depende, entre otras variables, de la aparición de la podredumbre blanda de la raíz, estando relacionadas ambas con las temperaturas elevadas.

La podredumbre blanda que aparece en estas remolachas se denomina comúnmente “cocido de la remolacha”, y se caracteriza por la aparición en la raíz principal, en la zona de inserción de los peciolos, de lesiones marrón-grisáceas. Según avanza la enfermedad desde la corona hacia abajo, tanto superficial como internamente el tejido se vuelve marrón y esponjoso. En la superficie de la raíz aparece un micelio primero blanco y luego oscuro. Aparece también un fluido espumoso de olor vinoso.

Durante los veranos de los años 1994, 1995 y 1996 se realizó el diagnóstico de 130 muestras de remolachas “cocidas”, siendo *Rhizopus arrhizus* el hongo detectado en el 80% de las mismas.

En los años 1996 y 1997 se realizaron tres ensayos de patogenicidad de dos aislados de *Rhizopus arrhizus*, sobre distintas variedades de remolacha.

Estos ensayos se llevaron a cabo en laboratorio en condiciones controladas, mediante la inoculación artificial de esporas del hongo. Los aislados de *Rhizopus* utilizados fueron: Rp 10-94, procedente de Jerez de la Frontera (Cádiz) y Rp 86-96, procedente de La Luisiana (Sevilla).

En el momento de la inoculación, las plantas test tenían entre tres y cuatro meses de edad.

Los resultados obtenidos indicaban que *Rhizopus arrhizus* es un hongo patógeno de la remolacha capaz de producir “podredumbre blanda” de la raíz.

Además de demostrar la patogenicidad del hongo se comprobó que la agresividad del ataque dependía de la presencia o ausencia de heridas en la raíz de la remolacha, de la variedad de remolacha utilizada y de la cepa del hongo inoculada.

### A3.30 CAÍDA DE PLÁNTULAS DE REMOLACHA EN LA ZONA DE SALAMANCA: AGENTES CAUSALES, IMPORTANCIA Y CONTROL

Ramírez de Lara, M. C. y Ayala García, J.

AIMCRA (*Asociación de Investigación para la mejora del cultivo de la remolacha azucarera*). Apdo. 855, 47080 VALLADOLID.

Durante las primaveras de los años 1994, 1995 y 1996, se llevaron a cabo una serie de experiencias en la provincia de Salamanca, encaminadas a conocer los agentes bióticos responsables de la caída de plántulas en nascencia y a valorar los daños producidos por ellos.

Se realizaron ensayos en cuatro parcelas cada año, y en laboratorio se llevó a cabo el cultivo de remolacha en condiciones de temperatura y humedad controladas, en los suelos de estas parcelas.

Los síntomas de enfermedad más frecuentes fueron, tanto en los ensayos de campo como en los de laboratorio, los propios de Pie Negro, y los hongos causantes de esta enfermedad en ambos casos fueron *Aphanomyces cochlioides*, *Pythium* spp, *Fusarium* spp y *Rhizoctonia solani*, siendo los dos primeros los patógenos más frecuentemente detectados.

Los daños ocasionados por la enfermedad en el campo dependen de las condiciones ambientales y otros factores de riesgo, variando de 0 a 18% de caída de plántula, en ausencia de tratamiento fungicida.

Entre los factores de riesgo cabe destacar la repetición del cultivo, el encharcamiento, la formación de costra superficial, la siembra tardía o la resiembra.

En los ensayos en condiciones controladas, el porcentaje de caída de plántula varía entre el 30 y el 99%.

En el campo, la protección fungicida aplicada a la píldora (Tachigaren, 14g/unidad y TMTD, 16g/unidad), es suficiente para disminuir el daño producido por los patógenos, según el nivel de ataque, entre el 40 y el 90%. Si el fungicida es aplicado directamente a la semilla desnuda, el tratamiento no es efectivo.

En laboratorio, el fungicida aplicado a la píldora protege a la plántula del ataque de hongos en nascencia durante un cierto período de tiempo, siempre que los niveles de inóculo no sean muy elevados. Si el fungicida es aplicado directamente a la semilla desnuda, el período de protección disminuye.

A pesar de que en laboratorio la capacidad patógena de los hongos de suelo se amplifica, se observa un paralelismo entre lo que ocurre en campo y en laboratorio en cuanto a patógenos detectados, porcentaje de caída de plántulas y eficacia de los fungicidas.

### A3.31 *Phytophthora citricola*: SU PRESENCIA EN SUELOS Y AGUAS DE RIEGO DEL PAIS VASCO.

Larregla Del Palacio, S.<sup>1</sup>, Berra Lertxundi, D.<sup>2</sup>.

1. Sanidad Vegetal. Diputación Foral. Bº Arteaga s/n. 48016 Derio (Bizkaia).

2. Sanidad Vegetal. Laboratorio Agrario de Fraisoro. 20159 Zizurkil (Gipuzkoa).

Dentro de las especies del género *Phytophthora*, *Phytophthora citricola* se halla presente en los cinco continentes; sin embargo, hasta el momento presente, no ha sido constatada su presencia en nuestro País. Al realizar una prospección para conocer la presencia de hongos del género *Phytophthora* la aparición, con cierta frecuencia, de la especie *P. citricola* nos motivó a indagar más a fondo su papel, no sólo en el medio agrícola sino en el ecosistema en general.

Sobre 1.204 muestras de tierra se detectó *P. citricola* en 68 de ellas. La procedencia de las tierras que albergaban el hongo fue muy diversa: acacia, acebo, abeto douglas, alcanforero, álamo, alerce, aliso, argoma, avellano, castaño, cerezo, clavel, encina, fresno, frondosas arbóreas, frondosas arbustivas, haya, humedal, manzano, nogal, pino, plátano, pradera, sauce, tierra de talud, tierra de borde de arroyo y zarza.

En prospección sobre 547 muestras de suelo de pinar de *Pinus insignis* con alguna sintomatología de decaimiento, sólo en 7 casos se aisló *P. citricola*. En análisis de muestras con síntomas de decaimiento, recibidas en laboratorio, se aisló *P. citricola* en clavel, hiedra, lavanda y manzano.

Realizado un seguimiento en encinar, a distintas profundidades, entre 0-80 cm., para conocer la persistencia en el suelo de *P. citricola* a lo largo del año, el hongo se detecta, con ciertas fluctuaciones, durante todos los meses del año.

En muestreos en 3 invernaderos con cultivo de pimiento en los que hubo daños de "tristeza", para realizar un seguimiento de la fluctuación de la densidad de inóculo de *P. capsici* en ausencia de cultivo, se constató la presencia de *P. citricola* y *P. cryptogea* en la época invernal, en uno de los invernaderos estudiados. Analizadas las aguas de riego de 10 explotaciones durante 5 semanas consecutivas, colocando trampas de pétalos de clavel en los depósitos de agua y/o en los cursos de los ríos, aguas arriba y aguas abajo de las explotaciones, se aísla *P. citricola*, generalmente acompañada de *P. cryptogea*, en las 8 explotaciones que riegan con agua de río.

De los datos expuestos se puede deducir que *P. citricola* está distribuida ampliamente en suelos y aguas y, por tanto, se le puede considerar como una especie endémica en el País Vasco.

### A3.32 DETECCION MEDIANTE PCR DE INFECCIONES LATENTES DE *Colletotrichum acutatum* EN PLANTAS DE FRESA

Suárez, M.B.<sup>1</sup>, Martínez-Culebras, P.<sup>2</sup>, Grondona, I.<sup>1</sup> y Monte, E.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Microbiología y Genética (Universidad de Salamanca). Edificio Departamental. Laboratorio 208. Avda. Campo Charro s/n 37007 Salamanca.

<sup>2</sup> Colección Española de Cultivos Tipo (CECT). Universidad de Valencia. Campus de Burjassot 46100 Burjassot, Valencia.

Las especies de *Colletotrichum* causan importantes pérdidas económicas en los cultivos de fresa, estando implicadas en la podredumbre de plantas y frutos (antracnosis). En la Unión Europea, *C. acutatum* es considerado patógeno de cuarentena atribuyéndosele la mayoría de los daños. En Norteamérica gran parte de los problemas de antracnosis en el cultivo de fresa son causados también por *C. fragariae*, indistinguible en términos morfológicos de *C. gloesporioides* (estado asexual de *Glomerella cingulata*), al que se considera como una “raza” patogénica muy virulenta.

La identificación de las especies de *Colletotrichum* patógenas de fresa no es fácil, dada la gran variabilidad morfológica y de cultivo que presentan. Recientemente Buddie *et al.* (1998) han propuesto un esquema molecular, con objeto de obtener una clasificación más consistente de estas especies.

La enfermedad, en la mayoría de los casos, no puede ser diagnosticada de forma visual en los plantones de fresa que se importan desde Estados Unidos, con lo que se hace necesario el desarrollo de un test de diagnóstico seguro, rápido y fiable para *C. acutatum*, en material vegetal asintomático, sin necesidad de aislar el patógeno en cultivo puro.

Con este objetivo se utilizaron plantas asintomáticas de fresa que habían sido artificialmente inoculadas con distintos aislamientos de *C. acutatum* y de las que se extrajo el DNA genómico para amplificación por PCR utilizando primers específicos para *C. acutatum*. Los primers se diseñaron en base a la clasificación molecular propuesta por Buddie *et al.* (1998). Se evaluaron distintos métodos de extracción del DNA, así como distintas estrategias para evitar la inhibición de la polimerasa debida a la presencia de inhibidores en el material vegetal.

Dependiendo de los tamaños de las bandas obtenidas en la PCR se detectaron cuatro grupos moleculares en *C. acutatum* patógenos de fresa. Este método permitió la detección e identificación rápida de este patógeno de cuarentena en plantas de fresa.

Buddie *et al.* (1998). Molecular characterization of *Colletotrichum* strains derived from strawberry. *Mycol. Res.* **102** (en prensa).

Trabajo financiado por UE (Proyecto AIR3-CT94-1322).

### A3.33 DOCE AÑOS DE ESTUDIO DE LAS PODREDUMBRES RADICULARES DEL AGUACATE (*Persea americana* Mill.) EN LA COSTA SUR DE ESPAÑA

López Herrera, C.J.<sup>1</sup>, Pérez Jiménez, R.M.<sup>2</sup>, Melero Vara, J.M.<sup>3</sup>, Basallote Ureba, M.J.<sup>4</sup> y Zea Bonilla, T.<sup>2</sup>

1. E.E. La Mayora. C.S.I.C. 29750 Algarrobo-Costa, Málaga.
2. Centro de Investigación y Formación Agraria 29140 Churriana, Málaga.
3. Instituto de Agricultura Sostenible, C.S.I.C. Apdo.4084. 14080 Córdoba.
4. Centro de Investigación y Formación Agraria. Apdo. 240. 14080, Córdoba.

La podredumbre radicular causada por *Phytophthora cinnamomi* Rands y la podredumbre blanca causada por *Rosellinia necatrix* Prill. son las enfermedades más importantes del cultivo del aguacate en las provincias de Málaga y Granada, principales productoras de este fruto en España, con un 79,9% de la producción total del país. En este trabajo se resume el estudio desarrollado en los últimos doce años por nuestro equipo, encaminado a establecer la dispersión geográfica de estas enfermedades y su incidencia en plantaciones comerciales de aguacate, a conocer las poblaciones de cada uno de los agentes causales de estas enfermedades y desarrollar un control integrado de las mismas, mediante distintos métodos de lucha físicos, químicos y estudio de resistencia.

En el periodo 1986-1997, se prospectó un total de 214 fincas aguacateras en las provincias de Málaga y Granada, en las que se muestrearon 658 árboles que presentaban necrosis en raíces absorbentes y gruesas, y con síntomas aéreos de marchitez, pérdida total o parcial de sus hojas y muerte del árbol. Los aislamientos y las pruebas de patogenicidad realizados identificaron como agentes causales de estas podredumbres radiculares (PR) a *P. cinnamomi* y *R. necatrix*. El porcentaje de incidencia medio de cada patógeno en el total de fincas visitadas en los doce años de muestreo fue del 25% para *P. cinnamomi* y del 40 % para *R. necatrix*. Las inoculaciones artificiales realizadas con aislados de ambos patógenos sobre plantas de aguacate de semillas del cv. Topa-Topa, establecieron grupos de distinta virulencia para cada uno de ellos. Asimismo, se han realizado estudios de la morfología y características culturales de estos aislados, los cuales han sido comparados entre sí y con otros de distinta procedencia geográfica.

Finalmente, se ha demostrado la efectividad de la solarización en el control físico de las PR en plantaciones comerciales de la zona. Adicionalmente se han realizado ensayos de control químico aplicando distintos productos fungicidas tanto en campo como en invernadero. Actualmente la investigación está encaminada a detectar entre material vegetal de distinta procedencia la existencia de resistencia /tolerancia a los patógenos citados para realizar un control integrado de las PR del aguacate



### A3.34 DIVERSIDAD GENÉTICA DE *Botrytis cinerea* EN LOS CULTIVOS PROTEGIDOS DE ALMERÍA

Alfonso, C., Raposo, R., Melgarejo, P.

*Departamento de Protección Vegetal. INIA. Carretera de la Coruña km 7. 28040 Madrid*

*Botrytis cinerea*, el anamorfo de *Botryotinia fuckeliana* es un hongo heterotálico y haploide. Ataca a un amplio rango de huéspedes en zonas templadas y causa la podredumbre gris en cultivos importantes económicamente, causando graves pérdidas. Existen muchos estudios que tratan de su biología, patogénesis, epidemiología y control siendo, sin embargo, muy escaso el conocimiento genético del hongo. En este trabajo se presenta un estudio realizado con marcadores moleculares RAPD sobre la estructura de la población de *B. cinerea* de Almería.

Se realizaron dos muestreos de *B. cinerea* en los cultivos protegidos de Almería; el primero al comienzo de la epidemia (diciembre 1992) en 24 invernaderos de las regiones de Levante y de Poniente, recogiendo un total de 65 aislados. Tres meses más tarde (al final de la epidemia y después de muchas aplicaciones de fungicidas) se hizo un segundo muestreo, solo en la zona de Poniente, recogiendo 75 aislados de 16 invernaderos. Se incluyeron también 4 aislados de Holanda, 4 de Italia y 6 de Israel.

Se utilizaron 10 cebadores de la serie OPB y uno de la serie OPD que generaron 79 marcadores RAPD, de los cuales 46 eran polimórficos y 33 monomórficos. La presencia y ausencia de cada banda se consideró como 1 y 0, respectivamente, dándose a todas las bandas el mismo peso. Se asumió que cada banda representaba un locus génico simple. Para medir la variación genética se utilizó el índice de diversidad de Nei y las comparaciones estadísticas entre grupos de aislados se hicieron usando el coeficiente de diferenciación de Nei ( $G_{ST}$ ). Se hicieron comparaciones entre invernaderos, entre regiones, entre aislados del primer muestreo y del segundo, y entre aislados de diferentes países. Se calculó también la frecuencia de cada marcador para cada una de las subpoblaciones que se habían comparado y se realizó un análisis de contingencia de  $\chi^2$  (calculándose el estadístico  $G^2$ ) para ver la heterogeneidad de la frecuencia de los marcadores entre subpoblaciones. Esto nos permitió conocer la contribución de cada marcador para diferenciar subpoblaciones.

Los resultados muestran que el 93% de la diversidad genética se debe a la variabilidad génica entre aislados dentro de cada invernadero, el 6% a la existente entre invernaderos por regiones y el 1% a la existente entre regiones. Cuando se comparan poblaciones de otros países o aislados del primer o del segundo muestreo el 95% de la diversidad génica se debe a la diferencia de los aislados entre sí. Esto nos indica que *B. cinerea* es una sola población y que hay una gran diversidad entre aislados.

### A3.35 MODIFICACIÓN DEL MÉTODO CAMPBELL PARA UN RÁPIDO AISLAMIENTO DE *Phytophthora* spp. DEL SUELO.

Vázquez-Ruiz de Ocenda, R.A.

*Departamento de Biología Vegetal. Universidad de Santiago de Compostela, Campus de Lugo. 27002 Lugo.*

Tradicionalmente, el aislamiento a partir del suelo de las distintas especies de *Phytophthora*, y en particular de *P. cinnamomi* Rands, se realiza por el método de “capturas”, utilizando como “cebos” diferentes tipos de material vegetal (frutos, hojas, pétalos, etc,...). Fue Campbell en 1949 el primero en idear este tipo de técnicas, dada la dificultad de aislar *Phytophthora* spp. directamente en medios de cultivo, usando para ello la manzana como “cebo”.

La modificación que se propone consiste en la extracción, mediante sacabocados, de cilindros de manzana de 5-7 mm de diámetro. Estos cilindros se colocan verticalmente en pequeños recipientes (*e.g.* el tamaño de un envase de yogur) que contengan la muestra de suelo humedecido hasta una altura de unos 2-3 cm, de forma que los cilindros sobresalgan otros 2 cm por encima del nivel del suelo. Se dejan así en condiciones de laboratorio. A las 24 horas se extraen los cilindros y se lavan cuidadosamente en agua corriente, se disponen en placas con papel de filtro para eliminar el exceso de humedad y, con ayuda de un escalpelo, se trocean en pequeños discos de 2-3 mm de grosor. Estos fragmentos se pueden disponer directamente sobre placas Petri con aquellos medios de cultivo que, preferentemente, favorezcan el desarrollo de estas especies, o bien, sobre medios generales. A las 48 horas se pueden observar las placas, en posición invertida, directamente al microscopio (4x,10x) para comprobar el crecimiento de los hongos: la fácil identificación del micelio permite detectar la presencia de *Phytophthora*. Se puede proceder entonces al aislamiento de las colonias en cultivos puros.

**Con la modificación que aquí se describe se pueden obtener cultivos puros de *Phytophthora* spp. procedentes del suelo, en tan sólo 5 días. Este método sencillo permite, asimismo, la evaluación de un elevado número de muestras, al tiempo que facilita la realización de un número muy alto de repeticiones.**

### A3.36 APTITUD PARA MICORRIZACIÓN DE PORTAINJERTOS DE FRUTAL DE HUESO (*Prunus* spp.).

Hernández, A.<sup>1</sup>, Calvet, C.<sup>1</sup>, Pinochet, J.<sup>2</sup>, Bonet, A.<sup>1</sup>, Camprubí, A.<sup>1</sup>, Estaún, V.<sup>1</sup>

1. Dpto. de Patología. IRTA. Ctra. de Cabrils s/n. 08348-Cabrils. Barcelona.

2. Agromillora Catalana, S. A., El Rebato s/n, 08739 T. M. Subirats, Barcelona.

La asociación de raíces con hongos formadores de micorriza se establece virtualmente en todos los portainjertos de distintos orígenes para árboles frutales. Como respuesta a la micorrización se produce un aumento considerable del desarrollo de la planta. Se ha demostrado que en muchos casos, las plantas micorrizadas toleran mejor las situaciones de estrés abiótico y el ataque de plagas y enfermedades del suelo (nematodos y hongos principalmente). El conocimiento de la dependencia micorrícica de los principales portainjertos comerciales y experimentales de *Prunus* de introducción reciente en España, con énfasis en aquellos susceptibles a nematodos, es limitado. En este trabajo se pretendió caracterizar las asociaciones hongo-portainjerto capaces de promover respuestas favorables en el desarrollo de las plantas en su fase inicial. Con ese objetivo se evaluó la aptitud para micorrizar de 19 portainjertos de *Prunus* y sus selecciones bajo condiciones controladas en invernadero. Los portainjertos fueron: 'G x N No. 22', 'G x N No. 15', 'Adesoto-101', 'Myrobalán 29 C', 'Cadamán', 'GF 8-1', 'Montclar', 'Julior', 'Mayor', 'GF 677', 'CAB-6P', 'Torinel', 'Monpol', 'Montizo', 'Ademir', 'Mirocal', 'Ishtara', 'Barrier', y 'Adara'; en su mayoría híbridos de melocotonero por almendro, melocotoneros, ciruelos y cerezos de origen español, francés e italiano. Las plantas se inocularon con tres hongos formadores de micorriza: *Glomus intraradices*, *Glomus mosseae* y *Glomus etunicatum* y se hicieron crecer durante un periodo de 150 días aproximadamente en macetas de 3 litros de capacidad. Los resultados del estudio indicaron que los portainjertos presentaban diferencias significativas en algunos parámetros de crecimiento medidos como respuesta a la inoculación con los diferentes hongos arbusculares. El aislado nativo de *G. intraradices*, en la mayoría de los casos, fue el endófito más infectivo y efectivo.

### A3.37 EFECTIVIDAD DE LA SIMBIOSIS MICORRIZA EN OLIVO.

V. Estaún<sup>1</sup>, A. Camprubí<sup>1</sup> C. Calvet<sup>1</sup> y J. Pinochet<sup>2</sup>

1. *Departament de Patologia Vegetal. Centre de Cabrils. IRTA. Crta de Cabrils, s/n 08348 Cabrils (Barcelona).*

2. *Agromillora Catalana. El Rabato s/n, 08739 Subirats (Barcelona).*

El olivo es un árbol tradicional de zonas mediterráneas, muchas veces cultivado en terrenos marginales. Debido al incremento del consumo de aceite de oliva experimentado desde los años 80, el cultivo del olivo ha despertado el interés de agricultores y técnicos. El olivo presenta la simbiosis micorriza arbuscular de forma natural y se ha evaluado su dependencia a esta simbiosis en condiciones controladas, sin embargo no hay resultados que permitan valorar la efectividad de la simbiosis a largo plazo. En este trabajo se ha estudiado la respuesta de dos variedades productoras de aceituna de almazara, Arbequina y Picual, a la inoculación con dos hongos formadores de micorrizas arbusculares *Glomus mosseae* y *Glomus intraradices*. Ambos hongos se han mostrado efectivos en promover el crecimiento de otras plantas. *G. mosseae* (BEG nº12) es un hongo de colección proveniente de Inglaterra y *G. intraradices* (BEG nº72) es un aislado local de zona árida. En un primer estudio en microparcela con una duración de 18 meses ambos hongos promovieron el crecimiento de las dos variedades ensayadas, sin embargo *G. intraradices* fue netamente más efectivo, desde el principio del ensayo, que *G. mosseae* en la variedad Picual. En un segundo estudio se inocularon plantones de la variedad Arbequina con ambos hongos, *G. mosseae* y *G. intraradices* en la fase de engorde en vivero, y posteriormente se transplantaron a campo en una plantación semi-intensiva con fertirrigación. En estas condiciones, al cabo de 12 meses del trasplante (22 desde la inoculación en vivero) las plantas inoculadas seguían mostrando diferencias con las no inoculadas aunque estas últimas ya habían establecido la simbiosis con hongos nativos.

### A3.38 IDENTIFICACIÓN DE LAS DIFERENTES ESPECIES DE *Armillaria* EN EL REINO UNIDO.

Pérez Sierra, A. M., Whitehead, D. S.

*Royal Horticultural Society. Wisley. Woking. Surrey GU23 6QB. Reino Unido.*

*Armillaria* es uno de los agentes causantes de la enfermedad de la raíz en plantas leñosas y es uno de los problemas más importantes en los jardines británicos. Hasta hace poco nos referíamos a *Armillaria* como *Armillaria mellea* aunque actualmente en Europa se han identificado 7 especies diferentes: *A. mellea*, *A. ostoyae*, *A. gallica*, *A. tabescens*, *A. cepistipes*, *A. borealis* y *A. ectypa*. De estas especies, *A. mellea* y *A. ostoyae* son altamente patogénicas y el resto se consideran patógenos débiles o saprófitos. Para nuestro centro de diagnóstico es muy importante distinguir las diferentes especies para poder aconsejar el método de control adecuado.

Necesitamos un método de identificación rápido y preciso. Utilizando la técnica PCR descrita por Harrington y Wingfield (1995) conseguimos nuestro objetivo. El método utilizado es el siguiente: para el aislamiento de *Armillaria* tomamos micelio de las raíces afectadas, inoculándolo en uno de los siguientes medios de cultivo: extracto de malta, medio de Russell modificado o agar zanahoria. Tomando una pequeña cantidad de micelio de la colonia resultante y aplicando la técnica PCR, obtenemos un fragmento de aproximadamente 900 pares de bases. Realizamos la digestión de este fragmento con las enzimas de restricción *AluI*, *BsmI* y *NdeI*. La purificación del ADN no es necesaria con *AluI*, pero sí con *BsmI* y *NdeI*. Para esto utilizamos las columnas QIAquick. Una vez terminada la digestión se comprueba el resultado por electroforesis en un gel de agarosa. Los patrones de restricción nos permiten distinguir las diferentes especies de *Armillaria*.

Más de 250 muestras han sido identificadas con esta técnica en nuestro laboratorio. Actualmente se está creando un mapa con la distribución geográfica de las diferentes especies. Cada año con las muestras recibidas se actualiza un listado de los arbustos y árboles más susceptibles y más resistentes. Esta técnica nos ha ayudado a solventar uno de nuestros problemas y se intentará aplicar para la identificación de las diferentes especies de *Phytophthora*.

### A3.39 ESPECIES DE *Phytophthora* ASOCIADAS CON LA MORTALIDAD DE ALISOS EN GRAN BRETAÑA

Delcán Giráldez, J. Brasier, C.M.

*Forestry Commission Research station, Alice Holt Lodge, Wrecclesham, Farnham, Surrey GU10 4LH, U.K.*

Una pequeña proporción de alisos situados en la ribera de los ríos o en áreas sometidas a inundaciones en Gran Bretaña, Austria, Francia, Alemania, Holanda y Suecia están afectadas por una enfermedad letal. En 1995 el 5 % de los alisos de Gran Bretaña estaban afectados por esta enfermedad. De las lesiones situadas en la base del tronco de estos árboles se aisló una especie de *Phytophthora* desconocida que presenta características morfológicas similares a *P. cambivora* aunque es homotálica en vez de heterotálica y muestra una frecuencia alta de oogonios abortados, una forma de la colonia única y una menor temperatura óptima de crecimiento en agar zanahoria.

Estudios citológicos y moleculares (secuencias ITS y RAPDs) de este hongo indican que es un híbrido interespecífico relacionado con *P. cambivora* (Brasier *et al*, in Press). Algunos aislados de este patógeno muestran una gran variabilidad e inestabilidad genética. En este trabajo se realizó un muestreo detallado en zonas afectadas de Gran Bretaña en el verano de 1997 para intentar estudiar: A) si la variación genética observada era mayor en la población no patogénica, en el suelo y en el agua del río que en la patogénica en los alisos. y B) que otras especies de *Phytophthora* están presentes en los ríos. Para ello se tomaron muestras de las lesiones en la base del tronco de los alisos y del suelo cercano a estos árboles y a ríos. Se introdujeron trozos pequeños de corteza en manzanas que fueron utilizadas como cebo para aislar *Phytophthora*. Las muestras de suelo se sumergieron en agua y se colocaron hojas de alisos flotando en la superficie, estas hojas también se utilizaron como cebo para aislar *Phytophthora*. Los aislados obtenidos se analizaron morfológicamente y se realizaron experimentos de velocidad de crecimiento. Como resultado del muestreo solo se obtuvieron aislados típicos de la *Phytophthora* del aliso de lesiones del tronco y no se observaron variantes genéticas. Del suelo se aislaron diferentes especies de *Phytophthora*: *P. gonapodyides*, *P. citricola*, *P. megasperma*, *P. cactorum*, diferentes especies de *Pythium* y solamente 2 aislados típicos de la *Phytophthora* del aliso. La población que se aisló en el suelo de alisos de la ribera de los ríos es muy diferente de la que se obtuvo en las zonas alejadas de los ríos. En suelos de ribera de río la especie de oomicetos más abundante es *P. gonapodyides*.

## B1.1 INCIDENCIA DEL VIRUS Y DE LA PATATA (POTATO VIRUS Y, PVY) EN EL CULTIVO DEL TOMATE DEL SUR-OESTE DE TENERIFE

Ríos D.<sup>1</sup>, Ravelo B.<sup>1</sup>, Espino A.I.<sup>2</sup>, Otazo, C.<sup>2</sup>; de León J.M.<sup>2</sup> y Jordá C.<sup>3</sup>.

(1) *Cabildo Insular de Tenerife*

(2) *Laboratorio Sanidad Vegetal. Consejería de Agricultura Pesca y Alimentación del Gobierno de Canarias*

(3) *Dpto. Producción Vegetal. Patología. Agrónomos. Universidad Politécnica de Valencia.*

En estos últimos años la incidencia del virus Y de la patata (PVY) en el cultivo de tomate de otoño para exportación ha sido muy alta, produciéndose importantes pérdidas económicas.

Se han detectado dos razas del virus, PVY<sub>0</sub> y PVY<sub>N</sub>, siendo este último más perjudicial ya que produce daños directos sobre el fruto.

La primera detección del PVY<sub>N</sub> en la Isla fue en 1993. El presente trabajo recoge la prospección y estudio de ambas trazas en la zona de cultivo más importante de esta hortícola en el Sur-Oeste de Tenerife, atendiendo a diferentes factores. La interacción planta-virus, así como la incidencia de la enfermedad en distintas parcelas pertenecientes a diferentes zonas situadas a diferentes alturas sobre el nivel del mar (0-200 m, 200-300 m y más de 600 m).

La influencia que pueda existir en la manifestación de la enfermedad según la calidad del agua empleada en el riego y el tipo de abonado utilizado.

La relación existente entre presencia de pulgones y otros insectos así como colonización de la parcela por plantas silvestres y otros cultivos asociados de verano, en campos afectados.

Paralelamente se ha realizado también una búsqueda de los posibles reservorios en dichos campos citados, a las diferentes alturas estudiadas, encontrándose primeras citas de plantas hospedadoras del virus entre las plantas ruderales.

## B1.2 INCIDENCIA DE POTYVIRUS EN MAÍZ Y EN HUÉSPEDES ALTERNATIVOS EN CATALUÑA

M. Angeles Achón, Marta Sobreperere

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

El mosaico enanizante del maíz es la principal enfermedad vírica del maíz en Cataluña. La caracterización de aislados presentes de la zona indicó que esta enfermedad está ocasionada por el virus del mosaico enanizante del maíz (MDMV), aunque el número de muestras analizadas es insuficiente para determinar si esta enfermedad está sólo inducida por este virus o también por el virus del mosaico de la caña de azúcar (SCMV). Estos dos potyvirus se incluyen actualmente dentro del subgrupo del SCMV, que comprende además el virus del mosaico del sorgo (SrMV) y, el virus del mosaico de la cañota (JGMV).

Se han realizado muestreos continuados para determinar la incidencia y distribución de MDMV y SCMV, los dos miembros del complejo de SCMV identificados en Europa. La selección de los campos de muestreo se ha realizado al azar y en cada campo se ha llevado a cabo un muestreo al azar y otro dirigido hacia plantas con síntomas de mosaico. Los muestreos de primavera y otoño se realizaron en malas hierbas y el de verano en maíz y malas hierbas. La presencia de MDMV y SCMV en las muestras se ha determinado mediante el método ELISA-DAS utilizando antisueros policlonales. Algunas muestras también se han analizado por inmunoblot.

La incidencia de MDMV en maíz es superior al 27% y el único huésped alternativo que parece jugar un papel importante en la epidemiología de este virus en la zona de Lleida es la cañota (*Sorghum halepense*). Con muy pocas excepciones esta especie se encontró en todos los campos y al menos una muestra estaba infectada con el virus. Por el momento no se ha detectado claramente SCMV en ninguna de las muestras de maíz ni en ningún huésped alternativo.

Se ha encontrado variabilidad en el tamaño de la proteína de cubierta de MDMV, mayor en las muestras de cañota analizadas que en las de maíz. Estos resultados pueden indicar la presencia de más de una cepa de MDMV e incluso de otro miembro del subgrupo.



### **B1.3 EVOLUCIÓN DE LA PROPORCIÓN DE ADULTOS DE *Frankliniella occidentalis* (Pergande) TRANSMISORES DEL “TOMATO SPOTTED WILT VIRUS” (TSWV) EN RELACIÓN CON LA INCIDENCIA DE LA ENFERMEDAD EN CULTIVOS DE PIMIENTO EN INVERNADERO.**

Sánchez Sánchez, J.A.<sup>(1)</sup>; Lacasa Plasencia, A.<sup>(1)</sup>; Gutiérrez González, L.<sup>(1)</sup>; Martínez Lluch, M.C.<sup>(1)</sup>; Contreras Gallego, J.<sup>(2)</sup> y Hita Gambín, I.<sup>(1)</sup>

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

(2) Dpto. Ing. Aplicada. Producción Vegetal. E.T.S.I. Agrónomos. Universidad de Murcia, Paseo Alfonso XIII s/n 30.203 Cartagena (Murcia).

*Frankliniella occidentalis* (Pergande) constituye la principal plaga de las que afectan al pimiento cultivado bajo plástico en el Sudeste de España, debido principalmente, a la elevada capacidad y eficacia para transmitir el “Tomato Spotted Wilt Virus” (TSWV). La problemática se acentúa cuando se lleva a cabo un control biológico de *F.occidentalis*, donde antes de la reducción de las poblaciones de trips por los depredadores transcurre un período de tiempo, más o menos amplio, que puede ser decisivo con respecto a la incidencia del TSWV en fechas futuras.

El desarrollo de modelos epidemiológicos que permitan predecir la incidencia del TSWV en relación a las densidades poblacionales de *F.occidentalis*, constituye una herramienta fundamental para el manejo de los cultivos donde se adopten programas con un control biológico del trips.

Como primer paso para establecer un modelo epidemiológico, se pretendía conocer la evolución de la proporción de adultos transmisores en una población de *F.occidentalis*, en relación con la cantidad de plantas de pimiento afectadas por TSWV presentes en el cultivo. La experiencia se llevó a cabo en un invernadero dividido en dos sectores: en uno de ellos se arrancaban las plantas con síntomas de TSWV y en el otro se dejaban. Se partió de una densidad inicial del 0,6-0,7% de las plantas con síntomas de TSWV, y las poblaciones de trips se dejaron evolucionar sin ningún tipo de intervención. Semanalmente se valoraba la incidencia del TSWV, se hacían muestreos para conocer las densidades de trips y se tomaban adultos que eran analizados individualmente por inmunopresión para saber si eran o no vectores.

En el sector donde se realizó el arranque de plantas, la incidencia al final del ensayo de la virosis fue del 19,7%, y la proporción de adultos de *F.occidentalis* transmisores osciló entre el 0,6 y el 3,6%, sin que se encontrara ninguna relación con el porcentaje de plantas arrancadas con síntomas TSWV. En el sector donde no se arrancaron plantas con síntomas de virosis, al final del ensayo se alcanzó una incidencia del 63,8%, y la proporción de adultos transmisores aumento desde el 0,5 hasta el 7, encontrándose un buena correlación ( $r^2=0,834$ ,  $P<0,001$ ) entre la proporción de adultos infectivos y el porcentaje de plantas con virosis, considerando un período de retardo equivalente al tiempo necesario para que una larva de trips de primer estadio alcance el estado adulto.

## B1.4 EL AMARILLO VÍRICO DE LA REMOLACHA AZUCARERA. EPIDEMIOLOGÍA Y CONTROL

Ortiz-Barredo A.<sup>1</sup>, Cristina Pérez de San Román C.<sup>2</sup>, Cambra M.<sup>3</sup>, Ayala J.<sup>4</sup>

1. ETSIA, Universidad Pública de Navarra, 31006 Pamplona. [Amaia.ortiz@UPNA.es](mailto:Amaia.ortiz@UPNA.es)

2. AZTI-CIMA. Apdo. 46. 01080 Vitoria

3. IVIA. Apdo. Oficial. Moncada, Valencia

4. AIMCRA. Apdo. 855. 47080 Valladolid

El amarilleo vírico de la remolacha está ocasionado por dos virus: BMV (Beet Mild Yellowing Luteovirus) y BYV (Beet Yellowing Closterovirus). Según las prospecciones realizadas entre 1989 y 1994, estos dos virus están presentes en todas las zonas remolacheras españolas. La incidencia media registrada fue de alrededor del 10 % en las zonas Norte y Centro y de un 2% en la zona Sur. Esta enfermedad se presentó en rodales, con una diseminación predominante en la dirección de la línea de siembra, motivado por la aparición de pulgones ápteros en el cultivo. Durante estos años, en la zona Norte, las especies de pulgones *Myzus persicae*, *Aphis fabae* y, esporádicamente *Macrosiphon euphorbiae*, se encontraron colonizando las remolachas durante la época de cultivo. En los ensayos realizados con clones recogidos en campo y mantenidos en condiciones de cría controladas, *M. persicae* fue capaz de transmitir BMV y BYV con una eficacia del 80%, mientras que *A. fabae* sólo transmitió BYV, con un 20% de eficacia. Sin embargo la presión infectiva de *A. fabae* fue mayor, ya que en campos sin protección insecticida, tanto el número de remolachas infestadas, como el número de pulgones por planta fue mayor para *A. fabae* que para *M. persicae*. Un 16 % de las 86 especies de malas hierbas más abundantes recogidas en los bordes de campos de cultivo, resultaron potenciales fuentes de inóculo. Cabe destacar cuatro especies que actuarían como reservorio de esta enfermedad: *Stellaria media*, *Picris echioides*, *Senecio vulgaris* y *Capsella bursa-pastoris*, que además de ser huéspedes de BYV y BMV, *M. persicae* y *A. fabae* son capaces de alimentarse de ellas. Fue posible establecer una única curva de vuelo de pulgones en todos los campos de la zona Norte remolachera, con una época de máxima población, que abarcó todo el mes de junio con variaciones de 15 días antes y después de esas fechas. El pico de máxima población de *M. persicae* y *A. fabae* coincidió en el tiempo con el de los pulgones totales recogidos en trampas amarillas de agua de tipo Möericke. En función de la dinámica de vuelo, fue posible establecer una estrategia de control eficaz utilizando insecticidas. Los tratamientos aplicados periódicamente, a fin de mantener las remolachas protegidas con insecticida en el periodo que abarcó desde que se observaron los primeros pulgones ápteros en el cultivo, hasta las fechas de máxima población de éstos, fueron eficaces para reducir significativamente la incidencia de la enfermedad. Este periodo coincidió con la época de máxima población de pulgones alados y siempre que fueron atrapados individuos alados de estas mismas especies. Este periodo presentó una duración de aproximadamente un mes, entre las últimas semanas de mayo y primeras de junio.

## **B1.5 BARRERAS AL INTERCAMBIO GENÉTICO EN POBLACIONES NATURALES DEL VIRUS DEL MOSAICO DEL PEPINO.**

Escriu, F., Malpica, J.M., Fraile, A., García-Arenal, F.

*Dpto. de Biotecnología. Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos. 28040 Madrid.*

El Cucumovirus del Mosaico del Pepino (CMV) posee su genoma dividido en tres segmentos que se encapsidan en partículas distintas. Esto implica un coste biológico relacionado con la necesidad de que, para causar infección, entren en la misma célula del huésped las tres partículas que constituyen el genoma completo. No obstante, la división del genoma podría suponer una ventaja evolutiva al permitir el intercambio de los segmentos genómicos (pseudorrecombinación).

En nuestro laboratorio se ha realizado un extenso trabajo de caracterización de la estructura genética de poblaciones españolas de CMV. En ellas se ha encontrado dos tipos genéticos mayoritarios, tipo 1 y tipo 2, cada uno con el mismo patrón de protección frente a ribonucleasas para los tres RNAs, frente a sondas de las cuatro fases de lectura abierta del genoma de la cepa Fny de CMV. También se han encontrado infecciones mixtas de ambos tipos, y una baja proporción de tipos pseudorrecombinantes entre ellos, que no responden a una asociación aleatoria de los tres RNAs, y que no se fijan en las poblaciones. Existe, por tanto, evidencia de barreras en contra del intercambio genético, y cuando éste se produce, algunas asociaciones resultan más ventajosas que otras.

El objetivo del presente trabajo consiste en estudiar la naturaleza de estas barreras de selección. Para ello se han analizado poblaciones de CMV en las que se ha hecho posible el intercambio genético al coinocular de dos en dos en un huésped sistémico (*Nicotiana tabacum* cv. *Xanthi nc*) cantidades equivalentes de 4 aislados de campo que representan los tipos 1 y 2. A partir de estas infecciones mixtas se obtuvieron descendencias constituidas por la población de viriones presentes en la hoja inoculada, y las poblaciones de RNA viral presentes en extractos de hoja inoculada y de hoja de infección sistémica. Entre 44 y 150 descendientes, según el caso, fueron separados en un huésped de lesión localizada (*Chenopodium quinoa*) y multiplicados sobre *N. tabacum* cv. *Xanthi nc*. El análisis y comparación de las frecuencias con que aparecen los distintos tipos genéticos (los tipos 1 y 2 originales y sus pseudorrecombinantes) en estas poblaciones experimentales ilustra sobre los procesos del ciclo biológico del virus (replicación, acumulación, encapsidado, transmisión) en los que operan las barreras al intercambio genético. Estos datos son relevantes para entender la genética y dinámica de las poblaciones de un patógeno importante, y principalmente, por las posibilidades de su control por resistencia (convencional o transgénica), y el impacto de estas estrategias en la población del patógeno.

## B1.6 VARIABILIDAD GENÉTICA DEL VIRUS DEL ENROLLADO DEL ALGODÓN Y DE SU VECTOR, *Bemisia tabaci*.

Sanz, A.I.<sup>(1)</sup>, Beitia, F.<sup>(2)</sup>, Cenis, J.L.<sup>(2)</sup>, Malpica, J.M.<sup>(2)</sup>, Fraile, A.<sup>(1)</sup>, García-Arenal, F.<sup>(1)</sup>.

<sup>(1)</sup> E.T.S.I. Agrónomos. Universidad Politécnica de Madrid. 28040 Madrid.

<sup>(2)</sup> C.I.T.-I.N.I.A. 28049 Madrid.

El enrollado de las hojas del algodón es una enfermedad descrita en 1967 en Pakistán, que origina graves pérdidas económicas en este cultivo. La incidencia de la enfermedad fue baja hasta que en 1987 el síndrome comenzó a extenderse desde el centro de la principal zona productora de algodón alrededor de Multan hasta llegar, en 1995, a invadir más de 400.000 Ha en la provincia del Punjab. La etiología de la enfermedad se debe a un Geminivirus, el virus del enrollado del algodón, CLCuV, que se transmite por *Bemisia tabaci*. La mosca blanca está presente en todas las áreas productoras de algodón, sin embargo la enfermedad no ha alcanzado proporciones epidémicas en la provincia de Sind, también productora de algodón y situada al sur de Punjab.

En un estudio anterior hemos comprobado que CLCuV además de algodón infecta otros cultivos y malas hierbas presentes en la zona. La población viral natural se compone de diversas variantes genéticas que no se correlacionan con la planta huésped o la procedencia geográfica. La recombinación entre variantes, y/o con virus relacionados, parece ser frecuente.

CLCuV es pues, un ejemplo típico de virus emergente y plantea cuestiones sobre su origen y su distribución interesantes para enfocar su control. En este trabajo hemos abordado estas cuestiones. Para ello, hemos analizado las poblaciones de geminivirus y de su vector, *Bemisia tabaci*, en una zona más amplia, que incluye las provincias de Punjab y Sind. Durante la primavera de 1997, época en la que no está presente el cultivo de algodón, se obtuvo una colección de muestras de posibles huéspedes alternativos o rebrotes de algodón, recogiendo plantas con síntomas de infección por geminivirus.

A partir del DNA extraído de las muestras se amplificaron, mediante PCR, fragmentos de DNA correspondientes a distintas regiones del genoma viral. El 99% de las muestras contenían geminivirus. El clonaje y la determinación de la secuencia de una muestra de los fragmentos amplificados ha permitido confirmar la presencia de CLCuV en la región de Sind. Asimismo, TLCLV, el virus del enrollado del tomate, es muy abundante en la zona estudiada, encontrándose frecuentemente en infecciones mixtas con CLCuV, con el que puede generar recombinantes.

La variabilidad genética de *Bemisia tabaci* se analizó mediante RAPDs. Los resultados muestran que hay dos tipos genéticos principales, uno limitado al Punjab, y el otro presente en Punjab y Sind.

A partir de estos resultados se pueden plantear hipótesis sobre el origen de CLCuV y de la epidemia de enrollado en algodón.

## B1.7 EVOLUCIÓN DEL ENROLLADO DE LA VID (GLRaV-3) EN UN VIÑEDO INFESTADO POR *Planococcus citri*

Cabaleiro Sobrino, C.<sup>1</sup> y Segura Iglesias, A.<sup>2</sup>

1. Universidad de Santiago de Compostela, Departamento de Producción Vegetal. Escola Politécnica Superior. Campus Universitario s/n, 27002 LUGO.

2. Universidad de Santiago de Compostela, Departamento de Biología Vegetal. Facultad de Biología. Campus Sur s/n, 15705 Santiago de Compostela.

Desde 1990 se realiza el seguimiento de un viñedo situado en Beluso (Pontevedra). En una parcela se comprobó que uno de los virus del enrollado de la vid (GLRaV-3) presentaba una altísima incidencia y una dispersión relativamente rápida por acción de cochinillas algodonosas (*Pseudococcidae*) que se identificaron en 1994 como *Planococcus citri* Risso y que resultaron ser vectores del virus. En esa finca 40 de las 42 cepas analizadas eran positivas en 1997 frente a un 33% en 1990.

En dos subparcelas de la finca estudiada en las que se habían detectado cochinillas pero en las que no había fuertes infestaciones y en las que se dieron tratamientos insecticidas de invierno, se establecieron plantas jóvenes en el lugar de cepas adultas arrancadas del emparrado o bien entre las cepas existentes en espaldera. Las cepas (Albariño controlado sobre SO4 certificado y Cabernet o Pinot noir sobre SO4 certificados) se analizaron por ELISA en el momento de la plantación (1995) y posteriormente en verano cada año. En 1996 dos cepas en una de las subparcelas dieron positivo por ELISA, aunque con baja absorbancia; en 1997 esas dos cepas y otras dos más dieron positivos claros. En algunas de estas plantas jóvenes, pero no en todas, se encontraron un máximo de 1-2 cochinillas, ninfas de segundo o tercer estadio; en ningún caso una infestación de importancia.

Del estudio de la curva de avance de la epidemia en las cepas adultas y de los años iniciales en las jóvenes, de la fecha de posible llegada de los vectores y de la distribución espacial del virus en la parcela se puede concluir que en viñedos con presencia de vectores de GLRaV-3 y establecidos con material vegetal sin control o vecinos a viñedos con alta incidencia del virus, difícilmente se llega a la plena producción del viñedo sin una incidencia altísima del virus lo que da lugar a que, en vez de mejorar la calidad del mosto con la edad de las cepas, se produzca un deterioro que puede ser bastante notable sobre todo en años de maduración conflictiva. La localización precoz de los vectores y la realización de tratamientos localizados para erradicarlos es imprescindible puesto que una vez extendido el vector los tratamientos insecticidas, aunque controlan bien la plaga, no impiden la transmisión del virus.

## B1.8 DETECCIÓN EN PIMIENTO EN ARGENTINA DE LOS SUBGRUPOS I Y II DEL CUCUMOVIRUS DEL MOSAICO DEL PEPINO Y SUS RNA SATÉLITES.

Atencio, F. A.<sup>1,3</sup>, O. Gracia<sup>1</sup>, R. Zandomeni<sup>2</sup>, O. Grau<sup>2</sup>.

1. *E.E.A. Mendoza - INTA. CC 3 (5507). Luján de Cuyo. Mendoza. Argentina.*

2. *CICA - INTA, CC 25 (1712). Castelar. Buenos Aires. Argentina.*

3. *Centro de Investigaciones Biológicas. CSIC. Velázquez 144. 28006 Madrid.*

Se analizaron muestras obtenidas en prospecciones de cultivos comerciales y experimentales de pimiento (*Capsicum annuum* L), en distritos de las provincias de Mendoza y Salta, que mostraban síntomas de enanismo, mosaico suave a severo, deformación y diseños necróticos en hojas y frutos.

El virus del mosaico del pepino (cucumber mosaic cucumovirus, CMV) fue identificado directamente en extractos de RNA de las muestras de campo por RT-PCR. Para distinguir los correspondientes subgrupos del virus, se analizaron los patrones de bandas obtenidos por digestión de los productos de amplificación con enzimas de restricción. Hubo coincidencia con los análisis serológicos con anticuerpos poli y monoclonales específicos para cada subgrupo, aunque estos fueron mucho menos sensibles que el sistema RT-PCR/enzimas de restricción.

Se encontraron muestras positivas para ambos subgrupos, pero no en infecciones mixtas, correspondiendo con una distribución geográfica, donde las pertenecientes al subgrupo I del virus fueron halladas en las áreas muestreadas al Norte (Salta) y las del II en muestras al Sur (Mendoza).

Algunas muestras fueron inoculadas mecánicamente en tabaco y pimiento, y fueron detectados RNAs satélites en extractos de RNA total por RT-PCR con iniciadores específicos. Los fragmentos de amplificación de satélites de aislamientos de cada zona fueron clonados, secuenciados y comparados con secuencias de satélites ya descritos, apareciendo, en ambos casos, un alto grado de similitud (>96%) con el satélite de CMV-Y.

## B1.9 VARIABILIDAD GENÉTICA DE LAS POBLACIONES NATURALES DEL VIRUS DEL RIZADO AMARILLO DEL TOMATE EN ESPAÑA: PERIODO 1992-1997.

Navas-Castillo, J.<sup>1</sup>, Sánchez-Campos, S.<sup>1</sup>, Díaz, J. A.<sup>1</sup>, Reina, J.<sup>2</sup>, Bejarano, E. R., Moriones, E.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Estación Experimental “La Mayora”, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, 29750 Algarrobo-Costa, Málaga.*

<sup>2</sup>*Departamento de Genética, Facultad de Ciencias, Universidad de Málaga, Málaga.*

El virus del rizado amarillo del tomate (TYLCV) es la causa de graves pérdidas económicas en los cultivos de tomate del sur peninsular español desde el año 1992 en que se describió por primera vez en España (Moriones y col., 1993). El control de las infecciones mediante prácticas culturales o mediante la reducción de las poblaciones de *Bemisia tabaci*, su vector natural, es muy difícil y poco efectivo. Por ello, la mejor opción para el control de TYLCV es el desarrollo de cultivares resistentes o tolerantes. Una de las principales limitaciones de las resistencias o tolerancias es su durabilidad en campo, dado que en muchas ocasiones son fácilmente superadas por tipos virales que pueden estar presentes en las poblaciones naturales y que se seleccionen como consecuencia de la presión que supone la introducción de los nuevos cultivares. La disponibilidad de datos acerca de la variabilidad natural del TYLCV puede aportar información acerca de la posible efectividad de la estrategia de resistencia/tolerancia escogida. En este sentido, hemos realizado un estudio de la variabilidad molecular entre aislados de TYLCV recogidos en las epidemias españolas desde el año 1992 hasta el año 1997. Se ha estudiado este aspecto en tres regiones del genoma con distinta funcionalidad y, por tanto, probablemente sometidas a diferentes presiones selectivas. Las regiones escogidas fueron la fase de lectura abierta de la proteína previa a la proteína de la cápsida (V1) y la de la proteína C2, como regiones bastante conservadas, así como la región intergénica, IR, como región variable. Se ha combinado el análisis del polimorfismo conformacional del DNA de cadena sencilla (*single strand conformation polymorphism*, SSCP) con la secuenciación directa para estos estudios. Los resultados indican un alto grado de conservación en la V1 y la C2, y una amplia variabilidad en la IR, que no afecta a los motivos conservados descritos en ella. El análisis de la variabilidad de la IR no permite identificar ninguna estructuración temporal ni espacial obvia de las poblaciones de TYLCV.

### LITERATURA CITADA

Moriones, E., Arnó, J., Accotto, G. P., Noris, E., and Cavallarin, L. 1993. First report of tomato yellow leaf curl virus in Spain. *Plant Dis.* 77:953.

## B1.10 UN NUEVO GEMINIVIRUS ENCONTRADO EN CUBA

Martínez Zubiaur, Y.<sup>1,2</sup>, de Blas, C.<sup>1</sup>, Quiñones, M.<sup>2</sup>, Castellanos, C.<sup>3</sup>, Peralta, E. L.<sup>2</sup>, Romero, J.<sup>1</sup>

1. *Departamento de Protección Vegetal, CIT-INIA, Autopista A-6, Km 7, 28040 Madrid.*
2. *Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria, Apartado 10, San José de Las Lajas, La Habana, Cuba.*
3. *Departamento de Mejora Genética Animal, CIT-INIA, Autopista A-6, Km 7, 28040 Madrid.*

Se ha detectado en Cuba un nuevo geminivirus bipartito que ha sido clonado y secuenciado. Consta de un DNA A (2620 nt) y un DNA B (2586 nt) cuya estructura genómica es semejante a la de los Begomovirus del Nuevo Mundo. Se comparó la secuencia con la de otros geminivirus, siendo el virus más relacionado el virus del moteado del tomate (TMoV) detectado en la cercana península de la Florida (EEUU), con una similitud del 81'9 % y 65'5% entre los DNAs A y B, respectivamente. La construcción de árboles filogenéticos con los alineamientos de las secuencias de los otros Begomovirus del Nuevo Mundo le situaron dentro del subgrupo del virus del mosaico del abutilon (AbMV) que incluye, además de TMoV y AbMV, a los virus del enanismo de la judía (BDMV), el mosaico dorado de la Sida (SGMV) y otro geminivirus encontrado en Cuba, el virus taíno del moteado del tomate (TTMoV). Los componentes genómicos A y B presentan una región común de 168 nt con un 95% de identidad. Se encontraron en esta región elementos típicos implicados en replicación y transcripción, aunque los iterones o elementos repetidos característicos del grupo no están conservados en los dos geminivirus cubanos. La confirmación de que los DNAs A y B secuenciados constituían los componentes del genoma viral, se obtuvo por agroinoculación. Estos datos muestran que el aislado cubano es un nuevo geminivirus para el cual se ha propuesto el nombre de virus del tomate de la Habana (HTV).



## **B1.11 INCIDENCIA DE LA ENFERMEDAD DEL MOSAICO DEL AVELLANO EN LAS PRINCIPALES ÁREAS DE CULTIVO DE CATALUÑA Y EFECTOS SOBRE LA PRODUCCIÓN.**

Aramburu de Vega J.<sup>1</sup> y Rovira Cambra M.<sup>2</sup>

1.- I.R.T.A. Departamento de Patología. Ctra. de Cabrils s/n 08348 Cabrils (Barcelona).

2.- I.R.T.A. Departamento de Arboricultura Mediterrania. Apartado 415, 43280 Reus (Tarragona).

La explotación comercial del avellano en España se encuentra localizada fundamentalmente en la provincia de Tarragona y su baja rendimiento ha provocado últimamente serios conflictos del sector con la Administración que han desembocado en la concesión de ayudas para el cultivo. Son varias las causas que pueden influir en la productividad de las plantaciones y entre ellas esta la enfermedad del mosaico del avellano causada por el "apple mosaic virus" (ApMV). En este trabajo se cuantifica cual es el efecto de esta virosis en la variedad 'Negret', mayoritariamente cultivada en Cataluña y se determina cual es el grado de difusión en las principales áreas de cultivo.

En 1989 se plantó una parcela con 128 de la variedad 'Negret' y 8 de la variedad 'Segorbe' utilizados como polinizadores. El año siguiente se eligieron al azar la mitad de los árboles y se injertaron con dos chapas de corteza de un avellano infectado. Durante los 8 años del ensayo se compararon distintos parámetros: vigor, producción y características de calidad de la avellana. También se determinó la posible difusión natural del virus en la parcela de ensayo desde los árboles infectados a los sanos y la incidencia en 160 parcelas de "Negret" de 14 municipios de las principales zonas de cultivo de Cataluña.

Los resultados de dicho ensayo demuestran que los árboles sanos llegan a producir casi un 80% más que los árboles infectados, debido fundamentalmente a que en estos últimos se produce una fuerte pérdida de avellanas después del cuajado. Durante el ensayo no se detectó infección natural de los árboles sanos; sin embargo, en la prospección realizada en las principales áreas de cultivo, todas las parcelas se encontraban infectadas con el virus. La razón es que tradicionalmente el avellano se ha multiplicado siempre por rebrotes y muy probablemente utilizando material infectado, ya que se trata de una enfermedad que pasa muy desapercibida por su sintomatología o que se ha atribuido a procesos carenciales. Estos resultados demuestran la necesidad de utilizar material certificado con garantías sanitarias para las nuevas plantaciones, lo que con toda seguridad garantizará mayores producciones durante muchos años dada la escasa o nula infección que cabe esperar a partir de las parcelas infectadas.

## **B1.12 HETEROGENEIDAD DEL VIROIDE DE LA EXOCORTIS DE LOS CITRICOS (CEVd).**

Gandía M., Palacio, A., Duran-Vila, N.

*Departamento de Protección Vegetal y Biotecnología. Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias. Apartado Oficial. 46113 Moncada. Valencia.*

La exocortis es una enfermedad que afecta a cualquier especie o variedad de cítricos injertada sobre un patrón sensible. Su agente causal es el CEVd, un viroide típico, con un rango de huéspedes amplio, y cuyo tamaño oscila entre 370 y 375 nucleótidos.

El análisis conformacional de DNA monocatenario (SSCP) ha permitido determinar la heterogeneidad del CEVd en aislados de distintas procedencias. Para ello se obtuvieron preparaciones de DNA con la secuencia completa del viroide mediante retrotranscripción y amplificación por PCR empleando una pareja de cebadores contiguos diseñados en base a la secuencia de la región central conservada: CEVd-1 (complementario a las bases 81-98) y CEVd-2 (homólogo a las bases 99-117), y se analizaron en distintas condiciones electroforéticas. Se observaron diferencias claras en las migraciones del hDNA o el cDNA que eran debidas a variaciones (intercambios, deleciones o adiciones) en la secuencia de nucleótidos.

El análisis de 311 clones obtenidos a partir de uno de los aislados, utilizando dos condiciones electroforéticas distintas para el análisis por SSCP y la secuenciación de los clones más representativos, ha permitido establecer la heterogeneidad existente dentro del aislado. Con ello se ha demostrado que los aislados de CEVd constan de poblaciones de viroides con individuos conservados (secuencias maestras) y un número variable de secuencias minoritarias. La variabilidad observada afecta todos los dominios estructurales de la molécula, excepto el bucle terminal izquierdo (TL) en el cual se ha postulado la existencia de un motivo conservado (TCR) en la hebra superior que probablemente tenga una función esencial en la replicación. La escasa variabilidad observada en la región central conservada (CCR) no afectaba la zona estrictamente conservada comprendida entre los nucleótidos 84-111 (CCR superior) y 267-292 (CCR inferior).

## B2.1 CARACTERIZACIÓN Y DIFERENCIACIÓN DE CEPAS DE *Pseudomonas syringae* PATOVARES *phaseolicola* Y *syringae* MEDIANTE RIBOTIPIFICACIÓN.

González Fernández, A.J.<sup>1</sup>; Landeras Rodríguez, E.<sup>2</sup>; Mendoza Fernández, M<sup>a</sup>.C.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Centro de Investigación Aplicada y Tecnología Agroalimentaria, Consejería de Agricultura, Principado de Asturias. Apdo 13, 33300, Villaviciosa, Asturias. E-mail: ciatavilla@princast.es.

<sup>2</sup> Area de Microbiología, Dpto. de Biología Funcional, Facultad de Medicina,. Universidad de Oviedo, Julián Clavería s/n, 33070 Oviedo.

Las bacterias que afectan mayoritariamente al cultivo de la judía en la zona norte de la Península Ibérica son *Pseudomonas syringae* pv *phaseolicola* (*Psp*) y *Pseudomonas syringae* pv *syringae* (*Pss*). Los métodos clásicos para la identificación de estos patógenos se basan en la expresión de diferentes caracteres fenotípicos siendo, en ocasiones, los resultados contradictorios o confusos. Por ello, cada vez es más frecuente la utilización de técnicas de biología molecular en la diferenciación y tipificación de cepas de diferentes géneros y especies.

En el presente estudio se valoró la utilidad de la ribotipificación, utilizando las endonucleasas de restricción *Bgl*II y *Sal*I, como marcador molecular en la tipificación de *Pseudomonas syringae* pv *phaseolicola* y pv *syringae*. Para ello, se analizó una serie de 60 cepas; 14 fueron aisladas en Asturias en el periodo 1990-1997, correspondiendo cinco a *Psp* y nueve a *Pss*; 43 procedentes de Castilla y León aisladas durante el año 1995; correspondiendo 38 a *Psp* y cinco a *Pss*; y tres *Psp* cedidas por el País Vasco y aisladas en 1996. Con *Bgl*II la serie total se diferenció en 11 ribotipos, dos correspondientes a cepas de *Psp* y nueve a cepas de *Pss*, con un bajo índice de discriminación (ID = 0,46). Utilizando *Sal*I se logró un poder de discriminación mayor (ID = 0,84), diferenciando un total de 14 ribotipos, seis en *Psp* y ocho en *Pss*. Ninguno de los ribotipos generados por cada enzima fue común a los dos patovares. La combinación de los resultados permitió aumentar el poder de discriminación (ID = 0,85) dividiendo la serie en 19 ribotipos combinados (RTCs). Los datos agrupados fueron utilizados para hacer un estudio de la relación filogenética entre RTCs, utilizando el índice de similitud de Dice, obteniéndose un dendrograma en el que las cepas de ambos patovares aparecen agrupadas en dos “clusters” diferentes y poco relacionados entre sí (24,7% de similitud).

La ribotipificación, tanto con *Sal*I como con *Bgl*II, permite diferenciar claramente las cepas de ambos patovares. El dendrograma resultante de la combinación de los resultados obtenidos con ambas enzimas muestra que las cepas pertenecientes a los dos patovares se encuentran genéticamente poco relacionadas y además, las cepas pertenecientes al patovar *syringae* presentan un alto grado de heterogeneidad.

## **B2.2 RESULTADOS PRELIMINARES DEL MAPA DE RIESGO CLIMÁTICO DE FUEGO BACTERIANO (*Erwinia amylovora*) EN ESPAÑA**

Llorente, I., Montesinos, E.

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

El fuego bacteriano es una de las enfermedades más graves que afectan a los frutales de pepita y especies de plantas ornamentales de la familia de las rosáceas en el mundo, ya que es altamente contagiosa, de difícil control una vez introducida en una zona, y ocasiona la muerte progresiva de los árboles de variedades sensibles, afectando a la producción y modificando la estructura varietal del sector frutícola e incrementando los costes de producción.

La enfermedad fue señalada por primera vez en 1780 en USA, extendiéndose posteriormente a otras zonas del país y Canadá y a otras partes del mundo. En Europa se detectó en Inglaterra en 1957 y desde entonces se ha extendido desde el sur y norte, como una pinza, hasta la franja de países antes considerados como libres, que incluye Austria, Suiza, Hungría, Italia y España. No ha sido descrita en zonas frutícolas del hemisferio sur como Sudáfrica, Argentina o Brasil, pero sí en Nueva Zelanda y Australia. En España, después de su detección en 1995 en el País Vasco, y a pesar de su progresión hacia Navarra, las grandes zonas frutícolas situadas en el valle del Ebro (La Rioja, Aragón, Cataluña) y otras importantes como Extremadura, Murcia y Valencia siguen siendo zonas libres de fuego bacteriano.

Dado que la gravedad del fuego bacteriano varía en función de las condiciones climáticas, abundancia de plantas huésped y su estado fenológico, y presencia de inóculo, conviene utilizar sistemas de evaluación de riesgo de la enfermedad que permiten guiar los tratamientos para el control de la enfermedad, realizar muestreos selectivos en los momentos y lugares de mayor riesgo, o confeccionar mapas de riesgo en base a datos fenoclimáticos históricos.

En la actualidad estamos elaborando un mapa de riesgo de fuego bacteriano basado en los parámetros climáticos de varias zonas frutícolas españolas (principalmente productoras de pera y manzana). Se utilizan los datos climáticos de varios años (5-10) procedentes de 100 estaciones meteorológicas de Cataluña, Aragón, La Rioja, Navarra y el País Vasco. Los niveles de riesgo se han obtenido a partir de los principales modelos existentes como el Sistema Revisado de Billing (SRB), Parefeu del INRA-MeteoFrance y Maryblyt de la Universidad de Maryland. Los parámetros climáticos básicos utilizados son la temperatura y pluviometría. Se exponen los resultados preliminares obtenidos en forma de isolíneas de riesgo.

## B2.3 ESTUDIO DE VARIABILIDAD DE CEPAS EPIFÍTICAS DE *Erwinia herbicola* MEDIANTE LA AMPLIFICACIÓN DE ELEMENTOS GENÉTICOS REPETITIVOS.

Rojas A., Reche P., Jiménez P., Alvarez F. y García de los Ríos J. E.

Unidad de Fitopatología. Facultad de CC Experimentales y Técnicas. Universidad San Pablo C.E.U. Carretera de Boadilla del Monte Km 5.3. Fax 3510496. E-mail: [jgarios@ceu.es](mailto:jgarios@ceu.es). Boadilla del Monte. 28668 MADRID.

En el género *Erwinia* hay quince especies clasificadas en el Bergey's Manual, de las que catorce son patógenas para diversas plantas y, concretamente *Erwinia herbicola* es una especie saprofita o epífita de una gran variedad de vegetales. De acuerdo con la última edición del Bergey's Manual, en esta especie se debe incluir cualquier bacteria epífita que cumpla los caracteres generales de *Erwinia* y no sea patógena.

Por otro lado, en Microbiología Clínica, a bacterias que tienen las mismas características bioquímicas que *Erwinia herbicola* se les denomina *Enterobacter agglomerans*.

En este trabajo se han comparado cepas de *Erwinia* aisladas a partir de tumores de varias plantas (*Olea europaea*, *Nerium oleander*, *Fraxinus angustifolia* y *Retama sphaerocarpa*), inducidos por *Pseudomonas syringae* subsp. *savastanoi*, bacterias obtenidas como epifitas en las mismas plantas y las cepas tipo *Erwinia herbicola* NCPPB 2971 y *Enterobacter agglomerans* ATTC 27155.

Todas las bacterias que eran caracterizadas como *Erwinia herbicola* por las pruebas de identificación clásicas, cuando se sometían a identificación por el Sistema Automático ATB de Biomerieux empleando galerías ID 32 E, resultaban ser *Enterobacter agglomerans*.

La comparación de los genomas de todas las cepas se hizo empleando secuencias espaciadoras entre ADN ribosómico, y secuencias ERIC, REP y BOX, aplicando PCR.

Los resultados de la amplificación de regiones espaciadoras, nos muestran que las dos cepas tipo empleadas pertenecen a un mismo grupo taxonómico, mientras que el resto de las cepas obtenidas de diversas plantas y localizaciones geográficas no pertenecen al mismo grupo citado y se distribuyen en nueve ribotipos. Aunque la disgregación de grupos es mayor en el caso de las secuencias repetitivas, los fenogramas muestran una tendencia agrupadora semejante a la que se consigue mediante la amplificación de regiones espaciadoras, independientemente del índice utilizado.

## B2.4 ANÁLISIS DE LA FLORA BACTERIANA ASOCIADA A TUMORES EN *Retama sphaerocarpa* Bss.

Alvarez, F., Jimenez, P., Reche, P., Rojas, A. y García de los Ríos, J.E.

Unidad de Fitopatología. Facultad de CC Experimentales y Técnicas. Universidad San Pablo CEU. Ctra. Boadilla del Monte Km 5,3. Fax 3510496. E-mail: falvdav@ceu.es. Boadilla del Monte. 28668. MADRID.

*Pseudomonas syringae* subsp. *savastanoi* es una bacteria patógena en retama (*Retama sphaerocarpa* Bss.) (García de los Ríos, 1989), en la que produce hipertrofia de los tejidos afectados, siendo perfectamente visibles las formaciones tumorales o tubérculos.

Este microorganismo raramente se aísla en cultivo puro a partir de los tumores, siendo frecuente que aparezca asociado a otras bacterias, que han sido caracterizadas como *Erwinia herbicola* (cepas amarillas y blancas) y *Xanthomonas* spp. Las poblaciones que conforman la ecología del tumor están sometidas a la presión de diferentes agentes ambientales, y son éstos los que directamente determinan el número y composición de dichas poblaciones microbianas. Estas poblaciones se desarrollan sobre un clima mediterráneo, con las características oscilaciones de temperatura y pluviosidad.

Las muestras fueron tomadas desde Noviembre de 1995 hasta Agosto de 1996, cada dos meses, en un retamar afectado de tuberculosis en el término municipal de Boadilla del Monte (Madrid). Se eligieron diez retamas infectadas, de cada una de ellas se obtenía un tumor joven, diferenciado por su color gris-verdoso. Los tumores, previamente pesados, fueron sometidos a un lavado con Cloruro de Benzalconio al 1/1000 durante 15 minutos, para eliminar la flora epifítica. A continuación fueron transferidos a un mortero estéril, siendo homogeneizados con 10 ml de solución fisiológica estéril. A partir de esta suspensión, se realizaron diluciones decimales y se incubaron utilizando Agar Métodos Standart y Agar Nutritivo suplementado con antibióticos. Las placas fueron incubadas a 28°C durante 72 horas.

En el presente trabajo se muestra qué factores ambientales tienen mayor influencia sobre la evolución de las poblaciones. Del mismo modo, se trata de establecer un modelo matemático que explique la dinámica poblacional y el grado de influencia de dichos factores ambientales.

## B2.5 DETECCIÓN EN ESPAÑA DE *Ralstonia (Pseudomonas) solanacearum* CAUSANTE DE PODREDUMBRE Y MARCHITEZ EN PATATA

M. M. López<sup>1</sup>, B. Vicedo<sup>1</sup>, B.Lastra<sup>1</sup>, P. Llop<sup>1</sup>, P Caruso<sup>1</sup>, C. Morente<sup>1</sup>, A.I. Espino<sup>2</sup>, P. Rodríguez<sup>2</sup>, J.L. Palomo<sup>3</sup>, P. García<sup>3</sup>, M. Roselló<sup>4</sup>, J. Collar<sup>5</sup>.

1. Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias. Apartado Oficial, 46113 Montcada (València).
2. Servicio de Sanidad Vegetal. Apartado 60, La Laguna.
3. Centro Regional de Diagnóstico. Apartado 61, 37080 Salamanca.
4. Servei de Certificació i Sanitat Vegetal. Apartado 125, 46460 Silla (València).
5. Laboratorio Agrario y Fitopatológico. Apartado 10, 15080 Mabegondo (A Coruña).

*Ralstonia (Pseudomonas) solanacearum* es una bacteria de cuarentena en la Unión Europea, que causa podredumbre de tubérculos y marchitez de plantas en patata. En los últimos cinco años se han identificado focos de esta enfermedad en distintos países europeos y se ha convertido en uno de los principales peligros para dicho cultivo. Los países mediterráneos, con condiciones favorables para el desarrollo de la enfermedad, son los más amenazados.

Por ello, en distintas comunidades autónomas se iniciaron programas para la detección de *R. solanacearum* en patata de siembra y de consumo siguiendo la metodología oficial. En Canarias, Castilla y León, Galicia y Comunitat Valenciana se han analizado más de dos mil muestras en 1996 y 1997 que correspondieron a más de cuatrocientos mil tubérculos. Se identificaron focos de *R. solanacearum* en La Palma (Canarias) en distintas parcelas de la zona noroeste de la isla donde radica el cultivo de la patata. Los análisis realizados no han detectado la enfermedad en ninguna otra isla de Canarias. En Castilla y León se identificaron focos en Burgos, Soria y Segovia en patata de siembra y de consumo. En Galicia se identificaron dos muestras positivas de patata para pienso procedentes de Castilla y León. Todos los aislados obtenidos en los distintos focos fueron de la raza 3, biovar 2A. En la Comunitat Valenciana, los análisis de lotes de tubérculos y de plantas no han permitido localizar ningún foco de la enfermedad.

Los orígenes de dichos focos podrían estar relacionados con la plantación de patata con infecciones latentes y procedentes de otros países. Los análisis de agua realizados en las comunidades autónomas donde se detectaron focos, no han identificado *R. solanacearum* en agua de riego en ningún caso. Se están aplicando las medidas aconsejadas para erradicar la enfermedad en las distintas zonas.

En las prospecciones oficiales de la producción nacional realizadas en 1998 no se ha detectado ningún foco de dicha bacteria en la península ni en Baleares pero sí en La Palma.

## B2.6 INCIDENCIA Y EPIDEMIOLOGÍA DE DIFERENTES FITOPLASMAS DE LA VIÑA EN EL NORDESTE ESPAÑOL

Laviña, A., Batlle, A., Martínez, M.A.

IRTA, Departament de Patologia Vegetal. 08348 Cabrils. Barcelona.

Diferentes enfermedades causadas por fitoplasmas han sido descritas en viña. De todas ellas son la *Flavescencia dorada* (*FD*) y el *Bois Noir* (*BN*) las más frecuentes y las que causan mayores daños. La *FD* es transmitida por *Scaphoideus titanus* Ball. no habiendo sido demostrada la transmisión por otros vectores hasta el momento. *FD* es un fitoplasma que afecta exclusivamente a la viña. *BN* esta causada por un fitoplasma estrechamente relacionado con el stolbur y que afecta a numerosas especies herbáceas, hortícolas y leñosas. Varios vectores han sido descritos como transmisores de este, pero solo *Hyalestes obsoletus* Sign. ha sido citado como transmisor del *BN* en viña.

Desde 1994 se han realizado en el nordeste español varias prospecciones en este cultivo con el fin de estudiar la presencia de estos patógenos. En una de las parcelas afectadas por *BN* en el Alt Camp en Cataluña se realizó un seguimiento de la enfermedad durante cuatro años. Este último año se ha iniciado un estudio epidemiológico del *BN* para determinar los posibles vectores y las plantas huéspedes que actúan como reservorio en las diferentes zonas. La detección de *FD* y *BN* en insectos y plantas se ha realizado mediante la técnica de la PCR utilizando los iniciadores específicos STOL11f/r y FD9f/r; también se ha realizado un nested-PCR con los iniciadores universales P1/P7 y fU5/rU3.

En las prospecciones realizadas en 1994 y 1995 únicamente se identificó el fitoplasma del *BN* tanto en parcelas de Cataluña como de Navarra. En la prospección realizada en 1996 se identificó por primera vez la *FD* en diversas parcelas de l'Alt Empordà (Girona).

La incidencia de plantas enfermas en 25 parcelas afectadas de *BN* osciló entre un 3% en una de Cataluña hasta un 60% en una de Navarra. El estudio epidemiológico señaló un incremento de la incidencia que fue desde un 3,4% de plantas enfermas el primer año hasta un 18% el último. La alta incidencia en la parcela de Navarra hizo sospechar la presencia de vectores más eficientes en esta área. La incidencia de *FD* fue alta llegando a encontrarse parcelas con un 90% de plantas afectadas.

Se han identificado diferentes especies de cicadélidos (*Macrostelus fosficula*, *Psamotettix maritimus*, *Peragallia sinuata*, *Zyginidia scutellaris*...) portadoras del fitoplasma del *BN*, así como distintas especies vegetales positivas (*Convolvulus arvensis*, *Polygonum convolvulus*, *Lavandula officinalis*, *Thymus officinalis*...). El vector de la *FD* *Scaphoideus titanus* se encontró en todas las parcelas muestreadas de Cataluña, mientras que *Hyalestes obsoletus* vector del *BN* no ha sido identificado.



## **B2.7 EPIDEMIOLOGÍA DE *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*, BACTERIA CAUSANTE DE LA PODREDUMBRE ANULAR DE LA PATATA, EN CASTILLA Y LEÓN.**

Palomo Gómez, J. L.; García Benavides, P.

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

*Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*, responsable de la podredumbre anular de la patata, es un patógeno de cuarentena contemplado en la Directiva 77/93/CEE, que causa importantes daños en la producción de patata de siembra en Estados Unidos y Canadá. La Directiva 93/85/CEE establece las medidas de erradicación en caso de aparición de la enfermedad, no permitiéndose el cultivo de patata durante 3 años, y debiéndose eliminar las plantas espontáneas que sean posibles hospedadoras. Existen pocos trabajos sobre epidemiología de *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*, lo que justifica un estudio sobre la supervivencia de la bacteria en nuestras condiciones ambientales.

La experiencia se ha efectuado durante 3 años en un terreno naturalmente infectado en Alcazarén (Valladolid), estableciéndose un diseño en bloques al azar, con 25 parcelas de 30 m<sup>2</sup>, correspondientes a 5 tratamientos con 5 repeticiones. En 3 de ellos se cultivaron las siguientes variedades de patata: Monalisa (cultivo anterior), Kennebec (sensible), Desiree (tolerante). Se incluyó un tratamiento con remolacha azucarera, como posible hospedador; y un testigo, con vegetación espontánea. Durante el período de cultivo se observaron posibles síntomas y se tomaron muestras de patata, remolacha, vegetación espontánea y rebrotes de patata del cultivo anterior, que se analizaron por inmunofluorescencia indirecta. Durante los dos primeros años se han analizado un total de 512 muestras.

Sólo se detectó la presencia de la bacteria durante el primer año, en rebrotes de patata, y tras la recolección, en parcelas correspondientes a la variedad Monalisa. En las parcelas restantes, tanto de patata como de remolacha, los resultados fueron negativos. Tampoco se detectó la bacteria en ninguna de las plantas espontáneas analizadas. Durante el segundo año todas las muestras analizadas dieron resultado negativo.

Estos resultados confirman la permanencia del inóculo en el suelo al menos durante un año, disminuyendo a partir del segundo año hasta límites indetectables, lo que hace suponer que va a extinción. El período de cuarentena de 3 años establecido por la legislación debería ser suficiente para la erradicación de la enfermedad, en nuestras condiciones ambientales. No se ha podido confirmar que la remolacha azucarera o alguna de las plantas espontáneas estudiadas puedan actuar como hospedadores. Los rebrotes de patata infectados en el cultivo anterior constituyen un importante reservorio del inóculo. Monalisa fue la variedad que mostró mayor sensibilidad.

## B2.8 ENFERMEDADES CAUSADAS POR FITOPLASMAS EN VID EN ESPAÑA

Abad P.<sup>1</sup>, Dally E.L.<sup>2</sup>, Font I.<sup>1</sup>, Pastor S.<sup>1</sup>, Davis R.E.<sup>2</sup> y Jordá C.<sup>1</sup>

1. *Producción Vegetal. Patología Vegetal. Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos. Universidad Politécnica. Camino de Vera nº14. 46022 - Valencia.*

2. *USDA. A.R.S. Molecular Plant Pathology Laboratory. Beltsville. Maryland 20705*

Los amarilleamientos de la vid, entre los que se incluyen la Flavescencia Dorada (FD) y el "Bois Noir" (BN), son un grupo de enfermedades causadas por fitoplasmas. Para conocer la etiología y epidemiología de estas enfermedades es necesaria la identificación precisa de estos agentes patógenos, ya que la sintomatología es muy parecida en todas ellas. Su importancia ha aumentado considerablemente en nuestro país debido a la presencia de dos enfermedades de este grupo. Por primera vez, en Cataluña se localizaron parcelas afectadas por BN en las comarcas del Alt Camp y Penedès (Batlle et al., 1995) y por FD en viñas muy próximas a la frontera francesa en el Alt Empordà (Giralt et al., 1996).

Los síntomas más característicos de estas enfermedades son el amarilleamiento y/o enrojecimiento de las hojas con enrollamiento hacia el envés; sobreposición de hojas; los racimos no se forman o bien se secan; agostamiento de los brotes y aspecto "llorón" de las cepas.

Durante el pasado año, los Servicios de Protección de Vegetales de diversas comunidades autónomas enviaron a nuestro laboratorio plantas de vid con síntomas posiblemente causados por fitoplasmas. Se realizó una extracción de ADN total a partir de 2 g de hojas con síntomas. Para la amplificación de secuencias 16S del ADNr mediante "nested" PCR se han empleado diversas parejas de cebadores universales para fitoplasmas (R16mF2/R1, R16mF2n/R2 y P1/P7). Los productos de amplificación se han digerido con diversas endonucleasas de restricción (*AluI*, *BfaI*, *DdeI*, *EcoRII*, *HaeIII*, *HpaI*, *HpaII*, *KpnI*, *MseI*, *RsaI*, *TaqI* y *ThaI*). Los resultados del análisis RFLP identifican fitoplasmas FD (grupo 16SrV) en muestras procedentes de Cataluña y Rioja. En viñas originales de Canarias, Cataluña, Rioja y Valencia se diagnostican fitoplasmas del grupo Stolbur (16SrXII), estando estas plantas afectadas por la enfermedad BN.

Todas las variedades de vid son sensibles a estas enfermedades. Debido a la gravedad sobretodo de la FD, los organismos autónomos competentes están aplicando las medidas oportunas (control del material vegetal de plantación, lucha contra los insectos vectores y destrucción de las cepas afectadas) para evitar la propagación de estas enfermedades

### B3.1 AUMENTO DE LA INCIDENCIA DE FUSARIOSIS EN LOS ÚLTIMOS 5 AÑOS EN “DAMPING-OFF” DE ESPECIES FORESTALES.

Soldevilla Puga, C.

E.U.I. Téc. Forestal. (U.P.M.). U.D. de Zoología y Patología Forestal. C/Ramiro de Maeztu s/n. 28040 Madrid. e-mail: soldevilla @ forestales.upm.es

El *Damping-off*, es la enfermedad fúngica más importante en los viveros y semilleros forestales. La enfermedad presenta varias fases, dependiendo de la edad de la plántula: *Damping-off* de pre-emergencia, antes de emerger la plántula del sustrato, lo que se conoce como marras de nascencia de origen fúngico, *Damping-off* de post-emergencia, entre 0 y 3 meses, antes del endurecimiento de las células corticales del fuste, presentando decoloraciones en parte aérea, resquebrajamiento de la corteza, necrosis en cuello radicular y caída del cormo en el sustrato. *Damping-off* tardío, a partir de 3 meses y menos de 2 años, desarrollando marchitez y decoloración foliar de lento desarrollo en zonas aéreas apicales, confundible con síntomas de heladas.

Entre los agentes patógenos más veces aislados en España que forman parte de este complejo fitopatológico, se han detectado:

*Phytophthora parasitica*, *Pythium ultimum*, *Rhizoctonia solani*, *Fusarium oxysporum*, *Botrytis cinerea*, *Alternaria alternata*, *Fusarium moniliforme*, *F. solani*, *Cylindrocarpon destructans*, *Aureobasidium pullulans*.

Debido al cambio en las instalaciones, de viveros volantes a instalaciones permanentes, el cambio de producción, de raíz desnuda a contenedor, el cambio de sustrato, de suelo natural a turba o el empleo de invernaderos que producen dos o tres cosechas al año, se ha producido un cambio en los agentes fúngicos. Si hace 15 años los problemas más habituales estaban asociados a hongos Mastigomycotina pertenecientes a las *Pythiaceae* como *Phytophthora parasitica*, actualmente son hongos Deuteromycotina pertenecientes a las *Moniliaceae* como *Botrytis cinerea* o a las *Tuberculariaceae* como *Fusarium moniliforme*.

A través de las consultas que se realizan en el Consultorio de Fitopatología Forestal con sede en la U.D. de Zoología y Patología Forestal (E.U.I.T.Forestal), se ha comprobado que los agentes fúngicos que actúan con mayor frecuencia actualmente son:

|                                     |         |                                  |         |
|-------------------------------------|---------|----------------------------------|---------|
| <i>Fusarium moniliforme</i> :       | 42.18 % | <i>Fusarium oxysporum</i> :      | 23.02 % |
| <i>Cylindrocarpon destructans</i> : | 17.77 % | <i>Alternaria alternata</i> :    | 7.66 %  |
| <i>Fusarium roseum</i> :            | 3.69 %  | <i>Fusarium solani</i> :         | 3.01 %  |
| <i>Botrytis cinerea</i> :           | 0.90 %  | <i>Aureobasidium pullulans</i> : | 0.86 %  |

### B3.2 DESARROLLO DE *Pythium aphanidermatum*, *P. deliense*, *P. irregulare* y *P. ultimum* EN FUNCIÓN DE LA TEMPERATURA.

Rodríguez García, E , Sinobas Alonso, J.

*E.U.I.T. Agrícola. Universidad Politécnica de Madrid.*

Las especies de *Pythium* estudiadas se aislaron de muestras de suelos de 6 invernaderos representativos de la zona de Villa del Prado (Madrid) y se identificaron de acuerdo con los criterios expresados por Van der Plaats-Niterink (1981). Las especies aisladas más frecuentemente fueron *Pythium aphanidermatum*, *P. deliense*, *P. irregulare* y *P. ultimum*.

Se estudió el desarrollo de cuatro aislados de cada una de las especies a distintas temperaturas sobre medio agarizado durante 24 horas. Los aislados de *P. aphanidermatum* alcanzaron el máximo desarrollo entre 30 y 35°C, con una media de 75 mm.; entre 20 y 40°C alcanzaron una media de 40 mm. y entre 10 y 42°C no se observó crecimiento. El desarrollo de los aislados de *P. deliense* fue muy similar a los de *P. aphanidermatum*. Los aislados de *P. irregulare* alcanzaron el máximo desarrollo entre 25 y 30°C, con una media de 45 mm.; entre 20 y 32°C alcanzaron un desarrollo medio de 27 mm. y entre 10 y 35°C el desarrollo fue muy bajo. Los aislados de *P. ultimum* alcanzaron también el máximo desarrollo entre 25 y 30°C, con una media de 4 mm., algo inferior a la de *P. irregulare*. Otra diferencia apreciable entre *P. irregulare* y *P. ultimum* es que en este último, a 10°C, no se observa crecimiento.

La exposición a la temperatura de 38°C durante 24 horas fue letal para *P. ultimum* y durante 48 horas para *P. irregulare*. La exposición a 45°C durante 24 horas fue letal para *P. aphanidermatum* y *P. deliense*. La mínima temperatura experimental de 3°C no fue letal durante 72 horas de exposición para ninguno de los aislados

### B3.3 SUPERVIVENCIA DE *Botrytis cinerea* EN LOS INVERNADEROS DE ALMERIA

Raposo, R.<sup>1</sup>, Urrutia, T.<sup>2</sup>, Gómez, V.<sup>2</sup>, Melgarejo, P.<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>. Dept. Protección Vegetal, CIT-INIA, C. Coruña km.7. 28040 Madrid.

<sup>2</sup>. Laboratorio de Sanidad Vegetal, La Mojonera, 04004 Almería.

La enfermedad de la podredumbre gris, causada por *Botrytis cinerea*, ocurre frecuentemente en los cultivos de los invernaderos de Almería, donde causa importantes pérdidas. Todas las hortalizas de invierno son susceptibles de ser atacadas por este patógeno, que se controla fundamentalmente por métodos químicos. Los daños mayores se producen en el período de Noviembre a Marzo, cuando las condiciones ambientales son adecuadas. Los restos de cosecha infectados que quedan en el interior del invernadero y los que se apilan en el exterior pueden resultar un medio eficaz para la supervivencia y dispersión del hongo. Sin embargo, se desconoce exactamente cuál es la supervivencia de cada una de las posibles fuentes de inóculo (conidias, micelio, esclerocios) durante la fase saprofítica en las condiciones estivales y si la capacidad de supervivencia está relacionada con la resistencia a benzimidazoles y dicarboximidas, dos grupos de fungicidas empleados comúnmente para controlar la enfermedad de la podredumbre gris y para los que *B. cinerea* ha desarrollado resistencia. Se desconoce también si tiene lugar la reproducción sexual (aunque se han encontrado aislados con los dos grupos de apareamiento) y cuál es el posible papel en la supervivencia y diseminación.

En 1995 y 1997, desde Junio hasta el comienzo de la enfermedad en la cosecha siguiente, se colocaron en el interior y exterior del invernadero esclerocios y trozos de tallo inoculados artificialmente. Se muestrearon periódicamente para comprobar su viabilidad y su patogenicidad. Paralelamente, se realizó un experimento *in vitro* para comprobar la supervivencia a temperaturas controladas (7, 22, 30, 35 y 40 °C). En este ensayo se utilizó material inoculado artificial y naturalmente.

Los resultados demuestran que *B. cinerea* sobrevive tanto en el interior como en el exterior hasta la siguiente cosecha, aunque la supervivencia es mayor en el exterior del invernadero. Catorce aislados de 22 sobrevivieron después de 3 días a 40°C y todos ellos sobrevivieron 7 días a 30 o 35°C. Además, se ha detectado durante los dos años estudiados una correlación (según el coeficiente de rangos de Spearman) entre la resistencia a dicarboximidas (medida por la CE<sub>50</sub>) y la supervivencia de los esclerocios.

Los restos vegetales infectados se inspeccionaron periódicamente en condiciones de invernadero y colocados a temperatura controlada, para observar la posible formación de esclerocios y de apotecios. No se encontró ninguna estructura semejante a la descrita para los miembros de la familia *Sclerotiniaceae*. Tampoco se detectaron en las partes de la planta infectada, durante la fase de infección.

### B3.4 UN MODELO PARA LA ESTIMACIÓN DE LA MADURACIÓN DE LAS ASCOSPORAS DE *Pleospora allii* EN PERAL (f. con. *Stemphylium vesicarium*)

Llorente, I., Solà, X., Montesinos, E.

*Institut de Tecnologia Agroalimentària - Universitat de Girona. Avda Lluís Santaló s/n. 17071 Girona. E-mail: Llorente@intea.udg.es; Emonte@intea.udg.es*

La estemfiliosis del peral es una enfermedad fúngica causada por *Stemphylium vesicarium* cuyos síntomas se caracterizan por manchas necróticas en hojas y frutos. En años favorables la enfermedad puede provocar pérdidas de producción muy elevadas. Actualmente la estrategia de control de la enfermedad se basa en el control químico de la fase asexual del hongo (*S. vesicarium*) que es el agente causante de la enfermedad durante el período vegetativo del peral. No obstante la forma invernal corresponde a la fase sexual como *Pleospora allii* que forma pseudotecios en hojas y frutos que quedan en la plantación. En estos pseudotecios se forman las ascas y posteriormente las ascosporas, que al madurar y ser liberadas constituirán el inóculo primario de la enfermedad a partir del cual se iniciará el siguiente ciclo de la enfermedad. Una estrategia de control de la estemfiliosis podría estar dirigida a reducir el inóculo primario.

Durante los años 1996 y 1997 se realizaron ensayos en condiciones controladas para determinar la importancia de la humedad relativa y la temperatura en la evolución de la maduración de las ascas y ascosporas. Se obtuvieron pseudotecios de *P. alli* en placas petri con medio V8. Se colocaron en incubadores a las temperaturas de 5, 10, 15, 20, 25 y 30 °C y con humedades relativas del 60 % o superiores al 98 %. Periódicamente se analizaba el estado de madurez de las diferentes muestras. Paralelamente, durante los meses de octubre a mayo, se incubaron hojas de peral con pseudotecios de *P. alli* en condiciones naturales. Estas hojas provenían de fincas que habían presentado niveles elevados de estemfiliosis durante el período vegetativo anterior. De manera sistemática se analizaba el estado de madurez de las ascas y ascósporas en estas muestras.

Se observó que solamente se producía maduración de las ascas y ascosporas cuando la humedad relativa era superior al 98 %. También se determinó el efecto de la temperatura en la velocidad de maduración ajustando los datos experimentales mediante un modelo monomolecular. Finalmente se obtuvo una ecuación matemática, basada en la forma lineal de Gompertz, que relaciona el porcentaje de ascosporas maduras con los grados-día acumulados. Se validó posteriormente este modelo de predicción de maduración de las ascosporas comparando los niveles de maduración observados en el material incubado en fincas comerciales con los niveles predichos por el modelo a las temperaturas observadas en campo.

### B3.5 CARACTERIZACIÓN DE SÍNTOMAS Y DESARROLLO EPIDEMIOLÓGICO DE LA ANTRACNOSIS EN FRESA EN EL S.O. DE ANDALUCÍA.

de los Santos García de Paredes, B., Romero Muñoz, F.

*Centro de Investigación y Formación Agraria "Las Torres-Tomejil". Apdo Oficial 41200. Alcalá del Río. Sevilla.*

La antracnosis de la fresa es una enfermedad que puede afectar a la totalidad de la planta. Está originada por hongos del género *Colletotrichum*, habiendo sido detectada en la provincia de Huelva en 1991.

El estudio de la sintomatología e influencia medioambiental sobre el desarrollo de las distintas fases de la antracnosis, se llevó a cabo mediante ensayos en ambiente controlado y experiencias de campo, estas últimas realizadas durante tres años consecutivos en la finca "El Cebollar", situada en Moguer (Huelva). El diseño experimental fue de bloques al azar con cuatro repeticiones. Se utilizaron plantas frescas del cultivar "Oso Grande". Se inocularon artificialmente en suspensión de conidias ( $10^4$  conidias/ml) de *Colletotrichum acutatum*, trasladándose, posteriormente, a cámara frigorífica (2°C) durante siete días hasta plantación. Se dispuso de plantas testigo que sufrieron inmersión en agua y que se mantuvieron en las mismas condiciones. Los datos meteorológicos fueron suministrados por el Centro Meteorológico de Andalucía Occidental. En ambiente controlado se estudió la inducción de síntomas mediante distintos tipos de inoculación en diferentes partes de la planta.

Los síntomas que caracterizaron a la enfermedad: podredumbre de corona, iniciándose, generalmente, en la inserción de estolones; marchitez de flores y podredumbre de frutos, en diferentes estados de maduración; así como necrosis en estolones y peciolo, obtenidas en ambiente controlado, coinciden con los descritos por otros autores. Se han apreciado manchas necróticas en hojas y decoloración del cortex de las raíces que no responden a la sintomatología característica de esta enfermedad.

El desarrollo temprano de antracnosis en su fase de podredumbre de corona, que origina las mayores pérdidas de planta, se ve favorecido por la ocurrencia de precipitaciones inmediatamente posteriores a la plantación, cuando están acompañadas por temperaturas superiores a 20°C. La mayor incidencia de podredumbres de fruto se produce durante períodos de lluvia seguidos de aumento de las temperaturas.

### B3.6 INFLUENCIA DE LOS FACTORES AMBIENTALES SOBRE LA CONCENTRACIÓN DE ESPORAS EN EL AIRE DE *Stemphylium vesicarium* Y SU TELEOMORFO.

Basallote Ureba, M.J.<sup>1</sup>, Prados Ligeró, A.M.<sup>2</sup>, Melero Vara, J.M.<sup>3</sup>

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

2. Centro de Investigación y Desarrollo Agrario "Alameda del Obispo". Consejería de Agricultura y Pesca. Junta de Andalucía. Apdo. 3092. 14080 Córdoba.

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

Las manchas foliares de ajo y cebolla, ocasionadas por *S. vesicarium*, producen la seca prematura de plantas y, consecuentemente, importantes reducciones de rendimientos. La lucha contra la enfermedad se lleva a cabo, fundamentalmente mediante tratamientos fungicidas desde principios de marzo a finales de mayo. Nuestras observaciones en campo nos indican que el desarrollo de las epidemias de manchas foliares está muy influido por las condiciones ambientales. El objetivo de nuestro trabajo ha sido determinar qué factores meteorológicos están asociados con la producción y la liberación de esporas en el aire, a fin de poder diseñar estrategias más adecuadas de control.

Durante 1992-96, se dispusieron restos de hojas de ajo infectadas por *S. vesicarium* en la superficie de una parcela situadas en Córdoba. En su proximidad, se sembró una parcela trampa de ajo en la que se colocó un capturador volumétrico de esporas que permitió el registro horario de las concentraciones de conidias del patógeno y de ascosporas de su teleomorfo, *Pleospora allii*. También se registraron horariamente temperatura, humedad relativa, pluviometría y déficit de presión de vapor (DPV). Las observaciones de síntomas en las parcelas trampa se llevaron a cabo desde el momento de aparición de las primeras lesiones hasta la recolección del cultivo.

La concentración de conidias en el aire mostró una marcada periodicidad diurna, con altas capturas entre las 12 y las 18 h y bajas entre las 22 y las 6 h Sin embargo, las capturas de ascosporas no se ajustaron a ninguna periodicidad. Las mayores concentraciones de conidias en el aire se registraron de finales de abril a principios de junio, con máximos en mayo. Las condiciones ambientales preponderantes en los periodos de liberación de conidias fueron temperaturas máximas de 19-25 C, humedad relativa por encima del 95%, precipitaciones en los días precedentes y DPV fluctuante entre 5 y 20 mb. Por otro lado, las mayores descargas de ascosporas se registraron de febrero a abril y, estuvieron relacionadas con lluvia, y temperaturas medias diarias de 7-17 C. Los primeros síntomas en las plantas de las parcelas trampa fueron precedidos de pequeñas capturas de esporas, mientras que la fase explosiva de la enfermedad siempre tuvo lugar en los máximos picos de capturas durante el mes de mayo.



### **B3.7 INFLUENCIA DE FACTORES AMBIENTALES EN EL DESARROLLO DE PSEUDOTECAS DE *Pleospora allii* EN HOJAS DE AJO INFECTADAS POR *Stemphylium vesicarium*.**

Prados Ligeró, A.M.<sup>1</sup>, Melero Vara, J.M.<sup>2</sup>, Basallote Ureba, M.J.<sup>3</sup>

1. Centro de Investigación y Formación Agraria "Alameda del Obispo". Consejería de Agricultura y Pesca. Junta de Andalucía. Apdo. 3092, 14080 Córdoba.

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

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

Las pseudotecas de *P. allii*, teleomorfo de *S. vesicarium*, desarrolladas durante el invierno en los restos de cosecha de ajo infectados, constituyen una importante fuente de inóculo primario en las epidemias de Manchas foliares. Esto nos ha llevado a estudiar el desarrollo de pseudotecas en ambiente controlado, en función de la temperatura y la humedad relativa (HR) de incubación.

Hojas de ajo naturalmente infectadas por *S. vesicarium* fueron recolectadas e incubadas a 5, 10, 15 y 20 °C en contenedores herméticos con HR 35, 75, 80, 86, 88, 96, 98 y 100%. Se realizaron muestreos cada 15 días durante un periodo de 3 meses para determinar el estado fenológico de las pseudotecas de *P. allii* según una escala de maduración previamente establecida, que permitió el cálculo, para cada muestreo temporal, de los índices de maduración de pseudotecas para los distintos tratamientos.

A HR < 96% no se observaron pseudotecas en hojas de ajo infectadas, independientemente de las temperaturas de incubación. El número de pseudotecas formadas fue mayor cuando éstas se incubaron a 5 ó 10 °C y con HR del 100%. Se mostró interacción entre temperatura y HR de incubación. A 5 °C, el número de pseudotecas formadas se incrementaba linealmente con el aumento de HR de incubación, mientras que fue similar para las hojas incubadas a 10 °C y HR de 96, 98 y 100%. El número de pseudotecas formadas a 15 y 20 °C fue nulo o muy bajo cuando la HR fue de 96 ó 98%. La incubación de las hojas a HR de 96 ó 98%, y a cualquiera de las temperaturas estudiadas, resultó en la formación sólo de pseudotecas inmaduras o degeneradas, mientras que todas las que se formaban con HR del 100% llegaban a alcanzar la maduración a los 45-75 días, dependiendo de la temperatura de incubación. A humedad de saturación, los porcentajes mayores de pseudotecas maduras se obtuvieron a bajas temperaturas (5 ó 10 °C), si bien degeneraban tras alcanzar la madurez. Por el contrario, la incubación a 15 ó 20 °C ocasionó la degeneración de las pseudotecas antes de que llegaran a madurar.

### B3.8 ENFERMEDADES FOLIARES DE LA REMOLACHA AZUCARERA CAUSADAS POR *Erysiphe betae* Y *Cercospora beticola* EN ANDALUCÍA DURANTE 1996 Y 1997.

Cabrera de la Colina, J., López Garrido, F. J., Campos Gallego, J A y Serrano Ruiz, M.

*E.U.I.T.A. Departamento de Producción Vegetal y Tecnología Agraria. Universidad de Castilla-La Mancha. Ronda de Calatrava s/n. Ciudad Real.*

Andalucía con el 40% de la superficie cultivada es la segunda región en importancia en el cultivo de remolacha azucarera (*Beta vulgaris*). Las enfermedades foliares que más afectan a este cultivo en otras regiones españolas como Castilla y León y Castilla-La Mancha son el oidio (*Erysiphe betae*) y las necrosis foliares causadas por *Cercospora beticola*, suponiendo su control gastos medios de 40.000 pts /ha (Ayala J. y Bermejo J. L., 1994).

En este trabajo se presentan los resultados obtenidos acerca de la distribución, incidencia y severidad de ambas enfermedades en la comunidad andaluza durante el bienio 1996-1997. Entre los meses de abril a junio de ambos años, se realizaron prospecciones fitopatológicas en parcelas de secano y de regadío de las provincias de Córdoba, Sevilla y Cádiz. Para cada fecha y parcela se evaluó el porcentaje de plantas con síntomas de cada enfermedad y la severidad de los mismos, según una escala que para oidio fue 1-5 (1: planta sin síntomas; 5: hoja con el 100% de la superficie foliar cubierta de micelio fúngico), y en el caso de cercosporiosis se utilizó la escala de severidad KWS comprendida entre los valores 1-9.

Ambas enfermedades tuvieron una amplia distribución durante ambos años, encontrándose en el 90% de las parcelas muestreadas, alcanzando en algunas fechas valores medios de incidencia del 63% para oidio y del 41% para *C. beticola*. Las medias de la incidencia y severidad se presenta en la siguiente tabla:

Media de la incidencia y severidad de las infecciones causadas por *E. betae* y *C. beticola* en Andalucía durante 1996-1997\*

|            | <i>C. beticola</i> |        | <i>E. betae</i> |        |
|------------|--------------------|--------|-----------------|--------|
|            | 1996               | 1997   | 1996            | 1997   |
| Incidencia | 25,6 a             | 13,3 b | 43,3 a          | 44,8 a |
| Severidad  | 1,5 x              | 1,2 y  | 1,6 x           | 1,5 y  |

\* Para cada fila y agente patógeno valores seguidos de letras diferentes difieren significativamente al nivel de probabilidad del 95%

Las distintas condiciones climáticas de ambos años influyeron en la menor importancia de estas enfermedades durante 1997. Del mismo modo se pudo comprobar una mayor incidencia y severidad de ambas enfermedades en las parcelas de regadío frente a las de secano.

### **B3.9 DISTRIBUCIÓN DE LA PODREDUMBRE RADICULAR PRODUCIDA POR *Phytophthora cinnamomi* Rands EN LOS CULTIVOS DE AGUACATE DE TENERIFE.**

*Hernández Hernández, E., Siverio de la Rosa, F. y Gallo Llobet, L.*

Departamento de Protección Vegetal, Instituto Canario de Investigaciones Agrarias, Apartado 60, 38200 La Laguna, Tenerife, Islas Canarias.

El aguacate es el segundo cultivo subtropical en número de hectáreas en las Islas Canarias. La falta de control en la introducción del material vegetal y la deficiente sanidad de los viveros, han favorecido la dispersión de la enfermedad en los distintos municipios.

La podredumbre de raíz del aguacate producida por *Phytophthora cinnamomi* Rands fue detectada y diagnosticada por primera vez en las Islas Canarias en 1975. El mapa de distribución de la enfermedad existente en la actualidad para el archipiélago fue realizado fundamentalmente en base a las muestras recibidas en el Instituto Canario de Investigaciones Agrarias aportadas por agricultores y técnicos para su diagnóstico.

El objetivo de este trabajo ha sido la elaboración de un mapa de distribución actualizado de la enfermedad para la isla de Tenerife en el que se recoge su presencia en los cultivos de aguacate y la gravedad de los daños. Para ello se ha realizado una encuesta entre los productores en la que se ha obtenido información relativa a la enfermedad, epidemiología y otros datos de interés para el cultivo. Se tomaron muestras de raíces y de suelo en las fincas afectadas. El aislamiento del patógeno se llevó a cabo mediante sistemas de trapeo y medios selectivos.

### **B3.10 EFECTO DE LA NUTRICIÓN DEL OLIVO SOBRE EL REPILO CAUSADO POR *Spilocaea oleagina***

Bohórquez, J. M., López-Doncel, L. M., Alcántara, E., Trapero, A.

Dpto. de Agronomía, E.T.S.I.A.M., Universidad de Córdoba. Apdo. 3048, 14080 Córdoba.

Una medida complementaria recomendada para el control del Repilo del olivo, causado por el hongo *Spilocaea oleagina*, es el manejo de la fertilización del cultivo. Sin embargo, la relación entre nutrición del olivo y Repilo no ha sido suficientemente investigada. El elemento nutritivo más relacionado con esta enfermedad es el nitrógeno, cuya abundancia favorece la formación de tejidos jóvenes y suculentos que son más susceptibles a patógenos biotrófos como *S. oleagina*. Además del nitrógeno, la deficiencia de calcio ha sido asociada con infecciones severas de *S. oleagina*, pero también se han observado ataques severos de Repilo en suelos con niveles elevados de calcio. El potasio también se ha relacionado con defoliaciones del olivo, pero no se conoce su efecto sobre el Repilo.

Todos los experimentos se han realizado con material vegetal del cultivar susceptible 'Picual'. En algunos experimentos se han utilizado plántones de menos de un año cultivados en invernadero, bien en un sistema de cultivo hidropónico, o en bolsas con una mezcla de arena, limo y turba (1:1:1 en volumen). En otros experimentos, el material utilizado ha sido hojas de olivos de más de quince años de edad, procedentes de dos ensayos de campo sobre fertilización del olivar, situados en las provincias de Córdoba y Jaén. Tanto los plántones, como las hojas separadas de éstos o de los olivos de los campos experimentales, se inocularon con *S. oleagina* en condiciones controladas y se evaluó la incidencia y severidad de las infecciones visibles, así como las infecciones latentes mediante la inmersión de las hojas en una solución de NaOH al 5 %.

Las soluciones nutritivas empleadas permitieron alcanzar el objetivo de tener plántones de olivo con deficiencias de N, K y Ca. Asimismo, se pudo disponer de olivos con deficiencias de N y K de los experimentos sobre fertilización del olivar en campo. Las inoculaciones con *S. oleagina* no pudieron demostrar la existencia de un efecto marcado entre las deficiencias de los nutrientes estudiados y la severidad del Repilo. No obstante, los resultados sugieren una correlación entre un mayor aporte de N y una mayor severidad de las infecciones de *S. oleagina*. Asimismo, en algunos ensayos se encontró correlación entre la deficiencia de K y la mayor severidad del Repilo. Las plantas con deficiencia de Ca presentaron valores variables de la severidad de las infecciones, hecho que no permitió alcanzar ninguna conclusión definitiva respecto a este elemento. La deficiencia de este último elemento, en cambio, resultó favorable para el desarrollo de podredumbres radiculares de origen fúngico en el cultivo hidropónico.

### B3.11 CARACTERIZACIÓN EPIDEMIOLÓGICA DEL REPILO DEL OLIVO.

Viruega, J.R., Trapero, A.

*Depto. Agronomía, ETSIAM, Universidad de Córdoba. Apdo. 3048, 14080 Córdoba.*

El Repilo del olivo, causado por el hongo *Spilocaea oleagina*, está ampliamente distribuido por la mayoría de las regiones olivareras, aunque la intensidad de sus ataques varía considerablemente en función del lugar y de la climatología. A pesar de que la enfermedad es bien conocida, la información actual sobre su epidemiología es incompleta, fragmentaria y, a veces, contradictoria. La caracterización de las epidemias es fundamental para cuantificar la relación entre la severidad de la enfermedad y las variables ambientales.

Los experimentos se realizaron durante 1994-1997 en un olivar del cultivar 'Picual' en el CIFA de Córdoba, que presenta condiciones muy favorables para el desarrollo del Repilo. En este campo se instaló una estación meteorológica para el registro automático de los datos climáticos y se cuantificaron, mediante evaluaciones semanales o quincenales, los siguientes componentes epidémicos: períodos de infección y de incubación de las infecciones (con plantas trampa), curva de progreso temporal de las infecciones (visibles y latentes), densidad y viabilidad de las conidias en las lesiones, dispersión de las conidias en el aire y caída de hojas.

La incidencia y severidad de la enfermedad varió significativamente entre años y entre estaciones. El período de infección fue muy largo, generalmente entre los meses de octubre y junio; sin embargo, las principales infecciones ocurrieron durante los días lluviosos de otoño-invierno, cuando la densidad de inóculo fue más alta (hasta  $4 \times 10^5$  conidias/cm<sup>2</sup> de lesión). En ausencia de lluvia, pero con períodos prolongados de humectación foliar, se produjeron infecciones ligeras, pero éstas no se detectaron en períodos secos ni durante el verano. Aunque la densidad de inóculo en primavera fue baja, en esta época se produjeron infecciones que permanecieron latentes durante el verano (hasta 140 días) y actuaron como fuente de inóculo primario para el desarrollo de la epidemia en otoño. La viabilidad de las conidias fue generalmente buena (40-80%) en todos los períodos, excepto al final de la primavera de 1995, época en la que debido a una severa sequía y a temperaturas extremadamente altas no se produjeron infecciones y, como consecuencia, los niveles de Repilo fueron indetectables durante el otoño de 1995 y hasta mayo de 1996, a pesar de que las condiciones ambientales fueron muy favorables. El muestreador volumétrico Burkard<sup>®</sup> no resultó adecuado para detectar y cuantificar conidias en el aire, sin embargo, los portas con adhesivo permitieron detectar conidias y establecer una gradación de la densidad de éstas hasta una distancia de 40 m de los árboles afectados. Los datos epidemiológicos determinados en este trabajo se están correlacionando con los parámetros climáticos y con los resultados de las investigaciones desarrolladas en condiciones controladas para establecer las bases de un sistema predictivo de los riesgos de infección que será verificado en diferentes comarcas olivareras.

### B3.12 INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA Y DE LA HUMEDAD EN LA INFECCIÓN DEL OLIVO POR *Spilocaea oleagina*.

Viruega, J.R., Trapero, A.

*Depto. Agronomía, ETSIAM, Universidad de Córdoba. Apdo. 3048, 14080 Córdoba.*

El Repilo del olivo, causado por *Spilocaea oleagina*, es la enfermedad más común de este cultivo, pero la intensidad de sus ataques varía considerablemente con los años y lugares. Las condiciones ambientales, sobre todo la lluvia y la temperatura, determinan en gran medida la extensión y severidad de las epidemias de Repilo. Sin embargo, no se conoce con precisión el efecto de dichos factores debido a la falta de investigaciones al respecto en condiciones controladas. En este trabajo se ha estudiado por primera vez la influencia de dos factores críticos, la temperatura y la humectación foliar, en la infección del olivo por *S. oleagina*.

Plantones de olivo del cultivar 'Picual', con hojas de 4-6 meses de edad, se inocularon por pulverización con una suspensión conidial del patógeno ( $1.5 \times 10^5$  conidias/ml), siguiendo una metodología desarrollada anteriormente. Tras la inoculación, algunos plantones recibieron varios períodos secos (6, 48, 72 y 168 horas) antes de incubarse 48 horas con ambiente saturado de humedad y otros se incubaron bajo diferentes combinaciones de ocho períodos de saturación de humedad (0, 6, 12, 18, 24, 36, 48 y 96 horas) y seis temperaturas (5, 10, 15, 20, 25 y 12-20°C). Después de esos tratamientos los plantones se mantuvieron en cámara de ambiente controlado a 12-20°C y humedad relativa <65% hasta la finalización del experimento. A los 70 días de la inoculación se evaluó la severidad de las infecciones latentes, utilizando la escala de Palti ligeramente modificada, después de sumergir las hojas durante 20 minutos en una solución de NaOH al 5%.

Los resultados mostraron una correlación positiva entre la duración de la humectación y la severidad de las infecciones para todas las temperaturas a partir de las 12 horas de humectación, no produciéndose infecciones con humectaciones inferiores. La interacción entre ambos factores fue significativa. Así, la temperatura más favorable para la infección resultó ser 20°C para 12, 18 y 24 horas de humectación; sin embargo, para humectaciones superiores el óptimo fue 15°C. A 5°C, sólo se detectaron infecciones con humectaciones superiores a 18 horas. Cuando tras la inoculación se incluyó un período seco igual o inferior a 48 horas, la severidad de las infecciones se incrementó respecto a las plantas que recibieron 48 horas de humectación sin período seco previo; sin embargo, para períodos secos superiores la severidad disminuyó significativamente. Con estos resultados se está elaborando un modelo cuantitativo de la infección del olivo por *S. oleagina*, lo que junto con las observaciones de campo, permitirá desarrollar un sistema de predicción de las epidemias de Repilo.

### **B3.13 IMPORTANCIA DE LAS HOJAS INFECTADAS CAÍDAS AL SUELO EN LA BIOLOGÍA DE *Spilocaea oleagina*, AGENTE DEL REPILO DEL OLIVO.**

Viruega, J.R., Luque, F., Trapero, A.

*Depto. Agronomía, ETSIAM, Universidad de Córdoba. Apdo. 3048, 14080 Córdoba.*

*Spilocaea oleagina*, agente causal del Repilo del olivo, es un hongo biotrofo específico de *Olea europaea* (olivo y acebuche). El nombre del patógeno hace referencia exclusivamente al estado asexual del hongo. El estado sexual, aunque ha sido objeto de numerosos estudios, no se conoce, pero podría corresponderse con *Venturia*, por analogía con otras especies de *Spilocaea*. El patógeno sobrevive durante los períodos desfavorables, principalmente tiempo seco y caluroso, en las hojas afectadas que permanecen en el árbol, aunque parece tener cierta capacidad de supervivencia en las hojas infectadas que caen al suelo. El papel de estas últimas en la biología del hongo y en la epidemiología de la enfermedad no es bien conocido, a pesar de que el Repilo se caracteriza por la intensa defoliación que produce en los olivos afectados.

Hojas caídas al suelo con síntomas de Repilo, procedentes de diversas comarcas olivareras andaluzas, se colocaron en bolsas de malla de nylon y se dispusieron en el suelo, bajo la copa de olivos en una parcela experimental de Córdoba, y en cámaras húmedas con ambiente saturado de humedad a 10°C. Periódicamente, se muestrearon y se observaron al microscopio las estructuras fúngicas producidas en las hojas. En varias épocas del año se recolectaron hojas recién caídas del cultivar 'Picual', con lesiones de *S. oleagina*, y se colocaron en bolsas de malla de nylon, las cuales se mantuvieron bajo la copa de los olivos. Semanalmente, se muestrearon las hojas y se cuantificó la densidad de las conidias mediante impresión de las lesiones en cinta adhesiva y conteo al microscopio de las conidias separadas. Asimismo, se determinó la viabilidad de dichas conidias mediante pruebas de germinación.

El estado sexual del hongo no se observó en ninguna de las hojas evaluadas. En algunas muestras, el hongo formó estromas, en los que se diferenciaron estructuras parecidas a esclerocios o cuerpos fructíferos inmaduros, pero éstos no llegaron a madurar ni en las hojas mantenidas en campo ni en las hojas incubadas en condiciones controladas. En las lesiones de las hojas caídas, el hongo no formó nuevas conidias y las ya existentes se mantuvieron viables por un período máximo de 11 semanas, dependiendo de las condiciones ambientales, si bien, su densidad disminuyó drásticamente a las pocas semanas. Después de las primeras lluvias, las lesiones de las hojas en el suelo fueron colonizadas rápidamente por hongos saprotrofos (*Cladosporium*, *Aureobasidium*, *Alternaria*, etc.) que desplazaron a *S. oleagina*. Estos resultados permiten concluir que las hojas de olivo infectadas que caen al suelo tienen una escasa importancia como fuente de inóculo para las epidemias de Repilo. El carácter biotrofo y la ausencia del estado sexual de *S. oleagina* determinan su dependencia casi exclusiva de las hojas infectadas que permanecen en el árbol para la supervivencia y para la producción de inóculo.

### B3.14 TRANSMISION DE *Verticillium dahliae* EN ESTIERCOL DE OVEJA

López Escudero, F.J., Martos Moreno, C. y Blanco López, M.A.

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

*Verticillium dahliae* es un invasor de suelo con una distribución mundial aunque con preferencia en zonas templadas. En Andalucía se cultivan numerosas especies huéspedes de *V. dahliae*, como algodón, cártamo, girasol, remolacha y cultivos hortícolas, que han aumentado la distribución y población del hongo. La elevada supervivencia de sus microesclerocios (MS) y la amplia gama de huéspedes le permiten un nivel mantenido de inóculo en el suelo. Además posee medios de dispersión de gran importancia epidemiológica en restos de cosechas, suelo o agua infestada, o en semillas o plantas infectadas que le permiten distribuirse a otras zonas. Otros medios de dispersión menos importantes podrían, sin embargo, explicar algunas situaciones de enfermedad en ausencia de otros medios más aparentes. Una práctica tradicional en Andalucía es el pastoreo de las rastrojeras de los cultivos aprovechando los veranos cálidos y secos. Estas prácticas, muy frecuentes y apreciadas hace años por los agricultores por la renta económica añadida y el estercolado del suelo, se están aplicando de nuevo en algunos campos por el interés ecológico que conllevan.

La utilización de rastrojos de algodón afectados por Verticilosis para la alimentación de las ovejas ha hecho sospechar la posibilidad de que el estiércol resultante pudiera estar infestado por el patógeno. En uno de estos campos situado en el término de Ecija (Sevilla), el estiércol se había amontonado al aire libre durante varios años, siendo utilizado en una nueva plantación de olivar como enmienda orgánica y para el establecimiento y reposición de plantones en los hoyos. Por ello, se tomaron muestras del estiércol y se analizaron para determinar la presencia de *V. dahliae* en ellas. Las muestras se desecaron en estufa durante 5 días a 27°C ó se procesaron de forma inmediata. El aislamiento de *V. dahliae* se realizó mediante el método de Tamizado Húmedo y siembra en medio selectivo de Agar Polipectato Sódico Modificado. A los 14 días de la siembra se examinaron las placas de Petri resultando colonias de *V. dahliae* con una densidad de hasta 8.4 MS por gramo de estiércol. Las colonias desarrolladas tenían escasa variabilidad morfológica en su aspecto y en el de los MS que las formaban, coincidiendo con una de las obtenidas a partir del campo que había sido estercolado. Los resultados obtenidos demuestran que *V. dahliae* es capaz no sólo de superar el proceso de digestión del ganado, sino que puede sobrevivir varios años en el estiércol superando los procesos fermentativos que ocurren en el mismo.



### B3.15 EPIDEMIOLOGIA Y DISPERSION DE *Verticillium dahliae* EN UNA PLANTACION NUEVA DE OLIVAR.

López Escudero, F.J., Martos Moreno, C. y Blanco-López, M.A.

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

La Verticilosis del Olivo (VO) es la enfermedad más importante de las nuevas plantaciones intensivas de olivar en Andalucía. El marco económico que rodea al cultivo ha propiciado su extensión en muchos casos a zonas anteriormente cultivadas con huéspedes herbáceos de *V. dahliae* como algodón, cártamo, girasol, remolacha y algunos cultivos hortícolas. Las plantaciones establecidas en suelos, infestados o no, se han realizado en ocasiones con material de plantación infectado. Además de ello, la inconsistencia o falta de aplicación de las prácticas culturales recomendadas para evitar la dispersión del hongo y reducir la enfermedad han incrementado la severidad de las infecciones en algunos campos, llegando a situaciones en las que el agricultor se plantea el arranque del olivar. La situación descrita queda reflejada en un olivar situado en el término de Ecija (Sevilla), de 14 has del cultivar 'Picual' (susceptible), plantado en el otoño de 1991 en suelos tradicionalmente cultivados de algodón. La incidencia media actual de la enfermedad es de 15.4 %, aunque en determinadas zonas inspeccionadas asciende hasta el 85%. En parcelas colindantes y con influencia para la dispersión eólica y edafológica de partículas vegetales y de suelo, se incluyen alternativas con cultivos huéspedes como algodón, girasol y remolacha. Además, los restos de los cultivos son aprovechados por el ganado y el estiércol procedente del mismo empleado en el replanteo de las plantas muertas por la VO.

Los análisis de suelo de diferentes zonas topográficas de la plantación, realizados mediante Tamizado Húmedo sobre medio de cultivo de Agar Polipeptato Sódico Modificado (APSM), revelan la presencia de *V. dahliae* en cantidades que oscilan entre 4.4 y 22.4 propágulos por gramo de suelo (ppg). Las observaciones morfológicas de las colonias en APSM reflejan cierta variabilidad en el tamaño y forma de éstas, y en el grado de melanización, tamaño y compactación de sus microesclerocios. Esta variabilidad se mantiene en las colonias obtenidas al repicar esclerocios individuales desde dicho medio a nuevas placas de Agar Agua y APSM, lo que podría sugerir distintas procedencias del patógeno. La coincidencia morfológica de algunas de estas colonias con las procedentes de estiércol infestado utilizado en el campo como enmienda, y el hecho de que no exista una relación aparente entre la densidad de inóculo en el suelo y la incidencia de enfermedad indican que el aporte continuo de MS procedentes de campos de algodón infestados adyacentes y del estercolado ha podido contribuir de forma notable al incremento de la población del patógeno en el suelo.

### **B3.16 INTERACCIÓN ENTRE LA TEMPERATURA DEL SUELO Y LA DENSIDAD DE INÓCULO DE RAZAS DE *Fusarium oxysporum* f.sp. *ciceris* EN LA FUSARIOSIS VASCULAR DEL GARBANZO.**

Méndez Rodríguez, M.A., Navas Cortés, J.A., Jiménez Díaz, R.M.

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

El garbanzo es una leguminosa de grano de interés para los ambientes agrícolas mediterráneos de secano, cuyo cultivo extenso en España y la Cuenca Mediterránea es limitado por los bajos rendimientos originados por la incidencia de diversos estreses abióticos y los ataques por enfermedades. Las enfermedades más ampliamente distribuidas y severas del garbanzo, tanto en España como en la Cuenca Mediterránea, son la Fusariosis Vascular (FVG) causada por *Fusarium oxysporum* f.sp. *ciceris* (Foc), y la Rabia causada por *Didymella rabiei*. La FVG afecta severamente a los cultivos de siembra primaveral en los ambientes secos y cálidos, originando pérdidas del 10-15% de cosecha en España. El control integrado de la FVG requiere un mejor conocimiento de la epidemiología de la enfermedad, incluyendo la comprensión más completa de las interacciones entre los factores que condicionan su desarrollo p.ej.: temperatura, densidad de inóculo, virulencia del patógeno y susceptibilidad del cultivar. En este trabajo se presentan resultados de experimentos en ambiente controlado para determinar la naturaleza y magnitud de dichas interacciones.

En todos los experimentos se han utilizado dos aislados de Foc representativos de las razas 0 y 5 del patógeno más extendidos en España; y los cultivares de garbanzo P2245 y PV61 que difieren en el nivel de susceptibilidad a las mismas. El inóculo consistió en clamidosporas de Foc producidas en condiciones controladas, que se mezclaron con suelo estéril para establecer 8 densidades de inóculo del patógeno. Los cultivares se sembraron en suelo infestado y crecieron en incubadores de control de temperatura radicular ajustados a temperatura constante de 10, 20, 25 y 30°C y 200  $\mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$ . El desarrollo de la enfermedad se evaluó por la severidad de síntomas foliares durante 60 días. Para cada combinación experimental, el progreso de enfermedad en el tiempo se ajustó mediante técnicas de regresión no lineal al modelo sigmoidal asimétrico de Gompertz. Para las razas y cultivares estudiados, los parámetros estimados para el modelo temporal determinaron el ajuste de superficies de respuesta que permiten establecer relaciones funcionales en las que el incremento de severidad de enfermedad es función del tiempo y la densidad de inóculo, o de la temperatura de suelo.

Nuestros resultados permiten concluir que en el patosistema Foc-garbanzo en el intervalo de los factores estudiados, la severidad de la FVG viene determinada por la virulencia del patógeno, la susceptibilidad del cultivar, la densidad de inóculo, y la temperatura del suelo. Aunque los elevados niveles de susceptibilidad de 'P2245', y de virulencia de la raza 5, juegan un papel determinante como factores individuales en la severidad de la reacción; también existió una interacción significativa entre la raza de Foc patógeno y la temperatura del suelo respecto del desarrollo de la enfermedad. Así, en las plantas inoculadas con la raza 0 los valores máximos de severidad se alcanzan a 25 y 30°C, y con la raza 5 el desarrollo de la FVG es disminuido por temperaturas diferentes a 25°C.

Subvencionado por el proyecto AGF97-1479

### B3.17 ANÁLISIS COMPARATIVO DE LA COMPATIBILIDAD VEGETATIVA DE AISLADOS DE *Verticillium dahliae* DE ALGODONERO DE ESPAÑA E ISRAEL

Pérez Artés, E.<sup>1</sup>, Korolev, N.<sup>2</sup>, Katan, J.<sup>3</sup>, Rodríguez Jurado, D.<sup>1</sup>, García Pedrajas, M.D.<sup>1</sup>, Bejarano Alcázar, J.<sup>4</sup>, Katan, T.<sup>2</sup>, Jiménez Díaz, R.M.<sup>1</sup>

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

2. ARO-Centro Volcani, Bet Dagan, Israel

3. Facultad de Agricultura, Universidad Hebrea de Jerusalem, Rehovot, Israel

4. CIFA, Junta de Andalucía, Apdo. 4240, 14080 Córdoba

Los aislados de *Verticillium dahliae* que infectan *Gossypium hirsutum* han sido caracterizados patogénicamente como defoliantes (*D*) o no defoliantes (*ND*) en España, y parcialmente defoliantes (*PD*) o *ND* en Israel. La similitud de reacciones causadas por aislados *D* y *PD* en algodónero sugiere la posibilidad de proximidad genética entre ellos. Esta hipótesis ha sido abordada en este estudio mediante el análisis de la compatibilidad vegetativa entre aislados por su caracterización en VCGs utilizando mutantes no utilizadores de nitrato (*nit*). La ausencia de reproducción sexual en *V. dahliae* circunscribe la posibilidad de intercambio genético entre aislados a aquéllos que pertenecen al mismo VCG.

La asignación de un aislado de *V. dahliae* a un VCG se determinó mediante el crecimiento enfrentado de sus mutantes *nit* con testores estándar del sistema internacional OARDC. De 56 aislados de *V. dahliae* obtenidos de algodónero en España, 26 fueron asignados al VCG1, 26 al VCG2A, 5 al VCG4B, y uno de los aislados fue auto-incompatible. Comparativamente, 178 aislados de algodónero obtenidos de Israel se asignaron a los VCG2B, VCG4B, y VCG2A en las proporciones 117: 63: 1.

La asignación de un aislado a un VCG estuvo estrechamente correlacionada con su patogenicidad sobre algodónero. Todos los aislados de VCG2A y VCG4B, independientemente de su origen geográfico, fueron caracterizados como *ND*, al igual que el aislado auto-incompatible de España. El VCG1 sólo contiene aislados *D* de España, y los aislados asignados al VCG2B fueron caracterizados como *PD*. En conclusión, mientras que los VCG2A y VCG4B se encuentran en España e Israel con diferentes frecuencias, los VCG1 y VCG2B se han encontrado restringidos en España e Israel, respectivamente

### B3.18 ANÁLISIS COMPARATIVO DE AISLADOS DE *Verticillium dahliae* DE ALGODONERO DE ESPAÑA E ISRAEL MEDIANTE RAPD-PCR

Pérez Artés, E.<sup>1</sup>, García Pedrajas, M.D.<sup>1</sup>, Bejarano Alcázar, J.<sup>2</sup>, Korolev, N.<sup>3</sup>, Rodríguez Jurado, D.<sup>1</sup>, Katan, T.<sup>3</sup>, Katan J.<sup>4</sup>, Jiménez Díaz, R.M.<sup>1</sup>

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

2. CIFA, Junta de Andalucía, Apdo. 4240, 14080 Córdoba

3. ARO-Centro Volcani, Bet Dagan, Israel

4. Facultad de Agricultura, Universidad Hebrea de Jerusalem, Rehovort, Israel.

La Verticilosis, causada por *Verticillium dahliae*, es la enfermedad más importante de *Gossypium hirsutum* en España e Israel. Experimentos de patogenicidad en condiciones controladas han dado lugar a caracterizar a los aislados de *V. dahliae* de algodónero como defoliantes (*D*) o no defoliantes (*ND*) en España, y como parcialmente defoliantes (*PD*) o *ND* en Israel. La similitud de las reacciones causadas por aislados *D* y *PD* de *V. dahliae* en algodónero, y la significación de la correcta caracterización patotípica de los aislados del hongo para el control de la enfermedad, condujo a comparar molecularmente aislados de *V. dahliae* de algodónero de los dos países y a determinar la diversidad genética en las poblaciones de aquéllos. El ADN de 92 aislados de *V. dahliae* obtenidos de *G. hirsutum* en España (36) e Israel (56), representativos de los patotipos de *D*, *PD*, y *ND*, se analizó mediante RAPD-PCR utilizando tres iniciadores individuales de secuencia arbitraria. En investigaciones anteriores, hemos demostrado que dichos iniciadores polimerizan bandas de ADN diagnósticas de los patotipos *D* y *ND*. En este estudio, los aislados de *V. dahliae* de España fueron correctamente asignados a los patotipos *D* o *ND* mediante el análisis RAPD-PCR. Por el contrario, ninguno de los aislados de Israel contiene el polimorfismo específico del patotipo *D*, y fueron caracterizados molecularmente como *ND*.

El análisis de similaridad mediante el método UPGMA utilizando el coeficiente de Jaccard definió cinco grupos RAPD. Los aislados de *V. dahliae* de Israel fueron incluidos en dos grupos distintivos con 4% y 8% de disimilaridad intragrupo, respectivamente, y 10% de disimilaridad entre ellos. Los aislados *ND* de *V. dahliae* de España constituyen un grupo RAPD junto con algunos aislados de Israel, con 5% de disimilaridad; mientras que los aislados *D* fueron casi idénticos entre sí y constituyen un grupo separado con cerca de 25% de disimilaridad con todos los aislados *ND*

Subvencionados por el proyecto OLI96-2131

### B3.19 ESTIMA DEL POTENCIAL DE INFECCION DE *Polymyxa betae* Keskin, DIRECTAMENTE EN EL TERRENO.

D'Ercole N., Nipoti P., Di Pillo L., Gennari S.

U. C. I. "S. T. A. A." - *Patologia Vegetale* - Università di Bologna - Italia

*Polymyxa beate* es un microorganismo importante en la etiología de enfermedades infecciosas de las plantas. En este sentido resulta decisivo en provocar el desarrollo de la rizomanía de la remolacha. La presencia de *P. betae* en el terreno se pone en evidencia mediante un ensayo biológico de dosis-respuesta. Este sirve para evaluar *a priori* el estado de salud del terreno en la hipótesis de destinarlo al cultivo de la remolacha.

El método empleado se basa en tres etapas fundamentales: a) preparación del terreno a examinar; b) producción de plantas sensibles; c) revelación y lectura de los síntomas.

Los cistosoros, una vez destruidos los tejidos radicales, se encuentran libres en el terreno y representan elementos de supervivencia. Cuando entran en contacto con exudados radicales específicos, recobran actividad produciendo zoosporas iniciando el proceso de infección. El método objeto del presente estudio utiliza esta característica fundamental de *P. betae*, en donde a un estímulo corresponde una respuesta. El protozoo viene determinado en base a la respuesta "ausencia - presencia" que permite establecer las unidades de potencial infectivo referido al 50% de las plantas en las condiciones de ensayo y las relaciones existentes entre los logaritmos de las concentraciones del terreno y el nivel teórico de la gravedad de la infección. El sistema de evaluación de *P. betae* permite obtener resultados en tres posibles niveles de consistencia: 1) baja presencia; 2) presencia media; 3) alta presencia.

El resultado en sentido general es de notable interés en cuanto permite la determinación de la presencia del protozoo que puede ser no infectivo o infectivo y por lo tanto difundir la rizomanía. La infectividad se determina con una pasaje sucesivo mediante el ensayo inmunoenzimático ELISA.

En conclusión la estima de la presencia de *P. beate* es posible y ampliamente confirmada por la aplicación efectuada en los terrenos y sobre los cuales se expondrá. Los datos resultan significativos al 99% siendo el coeficiente de correlación 0,85. Este método también puede tener aplicación para otras especies botánicas para las cuales *Polymyxa* es vector del virus del amarilleo nerval necrótico de la remolacha.

<sup>1</sup> Trabajo efectuado con el Gruppo di Ricerca del C.N.R. "Patologia delle piante ortensi" (G.RI.PA.P.O.) publicación n. 308

### B3.20 CARACTERIZACION Y COMPARACION DE DAÑOS PRODUCIDOS POR *Fusarium oxysporum* EN ESPECIES DE ESPARRAGO Y *Danae racemosa*

Fantino M. G.<sup>1</sup>, Pasini C.<sup>2</sup>, D'Aquila F.<sup>2</sup>, Nipoti P.<sup>1</sup>, Gennari S.<sup>1</sup>

1. U. C. I. "S. T. A. A." - *Patologia Vegetale* - Università di Bologna - Italia

2. Istituto Sperimentale per la Floricoltura di Sanremo - Italia

En Italia, la producción de planta ornamental esta muy desarrollada en Liguria, en particular en la "Riviera dei Fiori". Entre las especies mas cultivadas se encuentra *Danae racemosa* con 321 ha de superficie y el espárrago ornamental con 52 ha de superficie.

Estas especies hasta hace pocos años no presentaban graves daños fitopatológicos, pero en los últimos años en parte debido a la mayor difusión y explotación intensiva en zonas no apropiadas, han aparecido algunas adversidades entre las cuales la podredumbre basal provocada por *Fusarium oxysporum*. En algunas áreas esta enfermedad constituye un importante problema, especialmente en los terrenos compactos. En primavera la infección se instaura en las raíces y en los brotes jóvenes pero los síntomas más evidentes se observan a finales de otoño. Dado que no es bien conocida la correlación entre agente patógeno, huésped y ambiente de cultivo se ha iniciado un estudio con el fin de: aislar cepas de *Fusarium oxysporum* de plantas infectadas, coleccionar los aislados y clasificarlos, efectuar pruebas de patogenicidad sobre diversas liliáceas y pruebas *in vitro* de compatibilidad vegetativa (VCG) para diferenciar los aislados.

En el arco de dos años han sido coleccionados mas de 80 aislados de *Fusarium oxysporum* provenientes de los cultivos mencionados que mostraban síntomas de infección. 40 de estos aislados han sido utilizados para pruebas de patogenicidad cruzadas en invernadero entre *A. plumosus*, *A. sprengeri*, *A. officinalis* y *D. racemosa* comparándolos con aislados de *Fusarium oxysporum f.sp. asparagi* de patogenicidad bien conocida, aislados de *A. officinalis*. De los resultados obtenidos hemos determinado la elevada sensibilidad de *A. officinalis*, y *A. plumosus* a todos los aislados. Algunos aislados obtenidos de *A. sprengeri* también han resultado virulentos respecto a *D. racemosa* mientras *A. sprengeri* ha resultado resistente o al menos tolerante a todos los aislados. En base a estos datos hemos efectuado pruebas de compatibilidad vegetativa (VCG) con los 80 aislados obtenidos de estas especies. Los aislados han resultado autocompatibles; Solamente dos aislados obtenidos de *A. plumosus* cultivados en distintas haciendas han resultado compatibles entre si, pudiendo definirlos como pertenecientes al mismo grupo. En base a las pruebas efectuadas, los aislados ensayados han evidenciado un comportamiento patógeno diferenciado respecto a las especies de *Asparagus* sin que estos datos resulten avalados por los resultados de las pruebas de compatibilidad vegetativa.

### B3.21 SENSIBILIDAD FENOLÓGICA DEL OLIVO A INFECCIONES DE *Colletotrichum gloeosporioides*.

García Figueres, F.<sup>1</sup>, Pedret Tena, E.<sup>2</sup>, Duatis Monllaó, J.J.<sup>2</sup> y Marco Sanz, V.<sup>3</sup>.

1. *Unitat de Sanitat Vegetal. S.L.S.A. Dep. Agricultura Ramaderia i Pesca. Generalitat de Catalunya. Via Circulació Nord, Tram VI, Zona Franca, 08028 Barcelona.*

2. *Agrupacions de Defensa Vegetal d'Olivera. Pl. Mossén Ovidi Tobías, 6-8. 43500 Tortosa.*

3. *Servei de Protecció dels Vegetals. Of. Comarcal d'Amposta del Dep. Agricultura Ramaderia i Pesca. Generalitat de Catalunya. c/ Sant Pere, 41. 43870 Amposta.*

La afección conocida como "aceitunas jabonosas" se ha convertido en un grave problema en las comarcas del Baix Ebre y Montsià en el sur de Tarragona, produciendo elevadas pérdidas de cosecha, especialmente en lo concerniente a la acidez del aceite.

Desde la campaña de 1991-92, se han realizado numerosos estudios para determinar cual podría ser la mejor estrategia de control. Un factor importante es el conocimiento del momento de la infección primaria. Tradicionalmente se ha considerado el estadio de cambio de color del fruto como el momento de máxima incidencia y sensibilidad al ataque del patógeno. Debido a los recientes cambios taxonómicos del género *Gloeosporium* (*Gloeosporium olivarum*), se ha incluido el hongo causante de esta enfermedad en *Colletotrichum gloeosporioides* a la espera de conocer más datos al respecto.

Considerando diferentes conceptos referentes al momento de la infección primaria de *C. gloeosporioides* en otros frutos, se consideró la posibilidad de que se produjera ésta en estados fenológicos tempranos, como el cuajado y el endurecimiento del hueso, quedando de forma quiescente hasta la maduración.

En este sentido se inocularon ramas de olivo con suspensiones de esporas de *C. gloeosporioides* en dichos estados fenológicos. A la maduración del fruto, se muestrearon las ramas y se valoró el porcentaje de aceitunas infectadas después de una incubación de 10 días en cámara húmeda.

Se pudo observar que se producen infecciones latentes ya desde el momento del cuajado, aumentando el porcentaje de infección al endurecimiento de hueso y llegando a un máximo en el envero (cambio de color).

En un lote que sufrió aditivamente la inoculación en cada uno de los momentos citados, se pudo observar el efecto sumatorio de las sucesivas infecciones.

### B3.22 INTERACCIONES ENTRE HONGOS ENDOFÍTICOS Y GRAMÍNEAS EN PASTOS DE DEHESAS DE SALAMANCA

Zabalgogezcoa, I., Vázquez de Aldana, B.R., García Ciudad, A., García Criado, B.

*Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología, CSIC. Apartado 257, 37071 Salamanca.*

Los ascomicetos del género *Epichloë* (Fam. *Clavicipitaceae*) infectan a varias especies de gramíneas. Estos hongos son responsables de la producción en las plantas infectadas de diversos tipos de toxinas (ej. alcaloides ergopeptínicos), las cuales están asociadas a trastornos en el ganado que consume el pasto, así como a un incremento de la resistencia de las plantas a otros herbívoros como insectos y nematodos.

Desde 1996 se viene realizando un censo de gramíneas hospedadoras en pastos de dehesas de la provincia de Salamanca. Las especies hospedadoras de *Epichloë* hasta ahora identificadas en esta zona son: *Festuca arundinacea*, *F. ampla*, *F. ovina*, *F. rubra*, *Dactylis glomerata*, *Lolium perenne*, *L. rigidum*, *Holcus lanatus*, *Agrostis spp.*, *Brachipodium sylvaticum* y *B. phoenicoides*.

El principal objetivo de este estudio es estimar la frecuencia de infección endofítica en *F. rubra*, una especie relativamente abundante en los pastos de dehesa. Fuera de este contexto, *F. rubra* es un componente importante de céspedes de alta calidad. En muestreos realizados en 18 dehesas de la provincia de Salamanca durante los tres últimos años (1996 - 1998), se ha observado que en todas las poblaciones analizadas se detectaron plantas de las cuales se aisló *Epichloë festucae*. El resultado de un muestreo detallado realizado en 6 de estas dehesas y cuyo fin era estimar la tasa de infección endofítica en poblaciones de *F. rubra* es que la tasa de infección en estas poblaciones es de aproximadamente el 70%. *E. festucae* se transmite verticalmente por semilla y la infección en *F. rubra* es con frecuencia críptica. La asociación de *F. rubra* con *E. festucae* puede tener un papel importante en la adaptación de *F. rubra* a las condiciones de los ecosistemas de dehesas en Salamanca (i.e. baja precipitación y pastoreo continuo.)



### B3.23 ETIOLOGÍA Y CONTROL DE LA NECROSIS DE LA ADORMIDERA (*Papaver somniferum* L.) EN ANDALUCÍA

Muñoz Ledesma, F. J.<sup>1</sup>, Marín Jaime, M.<sup>1</sup>, Navas Cortés, J.A.<sup>2</sup> y R.M. Jiménez Díaz<sup>2</sup>

1.Alcaliber, S.A., Avda. Ventalomar, 1, 45007 Toledo.

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

La adormidera (*Papaver somniferum* L.) es una de las plantas cultivadas más importantes para la industria farmacéutica y constituye la única fuente de alcaloides destinados para uso medicinal. Andalucía, con cerca de 6,000 ha, ha sido la zona más importante al Oeste de Europa para el cultivo de adormidera. En la actualidad, este cultivo se está introduciendo en Castilla y León y Castilla la Mancha.

En los últimos años, se vienen observando en los cultivos de adormidera en Andalucía severos ataques de una Necrosis que afecta a hojas y tallo de la planta, que se han asociado con una importante disminución de cosecha. Los ataques de Necrosis tienen lugar principalmente en cultivos en el estado de cápsula, y se caracterizan por extensas necrosis de los tejidos corticales de raíz y cuello de las plantas, así como por lesiones necróticas en los tallos y hojas que dan lugar a tronchamientos o encamado de la planta. Estos síntomas, que han sido también descritos en diversos países cultivadores de adormidera, son causados por el hongo patógeno *Dendryphion papaveris* (Saw.) Saw. [estado teleomorfo *Pleospora papaveracea* (de Not.) Sacc.]. Los ataques de Necrosis son considerados como el factor limitante más importante para los cultivos de adormidera en el mundo.

En Andalucía, el 90% de los cultivos de adormidera inspeccionados durante 1995, 1996 y 1997 se encontraron afectados de Necrosis. Tanto las conidias como las ascosporas del hongo fueron patogénicas sobre las plantas de adormidera inoculadas en ambiente controlado.

Ensayos in vitro de diversas materias activas fungicidas sobre la inhibición del crecimiento miceliar de *D. papaveris*, la inhibición de la germinación de las conidias y la fitotoxicidad sobre la semilla llevaron a recomendar tratamientos de semilla comercial con Triadimenol. En condiciones de campo, se realizaron experimentos con los fungicidas Clortalonil, Iprodiona, Propiconazol y Tebuconazol aplicados a la parte aérea de la planta. Para asegurar la infección por el patógeno, las plantas se inocularon artificialmente con una suspensión en agua desionizada estéril conteniendo  $0.5 \times 10^5$  unidades formadoras de conidias (u.f.c.)/ml de *P. papaveracea*. La primera inoculación se realizó 7 días después del primer tratamiento fungicida y la segunda inoculación se realizó a los 7 días del cuarto tratamiento fungicida. El desarrollo de la enfermedad se evaluó por la severidad de los síntomas a intervalos semanales. Las epidemias tuvieron desarrollos binomiales y los tratamientos fungicidas proporcionaron reducciones importantes de la cantidad de enfermedad. En base a nuestros resultados de éstos y anteriores estudios el control eficiente de la Necrosis de la adormidera debe incluir la aplicación combinada de tratamientos fungicidas de la semilla, tratamientos fungicidas al cultivo, el enterrado de los restos de cosecha, y la práctica de rotaciones con cultivos no huéspedes de corta duración que faciliten la muerte del hongo en los restos enterrados.

Investigación financiada por Alcaliber S.A.

### B3.24 ESTRUCTURA RACIAL DE *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* EN LAS ISLAS CANARIAS

V. M. Regalado Guijarro, J. M. Hernández Hernández

*Instituto Canario de Investigaciones Agrarias (ICIA). Dpto. de Protección Vegetal. Apdo. 60. La Laguna (Tenerife)*

Una colección de cepas de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (FOC), aisladas de muestras de plantas enfermas y de suelos de plantaciones de banano, fue estudiada con el objeto de determinar grupos de compatibilidad vegetativa (VCG) y su comportamiento en pruebas de patogenicidad. Las muestras fueron tomadas de dos fuentes: 1) plantaciones del cv. 'Pequeña Enana' (AAA) de 25 años de antigüedad, y, 2) de plantaciones que han sido recientemente replantadas con el cv. 'Gran Enana' (AAA).

Los resultados mostraron que los aislados procedentes de plantas enfermas, tanto los de plantaciones antiguas como los de las recientemente reconvertidas al cv. 'Gran Enana' (AAA), pertenecen al VCG 0120, raza 4, y no presentan diferencias en agresividad entre ellos. La mayoría de los aislados de suelo de los dos tipos de plantaciones, exceptuando dos obtenidos de suelo de plantaciones antiguas que pertenecen al VCG 0120, representan grupos de compatibilidad de un solo componente, no identificados, aunque en los obtenidos de plantaciones antiguas se encontraron 4 grupos de compatibilidad formados por 4, 4, 2 y 2 aislados cada uno. Todos aislados de suelo se comportaron como saprófitos, exceptuando los dos aislados pertenecientes al VCG 0120, que mostraron un grado de agresividad similar al de los aislados procedentes de planta enferma. Estos resultados sugieren que no existen diferencias de estructura racial entre las poblaciones de FOC de los dos tipos de plantaciones estudiadas, y que FOC fue introducido en Canarias desde su área de origen, el Sudeste Asiático, propagándose posteriormente de manera clonal en las islas.

#### B4.1 INFLUENCIA DE LOS PERIODOS DE DESCANSO ENTRE CULTIVOS SOBRE LAS DENSIDADES DE POBLACIÓN DE *Meloidogyne* spp.

Ornat, C.<sup>1</sup>, Sorribas, F. J.<sup>2</sup>, Tzortzakakis, E. A.<sup>3</sup>, Verdejo Lucas, S.<sup>1</sup>

1: Dpto. de Patología. IRTA. Ctra. de Cabrils s/n. 08348-Cabrils. Barcelona.

2: Dpto. de Agronomía. ESAB. Comte d' Urgell 187. 08036-Barcelona.

3: Plant Protection Institute. N. A. R. F. Po Box 1802. 71110-Heraklion. Creta. Grecia.

El género *Meloidogyne* incluye organismos endoparásitos obligados que desarrollan su ciclo de vida en la raíz de la planta con excepción de los juveniles de segundo estadio, que se mueven libremente en el suelo. En ausencia de planta huésped, los juveniles consumen sus reservas energéticas, y mueren, por lo que los periodos de descanso entre cultivos pueden contribuir a regular las densidades de población del nematodo. Se realizó un estudio para determinar la influencia del descanso del suelo entre cultivos sobre la supervivencia del nematodo. Para ello, se realizaron muestreos al inicio y al final del periodo de descanso en parcelas comerciales de producción hortícola que estaban infestadas por *Meloidogyne* spp. y se calculó la tasa de supervivencia del nematodo (población final / población inicial). Los muestreos se llevaron a cabo en 6 parcelas de invernadero y 4 de aire libre durante varias campañas agrícolas en las comarcas de El Baix Llobregat (1991-1993) y de El Maresme (1994-1997). Los periodos de descanso entre cultivos oscilaron entre 4 y 18 semanas y se realizaban principalmente en dos épocas del año, después del verano (agosto-octubre) o después del invierno (enero-marzo). Las densidades de población del nematodo disminuyeron después de los periodos de descanso tanto en las parcelas de invernadero como de aire libre. La tasa de supervivencia del nematodo fue superior en las parcelas de invernadero que en las de aire libre y ésta tendía a ser menor cuando las poblaciones iniciales de *Meloidogyne* spp. eran más altas. La época del año en que se dejaba descansar el suelo, la especie de nematodo que infestaba la parcela, el cultivo previo o la textura del suelo no tuvieron un efecto marcado sobre la tasa de supervivencia. Sólo en los periodos de descanso en los que la presencia de malas hierbas era abundante, las densidades de población del nematodo incrementaron o mantuvieron estables después de este periodo. Para determinar el efecto del laboreo del suelo en combinación con los periodos de descanso se realizó un ensayo en un invernadero infestado por *M. arenaria* y *Pratylenchus neglectus* durante el verano. Para ello se realizó una labor con rotovator para destruir las raíces de cultivo previo de judía en la mitad de las parcelas marcadas y se determinaron las densidades de población de los nematodos semanalmente durante 8 semanas. La tasa de reproducción de *M. arenaria* y *P. neglectus* fue del 45% y 44% respectivamente, en las parcelas sin laboreo, mientras que, donde se había realizado el laboreo del suelo fue del 17% y 10%, respectivamente. Los descansos entre cultivos reducen las densidades de población de *Meloidogyne* spp. y el laboreo del suelo, al iniciar un periodo de descanso incrementa esta reducción, aunque la tasa de supervivencia del nematodo variaba considerablemente entre ensayos.

#### **B4.2 FLUCTUACIÓN DE LAS DENSIDADES DE POBLACIÓN DE *Meloidogyne arenaria* RAZA 2 EN CULTIVARES DE TOMATE SUSCEPTIBLE Y RESISTENTE.**

Melero, R.<sup>1</sup>; Sorribas, F. J.<sup>1</sup>; Ornat, C.<sup>2</sup>; Verdejo Lucas, S.<sup>2</sup>.

1 Dpto. de Agronomía. ESAB. Comte d'Urgell 187. 08036 Barcelona.

2 Dpto. de Patología Vegetal. IRTA. Crta de Cabrils s/n. 08348 Cabrils, Barcelona.

Los cultivares de tomate resistente a *Meloidogyne* disminuyen la reproducción de *M. incognita*, *M. javanica* y *M. arenaria*. La temperatura del suelo es el principal factor que afecta a la expresión de la resistencia, y también, al desarrollo del nematodo. Así, temperaturas superiores a los 28°C rompen la resistencia y el nematodo necesita entre 600-700 grados acumulados (temperatura basal 10°C) para completar su ciclo de vida. La obtención de modelos que relacionen la fluctuación de las densidades de población de *Meloidogyne* con la planta huésped y la temperatura sería una herramienta útil para diseñar estrategias de control del patógeno. En este estudio se determinó la invasión radicular, velocidad de desarrollo y la fluctuación de las densidades de *M. arenaria* raza 2 en tomate resistente y susceptible y la relación de dichos parámetros con la temperatura del suelo. Para determinar el efecto del cultivar de tomate sobre la invasión y desarrollo del nematodo se trasplantaron 40 plantas del cultivar susceptible Rosa y del resistente cv. Merlin e intercalaron entre el cultivo comercial y se fueron arrancando durante las primeras 7 semanas del cultivo para determinar y cuantificar los diferentes estadios de desarrollo del nematodo en el interior de las raíces. La fluctuación de la densidad de población del nematodo se determinó a intervalos semanales hasta que finalizó el cultivo. La temperatura del suelo se registró con una sonda colocada a 15 cm de profundidad. La invasión de las raíces de los cultivares de tomate por el nematodo se observó desde la primera semana del estudio y ésta era menor en el cultivar resistente que en el susceptible. En el cultivar susceptible, se detectaron hembras y huevos (7 huevos/ hembra) 31 días después de del trasplante (343 grados acumulados) y el número de huevos fue incrementando progresivamente, mientras que, en los cultivares resistentes, no se detectaron hembras ni huevos al final del estudio. La densidad de *M. arenaria* en las parcelas con tomate susceptible incrementó 37 veces al final del cultivo y los máximos de población se registraron a 1.100, 1.400 y 1.780 grados acumulados. En las parcelas con tomate resistente la tasa de crecimiento de la población fue <1 y se detectaron máximos a 1.400 y 1.780 grados acumulados aunque estos eran de magnitud muy inferior a los registrados en el cultivar susceptible. Los resultados de este trabajo muestran la utilidad de los cultivares resistentes de tomate para limitar el desarrollo del nematodo. La relación entre los grados acumulados y las densidades de población de *Meloidogyne* debe ser estudiada durante más tiempo ya que podría aportar información de valor para realizar las intervenciones necesarias para mejorar su control.

#### **B4.3 DESARROLLO DE LAS DENSIDADES DE POBLACIÓN DE *Meloidogyne* spp. EN LECHUGA.**

Sorribas, F. J.<sup>1</sup>; Ornat, C<sup>2</sup>; Puigdomènech, P.<sup>1</sup>, Verdejo Lucas, S.<sup>2</sup>

*1 Dpto. de Agronomía. ESAB. Comte d'Urgell 187. 08036 Barcelona.*

*2 Dpto. de Patología Vegetal. IRTA. Crta de Cabrils s/n. 08348 Cabrils, Barcelona.*

*Meloidogyne* spp. es el principal género de nematodos fitoparásitos que causa daño de importancia económica en cultivos hortícolas. La rotación de cultivos es una práctica cultural para el control de nematodos fitoparásitos que además, contribuye a mantener la calidad agronómica del suelo. La amplia gama de plantas huéspedes del nematodo limita el uso de la rotación de cultivos, aunque esta práctica puede llevarse a cabo si se conoce la respuesta de la planta frente al nematodo en diferentes condiciones ambientales. La lechuga es la hortaliza, junto con el tomate, más cultivada en el litoral barcelonés y se plantan diversos tipos a lo largo de la campaña agrícola, pero en la actualidad, no existen cultivares comerciales con resistencia al nematodo. El objetivo del trabajo fue estudiar el desarrollo de las poblaciones de *Meloidogyne* en lechuga en distintas épocas del año en explotaciones comerciales hortícolas. Durante los años 1992 y 1993 se realizó un estudio de la fluctuación de las densidades de población de *Meloidogyne* spp. en parcelas donde se cultivaba lechuga en la secuencia de rotación. Las parcelas se muestrearon en pretrasplante (Pi) y al final del cultivo (Pf) y se calculó la tasa de crecimiento de la población (Pf/Pi). Los resultados de este estudio indicaron que la densidad de población del nematodo incrementaba cuando la lechuga se plantaba en verano, pero sin embargo, disminuía cuando se plantaba en otoño. Posteriormente, se llevaron a cabo cinco ensayos para determinar el desarrollo del nematodo, la severidad del ataque y el efecto del mismo sobre la producción de lechuga. Los resultados de los ensayos realizados corroboraron las observaciones de campo. En el primer ensayo realizado en 1993, la lechuga se cultivó en verano (julio-agosto) y la población inicial del nematodo, 1.300 nematodos/250 cm<sup>3</sup> suelo, incrementó 12 veces al finalizar el mismo. La producción de lechuga se redujo en un 36% respecto a las plantas control. En los cuatro ensayos restantes realizados en 1995, 1996 y 1997, la lechuga se cultivó en otoño-invierno (noviembre-febrero). La población inicial en los ensayos fue de 5 a 1.800 nematodos/250 cm<sup>3</sup> suelo. La tasa de crecimiento de la población fue inferior a 1 en todos los ensayos, la severidad del ataque osciló entre 0 y 2,5, (escala del 0 al 10), y no se registraron pérdidas de producción. Los resultados de este estudio sugieren que el cultivo de lechuga puede reducir las densidades de población de *Meloidogyne* en el litoral catalán durante la época de otoño-invierno ya que el nematodo no llega a producir huevos debido al efecto combinado de la temperatura y el tiempo de permanencia del cultivo en campo.

#### B4.4 PROSPECCIÓN NEMATOLÓGICA SOBRE PLATANERA EN TENERIFE (ISLAS CANARIAS) DURANTE 1997

Jaizme-Vega, M.C.<sup>1</sup>, González, A.<sup>2</sup>, Espino, A.<sup>2</sup> y Pinochet, J.<sup>3</sup>

1. Instituto Canario de Investigaciones Agrarias, Apdo. 60, 38200 La Laguna, Tenerife

2. Sección Laboratorio de Sanidad Vegetal, Apdo. 457, 38200 La Laguna, Tenerife

3. Agromillora Catalana S.A., El Rebato s/n, 08739 San Sadurni d'Anoia, Barcelona

Con el propósito de conocer la distribución en función de las condiciones climáticas y agroecológicas del cultivo de los distintos géneros de nematodos que atacan a la platanera en la isla de Tenerife, se estudiaron los datos obtenidos de los análisis nematológicos de las raíces recogidas en los muestreos sobre las dos variedades predominantes (Gran Enana y Pequeña Enana).

*Pratylenchus* sp. está homogéneamente distribuido en los cultivos al aire libre de la zona norte, con poblaciones más numerosas que en las explotaciones bajo invernadero. En las fincas de orientación sur, este nematodo se presenta con niveles poblacionales menores en ambos sistemas de cultivo.

La frecuencia de detección de *Meloidogyne* spp. en los suelos del norte de la isla es baja, salvo algunas excepciones en condiciones de invernadero. Sin embargo, las poblaciones de esta especie en las zonas del sur son importantes en los dos tipos de prácticas agrícolas, favorecidas en este caso por temperaturas más elevadas.

Las dos especies más comunes son *M. incognita* y *M. javanica* que normalmente se encuentran de manera conjunta con *Helicotylenchus* sp..

En todas las situaciones estudiadas, la mayor incidencia corresponde a nematodos del género *Pratylenchus*. Por el momento no se conoce la estimación de pérdidas que los nematodos ejercen sobre la producción de plataneras del archipiélago.

## B5.1 DINÁMICA DE LAS ENFERMEDADES DE LOS CULTIVOS

Segarra Bofarull, J.

*Departament de Producció Vegetal i Ciència Forestal. ETSEA. Universitat de Lleida. Av. Alcalde Rovira Roure, 177. 25198 Lleida.*

La planificación de una estrategia de control requiere de la comprensión de la dinámica de dicho patosistema. Tal conocimiento puede describirse mediante el lenguaje ordinario o bien abstraerlo al lenguaje matemático con las consiguientes ventajas. Se formula un modelo general de epidemias en cultivos y se analiza su dinámica.

La población huésped se divide en individuos susceptibles (S), latentes (E) e infecciosos (I). Se considera que la enfermedad se transmite de forma directa vía inóculo (W, densidad de inóculo) y que éste se produce y muere a una tasa constante  $h$  (inóculo infección<sup>-1</sup> día<sup>-1</sup>) y  $d$  (día<sup>-1</sup>), respectivamente. La tasa típica del proceso de infección viene dado por  $\beta * W * S$  donde  $\beta$  es la tasa de contacto. El crecimiento del cultivo se modeliza de forma logística  $r * S * ((S + E + I) / K)$  y se incluye una tasa de mortalidad constante ( $u$ ) en todos los compartimentos.

La dinámica del patosistema queda definida por el valor de la tasa reproductiva básica  $R_0$ , cuyo valor se obtiene analíticamente. Para valores  $R_0 < 1$  la enfermedad se extingue inexorablemente. En el caso opuesto, la persistencia de la enfermedad es posible a través de: a) oscilaciones que decaen, más o menos rápidamente, hacia un punto de equilibrio globalmente estable, o b) ciclos límite en el cual se producen epidemias recurrentes en el tiempo, para valores superiores de  $R_0$ , demostrado a través de numerosas simulaciones. El intervalo interepidémico varía según los valores de los parámetros. La afluencia constante de inóculo externo impide la extinción de la enfermedad y reduce la posibilidad de oscilaciones periódicas estables.

Los principales parámetros que influyen en  $R_0$  son la tasa de contacto, las tasas de producción y mortalidad del inóculo y la duración del periodo infeccioso. A mayor  $R_0$  menor es la densidad de individuos susceptibles en el cultivo. Creemos que la tasa reproductiva básica  $R_0$  puede ser un instrumento útil para evaluar y comparar la eficacia de las medidas de control. No obstante, en la actividad agrícola la interrupción del progreso de la enfermedad, por ejemplo mediante la cosecha del cultivo, justifica que medidas de control destinadas a retrasar el comienzo epidémico sean recomendables porque reducen la cantidad final de enfermedad, aunque de hecho éstas no influyan en  $R_0$ .

## C1.1 ALTERACIONES EN LA EXPRESION DE GENES DEL HUESPED ASOCIADAS CON LA REPLICACION VIRAL

Miguel Aranda, Margarita Escaler y Andy Maule.

*John Innes Centre, Norwich NR4 7UH, Reino Unido.*

La replicación del potyvirus del mosaico del guisante transmitido por la semilla tiene graves consecuencias en la expresión de genes del huésped. Por un lado, causa el cese de la expresión de una amplia gama de genes [Wang y Maule (1995), *Science* 267:229-231] y por otro está asociada con la inducción de HSP70 y poliubiquitina [Aranda et al. (1996), *PNAS USA* 93:15289-15293]. La trascendencia de estos efectos nos es todavía desconocida, pero bien pudieran ser requerimientos esenciales para la replicación viral, así como estar relacionados con cuestiones tan fundamentales como la inducción de los síntomas de la enfermedad [Aranda y Maule (1998), *Virology* 243:261-267].

Con objeto de averiguar si las alteraciones mencionadas son generales para otros virus de plantas, hemos analizado también la interacción de un tobnavirus y de un potexvirus con guisante. Los resultados muestran que en aquellas células donde la replicación viral es activa, no se detecta RNA correspondiente al gen que codifica lipoxigenasa, mientras que hay un aumento claro de la señal correspondiente a los RNAs de HSP70 y poliubiquitina. Es decir, la replicación viral parece desencadenar una respuesta a estrés caracterizada por la inducción de ciertos genes y la represión de otros asociados con el normal funcionamiento celular.

La respuesta de la planta a la replicación viral tiene un gran parecido con la respuesta a otros estreses abióticos. Durante choque térmico se produce también la inducción de HSP70 y poliubiquitina, así como la degradación de RNAs de genes de proteínas de secreción. El control transcripcional de HSP70 y poliubiquitina durante choque térmico está regulado por un factor de transcripción denominado HSF. Nosotros hemos aislado y caracterizado un HSF de guisante que, a su vez, es un gen de respuesta a choque térmico. Sin embargo, y en contraste con HSP70 y poliubiquitina, HSF no responde al estrés inducido por la replicación viral. Estos datos indican que el choque térmico y la replicación viral inducen respuestas diferentes, y sugieren que existen mecanismos específicos de control de expresión de genes durante el estrés inducido por la replicación de virus.



## C1.2 INDUCCIÓN ESPECÍFICA DE PROTEÍNAS PRs EN LA REACCIÓN DE DEFENSA DE *Capsicum chinense* FRENTE AL VIRUS DEL MOTEADO SUAVE DEL PIMIENTO.

Elvira, M. I., Gilardi, P., García Luque, I., Serra Yoldi, M.T.

*Dpto de Biología de Plantas. CIB.CSIC. C/ Velázquez 144. 28006 Madrid.*

La resistencia frente a los tobamovirus en *C. chinense* es mediada por una respuesta hipersensible (HR), que se manifiesta por la formación de lesiones locales necróticas. El factor viral responsable de la inducción de la HR es la proteína de cubierta (CP) de la cepa S del virus del moteado suave del pimiento (PMMoV-S) (Berzal-Herranz *et al.* 1995. *Virology* 209: 498).

La infección de *C. chinense* por los tobamovirus -en reacciones compatibles e incompatibles- va acompañada por la síntesis y acumulación de una serie de proteínas relacionadas con la patogénesis (PRs). De éstas, las proteínas p26i, p24, y p15n (Mr: 26, 24 y 15 kDa, respectivamente) se acumulan tanto en las reacciones compatibles como incompatibles, aunque el patrón de acumulación es diferente para cada tipo de interacción. Otras proteínas: p26, p15 y p14 (Mr: 26, 15 y 14 kDa, respectivamente) se inducen en los estadios iniciales de la infección (24 h.p.i.) solamente en las hojas inoculadas con la cepa inductora de la HR (PMMoV-S).

Análisis serológicos y de secuencia de las proteínas p26, p26i y p24 muestran que estas proteínas están estrechamente relacionadas con las proteínas semejantes a osmotina de tomate, aunque tienen distribuciones subcelulares diferentes. Las proteínas p26i y p24 se localizan intracelularmente mientras que la proteína p26 se acumula en los espacios intercelulares.

La proteína p15 ha sido caracterizada como una proteína PR del grupo 1, de la que se han identificado tres isoformas de pI 7,4, 9 y 10. Al igual que las proteínas p26 y p14, las isoformas básicas de la proteína p15 sólo se inducen durante la HR.

En las plantas de *C. chinense* inoculadas con el virus X de la patata (PVX) y un virus quimera derivado de PVX que expresa la proteína de cubierta de la cepa inductora de la HR (PVX-CPS), el patrón de expresión de las proteínas PRs es idéntico al observado cuando se utilizaron como inóculos las cepas PMMoV-I (compatible) y PMMoV-S (incompatible), respectivamente.

Estos resultados demuestran que la proteína p14 y las isoformas básicas de la proteína p15 se inducen específicamente en la HR y son marcadores de la activación de los mecanismos de resistencia en este huésped.

### **C1.3 LA PROTEÍNA DE LA INCLUSIÓN CILÍNDRICA (CI) DE UN POTYVIRUS CONTIENE SEÑALES PARA SU LOCALIZACIÓN EN LA PARED CELULAR DE CÉLULAS DEL MESÓFILO DE TABACO.**

Juan J. Bernal (1), Arthur G. Hunt (2), John G. Shaw (3) y Emilio Rodríguez-Cerezo (1).

(1) *Centro Nacional de Biotecnología-CSIC, Madrid, España.*

(2) *Department of Agronomy, University of Kentucky, Lexington, EEUU.*

(3) *Department of Plant Pathology, University of Kentucky, Lexington, EEUU.*

En un estudio reciente de localización celular de proteínas virales en estadios iniciales tras la infección de células del mesófilo de tabaco por el potyvirus TVMV (tobacco vein mottling virus) se han identificado proteínas y estructuras virales que probablemente están implicadas en el transporte de los potyvirus a través de los plasmodesmos (1). Asimismo se demostró la asociación de la proteína no estructural de la inclusión cilíndrica (CI) a la pared celular en estadios tempranos de la infección, formando estructuras cónicas en áreas concretas de contacto entre células. Estas inclusiones a veces contienen en su interior complejos lineares de RNA viral y proteína de la cápsida (CP), que pueden ser transferidos de una célula a otra, aunque se desconoce si estos complejos son auténticos viriones.

En este trabajo se ha estudiado la existencia de señales específicas en las proteínas CI y CP del potyvirus TVMV que fueran capaces de dirigir estas proteínas hacia localizaciones subcelulares concretas en ausencia de infección viral. Se han examinado secciones de células del mesófilo de plantas de tabaco transgénicas, que expresan individualmente los genes CI o CP. Mediante el uso de anticuerpos conjugados a oro coloidal se detectó CP en el citoplasma de dichas células, y no hubo acumulación en orgánulos celulares o en la pared celular. Sin embargo, el análisis de varias líneas de plantas transgénicas que expresan CI, mostró que dicha proteína se acumula en la pared celular, incluso en áreas donde no existe contacto entre células. No se observaron las inclusiones cilíndricas características que forma esta proteína en infecciones virales. Cuando se usaron células de insecto *Spodoptera frugiperda* (Sf9) para expresar CI o CP a partir de vectores derivados de baculovirus se observó un patrón de expresión de CP semejante, es decir su acumulación en el citoplasma. En cambio, CI se detectó inicialmente en áreas periféricas, asociada a la membrana celular, aunque posteriormente forma grandes inclusiones cristalinas equivalentes a las inclusiones cilíndricas presentes en infecciones virales. Estos resultados muestran que la proteína CI contiene señales específicas para su acumulación en la membrana o en la pared celular, aunque deben existir otros factores adicionales inducidos en la infección por TVMV para su localización en áreas específicas de la pared celular. Los datos obtenidos sugieren además que la CP carece de señales para unión a plasmodesmos, y que debe ser transportada por interacción con otras proteínas virales.

(1). Rodríguez-Cerezo et al. *Virology* 236, 296-306 (1997).

#### C1.4 INTERACCIONES ENTRE TOMBUSVIRUS Y DOS RNA SATELITES: IDENTIFICACION DE UN DETERMINANTE PARA LA ACUMULACION DE RNA SATELITE EN EL EXTREMO 5' DEL RNA VIRAL

Celix, A.<sup>1</sup>, Burgyan, J.<sup>2</sup> Y Rodríguez-Cerezo, E.<sup>1</sup>

1. Centro Nacional de Biotecnología-CSIC. Campus de Cantoblanco. 28049 Madrid.

2. Agricultural Biotechnology Center, Godollo, Hungría.

Recientemente se han caracterizado dos RNAs satélites (sat) asociados a aislados naturales del virus del enanismo ramificado del tomate (TBSV, miembro tipo del género *Tombusvirus*) obtenidos de cultivos de berenjena y tomate: el satB1 (824nt) y el satB10 (613nt). La obtención de clones infectivos de ambos satélites ha permitido estudiar su efecto sobre los síntomas inducidos por las cepas Cherry y BS3 de TBSV, así como la acumulación de RNA viral, en ensayos realizados en *Nicotiana benthamiana*, berenjena y tomate. La presencia del satB10 en el inóculo atenuó los síntomas en todos los casos, mientras que el satB1 no modificó los síntomas. El satB10 reduce dramáticamente la acumulación de RNA genómico viral, mientras que el satB1 o no tiene efecto o la reduce ligeramente. Ensayos en protoplastos de *N. benthamiana* demuestran que el efecto atenuante del satB10 se debe a que interfiere en la replicación del virus ayudante. Se ha estudiado la capacidad de distintos tombusvirus de mantener los RNA satB1 y B10. Además de TBSV, se estudiaron el virus de la mancha en anillo del *cimbidium* (cymbidium ringspot virus, CymRSV) y el virus de la mancha en anillo del clavel italiano (carnation italian ringspot virus, CIRV) usando *N. benthamiana* como huésped común. Tanto CymRSV como CIRV fueron capaces de mantener los RNA sat de TBSV. El efecto sobre los síntomas y la acumulación de RNA viral fue en todos los casos similar al descrito para TBSV-Ch. Ambos satélites alcanzan niveles similares en tejido infectado para cada virus, con la excepción de CIRV, que resultó ser un *helper* poco eficaz del satB1. CIRV se distingue del resto de los tombusvirus por el mayor tamaño de su ORF1 que comienza en un AUG 66 nucleótidos anterior al AUG iniciador de otros tombusvirus. Utilizando una colección de virus quiméricos CIRV-CymRSV hemos mapeado la incapacidad de CIRV de mantener altos niveles del satB1 en el extremo 5' de la molécula, incluyendo la zona 5' no codificante y la mitad N-terminal de la ORF1. Posteriormente, utilizando un mutante puntual de CIRV que elimina el primer codón de iniciación hemos demostrado que esta mutación es suficiente para restaurar la capacidad de mantenimiento del satB1 a altos niveles. Por tanto, la proteína p33 (producto de la ORF1) de CIRV es menos eficaz que la homóloga de otros tombusvirus en la replicación del satB1. Una explicación alternativa sería que el menor tamaño de la p33 en el mutante puntual permitiera una mejor accesibilidad a secuencias conservadas que están presentes en la zona 5' no codificante del genoma de los tombusvirus.

## C1.5 IDENTIFICACION DE DETERMINANTES DE PATOGENICIDAD EN EL VIROIDE DEL MOTEADO CLORÓTICO DEL CRISANTEMO

De la Peña, M. , Navarro, B., Flores, R.

*Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas (UPV-CSIC), Universidad Politécnica de Valencia, Camino de Vera, 14, 46022 Valencia.*

La naturaleza viroidal de la enfermedad del moteado clorótico del crisantemo fue propuesta hace más de veinte años (1) pero sólo recientemente se ha identificado y caracterizado el patógeno (CChMVd). Es un RNA circular de 398-399 bases con ribozimas de cabeza de martillo en sus cadenas de ambas polaridades y que adopta una conformación ramificada como su estructura secundaria más estable *in vitro* (2). La existencia de cepas no sintomáticas de este mismo agente (CChMVd-NS) en clones de algunas variedades de crisantemo, fue postulada sobre la base de que estas plantas no mostraban síntomas al ser inoculadas con la cepa sintomática (CChMVd-S) (3). Con objeto de verificar esta hipótesis preparaciones de RNA de las plantas presumiblemente infectadas por la cepa CChMVd-NS fueron analizadas por hibridación *Northern* con una sonda de cRNA específica del CChMVd-S. Los resultados mostraron la presencia en estas plantas de señales en las posiciones correspondientes a las moléculas circulares y lineales del RNA viroidal, comprobándose así de forma directa la presencia de un RNA (CChMVd-NS) de tamaño y secuencia muy similares al CChMVd-S.

La caracterización molecular de varios clones de CChMVd-NS obtenidos por RT-PCR con dos parejas de cebadores adyacentes mostró dos mutaciones, localizadas en el dominio correspondiente a la ribozima de polaridad negativa, sólo presentes en la mayoría de los clones del CChMVd-NS: la secuencia del bucle 2 es GAAA (y no UUUC como en CChMVd-S), y el nucleótido entre las secuencias conservadas CUGA y GA es una C (y no una U como en CChMVd-S). Con el fin de analizar directamente el papel de estas mutaciones, y en particular de la primera de ellas que parece más importante, se introdujo la misma por mutagénesis dirigida en un clon de CChMVd-S y se llevaron a cabo bioensayos en crisantemo para observar su efecto: el clon de partida indujo un fenotipo sintomático mientras que el mutado produjo una infección asintomática. El nivel de acumulación del RNA viroidal, estimado por hibridación puntual, fue similar en ambos casos. Estos resultados muestran que la mutación en el tetrabucle 2 de la ribozima de polaridad negativa del CChMVd es suficiente para transformar una secuencia patogénica en otra latente, y que ésta es una característica intrínseca de la molécula no relacionada con su nivel de acumulación en el tejido.

1. Horst, R. K. (1975). *Phytopathology* 65: 1000-1003.
2. Navarro, B. and Flores, R. (1997). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 11262-11267.
3. Dimock, A.W., Geissinger, C.M. and Horst, R. K. (1971). *Phytopathology* 61: 415-419.

## C1.6 PROPIEDADES DE UNIÓN A RNA DE LA PROTEÍNA p23 DEL VIRUS DE LA TRISTEZA DE LOS CÍTRICOS.

López, C.<sup>1</sup>, Navas-Castillo, J.<sup>2</sup>, Guerri, J.<sup>3</sup>, Moreno, P.<sup>3</sup>, Flores, R.<sup>1</sup>

1. Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas (UPV-CSIC), Universidad Politécnica de Valencia, Camino de Vera 14, 46022 Valencia.
2. Estación Experimental La Mayora, CSIC, Algarrobo-Costa, Málaga.
3. Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias, Apdo. Oficial, Moncada, Valencia.

El marco de lectura abierta más próximo al extremo 3' del RNA del virus de la tristeza de los cítricos (CTV) codifica una proteína de 23 kDa cuya presencia es única entre los miembros del género closterovirus. La existencia en la misma de un grupo de aminoácidos cargados positivamente, adyacente a otro grupo con capacidad potencial de formar un "dedo de zinc", sugirió que p23 podría tener propiedades de unión a RNA y estar implicada en la regulación de la expresión del genoma viral.

Para confirmar esta propiedad de unión a RNA, una proteína de fusión conteniendo p23 fue sobreexpresada en *Escherichia coli* y purificada por cromatografía de afinidad en resina de amilosa. Experimentos de retardo en gel y entrecruzamiento promovido por luz ultravioleta, indicaron que la proteína recombinante une RNA de simple cadena cooperativamente sin especificidad de secuencia. Los análisis de competición demostraron que p23 se une más fuertemente a RNA de simple hebra que al resto de ácidos nucleicos. Además, la formación del complejo RNA-proteína fue estable a altas concentraciones de NaCl. Esta actividad *in vitro* no fue afectada al eliminar 74 aminoácidos internos próximos al extremo C-terminal. Sin embargo, otras deleciones afectando al dominio básico (17 aminoácidos), al supuesto "dedo de zinc" (20 aminoácidos) o a los dos (37 aminoácidos), eliminó totalmente la capacidad de unión a RNA en ensayos de tipo Northwestern. Estos resultados parecen indicar que tanto el dominio básico como el "dedo de zinc" son esenciales para la unión de la proteína p23 al RNA.

El papel funcional último que juega p23 en el ciclo replicativo viral está por demostrar. Plantas transgénicas que sobreexpresen p23 podrían ayudar a clarificar este papel y a obtener una posible fuente de resistencia derivada del patógeno.

### **C1.7 DESCRIPCIÓN INICIAL DE LA CITOPATOLOGÍA PRODUCIDA POR “Cucumber yellow stunting disorder crinivirus” (CYSDV) EN *Cucumis sativus* L.**

Rodrigo G<sup>1</sup>, Berdiales, B<sup>2</sup>., Rodríguez-Cerezo E<sup>2</sup>., Medina V<sup>1</sup>.

1. *Departament de Producció Vegetal i Ciència Forestal. Universitat de Lleida (UdL). Avda. Alcalde Rovira Roure 177, 25198 Lleida.*
2. *Centro Nacional de Biotecnología-CSIC, Cantoblanco, 28049 Madrid.*

CYSDV (“Cucumber yellow stunting disorder crinivirus”), citado en España por primera vez en 1996, ha sido objeto de un estudio inicial, al microscopio óptico (MO) y al microscopio electrónico de transmisión (MET), para determinar las zonas del tejido vegetal en las que se produce la infección y así, establecer las similitudes o diferencias que presentan los cambios ultraestructurales inducidos por él con lo ocasionados por el miembro tipo de su género, LIYV (“Lettuce infectious yellows crinivirus”). Para ello, muestras de hojas de pepino sano e infectado en diferentes estados fenológicos y/o grados de infección, se incluyeron en resina siguiendo un protocolo estándar, y se obtuvieron secciones semifinas y ultrafinas de las mismas para su observación. Se ha comprobado que la infección se localiza únicamente en el tejido vascular del floema, produciendo las típicas vesículas membranosas de los closterovirus, que las partículas semejantes a virus pueden agregarse formando paquetes y que, ya en zonas con síntomas incipientes de la enfermedad, la necrosis de las células puede dificultar la observación de la acción viral. Otras alteraciones producidas por CYSDV, semejantes o no a las producidas por LIYV, son discutidas también.

## **C1.8 DISTRIBUCIÓN ESPACIO-TEMPORAL DEL VIRUS DEL MOTEADO DEL CLAVEL (CarMV) EN PLANTAS DE *C. quinoa* CRECIDAS EN CONDICIONES QUE FAVORECEN LA INFECCIÓN LOCAL O LA INVASIÓN SISTÉMICA.**

S. García-Castillo, J.F. Marcos, V. Pallás y M.A. Sánchez-Pina

*Dpto. de Mejora y Patología Vegetal, CEBAS (CSIC), Apto. 4195, 30080 MURCIA*

En la práctica, la importancia de una determinada virosis viene condicionada por la capacidad del virus de invadir sistémicamente la planta. Esta invasión sistémica depende tanto de su capacidad para replicarse en las células inicialmente infectadas como del movimiento a corta o a larga distancia. El primero de estos dos tipos de movimiento es relativamente lento (micrómetros por hora) e implica el transporte célula a célula a través de los plasmodesmos, mientras que el segundo es relativamente rápido (centímetros por hora) e implica normalmente el tejido vascular. En los últimos años se ha abordado de manera considerable el estudio de las rutas que los virus utilizan para moverse tanto de una célula a otra como a las partes distales de la planta. Sin embargo, mucha menos atención ha recibido el estudio sobre los distintos factores que pueden condicionar o favorecer una infección sistémica.

El CarMV ocasiona la aparición de lesiones locales en las hojas del huésped experimental *C. quinoa* en determinadas condiciones experimentales de crecimiento (cámaras de crecimiento controladas con fotoperiodos de 16 horas de luz y a temperaturas medias diurnas y nocturnas de 24 °C y 18 °C, respectivamente). Sin embargo, en condiciones de invernadero, el CarMV habitualmente invade de forma sistémica las mismas plantas experimentales. El nivel de acumulación del virus (determinado mediante hibridación molecular) y el tamaño de las lesiones locales son similares en ambas condiciones sugiriendo que ni diferencias en la replicación y/o multiplicación ni en el movimiento célula-célula pueden explicar las diferencias de respuesta observadas. Análisis inmunocitoquímico y de hibridación *in situ* pusieron de manifiesto que en las hojas inoculadas el virus invade los mismos tipos celulares en ambos casos. A pesar de que el virus se detectó en concentraciones similares en células floemáticas de hojas inoculadas en las dos condiciones experimentales utilizadas, sólo alcanzaba el tallo y las partes distales de la planta (peciolo y tejido vascular de hojas sistémicas) en las plantas cultivadas en condiciones de invernadero, de manera análoga a lo observado en infecciones naturales en plantas de clavel. Estos resultados son similares a los observados en ciertos mecanismos de resistencia viral (p.e. Dufour y col., 1989; Can. J. Plant Pathol. 67, 655-660) y ponen de manifiesto que diversos factores ambientales pueden condicionar la infección sistémica viral de manera análoga a dichos mecanismos de resistencia.

Trabajo financiado por Proyecto BIO96-0459 de la DGICYT.

## C1.9 MOVIMIENTO DE PARTÍCULAS VIRALES EN EL FLOEMA.

Laureano Simón Buela y Fernando García-Arenal.

*E.T.S.I. Agrónomos. Universidad Politécnica de Madrid.*

Para establecer una infección sistémica en una planta, un virus debe moverse desde la primera célula infectada a las células vecinas a través de los plasmodesmos, puentes citoplasmáticos que conectan células adyacentes, y a larga distancia a través del tejido vascular. Se ha caracterizado el movimiento célula a célula de distintos virus pero el movimiento sistémico continúa siendo una gran incógnita. Generalmente se acepta que la mayoría de los virus que infectan plantas se mueven sistémicamente a través de los tubos cribosos del floema.

Se ha demostrado que la proteína de la cápsida (CP), que envuelve y protege el genoma viral, es necesaria para el movimiento sistémico de la mayoría de los virus estudiados. Cepas mutantes del virus del mosaico del tabaco que producían una CP que no encapsidaba el RNA genómico viral, o que presentaban mutaciones en el origen de encapsidación de ese RNA viral, no eran capaces de establecer una infección sistémica. Estos y otros resultados sugieren que el virus podría moverse sistémicamente como un virión completo, o como un complejo riboproteico formado por el RNA viral, la CP y probablemente otras proteínas virales y/o de la planta huésped.

Hemos abordado la caracterización de la forma(s) en que los virus se mueven a larga distancia analizando el sistema pepino/virus del mosaico moteado verde del pepino (CGMMV). Las ventajas de este sistema experimental son la posibilidad de recoger cantidades moderadas de floema de entrenudos seccionados de pepino y los altos títulos de infección que alcanzan los miembros del género Tobamovirus, entre los que se encuentra CGMMV, en los tejidos de la planta huésped.

Hemos detectado la CP de CGMMV en exudados de floema empleando técnicas inmunoquímicas (western blot). El RNA genómico también estaba presente, como delató su amplificación por RT-PCR. La amplificación sólo era posible tras realizar una extracción fenólica, indicando que el RNA de CGMMV estaba protegido en el floema de las plantas infectadas, posiblemente a través de la asociación con proteínas. Hemos cuantificado el grado de protección analizando la resistencia de esas estructuras riboproteicas a la digestión con RNAsa A. El resultado fue que el RNA de CGMMV presente en el floema es 2.500 veces más resistente a la digestión con RNAsa A que el RNA encapsidado en viriones purificados. También descubrimos que el RNA de los viriones purificados alcanzaba los niveles de resistencia del RNA presente en el floema, si mezclábamos los viriones purificados con exudado de floema procedente de plantas no inoculadas con el virus.

La estructura viral presente en el floema de pepinos infectados también presentaba el mismo perfil de sedimentación en gradientes de sacarosa y cloruro de cesio, y por tanto el mismo peso y densidad isopícnica, que los viriones purificados. Finalmente, tinciones negativas de las fracciones del gradiente de sacarosa revelaron en un microscopio electrónico la presencia de viriones en forma de bastón y de 300 nm de longitud en el exudado de floema de plantas infectadas, la misma estructura y longitud que los viriones purificados de CGMMV.

Los resultados sugieren que el movimiento viral en el floema se realiza principalmente, sino únicamente, en forma de partículas virales estabilizadas.



**C1.10 CARACTERIZACIÓN DE UN AISLADO DEL VIRUS DEL BRONCEADO CAPAZ DE ROMPER LA RESISTENCIA DEL GEN *Tsw* EN PLANTAS DE *C. chinense* PI 159236\*.**

Trad, J.<sup>1</sup>, Aarden, H.<sup>2</sup>, Hernández, A.<sup>2</sup>, Serra, M.T.<sup>1</sup> y Díaz-Ruiz J.R.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Departamento de Biología de Plantas, Centro de Investigaciones Biológicas, CSIC, Velázquez 144, 28006 Madrid.*

<sup>2</sup>*Western Seed España, S.A., Bajada Playa de Vargas S/N, 35260 Agüimes, Las Palmas de Gran Canaria.*

**El virus de las manchas bronceadas del tomate (TSWV) o virus del bronceado, produce pérdidas económicas en cultivos de hortícolas, frutícolas y ornamentales, tanto en España como en el resto del mundo.**

**Recientemente hemos estudiado en el laboratorio una infección viral mixta en una muestra de fruto de pimiento con síntomas de anillos cloróticos, procedente de un invernadero de experimentación de los programas de mejora genética de pimiento y tomate de la empresa Western Seed España, S.A. en Canarias.**

**Estos dos virus han sido separados e identificados como el patotipo P<sub>1,2,3</sub> del tobamovirus del moteado suave del pimiento (PMMoV) y el tospovirus de las manchas bronceadas del tomate (TSWV). Este aislado, denominado TSWV-PC97, ha sido caracterizado biológica y serológicamente, comparándolo con otros aislados españoles de TSWV y se ha comprobado que pertenece al serogrupo 1 y que tiene el mismo rango de huéspedes que los demás aislados, excepto que es capaz de romper la resistencia conferida por el gen *Tsw* en plantas de *C. chinense* “PI 159236”, donde los demás aislados permanecen localizados en las hojas inoculadas. Se ha establecido que esta resistencia frente a los aislados de TSWV es estable a diferentes temperaturas entre 24°-32°C y que la respuesta de *C. chinense* “PI 159236” no presenta las características típicas de las reacciones de tipo hipersensible. Se ha descartado también que la capacidad de TSWV-PC97 de sobrepasar la resistencia sea debida a algún tipo de complementación por el patotipo P<sub>1,2,3</sub> de PMMoV.**

**Se ha determinado la secuencia de nucleótidos del gen N de la nucleocápsida de TSWV-PC97 y del aislado español TSWV-C, previamente caracterizado y utilizado como referencia. Se ha visto que tienen una identidad de homología del orden del 95-98% entre ellos y con las secuencias conocidas de otros aislados de TSWV, no habiéndose encontrado diferencias significativas, confirmando la pertenencia de TSWV-PC97 al serogrupo 1 de TSWV.**

**Estos resultados pueden tener significación epidemiológica y apuntan a que el aislado TSWV-PC97 ha podido surgir a raíz de una presión selectiva debida a la presencia del gen *Tsw* de resistencia en los experimentos de invernadero.**

**\*Este trabajo ha sido parcialmente financiado con un Contrato de Investigación Western Seed España, S.A.-CIB (CSIC).**

## C1.11 EVALUACIÓN DE DISTINTOS HÍBRIDOS DE TOMATE COMERCIAL RESISTENTES AL VIRUS DEL BRONCEADO (TSWV).

Aramburu de Vega J. y Rodriguez Nogueiras M.

*I.R.T.A. Departamento de Patología. Ctra. de Cabrils s/n 08348 Cabrils (Barcelona).*

El cultivo del tomate en España, que se desarrolla mayoritariamente en toda la franja mediterránea, se ha visto condicionado en los últimos años por la enfermedad del bronceado causada por el *tomato spotted wilt virus* (TSWV), coincidiendo con la entrada en nuestro país del insecto vector que lo transmite, el trips *Frankliniella occidentalis* Perg. Debido a la amplia gama de huéspedes del virus y del vector y a que su forma de transmisión es de tipo persistente, las medidas preventivas no resultan muy eficaces. Solamente la introducción de híbridos de tomate resistentes al virus parece haber resultado efectiva, aunque esto ha supuesto cambios en la epidemiología de la enfermedad.

Con el propósito de evaluar estos tomates resistentes se ha realizado un estudio comparativo de 12 líneas híbridas de tomate que en fase de comercialización o desarrollo poseen las principales casas productoras de semillas. Se ha realizado un ensayo comparativo de infección en condiciones de campo y mediante ensayos controlados de infección, bien por inoculación mecánica con 4 aislados previamente caracterizados y bien mediante trips virulíferos puestos a alimentar directamente sobre los frutos.

Los resultados obtenidos indican que 2 de las líneas fueron susceptibles y 10 fueron resistentes, debido en todos los casos a la presencia del gen SW5 procedente de *L. peruvianum*. En estas líneas hay un pequeño porcentaje de plantas que probablemente no han incorporado la resistencia y son susceptibles. El gen SW5 confiere una resistencia parcial que hace que el virus este en estado de latencia con bajas tasas de replicación, pero que puede ser sobrepasado en algunos casos por causas no determinadas, aunque en nuestros ensayos queda descartado que sea debido a cambios en la patogenicidad del virus. La causa de síntomas muy característicos en forma de anillo, que aparecen de forma aleatoria en los frutos, se ha demostrado en ensayos de transmisión controlada, que son como consecuencia de infección por picadas directas de trips virulíferos.

## C1.12 SECUENCIAS COMPLEMENTARIAS Y SIMILARES FACILITAN LA FORMACIÓN DE RNAs DEFECTIVOS INTERFERENTES EN EL BROMOVIRUS MOTEADO DEL HABA (BBMV).

Romero Javier<sup>1</sup>, Pogany Judit<sup>2</sup>, Llamas Susana<sup>1</sup>, Bujarski Jozef<sup>2</sup>.

*1 Departamento de Protección Vegetal, INIA. Autopista A-6 Km 7,5 28040-Madrid.*

*2 Plant Molecular Biology Center, Northern Illinois University, DeKalb IL 60115 USA.*

Los RNAs defectivos interferentes (DI-RNAs) representan genomas virales incompletos y dependen del virus del cual proceden para su acumulación y diseminación. Los DI-RNAs son parásitos de su virus auxiliares y pueden modular la severidad de las enfermedades virales. Para estudiar el mecanismo de formación de los DI-RNAs en el BBMV, utilizamos como modelo un sistema mixto compuesto de los RNAs del BBMV raza Ba y un DI-RNA artificial construido a partir del RNA2 de la raza Mo y un DI de la raza Tu, esta construcción fue estable en diversos pases a través de haba. Para reducir el número de pases sobre una planta para obtener DI-RNAs nuevos, duplicamos 60 nt de la secuencia de la DI y la insertamos en el sitio Msc I en orientación directa o inversa, las cuales fueron coinoculadas separadamente con el virus auxiliar a plantas de haba. Análisis de la progenie nos demostró que el DI-RNA fue estable en tamaño en algunas plantas, mientras que otras mostraron la presencia de moléculas más pequeñas que al ser secuenciadas se observó que eran derivadas de los DI-RNAs inoculados. De estos resultados concluimos que secuencias complementarias entre partes distantes de los DI-RNAs facilitan los efectos de la delección, incrementando la frecuencia de los eventos que llevan a la formación *de novo* DI-RNAs. Se proponen los posibles modelos que intervienen en la formación de estas moléculas.

### C1.13 TOLERANCIA SISTÉMICA ADQUIRIDA EN PEPINOS INFECTADOS CON VIROIDES

Chaffai, M., Bellés, J.M., Hinarejos, C., Tuset, J.J., López, M.M., Duran-Vila, N.

*Departamento de Protección Vegetal y Biotecnología. Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias. Apartado oficial. 46113 Moncada. Valencia.*

El pepino es un excelente huésped de tres viroides: el viroide de la exocortis de los cítricos (CEVd), el viroide del enanismo del lúpulo (HSVd) y el viroide IV de los cítricos (CVd-IV), el cual comparte homología de secuencia con los otros dos. Los pepinos infectados con CEVd o CVd-IV son indistinguibles de los controles no inoculados, mientras que todas las variantes de HSVd estudiadas inducen síntomas característicos de enanismo, epinastia y arrugamiento de hojas.

Las plantas de pepino infectadas con CEVd o CVd-IV aunque asintomáticas presentan la síntesis y/o acumulación de una proteína de 28kDa que no se detecta en los controles no inoculados ni en las plantas infectadas con HSVd. Dicha proteína también se induce mediante aplicaciones exógenas de ácido salicílico, pero su acumulación en las plantas infectadas con viroides no parece estar mediada por un aumento en los niveles de ácido salicílico endógeno.

Con el objetivo de investigar si las plantas de pepino infectadas con viroides presentaban el fenómeno conocido como “resistencia sistémica adquirida” (SAR), se desarrolló un bioensayo que permitiera evaluar y cuantificar la respuesta de hojas de pepino frente a la infección con hongos y bacterias. Empleando este sistema se determinó la expresión de SAR frente a: *Fusarium oxysporum*, *Botrytis cinerea*, *Phytophthora cinamomi*, *Phytophthora parasitica*, *Phytophthora citrophthora*, *Pythium aphanidermatum*, *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* y *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans*. Las plantas infectadas con CEVd o CVd-IV así como las tratadas con ácido salicílico mostraban tolerancia frente a los hongos, y en menor grado frente a las dos bacterias estudiadas.

Se investigó también la tolerancia de las plantas infectadas con CEVd a la posterior inoculación con HSVd o CV-IV, y la de las plantas infectadas con CVd-IV a la posterior inoculación con HSVd o CEVd.

#### **C1.14 ESTUDIOS ANATÓMICOS Y REPRODUCCIÓN DEL DECAIMIENTO CAUSADO POR EL VIRUS DE LA TRISTEZA EN NARANJO DULCE INJERTADO SOBRE NARANJO AMARGO.**

Román Peruyero, M.P.<sup>1</sup>, Pina, J.A.<sup>1</sup>, García, A.<sup>2</sup>, Juárez, J.<sup>1</sup>, Navarro, L.<sup>1</sup>, Cambra, M.<sup>1</sup>,

1. Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias. Apartado Oficial, 46113 Moncada, Valencia.

2. Universidad Politécnica de Valencia. Departamento de Biología Vegetal. Camino de Vera, 14, 46022, Valencia.

La muerte del naranjo dulce (*Citrus sinensis* L. (Osb.)) injertado sobre naranjo amargo (*Citrus aurantium* L.) es la última fase del decaimiento producido por CTV. En campo este decaimiento puede tener lugar de manera lenta durante años o de manera repentina (colapso). No obstante, en invernadero nunca se ha logrado la muerte de plantas infectadas. Con estos antecedentes, se inició un estudio en invernadero encaminado a reproducir la muerte de plantas infectadas con aislados de CTV (T-388, T-300 y T-302, severo, moderado y suave, respectivamente) y conocer los cambios anatómicos que estos aislados pueden ocasionar en las plantas. Para ello se injertaron yemas de naranjo dulce, en naranjo amargo. Cuando las plantas crecieron se aplicaron distintos tratamientos (anillado, poda de raíces, tipo de sustrato) para determinar su posible influencia en el decaimiento y muerte de las plantas infectadas. En paralelo, se realizó un estudio anatómico de la corteza del naranjo dulce (2 cm encima del injerto), corteza de naranjo amargo (2 cm debajo del injerto) y de las hojas de las plantas del ensayo.

Las primeras muertes súbitas se produjeron a los 18 meses y tras 3 años se ha observado la muerte de 9 de las 30 plantas infectadas con el aislado común T-300 y 5 de las 30 infectadas con T-302. Las plantas infectadas con el aislado T-388 han ido declinando lentamente, con una fuerte reducción de longitud del tallo y ramas, así como el tamaño de hojas, presentando éstas amarilleamiento, acorchamiento y aclaramiento nervial. En el estudio anatómico los resultados indicaron grandes cambios a nivel de la corteza, tanto del floema como del cortex y de las hojas de las plantas infectadas con CTV en relación a las plantas sin infectar. Los datos obtenidos podrían contribuir a determinar las causas y condiciones en las que se produce el decaimiento y muerte de plantas por CTV.

## **C1.15 MUTACIONES EN EL EXTREMO AMINO DE LA PROTEINA “HELPER” (HC) AFECTAN A LA TRANSMISIÓN POR PULGONES DEL VIRUS DEL GRABADO DEL TABACO (TEV).**

Llave Correas, C., Martínez García, B. Díaz Ruíz, J.R., López Abella, D.

*Dpto. de Biología de Plantas. Centro de Investigaciones Biológicas. C.S.I.C., Velázquez 144, 28006 Madrid.*

El proceso de transmisión de virus por pulgones en el género *Potyvirus* (familia Potyviridae) requiere la participación activa de dos proteínas de origen viral: la proteína de la cápsida (CP) y el factor de transmisión “helper component” (HC). El factor HC es una proteína multifuncional implicada también en otros procesos como los movimientos célula a célula y sistémico del virus dentro de la planta.

Análisis mutacional y de secuencias han permitido mapear dominios esenciales para la transmisión en las regiones amino (KITC) y carboxilo (PTK) del HC en distintos potyvirus. Con el fin de identificar otras posibles regiones o residuos aminoacídicos determinantes de la actividad biológica del HC en transmisión hemos obtenido nueve mutantes para la región amino de esta proteína en el Virus del Grabado del Tabaco (TEV) utilizando el clon infeccioso pTEV 7DA cedido por el Dr. J.C. Carrington. Los cambios provocados afectan a residuos altamente conservados en diferentes potyvirus. Algunas mutaciones reproducen cambios encontrados en aislados españoles no transmisibles del Virus Y de la Patata (PVY).

Todos los mutantes analizados resultaron infecciosos en plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum* L. cv. Xanthi nc.) mostrando síntomas idénticos a los producidos por la variedad salvaje TEV HAT. Se comprobó por secuenciación directa que todas las mutaciones eran retenidas en la progenie viral. Igualmente el patrón de acumulación viral fue similar en todos los mutantes y en TEV HAT y TEV 7DA. Los experimentos de transmisión planta a planta por pulgones revelaron que mutaciones en algunas posiciones conservadas resultan en la pérdida de transmisibilidad del TEV. Esto indica que otros aminoácidos además de los motivos KITC y PTK podrían estar involucrados en la funcionalidad de la proteína HC durante el proceso de transmisión de potyvirus por pulgones.

Financiado por los proyectos CICYT PB 94-0023 y CAM 07B-0024-1997.

## **C1.16 CARACTERIZACIÓN DE LOS AISLADOS DE CÍTRICOS DEL VIROIDE DEL ENANISMO DEL LÚPULO (HSVd): FACTORES QUE DETERMINAN SU PATOGENICIDAD.**

Palacio, A., Duran-Vila, N

*Departamento de Protección Vegetal y Biotecnología. Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias. Apartado oficial. 46113 Moncada. Valencia.*

El grupo II (CVd-II) del complejo de viroides de los cítricos se puede definir como una familia de variantes del viroide del enanismo del lúpulo (HSVd). Dentro de este grupo se encuentran aislados patogénicos y aislados no patogénicos. Los aislados patogénicos inducen la enfermedad de la cachexia-xiloporosis que se caracteriza por la formación de hendiduras en la cara cambial de la madera que normalmente va acompañada de exudaciones de goma, decaimiento general del árbol e incluso su muerte.

Se han caracterizado 7 aislados mediante la obtención de DNA-viroide por retrotranscripción y amplificación por PCR, clonaje y secuenciación de los clones más representativos. Los clones a secuenciar se seleccionaron en base a la información obtenida mediante el análisis conformacional de DNA monocatenario (SSCP).

La heterogenicidad entre aislados osciló entre 96% y 99.7%. Se identificaron variantes dentro de los 6 aislados patogénicos que representaban una variabilidad entre 98% y 99.7%, mientras que el aislado no patogénico resultó ser muy conservado. Dicha variabilidad afecta todos los dominios estructurales de la molécula del viroide excepto el bucle terminal izquierdo (TCH) y la región central conservada (CCR), en la que se encontró un solo cambio en uno de los clones analizados. El dominio variable (V) resultó ser muy conservado, lo cual ha permitido identificar 5 nucleótidos característicos que diferencian los aislados patogénicos de los no patogénicos.

La estructura de menor energía libre de todos los aislados, tanto patogénicos como no patogénicos, es la de bastón, característica de los viroides típicos. Se ha identificado en los aislados patogénicos una posible conformación sub-óptima que no parece que puedan adoptar los aislados no patogénicos y en la que parecen estar implicados los 5 nucleótidos característicos del dominio V.

## C2.1 UNA COMPLEJA CASCADA DE REGULACION CONTROLA LA EXPRESIÓN DE LOS GENES *hrp* EN *Ralstonia solanacearum*

Brito, B., Marena, M., Barberis, P., Arlat, M., Genin, S., Boucher, C.

*Laboratoire de Biologie Moleculaire des Relations Plantes-Microorganismes. CNRS-INRA. 31326 Castanet-Tolosan cedex. Francia.*

*Ralstonia solanacearum* es el agente causal del marchitamiento bacteriano de las solanáceas. Al igual que en otras bacterias fitopatógenas, los genes *hrp* (de hypersensitive response and pathogenicity) en *R. solanacearum* controlan su patogenicidad en plantas huésped, así como la capacidad de provocar la respuesta hipersensible en plantas resistentes. Genes homólogos a los genes *hrp* se han identificado en bacterias patógenas animales, en donde sus productos génicos están implicados en la formación y ensamblaje de una maquinaria de secreción de proteínas denominada, sistema de secreción de tipo III.

La agrupación de genes *hrp* de la cepa GMI1000 de *R. solanacearum* está organizada en al menos 5 unidades de transcripción cuya expresión se induce en medio mínimo por medio del regulador HrpB. Recientemente, hemos demostrado que la expresión de los genes *hrp* se activa fuertemente durante el co-cultivo con suspensiones celulares de *Arabidopsis thaliana* y tomate, huéspedes de *R. solanacearum*. Esta activación depende del producto del gen *prhA*, localizado a la izquierda de la agrupación de genes *hrp*, que codifica una proteína receptora de membrana externa, por lo que postulamos que PrhA podría actuar como receptor de una señal procedente de la planta huésped que sería transducida al regulador HrpB a través de una nueva vía de regulación.

La caracterización génica de una región de 4 kb cadena abajo de la agrupación de genes *hrp* ha revelado la presencia de 4 pautas de lectura abierta, denominadas *hrpG*, *prhJ*, *prhR* y *prhI*. HrpG es un regulador de respuesta de sistemas de regulación de dos componentes, mientras que PrhJ es una proteína reguladora de la familia LuxR/UhpA de activadores transcripcionales. PrhI y PrhR son respectivamente un factor sigma extracitoplásmico y una proteína transmembrana. A excepción de HrpG homólogo a HrpG de *Xanthomonas campestris*, no se han identificado hasta la fecha proteínas homólogas a PrhJ, PrhR y PrhI implicadas en virulencia en otras bacterias fitopatógenas. Nuestros trabajos demuestran que HrpG controla la expresión de *hrpB* y de los restantes genes *hrp* en medio mínimo y en co-cultivo con suspensiones celulares de *Arabidopsis* y tomate. Por el contrario PrhJ, PrhI y PrhR están específicamente implicados en el control de la expresión de los genes *hrp* en presencia de células vegetales, formando parte de la cascada de regulación definida por PrhA. Los resultados obtenidos permiten definir una novedosa y compleja cascada de regulación que gobernaría la expresión de los genes *hrp* de *R. solanacearum* y su patogenicidad.



## C2.2 LA BACTERIOSIS DEL NOGAL. SENSIBILIDAD VARIETAL Y VIRULENCIA DEL PATÓGENO

Moragrega, C.<sup>1</sup>, Bacardit, C.<sup>1</sup>, Ninot, T.<sup>2</sup>, Aletà, N.<sup>2</sup>, Montesinos, E.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> *Institut de Tecnologia Agroalimentària-Certa, Universitat de Girona, Avda. Lluís Santaló s/n 17003 Girona.*

<sup>2</sup> *Departament d'Arboricultura Mediterrània. IRTA-Mas Bové. Apdo. 415. 43280 Reus.*

La bacteriosis del nogal es la principal enfermedad de este cultivo y provoca importantes pérdidas en la producción. Esta enfermedad afecta a la mayoría de zonas productoras de nuez del mundo. El agente causante es la bacteria *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis*. Esta bacteria provoca la necrosis de tejidos y órganos jóvenes, como yemas, flores, hojas y frutos. La enfermedad se manifiesta desde mayo hasta mediados de junio en flores y hojas, y a partir de mediados de junio afecta principalmente a los frutos. El desarrollo de la enfermedad está relacionado con las condiciones ambientales (humedad relativa elevada, lluvias y temperaturas entre 16 y 29 °C), la sensibilidad de las distintas variedades de nogal y la virulencia del patógeno. Actualmente el control de la enfermedad se basa en la aplicación preventiva de compuestos cúpricos a lo largo de todo el período vegetativo. El conocimiento de distintos aspectos de la patogenia de la bacteria, así como la determinación de la sensibilidad al patógeno de diversas variedades de nogal pueden ayudar a un mejor control de la enfermedad, basado en la utilización combinada de variedades resistentes, aplicación de medidas culturales de soporte y un control químico racional.

El desarrollo de una técnica para la inoculación artificial de *X. arboricola* pv. *juglandis* en frutos inmaduros de nogal permitió evaluar, en condiciones controladas, la sensibilidad de 25 variedades de nogal a dos aislados del patógeno y la virulencia de 9 aislados de distinta procedencia sobre la variedad Chico. En cada ensayo se realizó un diseño factorial totalmente aleatorizado con tres repeticiones de 10 frutos por repetición y tres inoculaciones por fruto. La utilización de índices de severidad, en función de síntomas observados en los frutos, permitió determinar estadísticamente el efecto de la variedad o del aislado en la severidad de la enfermedad.

Todos los aislados se mostraron patogénicos en frutos inmaduros de nogal, observando diferentes grados de virulencia en función de la procedencia geográfica y del órgano de aislamiento. En cuanto a las variedades, no se observaron variedades resistentes al patógeno. Los clones de prospección MB-Po-55, MB-Lu-22, MB-Po-26, y la variedad Adams-10, se mostraron poco sensibles. Entre las variedades sensibles o muy sensibles se encontraban variedades de interés comercial como Hartley, Chico, Pedro, Serr, Vina, Franquette, Mayette y Parisienne.

La sensibilidad de las distintas variedades al patógeno, determinada en este trabajo en condiciones ambientales controladas, coincide con la observada por distintos autores en condiciones naturales en campo, concretamente en plantaciones de nogal en Francia, Italia y Cataluña. Por otro lado, los tres clones de prospección que han presentado una sensibilidad moderada y similar a la variedad Adams-10 proceden de poblaciones gallegas de nogales de semilla. Algunos de estos clones han presentado también baja sensibilidad en condiciones de campo.

## C2.3 IDENTIFICACIÓN DE GENES IMPLICADOS EN VIRULENCIA EN LA BACTERIA FITOPATÓGENA *Pseudomonas syringae* pv. tomato cepa PT23

Aizpún M.<sup>1</sup>, Ortiz-Barredo A.<sup>1</sup>, Sesma A.<sup>1</sup>, Rangaswamy V.<sup>2</sup>, Bender C.<sup>2</sup>, Murillo J.<sup>1</sup>

1. Laboratorio de Patología Vegetal, ETS Ingenieros Agrónomos, Universidad Pública de Navarra, 31006 Pamplona, fax:948-169187, e-mail: [jesus@upna.es](mailto:jesus@upna.es)

2. Dept. Entomology and Plant Pathology, Oklahoma State University, Stillwater, Oklahoma 74078-3033.

*Pseudomonas syringae* pv. tomato (*Pto*) es el agente causal del moteado del tomate. Los síntomas más sobresalientes de la enfermedad son la aparición de lesiones necróticas puntiformes en hojas, tallos y frutos, y el desarrollo de halos cloróticos, en hojas, alrededor de las lesiones necróticas. La mayor parte de las cepas de *Pto* producen una fitotoxina, que presenta homologías con el ácido jasmónico, denominada coronatina, que participa en la producción de clorosis y necrosis y en el crecimiento de la bacteria *in planta*. En la cepa PT23 de *Pto*, los genes para la síntesis de coronatina (30 kb) se localizan en el plásmido nativo pPT23A (100 kb). En nuestro laboratorio se ha identificado un nuevo factor de virulencia (Véase Resumen de Sesma et al.), determinado por el plásmido pPT23B, que putativamente modifica un intermediario de la síntesis de coronatina. Este factor determina, junto con la coronatina, un aumento de al menos 4 veces en el área necrosada en hojas de tomate. Con el fin de localizar los correspondientes genes de virulencia en pPT23B se han realizado ensayos de complementación *in planta* con una colección de cósmidos solapados derivados de pPT23B. El cósmido p4E10, que contiene un inserto de 22 kb, fue el único que restauró el fenotipo silvestre. Otros autores han mostrado que este cósmido contiene genes de mantenimiento, el elemento IS1240, y un operón que contiene el gen de avirulencia *avrD* más 4 ORFs adicionales en una región de 12 kb. Para delimitar la región de virulencia, se realizaron nuevos ensayos *in planta* con subclones derivados de p4E10. Sólo dos de los clones ensayados, cuyos insertos no solapan y están adyacentes en p4E10 mostraron una complementación parcial de la virulencia. Nuestros resultados sugieren que la región de virulencia es de gran tamaño y que el operón *avrD* está probablemente implicado en este fenotipo. Los análisis por HPLC sugieren que la región de virulencia de pPT23B podría incrementar la síntesis de coronafacoilvalina, un subproducto tóxico de la síntesis de coronatina, y participar en la síntesis de un nuevo compuesto cuya identidad y actividad se están analizando.

## C2.4 IDENTIFICACIÓN DE UN NUEVO FACTOR DE VIRULENCIA EN *Pseudomonas syringae* pv.tomato PT23

Sesma, Ane<sup>1</sup>; Maite Aizpún<sup>1</sup>; Amaia Ortiz-Barredo<sup>1</sup>; Dawn Arnold<sup>2</sup>; Alan Vivian<sup>2</sup>, y Jesús Murillo<sup>1</sup>

(1) Laboratorio de Patología Vegetal, ETS Ingenieros Agrónomos, Universidad Pública de Navarra, 31006 Pamplona, fax, 948-169187, e-mail:jesus@upna.es

(2) Dept. Biological Sciences, University of the West of England, Bristol, Reino Unido.

La mayoría de las bacterias que interactúan con plantas contienen plásmidos que portan genes importantes o esenciales para esta interacción. La cepa PT23 de *Pseudomonas syringae* pv.tomato, el agente causal del moteado del tomate, contiene 4 plásmidos nativos. El mayor de ellos, pPT23A (100 kb), contiene los genes (30 kb) necesarios para la síntesis de la fitotoxina coronatina, que es responsable de la producción de halos cloróticos *in planta*, interviene en la producción de necrosis y favorece la colonización de la planta. pPT23B (83 kb) contiene el operón *avrD*, cuyo primer gen participa en la delimitación del espectro de huésped. pPT23C (65 kb) es críptico, y pPT23D (36 kb) confiere resistencia a cobre. Se ha descrito una gran homología entre estos cuatro plásmidos, lo que ha podido dificultar en el pasado la identificación de posibles genes plasmídicos de virulencia. En este trabajo hemos abordado la evaluación de otras funciones que podrían estar determinadas por genes plasmídicos. A partir de PT23, hemos construido la cepa UPN2, curada de los cuatro plásmidos nativos. PT23 y UPN2 no pudieron diferenciarse en cuanto a su velocidad de crecimiento en medio KMB o en medio mínimo, metabolismo de fuentes de carbono, patrón de resistencia a compuestos antibacterianos (excepto cobre), morfología, o inducción de respuesta hipersensible en tabaco, lo que sugiere que estos plásmidos no portan genes implicados en estas funciones. La contribución de los genes plasmídicos a la virulencia se ha estudiado inoculando artificialmente plantas de tomate y midiendo la evolución de las poblaciones bacterianas *in planta* y la producción de síntomas (necrosis y clorosis). Las lesiones necróticas producidas en plantas inoculadas con UPN2 fueron de 0.06 mm<sup>2</sup>, mientras que las producidas por la cepa silvestre alcanzaron un tamaño de 0.24 mm<sup>2</sup>, aunque el número total de lesiones y su dinámica de aparición fue la misma para ambas cepas. La población de UPN2 *in planta* también se redujo en dos órdenes de magnitud. La cepa UPN2(pPT23A) alcanzó poblaciones silvestres *in planta*, aunque las lesiones producidas (0.12 mm<sup>2</sup>) fueron significativamente menores que las producidas por PT23, mientras que UPN2(pPT23A, pPT23B) mostró fenotipo silvestre para todos los parámetros evaluados. Estos resultados, junto con los obtenidos utilizando derivados de pPT23A deficientes en la síntesis de coronatina, sugieren que pPT23B contiene genes de virulencia que juegan un papel importante en la producción de enfermedad en plantas de tomate. Nuestros resultados también sugieren que pPT23B podría estar implicado en la síntesis de una nueva fitotoxina altamente relacionada con la coronatina.

## C2.5 EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE NUTRIENTES Y EL ESTADO FENOLÓGICO SOBRE LA VIRULENCIA DE *Pseudomonas syringae* pv. tomato EN PLANTAS DE TOMATE CULTIVADAS EN HIDROPONIA

Ortiz-Barredo, A., Sesma A., Aizpún M., Murillo J.

**Laboratorio de Patología Vegetal, ETS Ingenieros Agrónomos, Universidad Pública de Navarra, 31006 Pamplona; fax 948-169187; e-mail: Jesus@UPNA.es**

La evidencia experimental acumulada sugiere que en *Pseudomonas syringae*, y probablemente en otras bacterias, la producción de enfermedad en la planta huésped depende de un complemento génico muy conservado (genes hrp/hrc), mientras que el tipo e intensidad de los síntomas dependen en gran medida de los determinantes de virulencia (ciertos genes avr, toxinas, hormonas, etc.). La contribución relativa de cada uno de ellos a la agresividad de la cepa bacteriana puede estar influida por numerosos factores ambientales, lo cual, junto con la naturaleza cuantitativa del fenómeno, ha dificultado la identificación de esos determinantes. En nuestro laboratorio, hemos estudiado el efecto de diversos factores ambientales y fisiológicos sobre la virulencia bacteriana, utilizando como modelo la cepa PT23 de *P. syringae* pv. tomato y cepas derivadas de PT23 con virulencia reducida. Como parámetros para cuantificar la virulencia, se estimaron la progresión bacteriana *in planta* y la producción de lesiones necróticas (número y tamaño de las lesiones y dinámica de aparición). Se utilizaron plantas de tomate (cv. Rio Grande) mantenidas en cultivo hidropónico con solución nutritiva Hoagland II en diluciones 1/5, 1/10 o 1/20. Para cuantificar el efecto del estado fenológico de la planta, se inocularon folíolos de la primera, segunda y tercera hoja verdaderas, midiéndose los parámetros independientemente para cada una de las distintas cepas. No se observaron diferencias significativas en el crecimiento de las diferentes cepas *in planta* en ninguna de las condiciones probadas. Sin embargo, en las plantas crecidas con pocos nutrientes (solución 1/20) el tamaño de las lesiones necróticas fue en todos los casos significativamente menor. En estas condiciones, las diferencias de virulencia entre las distintas cepas se hicieron mínimas y, en algunos casos, dejaron de ser significativas. Por el contrario, las diferencias en virulencia fueron máximas en plantas crecidas con alta concentración de nutrientes. Igualmente, hemos podido observar diferencias de virulencia entre las diversas cepas que no se pusieron de manifiesto en los ensayos con plantas crecidas sobre sustrato vegetal. La virulencia de las cepas disminuyó asimismo con la edad del tejido inoculado, aunque las diferencias se mantuvieron entre distintas cepas. Estos ensayos nos han permitido establecer unas condiciones definidas para la búsqueda de nuevos determinantes de virulencia en *P. syringae*.

## C2.6 DEFENSA FRENTE A PATÓGENOS BACTERIANOS: ELEMENTOS COMUNES EN LA PATOGENESIS DE PLANTAS Y ANIMALES

López-Solanilla, E., Miguel, E., Poza-Carrión, C., Aguilar, I., Llama-Palacios, A., García-Olmedo, F., Rodríguez-Palenzuela, P.

*Departamento de Biotecnología, Universidad Politécnica de Madrid; E.T.S. Ingenieros Agrónomos. Av. Complutense s/n 28040 Madrid.*

Las plantas y los animales presentan grandes diferencias en cuanto a su estructura celular, fisiología y modo de vida. Por tanto, cabría pensar que las estrategias que han desarrollado para el ataque, defensa y contraataque con sus respectivos patógenos sean también muy diferentes. Sin embargo, recientemente se han identificado mecanismos comunes en la patogénesis bacteriana de plantas y animales, tanto en el organismo hospedador como en el patógeno (Taylor, 1998). En nuestro laboratorio hemos abordado tres de estos mecanismos comunes y estamos estudiando su papel en la interacción planta-bacteria:

1) Los péptidos antimicrobianos, producidos por el huésped afectan a la capacidad de supervivencia e invasión del patógeno (García-Olmedo et al., 1995). La sensibilidad de la bacteria a estos péptidos está mediada por proteínas que afectan a la permeabilidad de la membrana externa de la bacteria (Titarenko et al., 1997) y también por proteínas que constituyen mecanismos de detoxificación específicos (Groisman et al., 1992). Hemos identificado uno de estos mecanismos en la bacteria *Erwinia chrysanthemi*, que consta de cinco genes *sap* (sensitive to antimicrobial peptides) A, B, C, D y F, organizados en un solo operón. El mutante *sap* es más sensible a ciertos péptidos antimicrobianos de vegetales y es menos virulento en tubérculo de patata y hoja de endivia (López-Solanilla et al., 1998). El operón *sap* de *E. chrysanthemi* es homólogo al previamente descrito operón *sap* de la bacteria *Salmonella typhimurium*, donde juega un papel similar, protegiendo a la bacteria de la acción de péptidos antimicrobianos de su huésped animal (Parra-López et al., 1993).

2) Las bacterias patógenas inducen un choque oxidativo en plantas y animales. Se ha propuesto que el agua oxigenada generada podría tener un efecto antimicrobiano, constituyendo la primera línea de defensa (Lamb y Dixon, 1997). Para contrastar esta hipótesis hemos estudiado la respuesta al estrés oxidativo en *E. chrysanthemi* y hemos generado un mutante en el gen regulador *oxyR*. Este mutante es: a) defectivo en catalasa, b) hipersensible a peróxido de hidrógeno, y c) incapaz de formar colonias individuales en medio sólido, a menos que se añada catalasa exógena. Sorprendentemente, el mutante *oxyR* mantiene intacta su virulencia en tubérculo de patata y hoja de tabaco. Este resultado sugiere, en contra de la visión generalmente aceptada, que el agua oxigenada no tiene un papel antimicrobiano directo es esta interacción (Miguel et al., enviado).

3) Los genes *hrp* (hypersensitive reaction and pathogenicity) codifican para un sistema de transporte, cuya función es introducir proteínas bacterianas en el interior de la célula vegetal, y que está conservado en bacterias patógenas de animales, como *Yersinia* y *Shigella*. (Alfano y Collmer, 1996). Hemos clonado y estamos caracterizando el "cluster" de *hrp* en la bacteria fitopatógena *Erwinia quercina*, que ataca diversas especies del género *Quercus*. Por otra parte, estamos empleando la Proteína Verde Fluorescente (GFP) unida a la técnica de microscopía confocal, para estudiar la expresión "in planta" de genes importantes en patogenicidad y la interacción entre cepas mutantes en algunos de estos genes.

### C3.1 EVALUACIÓN DE CULTIVARES AUTÓCTONOS Y LÍNEAS DE MELÓN PARA RESISTENCIA A LA FUSARIOSIS VASCULAR.

González Torres, R., Álvarez, J.

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

Se han evaluado 72 cultivares autóctonos y líneas de melón para resistencia a las razas fisiológicas 0, 1 y 2 de *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* (*Fom*).

Tras pregerminar semillas de melón, se sembraron en arena estéril y, 10 días después, las raíces de las plántulas se sumergieron en suspensiones de  $3 \times 10^6$  conidias/ml de las razas 0, 1 y 2 de *Fom* durante 30 seg. y se transfirieron a macetas de plástico de 0,2 l (2 plantas/maceta y 5 macetas/cultivar). Se emplearon como testigos las líneas Charentais T (susceptible a todas las razas), Charentais *Fom* 1 (resistente a las razas 0 y 2) y Charentais *Fom* 2 (resistente a las razas 0 y 1).

El cultivar C-87 (*Cucumis metuliferus*) resultó resistente a las razas 0, 1 y 2 de *Fom*. Los cultivares C-205 (*C. africanus*) y C-267 mostraron resistencia a la raza 0 y se apreció una reacción heterogénea, con plantas susceptibles y resistentes, a las razas 1 y 2. Cinco cultivares (Amarillo Cascarapinta, Amarillo Manchado, Banda de Godoy, BG-4078 y Tortuga) y una línea de mejora (Piel de Sapo Monoico) resultaron resistentes a las razas 0 y 2 de *Fom*, mientras que los cultivares Melón de Olor, PSM x PS y 9814 mostraron una reacción heterogénea, con plantas sensibles y resistentes a las razas 0 y 2. Los restantes 60 cultivares resultaron susceptibles a las tres razas.

Los cultivares C-87, C-205 y C-267 proceden de la Estación Experimental “La Mayora” del CSIC. Todos los cultivares procedentes de Extremadura mostraron resistencia a las razas 0 y 2, y todos los cultivares resistentes a estas razas (salvo los de “La Mayora”) cuyo origen nos es conocido, resultaron proceder de Extremadura.

Financiado por los proyectos AGF95-0962-C03-03 de la CICYT y SC98-046-C3-1 del INIA.

### C3.2 EVOLUCIÓN DE LA SENSIBILIDAD DE *Verticillium fungicola* AL FUNGICIDA PROCLORAZ - Mn.

Gea Alegría, F.J.<sup>1</sup>, Tello Marquina, J.C.<sup>2</sup>, Díaz Moral, D.<sup>3</sup>, Navarro Lozano, M.J.<sup>1</sup>

1. Centro de Investigación, Experimentación y Servicios del Champiñón (CIES). Apdo. nº 8. 16220 Quintanar del Rey. Cuenca.

2. Dpto. Biología Vegetal, Producción Vegetal y Ecología. Universidad de Almería. Cañada de San Urbano s/n. 04120 Almería.

3. Centro de Investigación Agraria de Albaladejito, 16194 Cuenca.

*Verticillium fungicola* (Preuss) Hassebrauk ocasiona la enfermedad de la Mole seca, una de las más comunes y graves del champiñón cultivado, *Agaricus bisporus* (Lange) Imbach. Estudios realizados sobre la incidencia de esta enfermedad en Castilla-La Mancha, comarca de La Manchuela, mostraron que el patógeno estaba presente en todas las naves y ciclos de cultivo de champiñón muestreados. *V. fungicola* fue aislado del 74,3% del total de champiñones enfermos analizados.

En trabajos previos se estudió el problema del control químico de la Mole seca, en base al comportamiento *in vitro* de seis fungicidas (benomilo, clorotalonil, formaldehído, iprodiona, procloraz-Mn, procloraz + carbendazima), frente a 20 aislados de *V. fungicola* obtenidos durante los años 1992-93. Los resultados pusieron de manifiesto que todos los aislados de *V. fungicola* eran más sensibles al complejo procloraz-Mn (valores medios de DL50 menores de 5 mg l<sup>-1</sup>) que al resto de fungicidas ensayados. Además de ser el más eficaz, el procloraz-Mn es el fungicida que principalmente se utiliza para luchar contra esta enfermedad. En este sentido, hay que destacar que la utilización intensiva de fungicidas DMI, y la relajación de los métodos de lucha preventiva, puede provocar la selección de individuos cada vez más resistentes.

Enmarcado en este contexto, el presente estudio aborda la evolución de la sensibilidad al procloraz-Mn, en aislados de *V. fungicola* recogidos a lo largo del período 1992-98. Para cada combinación aislado-fungicida se calculan los valores de los parámetros DL50 y DL90, además de la pendiente de la recta probit, utilizando como método de análisis la regresión probit. También se incluye el cálculo del nivel de resistencia, usando para ello un aislado de *V. fungicola* del año 1969, el cual se puede considerar como altamente sensible al procloraz-Mn.

Los datos obtenidos ponen de manifiesto un ligero aumento tanto de la DL50, como del nivel de resistencia; si bien, éstos no se pueden considerar alarmantes.

### **C3.3 ACTIVIDADES ENZIMATICAS CUTIN-ESTERASA Y PEROXIDASA INVOLUCRADAS EN EL PROCESO DE INFECCION DE GRANOS DE UVA (*Vitis vinifera* L.) POR *Botrytis cinerea*.**

Serrano González, J. M., Reina Pinto, J. J., Hoyo Becerra, C., Heredia, A.

*Departamento de Bioquímica, Facultad de Ciencias, Universidad de Málaga.*

*Botrytis cinerea* es un hongo que parasita a una gran variedad de plantas muchas de ellas de gran interés comercial. El rango de infección de este hongo es muy amplio y afecta a flores, productos hortícolas y distintos frutos.

Como parte de nuestro proyecto de investigación se ha llevado a cabo la detección y cuantificación de enzimas excretados por *B. cinerea* implicadas en los primeros estadios del proceso de infección del grano de uva. Las actividades enzimáticas investigadas son la actividad hidrolítica de la cutina vegetal, actividad cutinasa (una esterasa), y la actividad peroxidasa.

Para la caracterización de la actividad cutin-esterasa se realizó una primera aproximación experimental en la que se creció el hongo en medios sólidos y medios líquidos en presencia y ausencia de inductores. Estos inductores fueron el biopolímero cutina, componente mayoritario de muchas cutículas, y el monómero constituyente de éste, el ácido 16-hidroxihexadecanoico. Los resultados obtenidos indican que la actividad cutin-esterasa es inducida por dichos inductores. Puesto que la presencia de actividad esterasa no indica necesariamente que esta sea una actividad cutinasa, la existencia de dicha actividad cutinasa se constató analizando los productos de degradación obtenidos al incubar extractos enzimáticos con cutina radiactiva sintetizada en nuestro laboratorio.

En una segunda aproximación experimental, se estudió la actividad cutin-esterasa de *B. cinerea in vivo*, concretamente durante el proceso de infección del hongo en la superficie del grano de uva. Los resultados obtenidos indican que la actividad cutin-esterasa se presenta en los estadios tempranos del proceso de infección y no es detectada en estadios avanzados de ésta.

Paralelamente se investigó, en los ensayos *in vivo*, la actividad peroxidasa de *B. cinerea*. Esta actividad parece estar involucrada en la necrosis del tejido vegetal durante la infección. En las primeras fases la actividad detectada fue muy baja, mientras que en fases avanzadas, en las que la necrosis era aparente, la actividad peroxidasa fue bastante elevada.

Esta investigación ha sido financiada por el proyecto PTR94-0068



### C3.4 ESTUDIO DE LA SENSIBILIDAD DE *Trichoderma harzianum* A LOS FUNGICIDAS DE USO PERMITIDO EN LA PRODUCCIÓN DE TOMATE BAJO ABRIGO EN ALMERÍA.

Moyano Cárdbaba, C. , Raposo, R. , Melgarejo Nardiz, P.

*Instituto Nacional de Investigaciones Agrarias. Carretera de la Coruña, km.7. 28040. Madrid.*

La podredumbre gris, causada por *Botrytis cinerea*, es una de las enfermedades más importantes en los cultivos protegidos de Almería. Los métodos químicos con los que se controla la enfermedad llevan asociados una serie de problemas como son los residuos en las cosechas y la aparición de poblaciones resistentes. Actualmente se están desarrollando métodos integrados de control de plagas y enfermedades que incluyen el uso de agentes biológicos lo cual requiere que estos agentes sean compatibles con los fungicidas que se vayan emplear.

En algunos países se comercializa un producto biológico (Trichodex) capaz de controlar *Botrytis cinerea* y que puede servir para disminuir el uso de productos químicos llevando a cabo un control integrado de la enfermedad. Este producto es un preparado comercial del aislado T39 de *Trichoderma harzianum*.

Se está estudiando la efectividad del Trichodex en invernaderos de Almería, utilizándolo en alternancia con los fungicidas permitidos por la Junta de Andalucía en la producción integrada de tomate bajo abrigo. Como estudio paralelo se cree necesario ver el efecto que estos fungicidas tienen sobre *T. harzianum* ya que otros estudios realizados con aislados distintos muestran que en presencia de algunos fungicidas el crecimiento de *T. harzianum* se puede ver inhibido.

Para conocer la sensibilidad de *T. harzianum* a los fungicidas se probaron éstos a la dosis de campo y se comparó el crecimiento del aislado + fungicida con el control mediante espectrofotometría. La medición de la absorbancia se realizó a las 0 y 48 horas.

Se utilizaron conidias de *Trichoderma harzianum* almacenadas en glicerol a -20 ° C durante el tiempo que duró el experimento. La concentración utilizada fue de 20.000 conidias /ml que, una vez germinadas, se pusieron a crecer en la oscuridad a 20 ° C en una microplaca en contacto con cada fungicida.

Al comparar con respecto al control los porcentajes de inhibición de cada uno de los fungicidas sobre el aislado T 39 de *Trichoderma harzianum*, se ha visto que este aislado es sensible a algunos de los fungicidas que se utilizan en la producción integrada de tomate bajo abrigo, por lo que habría que restringir su uso cuando se esté utilizando Trichodex.

### C3.5 ACTIVIDAD -1,3-GLUCANASA EN TALLOS DE PIMIENTO INFECTADOS CON *Phytophthora capsici*.

Egea, C.<sup>1</sup>, Dickinson, M.J.<sup>2</sup>, Candela, M.<sup>3</sup>, Garcia, M.D.<sup>1</sup>, Candela, M. E.<sup>1</sup>

1. Dept. de Biología Vegetal. Facultad de Biología. Universidad de Murcia. Campus de Espinardo. E-30100 Espinardo (Murcia). SPAIN.

2. Plant Science Division. School of Biological Sciences. University of Nottingham. University Park. Nottingham NG7 2RD. UK.

3. Dept. de Genética. Facultad de Biología. Universidad Complutense de Madrid. E-28040 Madrid. SPAIN.

Las plantas han desarrollado una serie de mecanismos de defensa contra el ataque de microorganismos potencialmente patógenos. Uno de ellos es la producción de proteínas relacionadas con la patogénesis (PR) tales como  $\square$ -1,3-glucanasas. La velocidad de acumulación y la magnitud de la inducción de estas proteínas es diferente en interacciones planta-patógeno compatibles e incompatibles, y esas diferencias pueden ser decisivas para el éxito de la reacción defensiva.

Plantas de pimiento de una variedad resistente (Smith-5: S-5) y otra susceptible (Yolo Wonder: YW) se inocularon con *Phytophthora capsici*, aislado 17 [1]. La actividad  $\square$ -1,3-glucanasa se detectó en niveles muy bajos en los tallos control de S-5, pero no se detectó en YW. En contraste, la actividad se incremento con la infección, siendo mas pronunciada y detectada antes en S-5. La separación electroforética de proteínas con actividad  $\square$ -1,3-glucanasa reveló la presencia de una glucanasa básica (Rf 0,18) en la fracción extracelular, la cual puede estar asociada con la expresión de resistencia a *P. capsici* ya que su actividad únicamente fue inducida en la variedad resistente. En la fracción extracelular de las dos variedades se detectaron otras isoenzimas básicas (Rf 0,70, Rf 0,61), y en la fracción intercelular una básica (pI 8,9) y otra ácida (pI 4,8), sugiriendo que estas forman parte de la defensa inespecífica. Mediante el uso de "primers" degenerados y transcripción reversa a partir de un ARNm de S-5, se obtuvo un producto de aproximadamente 500 pb, el cual se clonó presentando una homología del 90% con una  $\square$ -1,3-glucanasa de *Nicotiana plumbaginifolia*. Este fue usado como sonda en *Northern blots* de ARN extraídos de la variedad sensible y de la resistente a diferentes tiempos de inoculación, para comparar los niveles y la regulación de la expresión entre estas variedades. Se detectaron tres transcritos, en un rango de 1,0 y 2,0 Kb, pero mientras que en S-5 aparecen incluso en el tejido sano y la zona mas próxima al lugar de infección 1 y 3 días después de la inoculación, en la variedad sensible la intensidad es mucho menor, no detectándose en los controles. Se discute el significado de estos resultados con respecto a la resistencia de pimiento frente a *P. capsici*.

### C3.6 PATOGENICIDAD DE AISLADOS DEL GÉNERO *Pythium* Pringsh. DEL AGUA DE RIEGO DEL PONIENTE ALMERIENSE (SE DE ESPAÑA)

Sánchez Sánchez, J. y E. Gallego Arjona

*Departamento de Biología Vegetal, Producción Vegetal y Ecología. Escuela Politécnica Superior. Universidad de Almería. La Cañada, s/n. 04120 Almería.*

Se caracterizó la virulencia de 55 aislados de *Pythium* spp. obtenidos de las aguas de riego del Poniente almeriense (Almería) durante el período de 10/1994 y 8/1997.

Para ello, se realizaron tres tipos de ensayos:

- de agresividad en pre-emergencia (inoculación en pre-germinación);
- de agresividad en pre-emergencia con semillas pregerminadas (inoculación en post-germinación);
- de agresividad en post-emergencia (inoculación en post-emergencia).

Para los ensayos de agresividad en pre-emergencia se inocularon 10 semillas de pepino (*Cucumis sativus*) cv. 'Ashley' situándolas en macetas de vermiculita sobre un disco de cultivo en medio agarizado que se recubrió con una capa del sustrato y se mantuvo en condiciones controladas: 25°C, 12 h luz/ 12h oscuridad y 60% HR durante 15 días. Se hicieron 9 repeticiones, distribuidas en 3 ocasiones diferentes. En el caso en que se inocularon semillas pregerminadas, lo fueron a 30°C durante 24 h.

En los ensayos de agresividad en post-emergencia, macetas sembradas con 10 semillas se inocularon a los 5 días de la siembra (cuando estaban recién desplegados los cotiledones) con un disco triturado de cultivo en medio agarizado. El experimento se realizó en las mismas condiciones, y se mantuvieron durante 15 días tras la inoculación.

En el primer tipo de ensayos se observó que: 27 aislados de *Pythium* spp. produjeron un 80-100% de marras de nascencia, 18 aislados produjeron del 30-70%, y el resto valores entre el 10-30%. Por el contrario, las marras de nascencia fueron inferiores al 10% en los testigos.

En el segundo tipo de ensayos, 27 aislados de *Pythium* spp. produjeron más de un 50% de marras de nascencia, de entre ellos 7 aislados superaron el 80%, además 19 aislados llegaron a producir un 10-30%, el resto no alcanzó el 10%. En los testigos, inoculados sólo con medio agarizado, no se llegó al 6%.

Por último, en los ensayos en post-emergencia, sólo 2 aislados de *Pythium* spp. superaron el 30% de plántulas caídas (sobre el total de plántulas emergidas), se situaron entre el 70-90%. Por otro lado, 9 aislados produjeron entre el 10-30% de plántulas caídas y el resto no alcanzó el 10%. En este caso, los testigos y 19 aislados no produjeron ningún caso de plántula caída.

Se observó como los valores de plántulas no válidas (marras de nascencia o plántulas caídas) son mayores cuanto más temprana es la inoculación con el patógeno.

### C3.7 *Fusarium moniliforme* Sheldon SOBRE *Pinus* spp: ENSAYOS DE PATOGENICIDAD

Mansilla Vázquez, J.P.<sup>1</sup>, Pintos Varela, C<sup>1</sup>, Sainz Oses, M.J.<sup>2</sup>, Vilariño, A.<sup>3</sup>

1. Estación Fitopatológica “Do Areiro”, Servicio Agrario, Excma. Diputación Provincial de Pontevedra, Subida a la Robleda, s/n, 36153 Pontevedra.

2.- Departamento de Producción Vegetal, Facultad de Veterinaria, Universidad de Santiago de Compostela, E-27002 Lugo.

3. Instituto de Investigaciones Agrobiológicas de Galicia CSIC, Ap. 122, E-15080 Santiago de Compostela. A Coruña.

*Fusarium moniliforme* es uno de los hongos que forma parte del complejo “Damping-off”, tanto de pre como de post-emergencia, que sufre la planta forestal.

Ante las numerosas muestras de coníferas, fundamentalmente de *Pinus* sp., recibidas en nuestra Estación con síntomas de “Damping-off” y sobre los que se aislaba con insistencia *F. moniliforme*, decidimos realizar ensayos de patogenicidad para comprobar el poder patógeno real del mismo.

En un primer ensayo se partió de semilla de *P. pinaster*, *P. radiata* y *P. pinea* inoculadas a un 4% con *F. moniliforme* previamente crecido sobre semilla de trigo estéril. El tanto por ciento de germinación de los testigos a las cuatro semanas fue muy alto frente a los inoculados, produciéndose casi un 100% de mortalidad a las nueve semanas: “Damping-off” de post-emergencia.

Ante los datos obtenidos se decidió testar diferentes productos utilizados normalmente como desinfectantes de semillas frente a *Fusarium*. Se utilizaron dos especies de pino (*P. radiata* y *P. pinaster*) y los productos testados fueron Benomilo, Captan, Iprodiona, Ciproconazol así como un producto biológico denominado Mycostop compuesto por esporas de *Streptomyces griseoviridis*. Los ensayos fungicidas “in vitro” realizados en laboratorio demostrados que el único fungicida inhibitorio a la concentración de 10 ppm es Benomilo. Para corroborar estos datos se realizaron los correspondiente ensayos en campo utilizando semillas de *P. pinaster* y *P. radiata* previamente desinfectadas con cada uno de los fungicidas a probar, inoculándose posteriormente con *F. moniliforme*, realizándose 16 repeticiones por tratamiento y obteniéndose resultados similares a los obtenidos “in vitro”. A su vez se aplicó una endomicorriza (*Glomus macrocarpum*), sobre ambas especies de pino, para comprobar la micorrización y determinar si poseía un cierto efecto inhibitorio sobre *F. moniliforme*. Como conclusiones podemos decir que:

\* *P. radiata* se muestra más resistente al ataque de *F. moniliforme* que *P. pinaster*.

\* El mejor fungicida, tanto en laboratorio como en campo, es el Benomilo aunque no llega a controlar la enfermedad ya que se produce una mortalidad a las nueve semanas muy elevada.

\* El fungicida biológico Mycostop parece que muestra cierta eficacia en el control de *F. moniliforme* aunque su forma de actuación es preventiva ya que su velocidad de crecimiento es menor que la de *Fusarium*.

\* *Glomus macrocarpum* no produce micorrización a las cuatro semanas.

### C3.8 SELECCION DE PATRONES DE AGUACATE (*Persea americana* Mill.) POR SU TOLERANCIA A *Rosellinia necatrix* Prill.

López Herrera, C.J.<sup>1</sup>, Pérez Jiménez, R.M.<sup>2</sup>, Zea Bonilla, T.<sup>2</sup>

1. Estación Experimental La Mayora. C.S.I.C. 29750 Algarrobo-Costa, Málaga.

2. Centro de Investigación y Formación Agraria. 29140 Churriana, Málaga.

La podredumbre blanca de raíz de aguacate causada por *Rosellinia necatrix* Prill. es una enfermedad muy extendida en las plantaciones aguacateras del litoral andaluz. Por ello se ha planteado con este trabajo, como uno de los métodos de lucha, la búsqueda de patrones de aguacate tolerantes a este patógeno.

Para la selección se han utilizado dos tipos de material de aguacate distintos. A) Plantas clonales, unas seleccionadas en California como tolerantes a *P. cinnamomi*, y otras seleccionadas en la E.E. La Mayora por su alta producción; y B) Plantas procedentes de semilla de la E. E. La Mayora, Islas Canarias, Sudáfrica y Australia, y de bancos de germoplasma situados en Méjico que contienen una selección de plantas de países tales como, Méjico, Honduras, Costa Rica Guatemala y Ecuador.

Se inoculó un total de 3.489 plantas correspondientes, a 68 variedades distintas con seis meses de edad procedentes de semilla, y a 5 patrones clonales tolerantes a *P. cinnamomi* y 3 clonales cv. Topa Topa de alta producción. El inóculo consistió en semillas de trigo colonizadas con un aislado muy virulento de *R. necatrix*. Se utilizó una media de 40 repeticiones por variedad, realizándose lecturas secuenciales de la muerte de las plantas y los resultados se expresaron como porcentaje de plantas muertas desde la inoculación a una fecha dada o fecha de muerte del 100% de las plantas.

Los patrones clonales inoculados con *R. necatrix* no presentaron resistencia a este patógeno, destacándose retraso de la enfermedad en alguno de ellos. El material de semilla que se ha estudiado hasta el momento ha resultado altamente susceptible a *R. necatrix*, con un nivel similar al observado en inoculaciones anteriores sobre el patrón comercial cv. Topa Topa.

Estos resultados sugieren en principio, que la búsqueda de material tolerante a *R. necatrix* implica el testaje de miles de plantas debido a la gran variabilidad genética del material de aguacate procedente de semilla, y confirman que el estudio de resistencia como método de lucha debe estar unido a otros métodos, físicos (solarización) y químicos (fungicidas sistémicos) para obtener un control integrado de la enfermedad.

### C3.9 RESPUESTA DIFERENCIAL DE CULTIVARES DE FRESA A *Colletotrichum* spp.

*de los Santos García de Paredes, B., Romero Muñoz, F.*

*Centro de Investigación y Formación Agraria "Las Torres-Tomejil". Apdo Oficial 41200. Alcalá del Río. Sevilla.*

Se han considerado 73 aislados de *Colletotrichum* spp., 72 facilitados por el I.M.I. (Instituto Micológico Internacional) y uno obtenido en la provincia de Huelva (CECT 20240), todos considerados patógenos de fresa. La respuesta a la infección de los cultivares: "Chandler", "Oso Grande", "Pájaro", "Camarosa" y "Selva", se evaluó en base al desarrollo de síntomas de podredumbre de corona; según la escala de 1 (planta sana de la que no se aísla el patógeno) a 8 (planta muerta). Las inoculaciones se efectuaron sobre frutos ("Oso Grande") y plantas utilizando una suspensión de conidias ( $10^4$  conidias/ml).

En la mayoría de los casos la respuesta de los cultivares no fue homogénea frente a un mismo aislado, diferenciándose en el conjunto de la planta.

Se observó distinto comportamiento patogénico intraespecífico, siendo globalmente más virulentos los aislados de la especie *C. gloeosporioides* y provocando una alta incidencia de la enfermedad el aislado CECT 20240.

El cultivar "Camarosa" fue el más susceptible a todos los aislados del género.

### C3.10 ESTUDIO DE LA RESISTENCIA A MILDIU (*Plasmopara halstedii*) EN LÍNEAS PURAS DE GIRASOL.

Molinero Ruiz, L.1, Melero Vara, J.M.1, Domínguez Giménez, J.2

1. Instituto de Agricultura Sostenible. CSIC. Apdo. 4084. 14080 Córdoba.

2. Centro de Investigación y Formación Agrarias. Junta de Andalucía. Apdo. 3092. 14080 Córdoba

El Mildiu del girasol, causado por *Plasmopara halstedii* (Farl.) Berl. & de Toni, se describió en España en 1972. De las 11 razas del patógeno descritas hasta ahora en el mundo, que se caracterizan por determinados patrones de resistencia/susceptibilidad en un conjunto de líneas puras de girasol (diferenciadoras), portadoras de distintos genes de resistencia, se han identificado en nuestro país la 1, 2, 4, 6, 7 y 10. Frecuentemente, los híbridos comerciales del Registro Nacional resistentes a Mildiu tienen incorporado el gen PI2, que confiere resistencia únicamente a las razas 1 y 2. Se considera que la mayoría de los genes descritos (PI1 a PI10) condicionan una resistencia de carácter monogénico y dominante y son independientes entre sí, aunque recientemente se ha descrito la existencia de alelismo entre dos genes de una misma línea diferenciadora.

A fin de conocer la herencia de la resistencia a las razas 6 y 7 de *P. halstedii* presente en las líneas puras DM4 (resistente a la raza 6) y HA61 (resistente a las razas 6 y 7), se realizaron los cruzamientos HA89xDM4 y HA89xHA61, y se obtuvieron en campo las generaciones F2 y los retrocruzamientos R1 por el parental susceptible (HA89). En todos los experimentos de evaluación de resistencia, se sembraron las semillas (mínimo 200 para analizar las F2 y 50 para los R1) en con arena:perlita (2:3 v/v), y se incubaron en cámara de ambiente controlado, con temperatura de 19-22 (C y fotoperiodo de 12 h/día de luz fluorescente de 360 (Em-2s-1). Las plántulas se inocularon por inmersión en suspensión de zoosporangios.

Al evaluar las reacciones frente a la raza 6, la segregación R:S del retrocruce de HA89xDM4 por el parental susceptible se ajustó a una proporción 1:1 ( $P=0.07$ ) y la de la F2 a una 3:1 ( $P=0.23$ ), lo que se asocia a la existencia en DM4 de un único gen responsable de la resistencia a la raza 6. El R1 de HA89xHA61 segregó en las proporciones 1:1 ( $P=0.12$ ) y 3:1 ( $P=0.34$ ) al ser inoculado con las razas 6 o 7 respectivamente. La F2 segregó en la proporción 3:1 ( $P=0.06$ ) cuando el inóculo utilizado era de la raza 6, y en una 15:1 ( $P=0.31$ ) cuando las inoculaciones fueron con la raza 7. Los ajustes (2 obtenidos sugieren la existencia en HA61 de un solo gen dominante efectivo frente a la raza 6, mientras que la resistencia a la raza 7 parece estar regulada por dos genes dominantes de acción independiente.

El conocimiento de la genética de la resistencia a nuevas razas de mildiu en líneas puras de interés en trabajos de mejora, permite utilizar éstas de forma que se incorporen a las líneas agrónomicamente convenientes los genes de resistencia a las nuevas razas, como la 6 o la 7, frecuentes en el Valle del Guadalquivir.

### C3.11 CARACTERIZACIÓN DE DIVERSOS AISLAMIENTOS DE *Fusarium moniliforme* Sheldon ASOCIADOS A *Pinus pinea* L.

Mirete, S.; de las Heras, A.; \*Río, P.; \*Posada, M.L.; \*Patiño, B., \*\*Muñoz, M.C.; \*Vázquez, C.; González-Jaén, M.T.

Departamentos de Genética y \*Microbiología III, Facultad de Biología, UCM y \*\*Unidad Docente de Zoología, Enfermedades y Plagas Forestales, E.U.I.T. Forestales, UPM, Ciudad Universitaria, 28040-Madrid.

*F. moniliforme* Sheldon es una de las especies de *Fusaria* que más frecuentemente aparece asociada a semillas de *P. pinea* L. y que produce efectos más drásticos tras la germinación en la viabilidad de las plántulas (Muñoz, 1991). La identificación de aislamientos dentro de una misma especie sólo es posible mediante la aplicación de métodos basados en el análisis de DNA. En este trabajo se aplica un método que analiza el polimorfismo para fragmentos de restricción (RFLPs) generado por la acción de varias enzimas de restricción sobre el producto de amplificación por PCR de DNA genómico, usando dos cebadores específicos de la región espaciadora intergénica del DNA ribosómico (IGS). Este método ha sido utilizado en un primer grupo de aislamientos de *F. moniliforme* Sheldon con el fin de explorar la eficacia en su aplicación a esta especie. Nueve de ellos proceden de semillas de piñas cerradas de *P. pinea* de varios montes la Comunidad de Madrid. También se incluyen dos aislamientos de la especie *F. moniliforme* Sheldon var. *subglutinans* (Woll. & Reink.), actualmente denominada *F. subglutinans* (Woll. & Reink.) Nelson, Tousson & Marasas f.sp. *pini* Hepting que produce serios daños en adultos de algunas especies de pinos y que fueron aislados de pies adultos de *P. radiata* en la provincia de Álava. Los resultados confirman la idoneidad de este método para identificar aislamientos en *Fusarium*.



### **C3.12 ENSAYO IMTP II- INIBAP/ EMPLAZAMIENTO 32 (CANARIAS): EVALUACIÓN DE LA RESISTENCIA AL MAL DE PANAMÁ EN PARCELAS CON ALTA DENSIDAD DE INÓCULO DE CULTIVARES DE PLÁTANO MEJORADOS EN CENTROS INTERNACIONALES.**

V. M. Regalado Guijarro, J. M. Hernández Hernández

*Instituto Canario de Investigaciones Agrarias (ICIA). Dpto. de Protección Vegetal Apdo. 60. La Laguna. Tenerife.*

En este trabajo se presentan los resultados preliminares del ensayo *International Musa Testing Program II* (IMTP II) coordinado por el *International Net Work for the Improvement of Banana and Plantain* (INIBAP), en el que se han probado 22 cultivares, en 37 emplazamientos localizados en distintos países, frente a diferentes poblaciones del patógeno y en diversas situaciones climáticas y agrícolas. De ellos, 9 fueron obtenidos en Centros Internacionales de mejora de Banano y Plátano; 7 se consideran germoplasma natural de interés para algunas zonas y 6 se incluyeron como referentes de susceptibilidad y resistencia. El ensayo se ha dispuesto según un diseño totalmente aleatorio, con 20 repeticiones por cultivar, en parcelas con alta densidad de inóculo en el suelo. A partir del sexto mes, se observaron la incidencia de plantas enfermas (%) y la severidad de los síntomas externos más característicos según una escala preestablecida de 3 valores. Como variables de interés agronómico se estudiaron, entre otras, la productividad, la duración total del ciclo, y el número de días entre plantación-parición y entre parición-cosecha. Al final del ensayo se valoró el área afectada en el interior del rizoma según una escala preestablecida de 6 valores. Además del análisis individualizado de cada ensayo, se realizará un análisis conjunto de los 37 emplazamientos para estudiar el efecto de las diferentes poblaciones del patógeno y las diversas situaciones climáticas y ecológicas sobre el comportamiento de los cultivares.

En el ensayo de Canarias, ninguno de los cultivares ensayados ha presentado valores altos de resistencia. Dos de ellos, variantes somaclonales obtenidos a partir del cultivo "in vitro" de un clon del cultivar 'Gran Enana' (AAA) en Taiwan, parecen más interesantes con valores algo más bajos de incidencia y de severidad, aunque uno de ellos presenta la desventaja de poseer un ciclo extremadamente largo. Algunos se volverán a probar en ensayos que incluirán dos tipos de material de plantación: plantas de cultivo "in vitro" y material convencional, ya que existen evidencias que sugieren que las plantas de cultivo "in vitro" son más susceptibles, lo que podría explicar los bajos valores de resistencia obtenidos en el presente ensayo.

### C3.13 EFECTO DE LOS FILTRADOS DE CULTIVOS DE *Ophiostoma novo-ulmi* SOBRE CALLOS Y CÉLULAS DE OLMO.

Diez Casero, J. J.<sup>1</sup>, Gil Sánchez, L. A.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>*Departamento de Producción Vegetal y Silvopascicultura. Universidad de Valladolid. Escuela Técnica Superior de Ingenierías Agrarias (E.T.S.I.I.A.A.). Av/ de Madrid 57. Palencia.*

<sup>2</sup>*Departamento de Silvopascicultura. Universidad Politécnica de Madrid. Escuela Técnica Superior de Ingenieros de Montes (E.T.S.I.M.). Ciudad Universitaria. 28040. Madrid.*

En muchas especies vegetales se ha observado una relación entre su crecimiento “in vitro” en presencia de los filtrados de cultivos de un patógeno específico (donde se encuentran todas las exotoxinas producidas por éste) y la resistencia que las plantas presentan a dicho patógeno. La aplicación de este tipo de metodologías podría ahorrar tiempo y espacio a los programas de mejora de patologías de especies forestales de largos turnos como el olmo.

En la enfermedad de la grafiosis se han identificado dos toxinas: un peptidoramnomano y una hidrofobina denominada ceratoulmina, que inducen una serie de síntomas morfológicos y fisiológicos similares a los producidos por *Ophiostoma novo-ulmi* en ejemplares adultos. Esto posibilita, en principio, la utilización de los filtrados de cultivos de *O. novo-ulmi* para la selección de olmos “in vitro”. Distintos investigadores ya han puesto de manifiesto un efecto de los filtrados de cultivos fúngicos sobre los callos y células de olmo.

Para observar las respuestas de los callos y células aisladas de olmo a los filtrados de cultivos de *O. novo-ulmi* se obtuvieron, por una parte, los filtrados de cultivos fúngicos, y por otra, los cultivos celulares de varios clones de olmos con distinta susceptibilidad a la grafiosis. El efecto se ensayó sobre dos materiales de experimentación distintos: callos y células aisladas de olmo (técnica del “Plating”).

La resistencia a la grafiosis no se mostró relacionada con el crecimiento de los callos de olmo en presencia de distintas concentraciones de filtrados. La utilización de células aisladas como material de experimentación permitió observar con mayor contraste el efecto causado por los componentes del medio de cultivo sobre el crecimiento de los tejidos de olmo cultivados “in vitro”.

Como conclusión, el crecimiento de los tejidos indiferenciados de olmo en presencia de los filtrados de cultivos fúngicos no es un método adecuado para ser usado en la selección de olmos resistentes a la grafiosis.

### **C3.14 DETERMINACION DE ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS RELACIONADAS CON LA RESISTENCIA DE VARIEDADES DE MELÓN FRENTE A *Sphaerotheca fuliginea* raza 1.**

Rivera, M.E.<sup>1</sup>, Olalla, L.<sup>2</sup>, Pérez-García, A.<sup>1</sup>, Codina, J.C.<sup>1</sup>, Fernández-Ranea, J.M.<sup>1</sup>, y de Vicente, A.<sup>1</sup>.

1. *Dpto. de Microbiología. Fac. de Ciencias. Univ. de Málaga. 29071, Málaga.*

2. *CIFH "La Mojonera". Apart. 91, El Ejido. 04700, Almería*

El oidio, causado por *Sphaerotheca fuliginea*, es una de las principales enfermedades de melón. Se han identificado tres razas diferentes del hongo, de las cuales solo las razas 1 y 2 han sido aisladas en España. Existen diversos cultivares de melón que manifiestan resistencia dependiente de la raza del hongo; así el cultivar Rochet es sensible a la raza 1 y el cultivar PMR-6 es resistente a las razas 1 y 2. Además se ha descrito una variedad, ANC-57, que manifiesta un grado de resistencia a la raza 1 dependiente de la temperatura; esta variedad es resistente cuando se cultiva a 26°C, mientras que a 21°C presenta sensibilidad parcial al ataque fúngico.

Las plantas frente al ataque de patógenos expresan una serie de respuestas bioquímicas que se pueden agrupar en tres tipos: síntesis de proteínas relacionadas con la patogénesis (PRs), entre las que destacan aquellas con actividad  $\beta$ -1,3-glucanasa y quitinasa, que actúan hidrolizando la pared celular fúngica y liberando moléculas "elicitors", síntesis de calosa, lignina y suberina, que bloquean los puntos de penetración del patógeno, y síntesis de metabolitos con actividad antimicrobiana, como las fitoalexinas; en la síntesis de lignina y fitoalexinas, la fenilalanina amonio-liasa (PAL) es la primera y más importante enzima de esta ruta.

En este trabajo se presentan resultados sobre la inducción de la  $\beta$ -1,3-glucanasa y PAL en las variedades de melón ANC-57, PMR-6 y Rochet durante la infección por *S. fuliginea* raza 1. Para los ensayos, las plantas se crecieron en cámaras de cultivo a 21 o 26°C, 16 h de fotoperiodo y 3800 lux. La 2ª hoja verdadera se inoculó extendiendo las esporas sobre la superficie de la hoja con un pincel. La actividad PAL se determina de forma directa, mediante extracción de la enzima y ensayo de actividad por detección espectrofotométrica a 290 nm de t-cinnamato. Asimismo la actividad PAL, necesaria en la síntesis de lignina, se puso de manifiesto de forma indirecta por la proporción de células que presentaban paredes lignificadas, mediante una técnica histoquímica, que emplea azul de toluidina. El estudio de la  $\beta$ -1,3-glucanasa se está llevando a cabo mediante tres aproximaciones experimentales: un ensayo colorimétrico, el que determina la actividad enzimática en función de la glucosa producida a partir de laminarina a 660 nm; por detección de actividad directamente en geles de acrilamida en condiciones nativas; mediante western blot, con un anticuerpo frente a  $\beta$ -1,3-glucanasa de tomate. Además en ambos casos se está analizando la expresión de mRNAs específicos, usando como sondas un clon de cDNA de  $\beta$ -1,3-glucanasa de *Nicotiana plumbaginifolia*, y un clon de cDNA de PAL de perejil. En general los resultados parecen indicar que en ANC-57 a 26°C la inducción de estas actividades ocurre de forma similar a la variedad resistente, PMR-6; mientras que a 21°C la manifestación de la resistencia está retrasada en el tiempo.

### C3.15 ESTUDIO DE MARCADORES MOLECULARES DE OLIVO ASOCIADOS A LA RESISTENCIA AL HONGO *Spilocaea oleagina* (Cast.) Hughes.

Vigliocco, A.<sup>1</sup>; Guerrero C.<sup>1</sup>, Botella, M. A.<sup>1</sup>; Valpuesta, V.<sup>1</sup>; Sánchez-Sevilla, J. F.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Bioquímica y Biología Molecular. Universidad de Málaga.

<sup>2</sup>Centro de Investigación y Formación Agraria de Málaga. Cortijo de la Cruz. Churriana. Málaga.

El “repilo” es una enfermedad de la planta de olivo (*Olea europaea* L.) causado por el hongo *Spilocaea oleagina* (Cast.) Hughes. Este hongo produce la defoliación del árbol con el consiguiente debilitamiento e importantes pérdidas en productividad. Se ha observado en esta relación planta-patógeno variedades de olivo con diferentes grados de susceptibilidad ante el ataque del hongo (López Doncel *et al.*, 1995).

Con el objetivo de conocer los mecanismos que operan en la defensa de la planta ante el ataque del hongo se plantearon las siguientes estrategias:

1) La búsqueda de marcadores moleculares asociados a la enfermedad mediante el uso de la técnica de AFLP (*Amplified Fragments Length Polimorfism*).

2) El aislamiento y la clonación de genes de olivo homólogos a genes de resistencia identificados en otras especies de plantas.

En la identificación de marcadores moleculares se utilizaron variedades con diferente grado de susceptibilidad al repilo, así como cruzamientos entre variedades susceptibles y resistentes. En una primera aproximación en el análisis de los perfiles de AFLP se ha podido observar patrones diferenciales de bandas entre variedades susceptibles y tolerantes a la enfermedad.

Recientemente, se han aislado varios genes de plantas que confieren resistencia a diversos patógenos. La comparación de la secuencia de estos genes revela una similitud en su estructura, aunque sin embargo, la homología a nivel de secuencia es muy baja. El alineamiento de los aminoácidos de estos genes determina la presencia de ciertas regiones conservadas. El aislamiento de fragmentos homólogos a estos genes de resistencia se realizó mediante el diseño de oligonucleótidos de secuencia degenerada correspondientes a las regiones conservadas. La amplificación por PCR a partir de DNA genómico del olivo permitió obtener una serie de bandas que fueron clonadas y secuenciadas. El análisis de las secuencias de los productos clonados mostró una homología significativa a genes de resistencia de diversas especies de plantas.

Este trabajo ha sido financiado por el proyecto OLI96-2185-CO403. A. Vigliocco esta financiada por una beca del Instituto de Cooperación Iberoamericana.

### C3.16 UNA NUEVA RAZA DE *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli* EN ESPAÑA

Alves Santos, F.M.<sup>1</sup>, Díaz Mínguez, J.M.<sup>1</sup>, Rodrigues Cordeiro, L.<sup>1</sup>, Sayagués Manzano, J.M.<sup>1</sup>, García Benavides, P.<sup>2</sup>, Martínez Crespo, M.C.<sup>3</sup>, Eslava, A.P.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Area de Genética. Departamento de Microbiología y Genética. Universidad de Salamanca. Plaza de los Doctores de la Reina s/n. 37007. Salamanca.

<sup>2</sup>Centro Regional de Diagnóstico. Consejería de Agricultura y Ganadería. Junta de Castilla y León. Apdo. 61. 37080 Salamanca.

<sup>3</sup>Departamento de Pastos y Forrajes. Servicio de Investigación Agraria. Consejería de Agricultura y Ganadería. Junta de Castilla y León. Apdo.Oficial. 37008 Salamanca.

El control de los hongos patógenos residentes en el suelo, como es el caso de *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli* (FOP), es difícil debido a su capacidad para sobrevivir como saprófitos aun en ausencia del hospedador. Las dos estrategias de combate más factibles son adecuar las prácticas de cultivo, para evitar la proliferación del patógeno y optimizar la salud de la planta, y la mejora genética para resistencia de las plantas afectadas.

En el caso de la fusariosis vascular, las variedades resistentes que se han descrito lo son frente a poblaciones de patógenos de origen predominantemente sudamericano. A efectos de planificar la mejora genética para fusariosis vascular de variedades de judía propias de Castilla y León, sería útil determinar la estructura en razas de los aislados de FOP autóctonos. Se han descrito cinco razas distintas de FOP, en función de las diferentes capacidades patogénicas de los aislados frente a un conjunto de variedades de judía establecido por el CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical, Cali, Colombia). Estas razas se corresponden a grandes rasgos con la procedencia geográfica de los aislados.

Los ensayos de infección realizados con aislados de FOP procedentes de El Barco de Avila y las variedades diferenciales del CIAT, ofrecen un patrón de especificidades de infección diferente a los descritos para las cinco razas conocidas. En consecuencia, estos aislados autóctonos han de encuadrarse en una nueva raza, que denominamos raza 6. Hemos determinado que los aislados autóctonos de FOP son altamente virulentos frente a todas las variedades diferenciales, incluso aquellas como HF 465-63-1 que son resistentes a todas las otras razas.

Adicionalmente, hemos comparado el comportamiento de aislados de la raza 6 con el de representantes de las otras cinco razas. Para ellos hemos determinado y comparado las cinéticas de infección frente a cuatro variedades muy cultivadas en Castilla y León (Blanca Riñón, Blanca Redonda, Plancheta y Pinta). Los resultados, en su conjunto, indican que los aislados de la raza 6 son más virulentos frente a estas variedades de judía que los aislados de las razas 1, 2, 3, 4 y 5.

### **C3.17 LA ELIMINACIÓN DEL GEN Bde47 DE *Botrytis cinerea* DETERMINA EN EL PATÓGENO UN AUMENTO DE SU CAPACIDAD PARA INFECTAR A LA PLANTA HUÉSPED**

Arranz, M., Eslava, A.P. y Benito, E.P.

*Area de Genética. Dpto. de Microbiología y Genética. Universidad de Salamanca. Edificio Departamental. Plaza Doctores de la Reina S/N. 37007. Salamanca.*

*Botrytis cinerea* es un hongo fitopatógeno importante que infecta una amplia variedad de plantas cultivadas. El control de la enfermedad resulta complicado, ya que el patógeno puede atacar distintos cultivos prácticamente en cualquier fase de desarrollo de los mismos así como infectar cualquier parte de la planta. Esta versatilidad del patógeno sugiere que el hongo posee diferentes mecanismos de infección. El análisis de estos mecanismos y la caracterización de los genes implicados en los mismos constituyen los objetivos fundamentales de nuestro trabajo.

Con el fin de identificar genes de *B. cinerea* implicados en el proceso de patogénesis hemos iniciado el estudio de genes del hongo cuya expresión es inducida durante su interacción con la planta huésped utilizando como sistema de trabajo la interacción *B. cinerea*-tomate. Mediante una aproximación experimental basada en el análisis y comparación del patrón de expresión génica del hongo durante su interacción con la planta huésped con el patrón de expresión del hongo durante su crecimiento saprofítico se han aislado varios fragmentos de cDNA derivados de genes de *B. cinerea* cuya expresión es inducida *in planta*. El primero de estos genes, Bde47, muestra expresión transitoria durante la interacción, con niveles de expresión muy elevados durante los estadios iniciales del proceso de infección, durante la formación de lesiones dispersivas y durante la colonización de la planta huésped en los estadios finales de la infección, sugiriendo una posible participación de su producto génico en las fases indicadas. Para confirmar esta posible implicación, se está llevando a cabo una caracterización funcional de mutantes deficientes en el gen Bde47 obtenidos por procedimientos de interrupción génica. Los mutantes Bde47<sup>-</sup> no presentan alteraciones morfológicas apreciables pero sí presentan, sorprendentemente, una agresividad superior a la de la cepa silvestre en ensayos de patogenidad sobre hojas de tomate, produciendo lesiones dispersivas que aparecen más temprano y progresan más rápidamente.

Dado el fenotipo de los mutantes deficientes en el gen Bde47, la identificación de su producto génico y el análisis de las consecuencias derivadas de su ausencia pueden proporcionar información sobre aspectos importantes de los mecanismos mediante los cuales *B. cinerea* es capaz de infectar la planta huésped.

### **C3.18 RESPUESTA DE LAS PEROXIDASAS A LA INFECCIÓN CON *Verticillium dahliae* EN PLANTAS DE *Capsicum annuum* L var. *annuum*.**

Pomar\*, F., Bernal, M.A. y Merino, F.

*Departamento de Biología Animal, Biología Vegetal e Ecología. Facultad de Ciencias. Universidade da Coruña, 15071 A Coruña. \* e-mail: fedefv@mail2.udc.es*

El marchitamiento, también conocido como “seca” o “tristeza”, producida por los hongos *Phytophthora capsici* y *Verticillium dahliae* es sin duda la enfermedad de mayor trascendencia económica en los cultivos de pimiento. Los mecanismos de defensa de las plantas ante los distintos patógenos incluyen una gran variedad de respuestas fisiológicas, como la síntesis de fitoalexinas o la sobreexpresión de distintas enzimas normalmente de carácter oxidativo o hidrolítico. Las peroxidasas forman parte de este sistema múltiple de respuesta. Estas enzimas juegan un importante papel en los procesos de endurecimiento de la pared, a través del entrecruzamiento difenólico y la lignificación, lo cual da lugar a la formación de una barrera física que impide el crecimiento del micelio. Asimismo, se ha apuntado la posibilidad de que radicales libres producidos por la acción de la peroxidasa, actúen como sustancias tóxicas que impidan la germinación de las esporas o el crecimiento del micelio.

Con el fin de estudiar la respuesta de las peroxidasas del pimiento a la infección con *Verticillium dahliae*, se inocularon plantas de 15 días con una suspensión de conidios a una concentración de  $10^6$ /ml. Para ello, se sumergían las plantas en la suspensión durante 45 minutos, tras haberles realizado un corte a medio centímetro del extremo de la raíz, para favorecer la infección. Asimismo, se preparó un control sustituyendo el inóculo por agua estéril. Tras la inoculación, se recogieron muestras a las 12, 24 y 48 horas y a los 7, 14, 21 y 28 días, congelándolas en nitrógeno líquido hasta su posterior análisis.

Se pudo comprobar, por medio de medidas espectrofotométricas, como a partir de los 7 días la actividad peroxidasa se veía incrementada tanto en tallo como en hojas hasta alcanzar un máximo a los 28 días desde la inoculación, si bien las raíces no experimentaban aumento hasta los 14 días. Por otra parte, el análisis zimográfico nos permitió observar como ya a partir de los 7 días se observan diferencias en todos los órganos, ya que en el patrón de isoenzimas aparece un balance en las formas ácidas aumentando el porcentaje de las A<sub>1</sub> y A<sub>2</sub> y descendiendo el de las A<sub>3</sub> y A<sub>5</sub>.

### C3.19 EVALUACIÓN DE LA RESISTENCIA A *Puccinia graminis* Y *P. recondita* EN POBLACIONES NATURALES DEL GÉNERO *Aegilops*.

Vicente Aparicio, M.A. y García Gonzalo, P.

*Instituto Madrileño de Investigación Agraria y Alimentaria. Comunidad de Madrid. Finca El Encín, Apdo. 127. 28800 Alcalá de Henares.*

Las especies silvestres del género *Aegilops* se consideran de gran interés en los programas de mejora de cereales, como donantes de genes de resistencia, entre otros, a *Puccinia graminis* f. sp. *tritici* y *P. recondita* f. sp. *tritici*.

Con el objeto de encontrar nuevas fuentes de resistencia a ambas royas, se han evaluado 45 poblaciones naturales pertenecientes a los géneros *Aegilops ovata*, *A. triuncialis* y *A. ventricosa*, recolectadas en 39 localidades españolas. Las inoculaciones se realizaron en estado de plántula con tres aislamientos de *P. recondita*, R-6, R-58 y R-84 y con R-34 de *P. graminis*.

Los resultados de esta evaluación ponen de manifiesto la presencia en todas las especies de poblaciones resistentes a la roya del tallo y de la hoja a excepción de *Ae. triuncialis* que es susceptible a *P. graminis*.

Se ha detectado la existencia de variabilidad interpoblacional de *Ae. ovata* y *Ae. triuncialis* con respecto a su resistencia a *P. recondita*. Esta variación podría explicarse en base a su relación con el hábitat natural de estas poblaciones. La asociación entre el grado de susceptibilidad / resistencia a los distintos aislamientos de *P. recondita* y los parámetros ecogeográficos correspondientes a las localidades donde fueron recolectadas las poblaciones, se estimó mediante la correlación producto-momento de Pearson. Los resultados sugieren que las poblaciones recolectadas dentro de su área natural de distribución acumulan más resistencia posiblemente por una mayor presión del patógeno en esas zonas.



### C3.20 RESISTENCIA DE CULTIVARES DE OLIVO A PATOTIPOS DE *Verticillium dahliae* Kleb.

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

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

La amplia utilización del cv Picual, extremadamente susceptible a *V. dahliae*, y el establecimiento en suelos infestados han contribuido al incremento de la Verticilosis en las nuevas plantaciones de olivar. El uso de cvs resistentes puede reducir la severidad de las infecciones y complementarse con otros medios de control en una estrategia de lucha integrada, lo que hace necesario conocer la resistencia de los cvs a los patotipos de *V. dahliae* existentes. En Andalucía se han identificado dos patotipos de *V. dahliae* predominantes, defoliantes (muy virulentos) y no defoliantes (moderadamente virulentos), denominados así por su reacción en algodonero. La capacidad patogénica en olivo se corresponde con la descrita en algodonero.

La resistencia de 23 cvs de olivo a los aislados V117 (defoliante) o V4 (no defoliante) de *V. dahliae*, se ha investigado en varios experimentos en ambiente controlado. Puesto que en los experimentos se utilizaban diferentes cvs, en todos ellos se repitieron los cvs Picual y Oblonga como testigos susceptibles y resistentes respectivamente. Se emplearon estaquillas enraizadas de 9-12 meses de edad que se inocularon por inmersión de raíces desnudas en una suspensión de  $10^7$  con/ml durante 30 min. y se transplantaron a macetas con suelo estéril. La resistencia de los cvs se estimó por la severidad de los síntomas (escala 1-5) y porcentaje de plantas muertas (PPM) a las 12 semanas de la inoculación (sdi) y por el área bajo la curva de progreso de la enfermedad (ABCPE) de la severidad de las reacciones.

Los dos cvs comparativos de la infección, Picual y Oblonga, fueron infectados por ambos patotipos, aunque de forma diferenciada. V4 causó infecciones asintomáticas en Oblonga y moderadas a severas en Picual. V117 ocasionó defoliación y muerte a las 4-8 sdi en Picual, y síntomas menos severos en Oblonga. En todos los cvs la severidad de las reacciones varió con el aislado utilizado, siendo más severa con el patotipo defoliante, por lo que la resistencia debe ser referida al patotipo existente. En las inoculaciones con el aislado defoliante, Empeltre y Frantoio destacaron del resto por su considerable nivel de resistencia, comparable e incluso superior a Oblonga, reflejado por el ABCPE (40-52%) y PPM (0-14%), por lo que han sido caracterizados como moderadamente resistentes. Sin embargo, la mayoría fueron susceptibles, con ABCPE del 57-77% y mortalidad del 25 a 89%; ó extremadamente susceptibles, con más del 90% de PPM y ABCPE superior al 70%. Con relación al patotipo no defoliante, consideramos resistentes los cvs Oblonga, Empeltre, Cobrancosa, Verdial de Alcaudete y Manzanilla, con 0% de PPM y una ABCPE de 25-31%; moderadamente resistentes los cvs con 0% de PPM y ABCPE de 28-39%; susceptibles, los cvs con 0-50% de PPM y ABCPE de 35-62%; y extremadamente susceptible los cvs con valores superiores a los anteriores.

**C3.21 HISTOPATOLOGÍA DE LAS PRIMERAS FASES DEL ATAQUE DE *Acremonium cucurbitacearum* Alfaro-García, W. Gams et J. García-Jiménez A MELÓN**

Sales, R.<sup>1</sup>, García-Jiménez, J.<sup>1</sup>, Moya, M<sup>a</sup>. J.<sup>1</sup>, Armengol, J.<sup>1</sup> y García-Luis, A.<sup>2</sup>

1. *Patología Vegetal. Dpto. Producción Vegetal. Universidad Politécnica de Valencia. Camino de Vera s/n. 46022. Valencia.*
2. *Dpto. Biología Vegetal. Universidad Politécnica de Valencia. Camino de Vera s/n. 46022. Valencia.*

*A. cucurbitacearum*, uno de los agentes implicados en el colapso del melón, afecta a las plantas de melón desde sus primeros estadios de desarrollo produciendo pardeamiento y acorchamiento de la zona del hipocotilo y necrosis de raicillas.

Basándose en estudios preliminares sobre histopatología del ataque del hongo a plantas de melón se ha realizado un estudio más detallado en el que mediante microscopía óptica y microscopía electrónica de barrido (criofractura), se han obtenido informaciones más precisas sobre la penetración del hongo y colonización en las zonas afectadas.

Se inocularon macetas con la cepa tipo A-419 con 50.000 UFC/g de suelo y se sembraron semillas pregerminadas de melón Piel de Sapo PS-1430. Se muestrearon a los 3, 6, 9, 12 y 15 días de la siembra. De cada una de ellas se seleccionaron fragmentos de hipocotilo y raíces para realizar los estudios histológicos. Las muestras fueron incluidas en bloques de parafina realizándose cortes histológicos de 25µm con un microtomo y teñidos con la tinción de Gerlach para su observación.

El estudio anatómico indica que las raicillas son los puntos de penetración del hongo hacia la raíz principal, en la que, a los 6 días, se encuentran hifas del hongo en el parénquima, pero no en los haces vasculares.

El hipocótilo no presenta infección hasta transcurridos los 12 días y el hongo se aloja en las células del cortex.

Se estudian las alteraciones histológicas que produce el hongo a nivel de las zonas infectadas.

### **C3.22 EVALUACIÓN DE LA RESISTENCIA CLONAL EN CHOPO FRENTE A *Cytospora chrysosperma* Fr.**

Alonso Izquierdo, D., Pajares Alonso, J.A., Diez Casero, J.J.

*Departamento de Producción Vegetal y Silvopascicultura. Universidad de Valladolid. Escuela Técnica Superior de Ingenierías Agrarias (E.T.S.I.I.A.A.). Av/ de Madrid 57. Palencia.*

*Cytospora chrysosperma* Fr. es un hongo que se encuentra frecuentemente sobre frondosas. Normalmente aparece en estado saprófito, pero en ocasiones actúa como parásito facultativo sobre chopos en condiciones de estrés medioambiental, atacados por plagas, etc.

*C. chrysosperma* se desarrolla debajo de la corteza, la cual toma un color pardo oscuro. Posteriormente aparecen los cuerpos de fructificación asexuales (picnidios) expulsando en tiempo húmedo zarcillos de color anaranjado (cirros), durante las estaciones de primavera y otoño. En el estadio final la corteza se seca, se desgarran en tiras y toma una coloración negruzca.

En el presente estudio, se pretende determinar el poder patogénico de *C. chrysosperma* y la resistencia clonal en chopos, mediante ensayos de inoculación sobre estaquillas de 11 clones de chopo (I-214, TRIPLO, I-MC, FLEVO, I-488, AGATHE F., LUX, 114/69, LUISA AVANZO, CANADA BLANCO y CAMPEADOR) y sobre chopos adultos de cuatro de estos clones (I-214, I-488, TRIPLO y FLEVO). En todos los ensayos se dejaron estaquillas o chopos sin inocular como control.

La sintomatología típica de *C. chrysosperma* ha aparecido sobre un 59% de las estaquillas inoculadas, aunque solo un 8% se han visto seriamente afectadas. Sobre los chopos adultos no se han detectado síntomas de la enfermedad hasta el momento.

### C3.23 CONTROL GENÉTICO DE EXOPOLIGALACTURONASA EN *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-lycopersici* (FORL)

\*Posada, M.L.; \*Patiño, B.; de las Heras, A.; \*Vázquez, C., González-Jaén, M.T.

*Departamentos de Genética y \*Microbiología III, Facultad de Biología, UCM, Ciudad Universitaria, 28040-Madrid.*

El cultivo de FORL, patógeno del tomate, sobre pectina o ácido galacturónico induce la producción de un complejo de poligalacturonasas (PGs) con modos de acción de tipo exo y endo. La purificación de la actividad exo-PG, mayoritaria del día de máxima actividad en cultivos de pectina, permitió la secuenciación de su extremo N-terminal y de un péptido interno. En base a ambas secuencias se diseñaron dos oligonucleótidos degenerados que se usaron como cebadores para la amplificación por PCR de secuencias codificadoras para exo-PG en el genoma de FORL. El producto de amplificación obtenido, de 755 pb, tenía una similitud de secuencia significativa con los dos únicos genes de exo-PGs descritos hasta ahora en hongos. Este fragmento fue utilizado como sonda para el estudio del control genético de esta enzima en cultivos de FORL sobre pectina y ácido galacturónico. El control de su expresión es básicamente a nivel transcripcional. El curso de la inducción del mRNA correspondiente al gen *exo-pg* se analizó mediante northern blot a diferentes tiempos comparando el efecto del inductor utilizado, pectina o ácido galacturónico, y el curso de la inducción del mRNA del gen *endo-pg*. El gen codificador para exo-PG tiene probablemente una sola copia por genoma en FORL y en otras especies de *Fusaria* analizadas mediante *Southern blot*, como ocurre para el gen *endo-pg* en las mismas especies.

#### C4.1 RESISTENCIA A *Tylenchulus semipenetrans* Cobb. EN NUEVOS PATRONES HÍBRIDOS DE CÍTRICOS.

Verdejo Lucas, S<sup>1</sup>, Sorribas, F. J<sup>2</sup>, Forner, J. B.<sup>3</sup>, Alcaide A<sup>3</sup>.

1. Dpto. Patología Vegetal, IRTA, Crta de Cabrils s/n, 08348 Cabrils, Barcelona.

2. Dpto. de Agronomía, ESAB. Comte d' Urgell 187, 08036 Barcelona.

3. Dpto. Citricultura, I.V.I.A, Apartado oficial, 46113, Moncada, Valencia,

El nematodo de los cítricos produce la enfermedad conocida como el decaimiento lento de los cítricos y limita la producción cítrica en condiciones edáficas y medio-ambientales muy variadas. El uso de patrones resistentes es un método de control efectivo, económico y no agresivo con el medio ambiente. Sin embargo, la existencia de biotipos del nematodo puede limitar la utilidad de algunos patrones resistentes. *Poncirus trifoliata* se utiliza como parental para obtener patrones resistentes al virus de la tristeza, *Phytophthora* y *T. semipenetrans*. Se evaluó la respuesta de nuevos patrones híbridos de cítricos, procedentes del programa de mejora de patrones de agrios del IVIA, frente a *T. semipenetrans*. Estos híbridos se caracterizaban por su resistencia o tolerancia al virus de la tristeza. Previamente a este estudio, se realizó un Test de Hospedadores Diferenciales para identificar los biotipos de *T. semipenetrans* más frecuentes en España. Los huéspedes diferenciales utilizados fueron *P. trifoliata*, olivo, swingle citranelo y naranjo amargo. Los resultados de este test mostraron que el biotipo de *T. semipenetrans* presente en España era el biotipo Mediterráneo probablemente debido a la amplia difusión de los patrones naranjo amargo y citranges Troyer y Carrizo. Para evaluar la resistencia a *T. semipenetrans* en ensayos de invernadero, se inocularon plantas de un año de edad con 10.000 huevos + juveniles por planta y se determinó la infectividad y potencial reproductivo del nematodo 6 meses después de la inoculación. Se evaluaron 26 híbridos de mandarina Cleopatra x *P. trifoliata*, 13 de mandarina Cleopatra x citrange Troyer, 17 citrange Troyer x mandarina Cleopatra, 1 de citrange Troyer x mandarina común, 1 de mandarina común x Troyer citrange, 4 de *Citrus wolkameriana* x *P. trifoliata*, 1 de tangelo Minneola x *P. trifoliata* y 2 de mandarina king x *P. trifoliata*. Se incluyó naranjo amargo y *P. trifoliata* como controles, susceptible y resistente al nematodo, respectivamente, y cada combinación nematodo-planta se repitió 7 veces. De los 66 patrones ensayados, 15 híbridos de mandarina Cleopatra x *P. trifoliata* (58% de los híbridos de esta selección); 3 de *Citrus wolkameriana* x *P. trifoliata* y uno de mandarina king x *P. trifoliata* mostraron resistencia al nematodo. Los híbridos con citrange Troyer como parental eran susceptibles a *T. semipenetrans* pero mostraban diferentes grados de susceptibilidad que representaban niveles bajos, medios y altos de reproducción del nematodo. La identificación de resistencia a *T. semipenetrans* en híbridos que son tolerantes al virus de la tristeza es de gran interés por su aplicación práctica pues algunos de estos híbridos poseen, además, caracteres agronómicos interesantes para su explotación comercial.

#### C4.2 INCIDENCIA Y PATOGENICIDAD DE NEMATODOS FITOPARÁSITOS EN PLANTONES DE OLIVO (*Olea europaea* L.) EN VIVEROS DE ANDALUCÍA

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

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

La notoria expansión y modernización del olivar en España en los últimos años ha dado lugar a la ampliación e intensificación de la actividad viverista en olivo. La significación de la sanidad del material vegetal inicial respecto del futuro productivo de la plantación, aconseja pues realizar estudios fitosanitarios en el contexto de la tecnología utilizada para la producción de plantones de olivo. Ello ha sido reconocido en la reciente legislación de la Junta de Andalucía sobre producción integrada del olivar, y es reforzado por pérdidas de vigor y decaimiento de las plantas observado en olivares jóvenes, a los que se ha asociado un complejo de factores relacionados con el suelo uno de cuyos componentes son los nematodos fitopatógenos.

Este trabajo se plantea con el objetivo de valorar la incidencia y distribución de nematodos fitopatógenos en el suelo y las raíces de plantones de olivo en diferentes viveros comerciales de las provincias de Córdoba, Jaén y Sevilla; así como de evaluar la patogenicidad de las especies con mayor significación fitonematológica sobre los cultivares de olivo de mayor repercusión en la moderna olivicultura.

En los viveros estudiados se han seleccionado plantas al azar de cada uno de los cultivares presentes en los mismos, y se ha realizado un análisis y estimación de las poblaciones de nematodos fitoparásitos en suelo y raíces de dichas plantas.

Los análisis nematológicos efectuados indican una elevada incidencia y distribución de los siguientes grupos tróficos de nematodos fitoparásitos: a) noduladores de raíz (*Meloidogyne arenaria*, *M. incognita*, *M. javanica* y *M. lusitanica*); b) lesionadores de raíz (*Pratylenchus fallax*, *P. penetrans*, *P. vulnus*, *P. thornei*, y *Zygotylenchus guevarai*); y c) ectoparásitos migratorios (*Criconemella xenoplax*, *Helicotylenchus pseudorobustus*, *H. vulgaris*, *Paratylenchus arcuatus*, *Para-trichodorus minor*, *P. teres*, *Trichodorus giennensis* y *Xiphinema pachtaicum*).

Asimismo, se han aislado y multiplicado poblaciones de *P. penetrans*, *P. vulnus*, *M. arenaria*, *M. incognita*, y *M. javanica* y se ha evaluado su patogenicidad sobre plantones de 3-4 meses de edad de los cultivares Arbequina y Picual en condiciones controladas. Los resultados obtenidos indican que el parasitismo por estos nematodos reduce significativamente el crecimiento de las plantas en ambos cultivares.

\*Subvencionado por el proyecto OLI96-2131

### C4.3 HISTOPATOLOGÍA DE LAS INFECCIONES DE PLANTONES DE OLIVO (*Olea europaea* L.) POR *Meloidogyne* spp. EN VIVEROS DE ANDALUCÍA

Rapoport, H.<sup>1</sup>, Castillo, P.<sup>1</sup>, Vovlas, N.<sup>2</sup> y Jiménez-Díaz, R.M.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Protección de Cultivos, Instituto de Agricultura Sostenible, CSIC, Apdo. 4084, 14080-Córdoba

<sup>2</sup> Instituto di Nematologia Agraria, CNR, Via G. Amendola 165/A, 70126-Bari, Italia

La utilización de material de plantación infectado por nematodos fitopatógenos constituye un riesgo para el establecimiento y posterior capacidad productiva de las nuevas plantaciones de olivar. En prospecciones recientes de viveros de olivo en Andalucía, hemos detectado elevadas incidencias de infecciones de plantones de olivo por diferentes especies de nematodos noduladores (*Meloidogyne* spp.).

En este trabajo se han estudiado las modificaciones histopatológicas en el sistema radical de plantones de diferentes cultivares de olivo obtenidos de viveros comerciales de Andalucía, que estaban infectados naturalmente por *Meloidogyne arenaria*, *M. incognita*, *M. javanica*, y *M. lusitanica*.

En cada vivero muestreado se seleccionaron plantones de todos los cultivares existentes (Arbequina, Cornicabra, Hojiblanca, Manzanilla, Picual), con edades comprendidas entre 3 y 18 meses. De los sistemas radicales con síntomas de nodulación se aislaron porciones noduladas de 5-10 mm de longitud, que fueron fijadas en FAE, incluidas en parafina y seccionadas en series de cortes longitudinales y transversales de 10-12 µm de grosor.

La observación microscópica de dichas secciones histológicas puso de manifiesto que, en todas las combinaciones seleccionadas y estudiadas, la infección por el nematodo originó células gigantes multinucleadas, situadas en el cilindro central y principalmente en las proximidades de los tejidos vasculares, cuyo número y extensión dió lugar a la distorsión del sistema vascular. La formación de las células gigantes estuvo asociada con una intensa proliferación celular (hiperplasia) en el tejido adyacente a la zona de infección, constituyendo el nódulo radical. En cada nódulo, el número de hembras fué variable si bien se encontraron hasta 8 hembras por nódulo en las raíces con mayores niveles de infección. Asimismo, la matriz gelatinosa conteniendo la masa de huevos del nematodo, normalmente extratisular, la hemos observado con bastante frecuencia incluida dentro del parénquima cortical de la raíz, y especialmente en la combinación *M. arenaria* -‘Cornicabra’. Estos resultados sugieren que la infección por el nematodo perjudica significativamente la fisiología del sistema radical del plantón de olivo, que puede ser aún más acentuada por la posibilidad de infecciones secundarias originadas por los huevos eclosionados intratisularmente.

\*Subvencionado por el proyecto OLI96-2131

## **D1.1 ESTADO ACTUAL DE LA SHARKA DE LOS FRUTALES DE HUESO EN LAS COMUNIDADES DE MURCIA Y VALENCIA**

Dicenta, F.<sup>1</sup>, Martínez-Gómez, P.<sup>1</sup>, Abad, E.<sup>2</sup>, García-Vidal, S.<sup>3</sup>, Llácer, G.<sup>4</sup>

- 1. Centro de Edafología y Biología Aplicada del Segura (CSIC). Apartado 4195, 30080 Murcia.*
- 2. Consejería de Medio Ambiente, Agricultura y Agua. Comunidad Autónoma de Murcia. La Alberca, Murcia.*
- 3. Conselleria de Agricultura, Pesca y Alimentación. Generalitat Valenciana. Ctra. Alicante-Valencia, Km. 276,5, 46460 Silla, Valencia.*
- 4. Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA). Apartado Oficial, 46113 Moncada, Valencia.*

Desde su detección en España, a mediados de los años 80, el virus de la sharka (“Plum pox potyvirus” o PPV) se ha mostrado devastador en las plantaciones de albaricoquero que ha infectado, depreciando los frutos hasta hacerlos inercializables. Las Comunidades más afectadas han sido las de Valencia y Murcia, donde en estos momentos se teme seriamente por la continuidad de este cultivo. A pesar de que el PPV se ha detectado en otras Comunidades, en éstas su importancia actual es mucho menor. Todas las variedades de albaricoquero tradicionalmente cultivadas en España son sensibles a los aislados tipo Dideron de este virus presentes en España, manifestándose una sintomatología más importante en las variedades precoces, que son las más interesantes para el mercado. Los ciruelos japoneses cultivados en las mismas regiones están infectados muy frecuentemente, pero la producción y comercialización de frutos apenas se ve afectada en esta especie. La infección de melocotoneros, en cambio, es poco frecuente y poco relevante con los aislados de PPV actualmente presentes en nuestro país.

Desde 1988 en Murcia y desde 1991 en Valencia se arrancan cada año los albaricoqueros y ciruelos enfermos detectados por los propios agricultores o por las campañas llevadas a cabo por los Servicios de Sanidad Vegetal de las Administraciones Autonómicas. Hasta 1997 inclusive, 97.500 ciruelos y 12.500 albaricoqueros han sido arrancados en 10 años en la Comunidad Autónoma de Murcia, con un coste en indemnizaciones de 130 millones de pesetas. En esta Comunidad, a partir de 1996, también se obliga al arranque subvencionado de los melocotoneros enfermos. En la Comunidad Valenciana los arranques han sido mucho más numerosos, 322.000 ciruelos y 351.000 albaricoqueros en sólo 7 años, con un coste superior a los mil millones de pesetas.

Se discutirá la efectividad de estas medidas de arranque subvencionado y se comentarán las medidas de control alternativas.



## D1.2 BÚSQUEDA DE FUENTES DE RESISTENCIA A VIRUS EN GERMOPLASMA DE *Cucumis* sp.: CMV, PRSV-W, WMV-2, ZYMV.

Moriones, E., Gómez-Guillamón, M. L., Camero, R.

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

El melón (*Cucumis melo*) es un cultivo hortícola de gran importancia en España tanto por la superficie de cultivo dedicada como por la producción e ingresos económicos que genera. Un 75% de la producción se realiza en cultivos al aire libre en diferentes regiones de las mitades este y sur peninsulares, mientras que el 25% restante procede de cultivos protegidos localizados fundamentalmente en Almería.

Los mosaicos del melón causados por virus transmitidos por pulgones son unos de los principales problemas virales de los melones cultivados al aire libre en España. Entre ellos, destacan el virus del mosaico del pepino (CMV), el virus de las manchas anulares de la papaya-tipo W (PRSV-W), el virus del mosaico de la sandía 2 (WMV-2) y el virus del mosaico del calabacín (ZYMV) (Luis-Arteaga y col., 1988). Estos virus se transmiten de forma no persistente y ocasionan pérdidas de producción importantes si las infecciones se producen en fases tempranas del cultivo. Su control es complicado, ya sea mediante el manejo del cultivo o el control químico de los vectores. Por ello la incorporación de resistencia es la alternativa más deseable. La disponibilidad de cultivares comerciales de melón resistentes a estas virosis es muy limitada por lo que se ha abordado el objetivo de la búsqueda de fuentes de resistencia alternativas en el germoplasma de *Cucumis* sp. disponible en el banco de la Estación Experimental “La Mayora” del CSIC. Se han probado 74 entradas diferentes para su resistencia/tolerancia a dos aislados de CMV diferentes biológicamente, un PRSV-W, un WMV-2 y dos ZYMVs de los patotipos 0 y 1, respectivamente. Los resultados indican que algunas de las entradas pueden ser buenas candidatas para su empleo en programas de mejora genética.

### LITERATURA CITADA

Luis-Arteaga, M., Álvarez, J. M., Alonso-Prados, J. L., Bernal, J. J., García-Arenal, F., Laviña, A., Batlle, A., Moriones, E. 1998. Occurrence, distribution and relative incidence of mosaic viruses infecting field-grown melon in Spain. *Plant Disease* (en prensa).

### **D1.3 LA DISTANCIA GENÉTICA AL AISLADO CON MEJOR GRADO DE ADAPTACIÓN DETERMINA LA PROTECCIÓN CRUZADA EN PVY.**

Alicia Romero y Fernando Ponz

*INIA, Dpto. de Mejora Genética y Biotecnología, Ctra. La Coruña, Km. 7,3. 28040 Madrid.*

El virus Y de la patata, PVY, es uno de los virus de plantas que más se han estudiado y de los más importantes por su incidencia económica en Solanáceas cultivadas, pero poco se sabe de su evolución. Tradicionalmente se han establecido grupos de aislados de PVY dependiendo del huésped, sintomatología y serología. Esto ha llevado a una clasificación no homogénea.

En nuestro laboratorio se ha desarrollado un método de caracterización molecular de aislados de PVY basado en inmunocaptura-RT-PCR (Nolasco y cols., 1993), seguidas de análisis de restricción de los productos amplificados (RFLP, Blanco-Urgoiti y cols., 1995). Así, se ha establecido una clara separación de razas de PVY procedentes de patata y de otros huéspedes, en función de la distancia genética (Blanco-Urgoiti y cols., 1995). Parece deducirse que la adaptación al huésped ha constituido una componente importante en la evolución de las distintas razas de PVY. La especialización ha alcanzado un grado tal que razas de PVY de patata no infectan pimiento y viceversa.

En este trabajo se ha analizado el grado de adaptación ("fitness") de distintas razas de PVY en un huésped común, tabaco. Mediante este nuevo método somos capaces de analizar molecularmente el concepto de interferencia en las infecciones dobles y de convivencia de patógenos no distinguibles por síntomas o serología.

Para estudiar el grado de adaptación de PVY en tabaco, se coinocularon diferentes aislados de PVY-patata y PVY-pimiento. Así, dos aislados de PVY-pimiento pertenecientes a patotipos distintos no conviven en tabaco. En el caso de dos restrictotipos de PVY-patata, uno de ellos es rápidamente desplazado por el otro, mientras que un PVY-patata y un PVY-pimiento sí conviven durante muchos pases en tabaco. Estos resultados sugieren una íntima relación entre las distancias genéticas entre dos aislados de un mismo virus y su capacidad de establecer infecciones mixtas en una misma planta. Este resultado fue confirmado mediante coinoculación de parejas de aislados con distancias genéticas intermedias, que convivían un número intermedio de pases.

Para comprobar que estos resultados se pueden extender a experimentos de protección cruzada, se inocularon secuencialmente dos aislados de PVY con distancias genéticas y sintomatología diferentes. Los resultados confirman que sólo dos aislados con distancia genética grande pueden ser utilizados para ensayos de protección cruzada clásica.

Estos resultados permiten afirmar que es posible un diseño racional de estrategias de protección cruzada, si se conoce la estructura genética de la población viral circulante en una zona y cultivo determinado, posible mediante la tecnología utilizada.

Blanco-Urgoiti, B., Dopazo, J., Sánchez, F., and Ponz, F. 1995. Arch. Virol. 141, 2425-2442.  
Nolasco, G., De Blas, C., Torres, V., and Ponz, F. 1993. J. Virol. Meth. 45, 201-218.

#### **D1.4 TRANSFORMACIÓN GENÉTICA DE CÍTRICOS CON EL GEN DE LA PROTEÍNA DE LA CÁPSIDA DEL VIRUS DE LA TRISTEZA DE LOS CÍTRICOS COMO ESTRATEGIA PARA DESARROLLAR RESISTENCIA.**

Domínguez, A. , Juárez, J. , Pina, J.A. , Navarro, L. , Moreno, P. , Peña, L..

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

El virus de la tristeza de los cítricos (CTV) causa una de las enfermedades más importantes de este cultivo en el mundo. Este patógeno es particularmente agresivo en naranjos, mandarinos y pomelos injertados sobre naranjo amargo, lo que ha obligado en la mayor parte de los países citrícolas a abandonar el patrón naranjo amargo y sustituirlo por patrones tolerantes al virus. Esta medida ha sido insuficiente para resolver el problema en algunos países ya que con el tiempo han ido apareciendo cepas más agresivas de CTV capaces de causar daños en algunas variedades comerciales con independencia del patrón utilizado.

Hasta el momento, no se han desarrollado formas estables de protección. En los últimos 10 años, una de las estrategias más prometedoras de protección frente a virosis ha sido la transformación genética de plantas con genes o secuencias del virus. El gen más utilizado ha sido el que codifica la proteína de la cápsida viral, que ha conferido protección eficaz en diferentes sistemas planta-virus. En el presente trabajo se ha transformado lima Mexicana (*Citrus aurantifolia*. Swing.) con el gen que codifica la proteína p25 de la cápsida de CTV. La lima Mexicana es muy sensible a CTV, lo que la hace un sistema modelo idóneo para la evaluación de la protección.

Se amplificó mediante RT-PCR el gen p25 de los aislados españoles T317 y T305. El primero causa síntomas muy tenues en lima, mientras que el segundo es muy virulento en éste y otros huéspedes. El DNA sintetizado se clonó en el vector de expresión pMOG180, entre el promotor 35S del CaMV con doble *enhancer* y el terminador NOS del gen de la nopalina sintetasa. Se subclonaron los módulos de expresión en el plásmido binario PBI121, entre los módulos marcadores neomicina-fosfotransferasa II (NOS-pro/NPTII/NOS-ter) y  $\beta$ -glucuronidasa (35S-pro/GUS/NOS-ter). Se introdujeron en la cepa desarmada de *Agrobacterium tumefaciens* EHA 105 y con ésta se transformaron segmentos de entrenudos de lima Mexicana. Utilizando la kanamicina como agente de selección y la reacción histoquímica GUS como marcador informador, se identificaron los regenerantes transgénicos, se microinjertaron *in vitro* y posteriormente se propagaron en invernadero. Se ha confirmado el carácter transgénico de las plantas mediante amplificación del transgén por PCR y análisis Southern. La expresión de los transgenes se ha analizado por medio de ELISA y Western.

Se han seleccionado más de 30 líneas transgénicas, de las cuales más de 20 expresan el transgén de interés. Actualmente se está evaluando el comportamiento de las mismas frente a CTV.

## D1.5 ESTUDIO DE LOS RENDIMIENTOS DE PRODUCCION DE UN SISTEMA DE CONTROL INTEGRADO DE LA RIZOMANIA DE LA REMOLACHA AZUCARERA

Gomis, M.D. <sup>1</sup>, Redondo, J. <sup>2</sup>, Hermosa, M.R. <sup>3</sup>, Grondona, I. <sup>3</sup>, Rico, C. <sup>2</sup> y Monte, E. <sup>3</sup>

<sup>1</sup> AMC Chemical-Trichodex S.A. Vicente Aleixandre 4, 3ªA. 41920 San Juan de Aznalfarache, Sevilla.

<sup>2</sup> Sociedad Cooperativa General Agropecuaria ACOR. Paseo Isabel la Católica 1. 47001 Valladolid.

<sup>3</sup> Departamento de Microbiología y Genética, Universidad de Salamanca. Edificio Departamental. Laboratorio 208. Avda. Campo Charro s/n. 37007 Salamanca.

La rizomanía es la principal enfermedad vírica de la remolacha azucarera. Desde su detección en Castilla y León, hace ahora 10 años, se han desarrollado estrategias de control de esta enfermedad por medio de variedades tolerantes al virus, manejo de las condiciones agronómicas de los cultivos y control biológico, tendentes a una reducción de la concentración de inóculo del hongo vector (*Polymyxa betae*).

En colaboración con la Cooperativa ACOR, se llevaron a cabo ensayos de control biológico de rizomanía con la formulación TRICHOMIC® (AMC Chemical), desarrollada por nosotros, sobre plantas de remolacha transplantadas en dos campos de Nava de Arévalo (Ávila), en las campañas 1996/97 y 1997/98; y uno de Iscar (Valladolid), en la campaña 1997/98, con problemas tradicionales de rizomanía. La variedad de semilla utilizada fue Riposte (SES Ibérica).

En los tres campos ensayados y durante las dos campañas, los rendimientos económicos (pesetas/Ha) del cultivo nunca fueron inferiores a los testigos, consiguiéndose incrementos que variaron entre un 28.9 y un 7.7%, según los casos. En uno de los campos de Nava de Arévalo, el incremento de producción (Kg/Ha) en los tratamientos con TRICHOMIC® fue de 28.5 y 10.1% en cada una de las dos campañas.

El uso de una variedad tolerante (Riposte), a la vez que se modifican las condiciones de cultivo (transplante) y se aplican microorganismos antagonistas del hongo vector del virus (TRICHOMIC®), constituye un método eficaz de lucha integrada contra la rizomanía.

## D2.1 EFECTO DEL FOSETIL-AL Y ETEFÓN EN EL CONTROL DE LA NECROSIS DE YEMAS DE FLOR EN EL PERAL

Vilardell,P., Moragrega,C., Montesinos,E.

*Institut de Tecnologia Agroalimentària-CeRTA, Universitat de Girona, Avda. Lluís Santaló, s/n, 17071 Girona. E-mail:intea@intea.udg.es*

La necrosis de yemas de flor del peral es una enfermedad que se manifiesta como una destrucción parcial o total de las yemas de flor durante la dormición o durante el periodo de desborre. Las primeras observaciones de ataques graves en España fueron señaladas a finales de los años setenta en Girona, a mediados de los ochenta en Lérida, y más tarde, a principios de los noventa en otras zonas frutícolas españolas como el valle del Guadiana en Extremadura. Durante 1994-1996 se observaron problemas graves en algunas zonas de Francia (valles del Rhône y Garone), Italia (Emilia-Romagna), Sudáfrica (Cape Province), y Brasil (Rio Grande do Sul).

El origen de la enfermedad es complejo e incluye desde ataques de *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, a factores ligados al estado nutricional del peral durante la dormición invernal, o a desequilibrios durante el periodo vegetativo. En los ensayos causa-efecto y de control de la enfermedad que se han realizado se ha observado que los tratamientos con antimicrobianos derivados de cobre o antibióticos, o la aplicación de nutrientes para compensar posibles desequilibrios nutricionales no han sido efectivos. Sólo algunos fosfonatos, como el fosetil-Al presentan una eficacia moderada media del 58%, según se ha podido demostrar en 24 ensayos realizados en 11 fincas comerciales durante 1989-1996, incluyendo las variedades Conference, Abate Fétel, Doyenne du Comice y General Leclerc.

En estudios efectuados en condiciones controladas con plantas de peral Conference cultivadas en maceta, se ha demostrado que entre diversos derivados del fosfonato, el cloroetilfosfonato (etefón), a pesar de no mostrar actividad *in vitro* contra *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, es muy efectivo en el control de las infecciones foliares por dicha bacteria fitopatógena. Los estudios sugieren que el producto actúa indirectamente controlando la enfermedad, posiblemente estimulando las defensas en la planta.

El objetivo de este trabajo ha sido ensayar en campo una estrategia combinada de aplicación de fosetil-Al durante primavera y etefón antes de caída de hoja. Se han realizado durante dos años (1996-1997) siete ensayos en diversas fincas comerciales de peral Conference con incidencias medias de necrosis de yemas de flor del 10-90%. Los resultados indican que la eficacia de esta estrategia de control es significativamente mejor y más consistente que la estándar basada en aplicaciones de fosetil-Al.

## D2.2 ACTIVIDAD DE DIVERSOS FOSFONATOS EN LA INTERACCIÓN *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*-PERAL

Moragrega, C., Montesinos, E.

*Institut de Tecnologia Agroalimentària-Certa, Universitat de Girona, Avda. Lluís Santaló s/n 17003 Girona.*

*P. syringae* pv. *syringae* es una bacteria causante de diversas enfermedades en más de 200 especies vegetales. En peral provoca la necrosis bacteriana, que afecta a la mayoría de zonas productoras de pera del mundo. El control de la enfermedad, basado en la aplicación preventiva de derivados cúpricos y antibióticos, está limitado por la baja eficacia de estos productos, por problemas de fitotoxicidad en la planta y por la aparición de resistencias en el patógeno. En los últimos años, el fosetil-Al, un derivado del ácido fosfónico, utilizado como fungicida sistémico en el control de enfermedades causadas por oomicetes en especies vegetales, se ha mostrado eficaz o moderadamente eficaz en el control de determinadas enfermedades bacterianas en plantas y de la necrosis de yemas de flor en peral. La forma de actuación de este producto no se conoce, a pesar de que en el control de enfermedades fúngicas podría actuar estimulando mecanismos de defensa en la planta.

Se evaluó la actividad de diversos fosfonatos (fosetil-Al, fosfonato potásico, etefón y fosfomicina) en el control de la infección por *P. syringae* pv. *syringae* en peral. Para ello se utilizó un modelo de estudio de la interacción *P. syringae* pv. *syringae* -peral, desarrollado en trabajos previos, basado en la utilización de plantas de peral de la variedad Conference (sensible), cepas del patógeno virulentas, dosis de inóculo entre  $10^7$  y  $10^8$  ufc ml<sup>-1</sup> y condiciones de incubación definidas (20-25 °C y 70-80% de humedad relativa). La inoculación del patógeno se realizó por microinfiltración localizada en hojas en las plantas. Los tratamientos con fosfonatos se realizaron por irrigación o pulverización de las plantas. Se ensayaron los diversos productos, aplicados a distintas dosis y cadencias.

El tratamiento de plantas de peral con fosfonatos redujo de forma significativa y consistente los niveles de enfermedad y la virulencia del patógeno. El efecto en el control de la enfermedad se mostró relacionado con la forma, dosis y cadencia de aplicación, y con el tipo de producto. La fosfomicina y etefón fueron los productos más eficaces en la reducción de la enfermedad, con DE<sub>50</sub> de 0.50 y 1.47 g HPO<sub>3</sub><sup>2-</sup> l<sup>-1</sup>, respectivamente. El fosfonato potásico y fosetil-Al presentaron una eficacia moderada, con DE<sub>50</sub> de 2.9 y 5.5 g HPO<sub>3</sub><sup>2-</sup> l<sup>-1</sup>, respectivamente. Por otra parte, el fosetil-Al, fosfonato potásico y etefón presentaron baja actividad antibacteriana *in vitro* con CMI<sub>50</sub> de 0.32 a 0.63 g HPO<sub>3</sub><sup>2-</sup> l<sup>-1</sup>. Los cambios estructurales y de permeabilidad observados en los tejidos de plantas tratadas con fosfonatos e inoculadas con el patógeno, junto con la baja actividad *in vitro* de estos productos sugiere una posible actuación de los fosfonatos en la planta estimulando mecanismos de defensa durante la interacción con *P. syringae*.

## D2.3 CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA Y GENÓMICA DE BACTERIAS EPÍFITAS POTENCIALES AGENTES DE BIOCONTROL

Bonaterre, A., Badosa, E., Alemany, J., Camps, J. y Montesinos, E.

*Institut de Tecnologia Agroalimentària-CeRTA. Universitat de Girona. Avda. Lluís Santaló s/n 17071 Girona. E-mail: annab@intea.udg.es.*

Los recientes progresos en el control biológico de enfermedades de los cultivos, han generado un interés creciente en la caracterización de nuevos agentes de biocontrol.

En el presente trabajo, se aislaron 200 cepas de *Erwinia herbicola* (mayoritariamente pertenecientes al biogrupo 1) y 217 de *Pseudomonas fluorescens* (predominantemente de los biovares I y V) procedentes de diversas localidades, plantas y órganos vegetales. Se determinó la capacidad antagonista *in vitro* en distintos medios de cultivo contra los patógenos *E.amylovora*, *P.syringae*, *Stemphylium vesicarium* y *Penicillium expansum*. La capacidad de biocontrol de infecciones se determinó mediante ensayos en frutos inmaduros (*E. amylovora*), en hoja de peral (*S. vesicarium*) y en manzana (*P. expansum*). El porcentaje de antagonistas fue mayor en los aislados de *P. fluorescens* que en los de *E. herbicola* y en aislados de raíz respecto a aislados de órganos aéreos. No se observó relación entre el antagonismo obtenido *in vitro* y el biocontrol de las infecciones *in vivo*.

Los antagonistas más eficaces fueron caracterizados fenotípicamente respecto a su antagonismo *in vitro* frente a 3 bacterias (*P. syringae*, *E. amylovora* y *Xanthomonas arboricola*) y 8 hongos fitopatógenos (*Aspergillus* sp. *P. expansum*, *Alternaria alternata*, *Rhizopus* sp., *Fusarium oxysporum*, *Botrytis cinerea*, *S. vesicarium* y *Phytophthora citrophthora*) y también frente a la utilización de 95 fuentes de carbono. Las cepas se agruparon según su espectro de antagonismo. Algunos grupos presentaron elevada actividad antibacteriana y antifúngica, mientras que otros mostraron únicamente actividad antibacteriana o antifúngica. El análisis de correspondencias entre el espectro de antagonismo y varias características de las cepas (origen, planta huésped, capacidad antagonista en distintos medios de cultivo) mostró que el antagonismo *in vitro* depende principalmente del patógeno indicador y del medio de cultivo del ensayo utilizados.

En las cepas de *P. fluorescens* se determinó la producción de compuestos antimicrobianos como el ácido cianhídrico, diacetil floroglucinol (DAPG) y ácido fenazina-1-carboxílico (PCA) mediante análisis bioquímico. En el caso del DAPG y PCA se utilizó además la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con iniciadores específicos de genes implicados en su biosíntesis. Una submuestra de cepas de *P. fluorescens* que fue caracterizada genotípicamente mediante el análisis de los fragmentos de macrorestricción del genoma obtenidos con enzimas de restricción de baja frecuencia de corte y separados mediante electroforesis en campo pulsante (PFGE), mostró una elevada heterogeneidad. No se observaron relaciones entre el patrón de antagonismo, la utilización de fuentes de carbono y los perfiles de macrorestricción obtenidos por PFGE.

## D2.4 ENSAYOS DE CONTROL DE LA NECROSIS APICAL DEL MANGO.

Cazorla, F.M.<sup>1</sup> ; Farré, J.M.<sup>2</sup>; Velasco, L.<sup>3</sup>; Durán, V.E.<sup>1</sup>; Hermoso, J.M.<sup>2</sup>; Torés, J.A.<sup>2</sup> y de Vicente, A.<sup>1</sup>

1. *Dept. de Microbiología, Facultad de Ciencias, Univ. de Málaga, 29071-Málaga.*

2. *Estación Experimental "La Mayora", CSIC, Algarrobo Costa, 29170-Málaga.*

3. *Tropicales del Sur S.A., Lepe, 21440-Huelva.*

La necrosis apical del mango es una enfermedad bacteriana que causa importantes daños en el cultivo del mango en el sur de la Península Ibérica, y cuyo agente causal es *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. Los daños más severos sobre los árboles de mango ocurren durante el otoño e invierno, con índices de afectación de la enfermedad (como porcentaje de yemas apicales con necrosis) de hasta el 80%, siempre asociados a la presencia de elevadas poblaciones de la bacteria en estos tejidos.

Se ha realizado un ensayo preliminar de control químico, sobre árboles de mango en la Estación Experimental "La Mayora" con tres productos fitosanitarios de uso generalizado, dos basados en cobre (ZZ-Cuprocol® y Caldo Bordelés del Vallés®) y otro cuya materia activa es el fosetil de aluminio (Aliette®). Se realizaron aplicaciones quincenales por vía foliar en los momentos más críticos de la enfermedad (noviembre a marzo) durante dos campañas (1992-93 y 1993-94). La población de bacterias totales, bacterias del tipo *P. syringae* y la incidencia de la enfermedad (porcentaje de yemas con necrosis) se evaluó mensualmente sobre las yemas de los árboles, empleando como control un grupo de árboles con síntomas de necrosis apical que no fueron sometidos a tratamiento. Estos experimentos mostraron resultados variables, con una reducción de la incidencia de la enfermedad apreciable en los tres grupos de árboles tratados, pero sólo en la segunda campaña, coincidiendo con condiciones climáticas de escasas precipitaciones.

Actualmente se está realizando un segundo ensayo en una parcela de Tropicales del Sur S.A. (Lepe, Huelva) iniciado en la campaña 1997-98, sobre 200 árboles, probando 24 tipos de tratamientos, que incluyen los tres del ensayo anterior y que en general podemos agrupar en 3 tipos generales: I) compuestos químicos de control fitosanitario, como compuestos de cobre, antibióticos, etc.; II) productos de control biológico, como extractos vegetales, lixiviados de compost fermentados, etc. y III) bacterias de uso potencial como antagonistas de la bacteria patógena, como cepas de *Pseudomonas* sp. y *Erwinia* sp. Todos los productos se aplicaron por vía foliar usando como mojante Nu-film® y se aplicaron desde octubre a mayo con periodicidad quincenal. En este ensayo también se han evaluado las poblaciones bacterianas sobre las yemas, así como la proporción de yemas con síntomas de necrosis tanto en los árboles tratados como en el grupo de árboles control.

Los resultados de ambos ensayos parecen indicar que el caldo bordelés y el fosetil de aluminio presentan mejores perspectivas que el resto de productos, con una reducción del índice de afectación de alrededor del 20% en comparación con los árboles sin tratar. Sin embargo, otros productos, como la dodina o el ácido fosforoso también redujeron los niveles de afectación respecto al de los árboles control sin tratar. En la próxima campaña de ensayo (1998-99) se ha planteado iniciar los tratamientos a finales del verano; para así intentar controlar las poblaciones bacterianas antes de que inicien su multiplicación.



## D2.5 PRODUCCIÓN DE ÁCIDO SALICÍLICO Y SIDERÓFOROS POR *Pseudomonas fluorescens* WCS374 Y SU IMPLICACIÓN EN LA SUPRESIÓN DE LA FUSARIOSIS VASCULAR DEL RÁBANO

Mercado Blanco J.<sup>1</sup>, Olsson, P.E., Van der Sluis, I., Van der Drift<sup>\*</sup>, K.M.G.M., Thomas-Oates<sup>\*</sup>, J.E., Van Loon, L.C. y Bakker, P.A.H.M.

*Department of Plant Ecology and Evolutionary Biology, P.O. Box 80084, 3508 TB Utrecht*

*<sup>\*</sup>Department of Mass Spectrometry, Sorbonnelaan 16, 3584 CA Utrecht, Utrecht University, The Netherlands.*

<sup>1</sup> *Dirección actual: Departamento de Protección de Cultivos, Instituto de Agricultura Sostenible, C.S.I.C., Apdo 4084, 14080 Córdoba, España.*

*Pseudomonas fluorescens* WCS374 controla eficientemente la Fusariosis vascular del rábano causada por *Fusarium oxysporum* f. sp. *raphani*. En dicho control se ha demostrado que uno de los mecanismos implicados es la inducción de resistencia sistémica (ISR) y en la que juegan un papel importante metabolitos regulados por hierro, tales como el ácido salicílico (SA) y el sideróforo pseudobactina. Mediante inserción de Tn5 se han aislado diferentes mutantes de la cepa WCS374 defectivos en la producción de pseudobactina (Pbs<sup>-</sup>). Aun así, todos ellos mostraron la capacidad de producir sideróforos, a la vez que una menor producción de SA y una fluorescencia azulada en medio succinato en presencia de luz UV. También se identificó un mutante SA<sup>-</sup>. Cuando se efectuó un segundo experimento de transposición en dicho mutante para obtener mutantes dobles Pbs<sup>-</sup> SA<sup>-</sup> se observó que en ellos no existía fluorescencia azul y que la actividad siderófora era considerablemente menor a la del mutante Pbs. Esto sugeriría la presencia de un sideróforo adicional en la cepa WCS374. El sobrenadante de un mutante Pbs<sup>-</sup> (374-08) se usó para la obtención, aislamiento, purificación y análisis por espectrometría de masas del nuevo sideróforo. Dichos experimentos han revelado la presencia de un compuesto con actividad siderófora y que contiene SA e histamina en su molécula. Al nuevo sideróforo se le ha dado el nombre de fluorobactina.

Los genes necesarios para la biosíntesis de SA que también parecen serlo para la síntesis de fluorobactina se han identificado en un fragmento de restricción de 5 kb. Estos genes, (*ftsCEAB*, de *fluorebactin synthesis*) y sus productos, han mostrado homologías relevantes con proteínas implicadas en la síntesis de SA y de diferentes sideróforos en bacterias. Los estudios de expresión *in vivo* en *Escherichia coli* de los genes *fts* mostraron que las deleciones que afectan al gen *ftsB* eliminan la producción de SA. Basados en la secuencia de ADN obtenida, se diseñaron “primers” específicos para estudiar la expresión génica de los genes *fts* mediante RT-PCR. Como conclusión, los genes *ftsCEAB* están probablemente organizados en una unidad transcripcional y su expresión está controlada por los niveles de hierro disponible. La supresión de la fusariosis vascular del rábano por la cepa WCS374 y sus diferentes mutantes defectivos en producción de sideróforos se ha demostrado mediante bioensayos. Todas las cepas analizadas redujeron considerablemente la incidencia de enfermedad, siendo el mutante 374-08 el más efectivo de todos los empleados.

## D2.6 IDENTIFICACIÓN DE GENES IMPLICADOS EN LA PRODUCCIÓN DEL SIDERÓFORO ALS84 POR LA CEPA *Agrobacterium radiobacter* K84

Peñalver, R.<sup>1</sup>, Oger, P.<sup>2</sup>, Farrand, S.K.<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>*Department of Crop Science. University of Illinois at Urbana-Champaign. Urbana, 61801 Illinois. USA.*

Los sideróforos son quelantes específicos de Fe<sup>3+</sup>, de relativo bajo peso molecular, que producen algunas bacterias y hongos en condiciones limitantes en hierro. Se ha estudiado la producción de sideróforos en respuesta a las limitaciones de hierro en el medio, en una colección de cepas de *Agrobacterium*. Todas las cepas estudiadas fueron capaces de crecer en condiciones limitantes en hierro, produciendo sideróforos tipo hidroxamato y/o catecol. La cepa de *A. radiobacter* K84 utilizada en control biológico produjo una alta cantidad de sideróforos tipo hidroxamato. Para determinar los genes implicados en dicha producción, se aislaron 5 mutantes independientes obtenidos con el transposón Tn5 afectados en la producción de estos sideróforos. Estos mutantes estaban también afectados de la misma manera en la producción de ALS84 (substancia de tipo antibiótico producida por la cepa K84). Uno de estos mutantes, M8-10, no produjo cantidades detectables de sideróforos mediante pruebas químicas, ni tampoco mostró actividad antibiótica ALS84 en bioensayo. A partir de este mutante se clonó un fragmento de ADN cromosómico de 9.1 kb que contenía la inserción del Tn5. Utilizando este fragmento clonado como sonda, se aisló, a partir de una genoteca de K84, un clon cósmido que restauró la capacidad inhibitoria ALS84 y la producción de sideróforos en el mutante M8-10. Esto implica que el gen mutado está a la vez implicado en la síntesis de ALS84 y de sideróforos en la cepa K84. Se secuenció el ADN que estaba flanqueando la inserción 8-10 a partir del transposón Tn5, y se observó que las secuencias obtenidas tenían una homología significativa con el gen *PvdS*, el cual codifica la pioverdina sintetasa, gen implicado en la síntesis del sideróforo pioverdina en *Pseudomonas aeruginosa*. La hibridación de los ADNs genómicos de una colección de cepas de *Agrobacterium* con el fragmento clonado del mutante M8-10 reveló que los genes de síntesis del sideróforo producido por la cepa K84 estaban también presentes en algunas cepas del biovar 2.

Con estos datos podemos concluir que la actividad inhibitoria ALS84 producida por la cepa K84 es debida a la síntesis de sideróforos tipo hidroxamato, y que se ha identificado uno de los genes responsables de la síntesis de este sideróforo.

### D3.1 AISLAMIENTO Y ESTUDIO DE AGENTES DE BIOCONTROL DE LA FUSARIOSIS VASCULAR DEL MELÓN.

Atarés Mallada, E., López Cosme, E., González Torres, R.

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

Se realizaron aislamientos de hongos antagonistas de muestras de suelo tomadas en parcelas del Servicio de Investigación Agroalimentaria (Servicio de Investigación Agroalimentaria de Zaragoza). En dichas parcelas se había cultivado melón durante los últimos tres años. Se seleccionaron colonias fúngicas representativas de la microflora de los suelos muestreados. Con diez aislados se realizaron pruebas *in vitro* que consistieron en el enfrentamiento de cada uno de ellos con 5 razas fisiológicas de *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* en placas petri conteniendo PDA como medio de cultivo. La evaluación de los enfrentamientos se realizó midiendo el área de crecimiento de los aislados fúngicos. De los diez aislados fúngicos seleccionados del suelo, sólo se escogió a *Trichoderma* sp. en base a su rápido crecimiento en el medio de cultivo y al control ejercido *in vitro* sobre las razas 0, 1, 2, 1.2 W y 1.2 Y de *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis*.

En el Experimento I se utilizó como antagonista a *Trichoderma* sp. y en el Experimento II se utilizaron cultivos envejecidos de *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis*, razas 0, 1, 2, 1.2 W y 1.2 Y. En ambos experimentos todas las razas resultaron patogénicas sobre el cultivo de melón, aunque se observó cierto retraso en la aparición de síntomas en las plantas tratadas con los antagonistas.

Por último se estudió la puesta a punto de la aplicación de *Trichoderma* sp. utilizándose como soporte polvo de talco. En el Experimento III, el talco infestado con *Trichoderma* sp. se mezcló con el sustrato de suelo estéril a razón de 10, 20 y 30 g de talco/kg de suelo, y se distribuyó en macetas. A continuación, las raíces de las plántulas de melón de 10 días se sumergieron en las suspensiones de inóculo de las razas 0, 1, 2, 1.2 W y 1.2 Y de *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* durante 30 sg. En este experimento ninguno de los tratamientos aplicados a las plantas de melón resultó efectivo para el control de la Fusariosis vascular, aunque algunas interacciones retrasaron la aparición de los síntomas de la enfermedad.

Financiado por el proyecto AGF 97-0549-C03-03 de la CICYT

### D3.2 EFICACIA DE MICORRIZAS ARBUSCULARES EN EL CONTROL DE LA FUSARIOSIS VASCULAR DEL MELÓN.

González Torres, R.<sup>1</sup>, López Cosme, E.<sup>1</sup>, Estaún, V.<sup>2</sup>, Camprubí, A.<sup>2</sup>, Calvet, C.<sup>2</sup>.

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

2. Institut de Recerca i Tecnologia Agralimentaries. Ctra. de Cabrils s/n, 08348 Cabrils, Barcelona.

A fin de probar la eficacia de la preparación de semilleros de melón micorrizados con *Glomus intraradices* para su trasplante a suelo infestado por una mezcla de razas de *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* (*Fom*) y posterior evaluación, se llevaron a cabo dos ensayos.

En el primer ensayo, tras pregerminar semillas de melón cv. Piel de Sapo, se sembraron en bandejas de 104 alvéolos con suelo estéril al que se le añadió unos 4 g de sustrato micorrícico, incubándose en cámara de crecimiento a 22°C, bajo luz (14 h al día) durante 30 días. Posteriormente, las plantas se trasplantaron en invernadero a macetas con 0.8 l de suelo infestado por *Fom* a razón de 2531 propágulos/g de suelo.

En el segundo ensayo se inocularon plantas de melón cv. Charentais T crecidas en arena estéril durante 10 días en cámara a 22°C con unos 4 g de sustrato micorrícico/planta. Las plantas recibieron idéntico tratamiento que en el primer ensayo.

**En ambos casos se realizaron evaluaciones a intervalos de 10 días, tanto en las plantas tratadas como en aquellas que no fueron tratadas. Los ensayos fueron de bloques al azar con 4 repeticiones, el primero con 10 plantas para cada tratamiento y el segundo con 12. En las evaluaciones se asignaron valores arbitrarios a cada planta, de 0 a 4, según la severidad de síntomas cloróticos o necróticos mostrado (0 = no síntomas; 4 = planta muerta).**

Los primeros síntomas se observaron 23 días después de la inoculación. A los 30 días, frente a valores de severidad de 2.3 y 1.7 para los testigos no micorrizados de ambos ensayos, los tratamientos con micorrizas dieron valores medios de severidad de 1.2 y 0.8 respectivamente, e incrementaron la altura de las plantas. A los 40 días estos valores fueron de 3.8 y 3.9 para los testigos no micorrizados y de 4.0 y 3.6 para las plantas micorrizadas, respectivamente. De los resultados se deduce que el aporte de micorrizas a semillas o plántulas de melón susceptible a *Fom* y sometidas a alta infestación, retrasa la aparición de síntomas de Fusariosis vascular.

Financiado por el proyecto AGF 97-0549-C03-03 de la CICYT

### D3.3 RESISTENCIA INDUCIDA EN *Ulmus minor sensu latissimo* FRENTE A LA GRAFIOSIS POR INOCULACIÓN PREVIA DE *Verticillium dahliae*

Solla Hach, A., Menéndez González, Y., Gil Sánchez, L.

***Unidad Docente de Anatomía, Fisiología y Mejora Genética Forestal. Departamento de Silvopascicultura. Escuela Técnica Superior de Ingenieros de Montes. Ciudad Universitaria. 28040 Madrid.***

La grafiosis es, sin lugar a dudas, la enfermedad más acuciante del siglo XX para los olmos de Europa y Norteamérica. El agente causante de la última pandemia es el hongo denominado *Ophiostoma novo-ulmi* Brasier.

Los métodos clásicos de control de la enfermedad, ya sea por fumigaciones para reducir las poblaciones de vectores, inyecciones sistémicas de compuestos químicos, o podas intensivas, resultan caros y no son bien acogidos en zonas urbanas. La introducción en el olmo de microorganismos que le induzcan resistencia se apunta como una alternativa más viable, tal y como afirman algunos trabajos publicados recientemente.

Sobre tres progenies de 6 años de edad de la especie *Ulmus minor sensu latissimo* se practicó un tratamiento cruzado hongo preventivo - grafiosis (n=6). Los hongos preventivos ensayados fueron dos cepas de la especie *Verticillium dahliae* y una de *Fusarium oxysporum* sp. *lycopersici*. Se inocularon el día 7 de abril de 1997 a 1/5 por debajo de la copa, a modo de esporas suspendidas en medio Czapek-Dox (Cz) (0.2 ml/árbol; 1 x 10<sup>6</sup> esporas/ml). Veinte días más tarde se inoculó una suspensión de esporas de la especie *O. novo-ulmi* en medio Tchernoff (Tc), a la misma altura y dosis comentada. Se practicaron también las inoculaciones control hongo preventivo + medio Tc, medio Cz + *O. novo-ulmi*, y medio Cz + agua destilada esterilizada.

A los dos meses de la última inoculación no se observó inducción de resistencia por parte del hongo *F. oxysporum*, pero sí por parte de las dos cepas de *V. dahliae*. Los olmos con ellas tratadas mostraron marchitamientos foliares medios de un 20 %, significativamente inferiores al de los árboles no tratados, que se marchitaron en un 78 % (99 %, LSD). A la vista de los resultados, el uso de *V. dahliae* parece ser un método convincente para prevenir la grafiosis, aunque se hace necesario el observar su efecto sobre ejemplares de mayor edad, y comprobar su validez a lo largo de todo el período de susceptibilidad. Además, su aplicación debería de quedar confinada en áreas urbanas dado el peligro potencial que representa este hongo sobre numerosos cultivos.

#### D3.4 CONTROL QUÍMICO DE *Armillaria mellea*

M. Nadal.; A. Moret.; El Bakali, M.A.

*Depart. de Biología Vegetal, Fac. de Biología, U.B. Av. Diagonal, 645, 08028 Barcelona*

La podredumbre blanca de las raíces causada por *A. mellea* (Vahl. Fr.) Kummer es una grave enfermedad fúngica, especialmente de las especies arbóreas, de difícil control químico. Por este motivo se estudia el efecto de un compuesto fenólico, el 2,6-Dimetilfenol sobre el crecimiento vegetativo de dicho hongo.

Al medio de cultivo base utilizado, Patata-Dextrosa-Agar (PDA), se añadieron distintas concentraciones de 2,6-Dimetilfenol disuelto en isopropanol a la proporción 1/8 y diversas concentraciones de monolaurato de polioxietilenesorbitan(Tween-20).

Se realizaron tres tipos de pruebas, en la primera, se ensayó 2,6-Dimetilfenol a las concentraciones de 0,5; 1; 2; 2,5; 3; 3,5; 4; 4,5 y 5  $\mu\text{l/ml}$  y en el segundo y tercer ensayo, a las mismas concentraciones de la materia activa se añadieron 0,5 y 1  $\mu\text{l/ml}$  de Tween-20 respectivamente.

El aislamiento del hongo en el laboratorio se realizó a partir de raíces de cerezo (*Prunus avium* L.) infectadas, procedentes de Torrelles de Llobregat (Baix Llobregat). El material vegetal se esterilizó superficialmente con hipoclorito sódico al 1% durante dos minutos, se lavó con agua destilada estéril y se sembró en cápsulas de Petri con PDA; dichas cápsulas se incubaron a 24 °C durante 21 días. A partir del primer aislado se obtuvieron cultivos puros de los cuales se sembraron discos de 4 mm de diámetro en cápsulas de Petri que contenían las distintas concentraciones de los productos ensayados. Para cada una de las concentraciones de los ensayos realizados se hicieron diez réplicas.

Se consideró como crecimiento vegetativo el incremento de biomasa (peso seco de la colonia) en lugar del crecimiento radial, puesto que, a concentraciones elevadas de 2,6-Dimetilfenol, el aumento de diámetro de la colonia era prácticamente nulo, mientras que se observaba un cierto desarrollo en altura. La mayor inhibición del crecimiento correspondió a la mezcla del compuesto fenólico a 2  $\mu\text{l/ml}$  con el Tween-20 a la concentración de 1  $\mu\text{l/ml}$ , la cual inhibía el desarrollo del hongo en un 94,23 %. Con la mezcla del producto a 2,5  $\mu\text{l/ml}$  y 0,5  $\mu\text{l/ml}$  de Tween-20 la reducción del crecimiento era del 94,03%. El 2,6-Dimetilfenol (sin Tween-20) a la concentración de 4  $\mu\text{l/ml}$  reducía el incremento de biomasa en un 88,51 %

El 2,6-Dimetilfenol con Tween-20 (1  $\mu\text{l/ml}$ ) actuaba como fungistático hasta concentraciones de 3,5  $\mu\text{l/ml}$  y como fungicida a partir de 4,0  $\mu\text{l/ml}$ . Parece ser que el Tween-20 altera la permeabilidad de la pared y membrana celular, facilitando la absorción indiscriminada de nutrientes y otras sustancias, incluso tóxicas o no que se hallan en el medio de cultivo, esto explicaría que concentraciones relativamente altas de Tween-20, sin sustancias tóxicas en el medio se incrementa la tasa de crecimiento del hongo y este no resultase tóxico e inhibiese el crecimiento de "*Armillaria mellea*"; este extremo está por el momento sin confirmar pero actualmente se está trabajando en esta hipótesis, mientras que empieza a ejercer efectos nocivos a concentraciones altas, incluso en ausencia de sustancias.

### D3.5 HISTOLOGIA DE LA RESISTENCIA INDUCIDA POR *Penicillium oxalicum* EN PLANTAS DE TOMATE FRENTE A *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*

De Cal, A., Garcia-Lepe, R, Melgarejo, P.

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

*Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* es el hongo que causa la marchitez vascular en plantas de tomate. El hongo invade el tejido vascular impidiendo el movimiento del agua a través del xilema, y provocando además la muerte gradual de las células parenquimáticas. En trabajos previos hemos demostrado que *Penicillium oxalicum* induce mecanismos de resistencia en plantas de tomate infectadas con *F. oxysporum* f. sp *lycopersici*.

Se realizó un estudio histológico de los tallos de las plantas de tomate para comprobar si la resistencia inducida por *P. oxalicum* se debe en parte a cambios en el sistema vascular. Para ello, se aplicaron diferentes dosis del antagonista en distintos estados de crecimiento de las plantas de tomate antes de ser inoculadas con el patógeno. Se utilizaron cinco cultivares de tomate (Super Roma, Precodor, VFN, Lorena y Ramon) que presentaban distintos grados de resistencia y susceptibilidad al patógeno. El estudio histológico se realizó sobre plantas que se habían desarrollado en cámaras de cultivo o invernadero. Se observaron al microscopio óptico hipocotilos y epicotilos de tallos y se registró el número de células del cambium, el número de haces del xilema y el número de vasos, así como el porcentaje de colonización de estos vasos por el patógeno.

*P. oxalicum* induce cambios histológicos en las plantas infectadas por *F. oxysporum* f. sp *lycopersici*. Todas las plantas de tomate infectadas con *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* muestran una disminución significativa de la zona cambial. Sin embargo, los tallos de plantas de tomate tratadas con *P. oxalicum* e infectadas con el patógeno presentan mayor desarrollo del cambium y menor colonización de los vasos del xilema que los tallos de las plantas no tratadas e infectadas. Un mayor número de vasos del xilema libres del patógeno en las plantas tratadas con *P. oxalicum* mejora el movimiento del agua en el interior de las mismas. Además las plantas inducidas poseen mayor número de vasos del xilema que las plantas enfermas sin tratar. La reducción del desarrollo de la enfermedad en las plantas tratadas con *P. oxalicum* puede ser debida en parte a: una proliferación de vasos libres de patógeno que se producen gracias a la permanencia o renovación del cambium y/o a la limitación del desarrollo del patógeno en el tejido vascular por efecto de sustancias fungitóxicas.

### D3.6 PAPEL DE LOS REGULADORES DE CRECIMIENTO EN EL CONTROL DE LA MARCHITEZ VASCULAR DE TOMATE POR *Penicillium oxalicum*

Raúl García Lepe, Antonieta de Cal y Paloma Melgarejo.

*Departamento de Protección Vegetal, INIA. Ctra. de la Coruña, km. 7. 28040. Madrid.*

*Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* es uno de los agentes causantes de la marchitez vascular del tomate. Este patógeno invade los tejidos vasculares de la planta induciendo una marchitez importante en las hojas debido fundamentalmente al bloqueo del xilema y a la reducción del aporte hídrico.

Los estudios llevados a cabo con *Penicillium oxalicum* han mostrado que este hongo es capaz de inducir resistencia en plantas de tomate frente a la infección por *Fusarium*. Esta resistencia se traduce en una disminución de la gravedad de los síntomas y en un aumento del aporte hídrico con respecto a las plantas enfermas no tratadas. Las plantas enfermas pierden el cambium, con lo cual pierden también la capacidad de sintetizar tejido vascular. Por el contrario, el tratamiento con el hongo antagonista hace que la planta mantenga la capacidad de regeneración de la zona cambial y sintetice nuevos vasos libres de patógeno.

Estos cambios histológicos observados hacen pensar que la acción de *P. oxalicum* compensa de alguna manera los desequilibrios hormonales asociados a la infección vascular. Se diseñaron experimentos para mimetizar la acción del antagonista mediante la aplicación exógena de reguladores de crecimiento (ácido giberélico ( $10^{-4}$  M), ácido indolacético ( $10^{-5}$  M) ó quinina ( $10^{-7}$  M)) a semilleros con plántulas de tomate, 7 días antes de su transplante a matraces con solución nutritiva. Asimismo, se intentó contrarrestar la acción de *P. oxalicum* adicionando inhibidores hormonales (ácido triiodobenzoico ( $10^{-5}$  M) ó cloruro de clorocolina ( $10^{-4}$  M)).

La aplicación de quinina o ácido giberélico logró controlar la pérdida de células del cambium y la reducción del diámetro y el número de vasos del xilema, aunque siempre en menor grado que el tratamiento con *P. oxalicum*. El ácido indolacético, sin embargo, acentuó el efecto del patógeno, aumentando la colonización de los vasos y agravando los síntomas de la enfermedad. La adición del inhibidor de giberelinas (cloruro de clorocolina) redujo el consumo de solución nutritiva de manera similar al patógeno. Sin embargo, el efecto del inhibidor de auxinas (ácido triiodobenzoico) no se relacionó con la infección.

La confirmación de la implicación de reguladores del crecimiento en el control de *Fusarium* en tomate vendrá del análisis de los niveles endógenos de estas hormonas.



### D3.7 EFECTO DE LOS ACIDOS FENÓLICOS SOBRE *Aspergillus parasiticus* EN RELACIÓN AL CRECIMIENTO FÚNGICO Y A LA PRODUCCIÓN DE AFLATOXINA B<sub>1</sub>.

Bilotti, G.<sup>1</sup>, Fernández-Pinto, V.<sup>2</sup>, Egea, C.<sup>1</sup>, Sid, A.<sup>1</sup>, Candela, M.E.<sup>1</sup>

1. Dept. de Biología Vegetal. Facultad de Biología. Universidad de Murcia. Campus de Espinardo. 30100- Espinardo, Murcia España

2. Dept. de Química Orgánica. Cátedra de Microbiología de Alimentos. FCEN. Universidad de Buenos Aires. Argentina

Desde que una planta comienza a formarse hasta su uso o consumo final está sujeta a daño y destrucción por una gran variedad de agentes biológicos, dentro de los cuales los hongos, son uno de los más importantes. Si las condiciones de almacenamiento post cosecha de granos y plantas no son las adecuadas pueden desarrollar ciertos hongos como *Aspergillus* y *Penicillium* que afectan seriamente su calidad. El desarrollo de estos hongos puede causar daños tales como reducción de la germinación, decoloración, degradación de carbohidratos, proteínas y lípidos, aparición de olores desagradables y producción de micotoxinas. Los ácidos fenólicos han sido implicados en la respuesta defensiva de las plantas frente a patógenos. Estos fenoles proveen resistencia a las plantas contra infecciones fúngicas en las etapas pre y post-infección (1).

En este trabajo se trató de probar “in vitro” el efecto de algunos de estos ácidos fenólicos sobre el crecimiento y la producción de aflatoxina B<sub>1</sub> en *Aspergillus parasiticus* NRRL 2999. El medio de cultivo utilizado fue PDA (Patata Dextrosa Agar). Los ácidos utilizados y sus dosis fueron: p-hidroxibenzoico (62.6 mg/l); vainillínico (41.7 mg/l); p-coumárico (12.8 mg/l); ferúlico (25.2 mg/l); salicílico (24.6 mg/l); y t-cinámico (41.7 mg/l). Estas dosis corresponden al contenido normal en planta de pimiento (*Capsicum annuum*) c.v. Smith 5, infectado con *Phytophthora capsici* (1). Se utilizó además otra dosis 10 veces superior a la indicada. Las medidas de crecimiento y producción de aflatoxina se realizaron a los 4, 8, 12 y 16 días desde la siembra del hongo.

El análisis estadístico por un diseño factorial muestra que el efecto inhibitorio sobre la producción de aflatoxina B<sub>1</sub> tiene lugar a la dosis 10x y únicamente con los ácidos benzoico, salicílico y vainillínico. La mayor inhibición la produjo el ácido benzoico reduciendo en un 40% la producción de la toxina. Los ácidos fenólicos en cambio, no afectan la velocidad de crecimiento del hongo a ninguna de las dosis utilizadas. Estos resultados nos llevan a afirmar que la inhibición de la producción de aflatoxinas por los ácidos fenólicos no está relacionada con la velocidad del crecimiento de este hongo. Ácidos fenólicos como el benzoico pueden ser usados para inhibir producción de aflatoxinas en infecciones post-cosecha debidas a *Aspergillus* spp.

(1) Candela M. E. y col.(1995) Plant Pathology: 44, 116-123.

### D3.8 PRODUCCIÓN Y ECOFISIOLOGÍA DE *Epicoccum nigrum* PARA SU MEJORA COMO AGENTE DE CONTROL BIOLÓGICO

Pascual, S.<sup>1</sup>, Magan, N.<sup>2</sup>, Melgarejo, P.<sup>1</sup>

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

2. Applied Mycology Group. Biotechnology Centre. Cranfield University. Bedford MK43 OAL, Reino Unido.

*Epicoccum nigrum*, una de las especies normalmente presente en la filosfera, es antagonista de varios patógenos, entre ellos *Monilinia laxa* en brotes de melocotonero; sin embargo su eficacia es variable. Su sensibilidad a la baja disponibilidad de agua podría explicar esta variabilidad, ya que la disponibilidad de agua es uno de los factores limitantes más importantes en la filosfera.

Se ha estudiado la posibilidad de mejorar la calidad de *E.nigrum* como agente de control biológico mediante manipulación fisiológica. Para ello se redujo la actividad hídrica ( $a_w$ ) del medio de cultivo mediante la adición de glicerol. Se compararon distintas propiedades del inóculo producido en estas condiciones (designado como *E.nigrum*98) frente al producido en medio de cultivo con alta  $a_w$  (designado como *E.nigrum*996). También se investigó sobre métodos de producción del hongo mediante fermentación sólida, a distintas  $a_w$ . Los resultados indican que:

1: *E.nigrum*98 muestra una mejora en la extensión de tubos germinativos y en algunos casos en el crecimiento radial de las colonias en condiciones de estrés hídrico, indicando la capacidad de aclimatación del hongo. En algunos casos su esporulación es más densa y la pigmentación del medio más intensa.

2: A baja  $a_w$ , la capacidad de competir por fuentes de carbono con el patógeno (*M.laxa*) es mayor en el caso de *E.nigrum*98, según indica el Índice de Intersección de Nichos.

3: Las esporas de *E.nigrum*98 sobreviven mejor que las de *E.nigrum*996 cuando se almacenan frescas. La liofilización reduce drásticamente la viabilidad.

4: La producción a baja  $a_w$  resulta en la acumulación de solutos compatibles (glicerol, seguido de arabitol). Esto produce una bajada en el potencial osmótico celular.

5: *E.nigrum* controla la podredumbre parda en cerezas, independientemente de la  $a_w$  a la que se produce.

6. *E.nigrum*98 controla más eficazmente la marchitez de brotes de melocotonero, probablemente por una mejor colonización de la filosfera.

7. En el sistema fermentación sólida desarrollado, se obtiene máxima esporulación a alta  $a_w$  (0.996) o a  $a_w$  reducida (0.98) ajustada con una mezcla de agua/glicerol en lugar de agua solamente. El principal soluto compatible acumulado es de nuevo glicerol.

### D3.9 TRATAMIENTO TÉRMICO SUBLETAL DE *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis*.

Soriano Martín, M.L.; Porras Piedra, A.; Pérez de los Reyes, C.; Cortés García, A.; Porras Soriano, A.

*Escuela Universitaria de Ingeniería Técnica Agrícola. Universidad de Castilla-La Mancha. Ronda de Calatrava 7. 13071 Ciudad Real.*

**La Fusariosis vascular del melón es una enfermedad ampliamente extendida en las zonas de cultivo de melón de Castilla-La Mancha, que se caracteriza por flacidez, amarilleamiento y necrosis de las hojas, y reducción en el desarrollo de la planta, pudiendo ocasionar su muerte.**

La lucha contra la enfermedad en cultivares no resistentes implica la utilización de trasplantes exentos del patógeno, lo que exige el uso de semilla sana y erradicación del parásito del sustrato y del contenedor. La alternativa a los tratamientos químicos, en viveros de melón, para el control de *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* (Fom), organismo causal de esta enfermedad, es la aplicación de métodos físicos, como pueden ser los tratamientos térmicos subletales que eviten los inconvenientes de la esterilización.

En este trabajo se presenta la influencia del tratamiento térmico subletal, a 32, 36, 40 y 44° C, durante 15, 30, 60 y 120 minutos, sobre la viabilidad (capacidad de formar colonia y longitud del tubo germinativo) de una suspensión de conidias ( $5 \times 10^5$  conidas/ml), de dos aislados (8701 y su mutante NIT) de Fom raza 2, así como su patogenicidad en plántulas de melón 'Charentais', susceptible a dicha raza.

El tratamiento térmico a 36° C, durante al menos 30 minutos, produce una reducción en el número de unidades formadoras de colonias (u.f.c.) -obtenidas sobre Agar-V8, a 27°C, durante 48 h- del 85 al 90%, respecto al testigo tratado a 25° C; alcanzándose en los tratamientos a 40° C, aplicado al menos durante 30 minutos, el 99% de reducción.

La longitud del tubo germinativo de las conidias tratadas, e incubadas en PDA durante 24 horas, a 27°C, se reduce según se incrementa la temperatura y tiempo de exposición, de forma exponencial decreciente (coeficiente de correlación 0,95).

La patogenicidad del inóculo en plántulas de melón, de 5-6 días, cuyas raíces se sumergieron durante 2 minutos en una suspensión de conidias tratadas térmicamente, tras lo cual se mantuvieron en cámara de crecimiento a 24-28° C, 16/8 h de fotoperiodo y 75% HR, durante 7 días, se redujo desde un 28%, en los tratamientos a 36°C durante 15 minutos, hasta el 62%, cuando el inóculo fue tratado a 44° C durante 120 minutos.

### D3.10 Desarrollo, evaluación y aplicación de modelos dosis-respuesta en control biológico de microorganismos fitopatógenos

E. Montesinos, A. Bonaterra

*Institut de Tecnologia Agroalimentària-CeRTA, Universitat de Girona. Avda. Lluís Santaló, s/n, 17071 Girona. E-mail: emonte@intea.udg.es*

El control biológico de enfermedades en los cultivos depende de las densidades de inóculo del patógeno y del agente de biocontrol. En procedimientos de prospección de agentes de biocontrol, se seleccionan candidatos en función de su eficacia determinada a partir de experimentos realizados en base a ensayos dosis-efecto del patógeno y agente de biocontrol. Debido a la gran cantidad de información generada son necesarios métodos estadísticos para ajustar los datos de curvas dosis-efecto a modelos matemáticos apropiados para obtener superficies de respuesta y parámetros objetivos que permitan cuantificar la virulencia del patógeno y la eficiencia del agente de control biológico, así como el rango de dosis del agente de biocontrol necesarios para obtener control de la enfermedad.

Se han desarrollado modelos matemáticos basados en ecuaciones del tipo exponencial negativo (MEN), hiperbólico de saturación (HS), y probabilístico (PB), que relacionan las densidades del agente de biocontrol y patógeno con los niveles de enfermedad. En el modelo MEN, los parámetros  $c$  y  $k$  facilitan información sobre la eficiencia del patógeno y agente de biocontrol, y  $B$  indica la máxima proporción del patógeno inactivada por el agente de biocontrol. El modelo HS posee como parámetros la dosis efectiva mediana ( $DE_{50}$ ) del patógeno ( $K_x$ ) y del agente de biocontrol ( $K_z$ ), valores asintóticos de enfermedad sin agente de biocontrol ( $Y_{max}$ ), y la máxima proporción de patógeno que el agente de biocontrol puede inactivar ( $I_{max}$ ). El modelo PB proporciona información sobre la virulencia relativa del patógeno ( $\tau$ ), eficiencia relativa del agente de biocontrol ( $\sigma$ ), y las  $DE_{50}$  del patógeno ( $\lambda$ ) y del agente de biocontrol ( $\mu$ ). Se utilizaron los datos experimentales de dos patosistemas (una enfermedad de la parte aérea y otra del sistema radicular) y dos tipos de agente de biocontrol (bacterias antagonistas y cepas no patógenas del patógeno). Los datos experimentales se ajustaron a los modelos mediante regresión no lineal utilizando el método de Newton-Raphson. Así, se ha determinado que en los casos estudiados la  $DE_{50}$  del agente de biocontrol (modelos HS y PB) para el sistema patógeno-biocontrol hongo-hongo fue de  $2 \times 10^3$  ufc/g suelo, y para el sistema bacteria-hongo fue de  $6 \times 10^6$  ufc/ml. La relación  $DE_{50}$  biocontrol/patógeno fue de 1-10 para el sistema hongo-hongo, y de 80-450 para el sistema bacteria-hongo.

Este trabajo muestra la utilidad de modelos epidemiológicos en el estudio de relaciones cuantitativas en control biológico para determinar parámetros relacionados con la eficacia del agente de biocontrol o virulencia del patógeno que permiten comparar agentes de biocontrol, patógenos y plantas huésped en condiciones diversas, así como determinar la respuesta del huésped al patógeno y al agente de biocontrol.

### D3.11 ESTRATEGIAS DE CONTROL DE *Penicillium expansum* EN POST-COSECHA DE MANZANA Y PERA MEDIANTE COMBINACIÓN DE PRODUCTOS QUÍMICOS Y BIOLÓGICOS

Francés, J. , Bosch, X. , Juan, J. L. , Montesinos, E.

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

Los fungicidas utilizados en post-cosecha de frutas pierden actividad más lentamente que los productos aplicados en campo. Esto conlleva a que actualmente el número de materias activas permitidas en los tratamientos post-cosecha sea muy limitado (tiabendazol, folpet, imazalil, orto-fenilfenol y metil-tiofanato), siendo la tendencia actual eliminar o minimizar los tratamientos para disminuir los límites máximos de residuos (LMRs) o buscar otros métodos alternativos de control, como el control biológico o la combinación de agentes de biocontrol con fungicidas aplicados a una dosis menor. En este trabajo se ensayaron diferentes métodos de control alternativos al químico utilizado tradicionalmente en las centrales frutícolas (imazalil + folpet), para el control de la podredumbre causada por inoculación artificial de *P. expansum* ( $10^5$  con/ml) en postcosecha de peras y manzanas. Estos tratamientos alternativos consistieron en el control biológico mediante aplicación de la bacteria *Pseudomonas fluorescens* EPS-288 a una dosis de  $10^8$  ufc/mL, aplicaciones de los fungicidas imazalil y folpet, y combinación de los fungicidas a bajas dosis con el producto biológico.

Se determinó la sensibilidad de *P. fluorescens* EPS-288 a los productos fitosanitarios aplicados en post-cosecha y campo, resultando ser compatible con casi todos. También se determinó, en condiciones ambientales controladas, la eficacia de los tratamientos químicos a bajas dosis, del tratamiento biológico y de la combinación de éstos en el control de la podredumbre causada por *P. expansum* en peras de la variedad Passe Crassane. La combinación de tratamientos químicos a bajas dosis con el biológico resultaron significativamente ( $p < 0.01$ ) más eficaces que los tratamientos químicos o biológicos por separado. Finalmente, durante tres años se realizaron ensayos piloto, en condiciones de atmósfera controlada en Centrales Frutícolas, consistentes en determinar la eficacia del tratamiento biológico y combinado (1/4 de la dosis comercial de imazalil y folpet + el agente de control biológico) en el control de la podredumbre causada por *P. expansum* en peras de la variedad Conference y manzanas de la variedad Golden, pertenecientes a 19 fincas comerciales de las comarcas de Girona. En este ensayo la eficacia conseguida por el agente de biocontrol y la del tratamiento combinado después de 6 meses de frigoconservación en atmósfera controlada, fue similar a la obtenida con el tratamiento químico convencional utilizado en la mayoría de las centrales frutícolas.

### **D3.12 EFECTO DE LA DESINFECCIÓN DEL SUELO SOBRE EL CONTROL DE *Phytophthora capsici* Leonnian EN CULTIVOS DE PIMIENTO EN INVERNADERO**

Lacasa Plasencia, A.<sup>1</sup>; Guirao Moya, P.<sup>1</sup>; Guerrero Díaz, M.M.<sup>1</sup>; Beltrán Paredes, C.<sup>2</sup>; Martínez Lluch, C.<sup>1</sup>; Contreras Gallego, J.<sup>3</sup>; Oncina Deltell, M.<sup>1</sup>

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

2. *Servicio de Protección y Sanidad Vegetal. Consejería de Medio Ambiente, Agricultura y Agua. C/ Mayor s/n 30.150 La Alberca (Murcia).*

3. *Dpto. Ing. Aplicada. Producción Vegetal. E.T.S.I. Agrónomos. Universidad de Murcia, Paseo Alfonso XIII s/n 30.203 Cartagena (Murcia).*

La mayor parte de las más de 1.300 Ha de invernaderos de Murcia que se destinan al monocultivo de pimiento grueso, se vienen desinfectando cada año con bromuro de metilo 98% + 2% de cloropicrina (BM 98:2) a dosis de 60 g/m<sup>2</sup>, y sellado del suelo con film de PE. Tan drástica actuación viene justificada por la incidencia de problemas fitopatológicos provocados por organismos habitantes del suelo y por obtener importantes aumentos en las producciones. *Phytophthora capsici* Leonnian se encuentra ampliamente distribuida por los suelos de la región, con graves repercusiones en aquellos invernaderos donde las desinfecciones no se han realizado correctamente.

Ante las actuales restricciones en el consumo del bromuro de metilo y su próxima prohibición en breve plazo por su impacto sobre la capa de ozono, se han planteado durante la campaña 97-98, en 4 invernaderos comerciales de pimiento con distinta problemática, los siguientes tratamientos:

T1)- BM 98%: Cloropicrina 2% a 60 g/m<sup>2</sup> y sellado con PE 200 GG (Estándar).

T2) BM 67%: Cloropicrina 33% a 45 g/m<sup>2</sup> y sellado con PE 200 GG.

T3) BM 67%: Cloropicrina 33% a 30 g/m<sup>2</sup> y sellado con V.I.F. 160 GG.

T4) Cloropicrina 99,5% a 50 g/m<sup>2</sup> aplicado en riego y sellado con PE 200 GG.

T5) Dicloropropeno 62,7% + Cloropicrina 35% a 25 ml/ m<sup>2</sup> en riego y sellado con PE 200 GG.

T6) Testigo sin desinfección ni sellado.

Se ha cuantificado el nivel de inóculo de *P. capsici* en tres de estos invernaderos donde en la campaña anterior se habían detectado plantas afectadas.

Tras finalizar el cultivo de pimiento anterior, los niveles de inóculo fueron: invernadero A, entre 0 y 0,5 propágulos/g. de suelo seco, invernadero B, entre 0,9 y 4,3 e invernadero C, entre 0 y 0,5. Los niveles de inóculo tras realizar las desinfecciones fueron 0 en todos los tratamientos de desinfección de los invernaderos B y C (T1, T2, T3 y T4), y en el testigo sin desinfección (T6) entre 0,04 y 0,15 en el invernadero B y 0,008 y 0,017 en el invernadero C. En el invernadero A en los tratamientos T1 y T3 fueron 0 los niveles de inóculo, 0,021 y 0,055 en T4 y 0 y 0,035 en T5.

Se ha efectuado una evaluación de la incidencia de la enfermedad para casa variante, en el cultivo de pimiento subsiguiente, encontrándose correspondencia entre el número de plantas enfermas y la densidad de inóculo original.

### D3.13 CONTROL DE *Penicillium expansum* MEDIANTE LA APLICACIÓN EN PRECOSECHA DE CEPAS MEJORADAS DE *Candida sake*

Teixidó Espasa, N., Usall Rodié, J., Viñas Almenar, I.

*Area de Postcollita, CeRTA, Centro UdL-IRTA. Avda. Rovira Roure, 177. 25198 Lleida.*

La levadura *C. sake* (cepa CPA-1) es un microorganismo con demostrada capacidad antagónica frente a los principales patógenos de postcosecha en fruta de pepita. Su aplicación en precosecha para el control de enfermedades en postcosecha aportaría una serie de ventajas como son la prevención de infecciones latentes, una menor manipulación de la fruta, disminución del periodo entre cosecha y conservación y finalmente se evitaría la contaminación adicional por hongos presentes en las soluciones de los “drenchers”. Sin embargo, la aplicación de los agentes de biocontrol en condiciones de campo se ha visto a menudo limitada por el estrecho margen de temperatura y humedad relativa al que son capaces de establecerse y sobrevivir, no pudiendo así controlar una plaga o enfermedad.

Estudios ecofisiológicos recientes con *C. sake* han demostrado que cuando se hace crecer este microorganismo en condiciones de baja actividad de agua ( $a_w$ ), se produce una modificación en las reservas endógenas que acumula y esto se traduce en una mayor resistencia a condiciones de estrés hídrico.

La demostración del mantenimiento de la efectividad como agentes de biocontrol de las cepas modificadas es de particular importancia, ya que sugiere que los cambios ecofisiológicos provocados en estas células no afectan su capacidad de biocontrol y seguramente pueden incluso mejorarlo.

Así pues, se llevaron a cabo ensayos de laboratorio y de campo para comparar la efectividad de las cepas  $a_w$ -tolerantes frente a la no modificada.

En los ensayos de laboratorio, la eficacia frente a la podredumbre azul en manzana de las cepas mejoradas fue en todos los casos similar e incluso mejor que la cepa no-modificada. Consiguiendo con la dosis inferior testada ( $7.5 \times 10^5$  ufc/ml) reducciones del diámetro de podredumbre y del porcentaje de agujeros podridos superiores al 90 y 78% respectivamente con las cepas mejoradas.

Los ensayos de campo consistieron en la aplicación del antagonista sobre manzanas artificialmente agujereadas, inoculadas con *P. expansum* y conservadas en frigoconservación durante 4 meses. Los resultados de los mismos, no mostraron diferencias significativas en la efectividad de biocontrol conseguidas por las tres cepas ensayadas. Sin embargo, la menor adherencia al fruto y el mayor crecimiento de la población que presentaron las cepas que habían sido modificadas hacen pensar que los requerimientos de energía para la producción de reservas endógenas puede resultar en una modificación de la concentración y características de la matriz extracelular de la levadura. Probablemente una mejora de la adherencia de las células modificadas podría traducirse en una mayor efectividad.

### D3.14 RESISTENCIA A FUNGICIDAS DE CEPAS DE *Sphaerotheca fuliginea* AISLADAS EN LAS PROVINCIAS DE MÁLAGA Y ALMERÍA.

Olalla, L.<sup>1</sup>, Rivera, M.E.<sup>2</sup>, del Pino, D.<sup>2</sup>, Cazorla, F.<sup>2</sup>, Cánovas, I.<sup>3</sup>, Parrilla, M.M.<sup>1</sup>, de Vicente, A.<sup>2</sup> y Torés, J.A.<sup>3</sup>.

1. CIFH “La Mojonera”. Apado. 91. 04700 El Ejido. Almería.

2. Dpto. de Microbiología. Fac. de Ciencias. Univ. de Málaga. 29071 Málaga.

3. Estación Experimental “La Mayora”. C.S.I.C. 29750 Algarrobo-Costa. Málaga.

*S. fuliginea* es el agente causante del oídio de las cucurbitáceas en las provincias de Málaga y Almería. El control de esta enfermedad suele realizarse mediante la repetida aplicación de productos fungicidas, pero la aparición de cepas resistentes dificulta enormemente su control. En este trabajo se evaluó la eficacia de doce fungicidas, pertenecientes a diferentes familias de antioídios autorizados para su uso en cucurbitáceas, frente a 28 cepas de *S. fuliginea* aisladas de cucurbitáceas, en su mayor parte en las provincias de Málaga y Almería. Los fungicidas ensayados fueron: bupirimato, nuarimol, tridemorf, triforina, imazalil, miclobutanil, propiconazol y triadimenol que actúan inhibiendo la biosíntesis del ergosterol del hongo y dinocap, kresoxin-metil, pirazofos y quinometionato con diferentes mecanismo de acción.

Se realizaron experimentos mediante tres protocolos diferentes:

a) plántulas cv. ‘Rochet’ de 30 días fueron inoculadas con una suspensión de conidios del hongo de 40.000 esporas/ml. A las 24 horas se trató la primera hoja con el fungicida a la dosis máxima recomendada y se observó el grado de ataque a los 12 días, mediante el conteo de conidios por unidad de superficie.

b) cotiledones desinfectados de melón cv. ‘Iran-H’ se colocaron en placas de petri sobre un medio de supervivencia. Sobre estos cotiledones se depositaron pequeñas masas de conidios del hongo y 24 horas más tarde se extrajeron del medio y se les aplicó 5 ml del fungicida mediante pulverización con una Torre Potter a 660 mm Hg de presión. Una vez secos los cotiledones, se volvieron a colocar sobre el medio de supervivencia. El desarrollo fúngico se observó con lupa binocular al cabo de 14 días.

c) cotiledones desinfectados de melón cv. ‘Iran-H’ se colocaron en placas de petri sobre un medio de supervivencia que llevaba incorporado el fungicida. A las 48 horas se depositaron sobre los cotiledones pequeñas masas de conidios. Al cabo de 14 días se observó el desarrollo fúngico mediante lupa binocular.

Con estos ensayos se pretende conocer el grado de resistencia de las poblaciones de *S. fuliginea* de nuestra zona a los fungicidas más comúnmente utilizados. Además, la comparación de los resultados obtenidos por los diferentes métodos, permitirá analizar el comportamiento del fungicida y su movilidad en el interior de la planta, es decir, si tiene efecto sistémico, translaminar o es sólo de contacto, y su potencial efectividad en tratamientos preventivos y curativos.



### D3.15 PROPIEDADES ANTIFÚNGICAS *IN VITRO* DE LA CAPSICINA CONTRA HONGOS CAUSANTES DE LA “TRISTEZA” DEL PIMIENTO.

Prego\*, M.C., Díaz, J., y Merino, F.

*Departamento de Biología Animal, Biología Vegetal e Ecología. Facultad de Ciencias. Universidade da Coruña, 15071 A Coruña. \* e-mail: pregofv@mail2.udc.es*

La “tristeza” del pimiento es la enfermedad de origen criptogámico de mayor importancia en el cultivo de esta solanácea. La aparición de resistencia a distintos fungicidas, así como los daños ambientales que causan, han aumentado el interés por la búsqueda de productos naturales que se puedan aplicar en el control de las enfermedades de las plantas. Un compuesto fenólico muy importante en el pimiento y que pudiera tener actividad fungistática o fungicida contra los hongos causantes de esta enfermedad es la capsicina.

Se ha estudiado el efecto de este compuesto sobre el crecimiento *in vitro* de *Verticillium dahliae* y *Phytophthora capsici*, principales causantes de la “tristeza”. Para ello se midió el crecimiento en diámetro así como el peso seco de las colonias de los distintos hongos que habían crecido en PDA suplementado con distintas concentraciones de capsicina. Además se hizo un estudio comparativo del efecto de la capsicina con sus análogos y precursores así como con otros fungicidas.

Todas las concentraciones ensayadas, que oscilan entre 0,05 mM y 2 mM, causaron inhibición en ambos hongos. De los datos obtenidos se deduce que la capsicina es más efectiva sobre *P. capsici* que sobre *V. dahliae*. Utilizando los datos de diámetro se obtiene una ED<sub>50</sub> de 0,25 mM para *P. capsici* y de 4,98 mM para *V. dahliae*. Los datos de peso seco nos revelan unas ED<sub>50</sub> más bajas tanto para *P. capsici* como para *V. dahliae*, 0,11 mM y 1,42 mM, respectivamente. Del estudio comparativo con los análogos y precursores se desprende que la cadena lateral de la capsicina es la principal causante del efecto antifúngico puesto que es el 8-metil-nonenoico el compuesto que mayor inhibición provoca en ambos hongos. Por otro lado, el fungicida que más inhibe el crecimiento de *V. dahliae* es el benomilo, siendo su efecto mayor que el de la capsicina. De todos los fungicidas ensayados, el metalaxil es el que causa una mayor inhibición en el crecimiento de *P. capsici*, y su efecto es mayor que el de la capsicina si consideramos los datos de diámetro de colonia, pero no detectamos diferencias significativas entre ambos cuando el crecimiento se analiza mediante la medida de peso seco.

### D3.16 SITUACION ACTUAL DE LA BÚSQUEDA DE RESISTENCIA A *Phytophthora cinnamomi* RANDS EN PATRONES DE AGUACATE DE RAZA ANTILLANA

Gallo Llobet, L., Siverio de la Rosa, F.

*Departamento de Protección Vegetal, Instituto Canario de Investigaciones Agrarias, Apartado 60, 38200 La Laguna, Tenerife, Islas Canarias.*

La obtención de patrones resistentes a la podredumbre de raíz causada por *Phytophthora cinnamomi* Rands es una prioridad mundial en la investigación sobre el aguacate (*Persea americana* Mill.).

El proceso de selección de aguacates tolerante-resistentes a la enfermedad, en el que se viene trabajando desde hace más de quince años, se realiza fundamentalmente con patrones de raza antillana aclimatados a las condiciones de las Islas Canarias.

El programa se inicia con la localización de patrones antillanos de interés, la obtención de semillas y la selección en una primera fase de plántulas en tierra infectada y tanques con solución nutritiva a la que se incorpora el patógeno. Las plantas seleccionadas se trasplantan a parcelas infestadas con alta densidad de inóculo, donde posteriormente se eligen las que presentan un mejor desarrollo para su propagación clonal. Con estos clones se reevalúa la resistencia en condiciones controladas. Por último, se establecen ensayos de campo en los que se estudian sus características agronómicas. El programa incorpora también la fecundación entre patrones seleccionados al objeto de mejorar su resistencia.

Hasta la fecha han sobrevivido a la enfermedad el cinco por ciento de los patrones seleccionados trasplantados para su evaluación en parcelas infestadas. Dos grupos de los que presentaban un mejor desarrollo han sido clonados junto con varios patrones conocidos por su resistencia o susceptibilidad a la enfermedad (Duke 7, Thomas, G755C y Topa-topa) empleando la técnica de Froelich y Platt modificada. A finales de 1997 se inició un ensayo con el primer grupo para su reevaluación en invernadero. Este ensayo incluye doce patrones seleccionados y los cuatro controles ya mencionados.

### D3.17 EFICACIA DE TRATAMIENTOS QUÍMICOS Y BIOLÓGICOS EN EL CONTROL DE LA PODREDUMBRE RADICULAR DEL OLIVO CAUSADA POR *Phytophthora megasperma*.

Cuesta Mariscal, F.J., Sánchez Hernández, M.E., Trapero, A.

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

La podredumbre radicular del olivo causada por especies de *Phytophthora*, fundamentalmente *P. megasperma*, es una enfermedad asociada al exceso de agua en el suelo, que está teniendo una elevada incidencia en olivares jóvenes en todas las comarcas olivareras andaluzas como consecuencia de las abundantes lluvias de los últimos tres años. La sintomatología inespecífica de esta enfermedad (marchitez generalizada y muerte de olivos jóvenes) llevó a incluirla como uno de los factores más importantes de la “seca” de olivos jóvenes en Andalucía. Una vez demostrada la patogenicidad de los aislados de *P. megasperma*, se ha iniciado una línea de trabajo sobre el control de esta enfermedad. Entre los objetivos de estas investigaciones se ha planteado la evaluación de productos químicos y biológicos aplicados al suelo o a la planta.

Los tratamientos evaluados han incluido distintas dosis y métodos de aplicación (mezcla con el suelo, riego, pulverización foliar) de fungicidas específicos de Oomicetos (Fosetil-Al, Metalaxil), fungicidas de amplio espectro (Enzone, Polioxina-B), nematicidas (Fenamifos), fertilizantes (Fosfato monopotásico, Fosfito potásico) y diversos mejorantes de suelo y enmiendas biológicas. Los experimentos se han llevado a cabo en invernadero, con plántones ‘Picual’ y ‘Arbequina’ de menos de 1 año, y en campo, en dos olivares seleccionados de Córdoba (‘Arbequina’, plántones de 1 año) y de Sevilla (‘Picual’, estacas de 4 años). En los ensayos de invernadero los plántones, procedentes de estaquillas semileñosas enraizadas bajo nebulización, se trasplantaron a macetas con suelos infestados natural o artificialmente con diferentes niveles de inóculo de *P. megasperma*. Superada la fase de trasplante, los plántones se mantuvieron con el suelo continuamente saturado de agua y a 15-25°C. En los ensayos de campo, los distintos productos se aplicaron en diferentes momentos sobre el cultivo ya establecido, bien directamente al suelo o mediante pulverización foliar.

Los resultados obtenidos en los experimentos de invernadero han demostrado que algunos productos, como Metalaxil, Fosfito potásico o Enzone, redujeron significativamente la severidad de la podredumbre radicular. Sin embargo, este efecto no se mantuvo, o se vio disminuido, en condiciones muy favorables para la enfermedad. En el campo de Córdoba, en condiciones de encharcamiento excesivamente prolongado que determinaron una mortalidad elevada de los plántones, ninguno de los tratamientos evaluados resultó eficaz para controlar la enfermedad. En el campo de Sevilla, donde sólo se aplicaron los fungicidas Fosetil-Al y Metalaxil, de momento no se han observado diferencias significativas entre los árboles tratados y los no tratados respecto a la severidad de síntomas aéreos; si bien, en este caso, no ha habido mortalidad de los olivos y la eficacia de los tratamientos debe considerarse a más largo plazo.

### D3.18 CONTROL DEL REPILO DEL OLIVO MEDIANTE LA APLICACIÓN DE FUNGICIDAS BASADA EN EL RIESGO DE INFECCIÓN.

Viruega, J.R.<sup>1</sup>, Montes, F.<sup>2</sup>, Civantos, M.<sup>3</sup>, Trapero, A.<sup>1</sup>

1. Depto. Agronomía, ETSIAM, Universidad de Córdoba. Apdo. 3048, 14080 Córdoba.

2. Laboratorio de Sanidad Vegetal, Junta de Andalucía. Apdo. 121, 41089 Montequinto, Sevilla.

3. Depto. Sanidad Vegetal, Junta de Andalucía. Avda. Madrid 25, 23008 Jaén.

Los tratamientos fungicidas contra el Repilo del olivo, enfermedad foliar causada por *Spilocaea oleagina*, son preventivos y se realizan rutinariamente a principios del otoño y al final del invierno, épocas generalmente consideradas como el inicio de los principales periodos de infección. Investigaciones recientes han puesto de manifiesto la importancia de la infección al final de la primavera en la epidemiología del Repilo. Por ello, se planteó un experimento para comparar la eficacia del momento de aplicación de fungicidas en el control de la enfermedad.

Se establecieron dos parcelas experimentales en campos comerciales de las provincias de Jaén (cultivar 'Picual') y Sevilla (cultivar 'Manzanilla') en una época, febrero de 1996, en que la incidencia de Repilo era casi indetectable (<0.02%). En cada parcela se evaluaron tres tratamientos: testigo sin tratar con fungicidas (A), aplicación convencional de fungicidas en otoño y a finales de invierno (B) y aplicación de fungicidas según el riesgo de infección (C). El producto químico utilizado fue un fungicida cúprico (protector) en el tratamiento B y una mezcla (cúprico más sistémico) en el tratamiento C. Cada tratamiento se aplicó a ocho olivos, realizándose evaluaciones periódicas de la incidencia de infecciones visibles en 12 ramos, de 100 hojas cada uno, elegidos al azar alrededor de la copa de cada olivo. La incidencia de infecciones latentes se determinó sobre una muestra de 200 hojas por árbol utilizando el método del NaOH. En Córdoba, una parcela del cultivar 'Picual', que se mantuvo libre de tratamientos fungicidas, sirvió como referencia de la evolución de la enfermedad.

En febrero de 1998 la incidencia media de infecciones totales (visibles+latentes) en el campo de Jaén fue 93.6% en los árboles testigo, 1.6% en los que recibieron cuatro aplicaciones convencionales y 2.7% en aquellos con tres aplicaciones según el riesgo de infección. Para el campo de Sevilla, en febrero de 1997, los resultados fueron 100% en los testigos, 22.1% en los que recibieron dos aplicaciones convencionales y 27.1% en los que recibieron una sola aplicación según el riesgo de infección. Estos resultados ponen de manifiesto la importancia de controlar el nivel de Repilo a finales de la primavera, ya que de este modo se disminuye el inóculo primario para el desarrollo de la epidemia en los meses favorables del otoño. Los umbrales de infección para determinar la necesidad de los tratamientos en cada época habrán de establecerse en función del cultivar, del lugar, de las condiciones climáticas estacionales y del riesgo de ataque de otros patógenos, principalmente los que afectan a las aceitunas durante el otoño.

### D3.19 RESISTENCIA DEL OLIVO AL REPILO CAUSADO POR *Spilocaea oleagina*

López Doncel, L.M.<sup>1</sup>, García Berenguer, A.<sup>2</sup> y Trapero, A.<sup>1</sup>

1. Depto. Agronomía, ETSIAM, Universidad de Córdoba. Apdo. 3048, 14080 Córdoba.
2. Depto. Olivicultura, CIFA, Alameda del Obispo s/n. Apdo. 4240, 14080.

La información sobre la resistencia del olivo al Repilo causado por *Spilocaea oleagina*, aunque es abundante, presenta numerosos datos contradictorios debido a que está referida a condiciones de campo y a la inexistencia de un método fiable de inoculación en condiciones controladas. Como parte de un programa de mejora varietal del olivo se ha incluido la evaluación por resistencia al Repilo de los principales cultivares españoles y otros de interés, presentes en el banco de germoplasma de olivo del CIFA de Córdoba, así como la descendencia de los cruzamientos entre los cultivares ‘Arbequina’, ‘Frantoio’, ‘Lechín de Sevilla’ y ‘Picual’.

En condiciones controladas se han inoculado plantones de 4 a 6 meses de edad y hojas jóvenes separadas de la planta. La inoculación se ha llevado a cabo siguiendo la metodología desarrollada anteriormente (López Doncel et al, 1995). En condiciones de campo, con una grave epidemia de Repilo desarrollada durante 1997-98, se han evaluado 307 cultivares presentes en el campo mundial de olivo del CIFA de Córdoba. Se han realizado observaciones sobre la incidencia de síntomas y defoliación en la cara norte, la más afectada, de cada árbol. Para ello se ha utilizado una escala de 0 a 10 (0 = no síntomas, 10 = ataque muy intenso en el que prácticamente todas las hojas muestran síntomas o la defoliación es muy severa).

Las inoculaciones artificiales han mostrado notables diferencias de susceptibilidad entre cultivares. Las principales variedades españolas son susceptibles, destacando entre las de mayor susceptibilidad ‘Cornezuelo’, ‘Cornicabra’ y ‘Picual’. En el extremo opuesto de resistencia se encuentra el cultivar ‘Lechín de Sevilla’. Además de éste, otros cultivares que presentaron un alto nivel de resistencia son ‘Frantoio’ (Italia), ‘Oblonga’ (USA) y ‘Galega’ (Portugal). Los resultados de la evaluación en condiciones de campo han puesto de manifiesto una gradación continua de susceptibilidad y han confirmado, en general, los datos obtenidos en inoculaciones controladas, siendo el porcentaje de cultivares resistentes o altamente resistentes del 30 %. Estos resultados también sugieren la existencia de variación patogénica entre poblaciones de *S. oleagina* procedentes de diferentes regiones olivareras. A este respecto, se están llevando a cabo inoculaciones con distintos aislados del patógeno. Las evaluaciones de campo han permitido también identificar cultivares que presentan un alto grado de resistencia frente a los ataques de otros hongos (*Colletotrichum gloeosporioides*, *Mycocentrospora cladosporioides*), lo que los hace candidatos idóneos para su inclusión en el programa de mejora varietal. Los resultados preliminares de la evaluación de la descendencia de los cruzamientos han permitido iniciar estudios sobre la herencia de la resistencia, así como seleccionar plantas con un elevado nivel de resistencia al Repilo, las cuales están siendo evaluadas por sus características agronómicas.

### D3.20 EVALUACIÓN DE LA EFICACIA DE FUNGICIDAS CONTRA *Spilocaea oleagina*.

Sánchez Pacheco, N. , Segura Pérez, M.R. , Trapero, A.

*Depto. Agronomía, ETSIAM, Universidad de Córdoba, Apdo. 3048, 14080 Córdoba.*

La aplicación de fungicidas protectores, especialmente compuestos cúpricos, para el control del Repilo del olivo causado por *Spilocaea oleagina* constituye una práctica habitual del cultivo en la mayoría de los olivares. Sin embargo, la información sobre la eficacia comparativa de los fungicidas sobre *S. oleagina* es prácticamente inexistente. Por ello, se ha puesto a punto un método para determinar en condiciones controladas el efecto de los fungicidas sobre la germinación de las conidias, sobre el crecimiento micelial y sobre la infección de las hojas de olivo.

El efecto sobre la germinación se ha evaluado utilizando varios compuestos de cobre (hidróxido, oxiclورو, óxido, sulfato) y fungicidas sistémicos. Para cada uno de ellos, se ha determinado la curva de respuesta a diferentes concentraciones y se ha calculado la concentración que inhibe el 50% de germinación respecto al testigo sin fungicida ( $DI_{50}$ ). Con dos fungicidas seleccionados, un compuesto de cobre (óxido) y un sistémico (benomilo), se ha estudiado el efecto sobre el crecimiento micelial en colonias del hongo cultivado en el medio Czapek-Dox agar al que se añadieron varias dosis de los fungicidas. El efecto sobre la infección de las hojas de olivo se ha evaluado mediante un bioensayo en el que hojas jóvenes separadas del árbol se inocularon con una suspensión conidial de *S. oleagina* mediante dos métodos: deposición de gotas y pulverización de las hojas. Antes, simultáneamente y después de la inoculación, las hojas se trataron con diferentes dosis de los fungicidas seleccionados. Para el cálculo de la  $DI_{50}$  se compararon los métodos de regresión lineal y el test Probit.

El efecto de los diferentes fungicidas cúpricos sobre la germinación de las conidias fue muy parecido, obteniéndose una  $DI_{50}$  entre 4-14 ppm. En cambio, el efecto de los fungicidas sistémicos fue muy variable, dependiendo del producto ensayado, con una  $DI_{50}$  entre 1-300 ppm. El efecto global del óxido cuproso y del benomilo sobre el crecimiento micelial se apreció claramente al cabo de dos meses de incubación en oscuridad a 15°C. Las dosis que inhibieron totalmente el crecimiento de las colonias fueron, respectivamente, 0.5 y 128 ppm. Los dos métodos de inoculación utilizados resultaron satisfactorios para determinar el efecto protector y erradicativo de los fungicidas sobre la infección foliar, si bien los resultados con la pulverización fueron más consistentes. Los dos fungicidas evaluados redujeron significativamente la incidencia y la severidad de las infecciones, observándose una inhibición total de la infección en los tratamientos que se hicieron simultáneos a la inoculación para las dosis más altas ensayadas, que fueron 300 ppm del óxido cuproso y 1000 ppm del benomilo. Los dos fungicidas mostraron efecto erradicativo, que en el óxido cuproso se manifestó sólo a los 3 días desde la inoculación mientras que en el caso del benomilo dicho efecto se prolongó hasta los 7 días. En el análisis estadístico de los resultados, el test Probit resultó más flexible para los diferentes productos, mientras que el modelo y la bondad del ajuste de la regresión lineal variaron con los productos ensayados.

### D3.21 ESTRATEGIAS DE CONTROL DE LA PODREDUMBRE NEGRA DE LA CHUFA (*Cyperus esculentus* L.) CAUSADA POR *Rosellinia necatrix* Prill.

García-Jiménez, J., Vicent, A., Busto, J., Moya, M<sup>a</sup>. J., Sales, R. y Armengol, J.

*Patología Vegetal. Dpto. Producción Vegetal. Universidad Politécnica de Valencia. Camino de Vera s/n. 46022. Valencia.*

En el último decenio se ha detectado, con una incidencia cada vez mayor una podredumbre negra de los tubérculos de chufa que estudios anteriores demostraron estar causada por *Rosellinia necatrix*.

El control de la enfermedad se está llevando a cabo mediante una estrategia múltiple que contempla distintas vías.

Métodos culturales: Las altas temperaturas alcanzadas durante los meses de verano impiden el desarrollo del hongo en campo, desarrollo que sí se produce a partir de octubre, con la bajada de temperaturas y la presencia de lluvias. Por tal motivo se recomienda una recolección temprana (octubre-noviembre). Paralelamente, los tubérculos afectados tienen una menor densidad y en los lavaderos tradicionales se eliminaban junto a otros restos (pajas, raíces, etc.) vertiéndolos en las acequias con la consiguiente infestación de parcelas regadas con dicha agua. En la actualidad los lavaderos han adaptado un filtro que recoge los restos evitando así su vertido en acequias.

Métodos químicos: Para la eliminación del inóculo presente en el suelo los mejores desinfectantes han sido el bromuro de metilo y enzone; el metam sodio no se ha mostrado eficaz mientras que la solarización no ha dado resultados concluyentes. Tampoco se han mostrado adecuados los tratamientos al tubérculo en presiembra con benomilo y procloraz.

Métodos físicos: Estudios previos mostraron que el óptimo de crecimiento de los aislados de *R. necatrix* se situaba en 23 °C, cesaba a 32 °C y los aislados morían tras 6 días a 35 °C. Ello hizo pensar en la posibilidad de saneamiento de los tubérculos afectados mediante termoterapia. Tras varios ensayos preliminares se ha puesto a punto un método que destruye el hongo dejando intacta la viabilidad de los tubérculos: antes de la siembra los tubérculos se tienen en remojo en agua durante 10-15 horas y se tratan con agua caliente a 53 °C durante 30 minutos. A continuación se enfrían en agua a temperatura ambiente durante unos 30 minutos y se procede a la siembra en el terreno definitivo. Este método ya está siendo utilizado extensivamente por diversos agricultores.

### D3.22 INFLUENCIA DE LA DENSIDAD DE INÓCULO DEL PATÓGENO Y LA TEMPERATURA EN EL EFECTO DEL ANTAGONISMO DE RIZOBACTERIAS SOBRE EL DESARROLLO DE LA FUSARIOSIS VASCULAR DEL GARBANZO

Landa, B. B., Navas Cortés, J. A., Hervás, A., Jiménez Díaz, R. M.

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

En las investigaciones sobre control biológico, la mayoría de los experimentos valoran el biocontrol mediante diferencias en los niveles finales de enfermedad o en el rendimiento del cultivo. Sin embargo, el análisis del progreso de enfermedad en el tiempo mediante comparación de curvas de incremento de enfermedad, permite una interpretación más dinámica del posible papel que un agente de control biológico puede tener en suprimir una enfermedad.

Investigaciones anteriores en nuestro laboratorio han demostrado que el desarrollo de la Fusariosis Vascular del Garbanzo (FVG), causada por *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* (*Foc*), es dependiente de la virulencia y densidad de inóculo de la raza del patógeno en el suelo, la susceptibilidad del cultivar de garbanzo, la temperatura y las interacciones entre estos factores. Asimismo, hemos mostrado que la aplicación conjunta al suelo y a la semilla de ciertas bacterias procedentes de la rizosfera de garbanzo confieren un nivel de control sobre el desarrollo de la FVG. No obstante, cabe la posibilidad de que la extensión de dicho antagonismo pueda ser influida por los factores citados anteriormente, que condicionan la magnitud de incidencia y severidad de los ataques de la enfermedad.

Para determinar el efecto de la densidad de inóculo de *Foc* y la temperatura en el antagonismo contra la FVG, se realizaron experimentos en condiciones controladas mediante siembra del cv. PV 61 en suelo infestado con 0, 25, 50, 100, 250, 500 y 1000 ufc/g suelo de la raza 5 de *Foc*. Se utilizaron cuatro aislados de las bacterias antagonistas *Pseudomonas fluorescens* (2), y *Bacillus* sp. (2), que se aplicaron simultáneamente a la semilla y al suelo. Las plantas crecieron en cámaras ajustadas a temperatura constante de 20, 25 y 30°C. El desarrollo de la enfermedad se evaluó en un curso temporal por la incidencia y severidad de los síntomas foliares. Para cada combinación experimental, el incremento en el tiempo del Índice de Intensidad de Enfermedad (IIE) se ajustó al modelo de Gompertz utilizando técnicas de regresión no lineal. Subsecuentemente, los parámetros estimados en el modelo temporal para cada combinación de tratamiento bacteriano y temperatura determinaron el ajuste de superficies de respuesta, que permitieron establecer relaciones funcionales en las que el incremento del IIE es función de la densidad de inóculo del patógeno y del tiempo de incubación.

Nuestros resultados demuestran diferencias en los niveles de protección conferidos por las distintas bacterias antagonistas estudiadas. No obstante, el efecto neto de esta protección es influido por la temperatura de incubación y la densidad de inóculo del patógeno en el suelo.

Subvencionado por el proyecto AGR97-1479



### D3.23 INFLUENCIA DEL CULTIVAR SOBRE EL CONTROL BIOLÓGICO DE LA FUSARIOSIS VASCULAR DEL GARBANZO

Hervás, A.<sup>1</sup>, Landa, B.<sup>1</sup>, Datnoff, L.<sup>2</sup>, Jiménez Díaz, R.M.<sup>1</sup>.

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

2. Department of Plant Pathology, Everglades Research and Education Center, Universidad de Florida, Belle Glade, FL 33430

La Fusariosis Vascular del garbanzo (FVG), causada por *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* (*Foc*), es uno de los principales factores que impiden la extensión del cultivo en muchas áreas potencialmente productoras en España y la Cuenca Mediterránea. El control más práctico y económicamente eficiente de la enfermedad es mediante la utilización de cultivares resistentes, cuya eficacia puede ser incrementada con la aplicación de antagonistas microbianos a la semilla y/o suelo. La efectividad del control biológico puede ser influida por un número de factores, entre los cuales el genotipo vegetal no ha sido suficientemente considerado. El principal objetivo de este trabajo fue determinar si la eficiencia en la supresión de FVG por antagonistas bacterianos (*Bacillus subtilis*) y fúngicos (*F. oxysporum* no patogénico, *Trichoderma harzianum*) puede variar en cultivares de garbanzo que difieren en resistencia a *Foc*.

El tratamiento de semillas germinadas de garbanzo con una suspensión de conidias de razas no patogénicas de *Foc*, o de aislados no patogénicos de *F. oxysporum*, redujo el desarrollo de la FVG. Sin embargo, la magnitud de la protección contra la enfermedad fue influida tanto por la naturaleza del agente de biocontrol como por el genotipo del huésped. Así, el aislado Fo 9009 de *F. oxysporum* redujo significativamente la cantidad de enfermedad en los cvs ICCV 4 y JG G2 tras la inoculación de las semillas con la raza 5 de *Foc* (*Foc* - 5); mientras que el aislado Fo 90105 protegió sólo "ICCV 4" contra la misma raza del patógeno. Asimismo, cuando semillas de "ICCV 4" y "PV 61" se trataron con conidias de Fo 90105 y se sembraron en suelo infestado con *Foc* - 5, la protección contra la enfermedad fué mayor y más consistente en "PV 61" que en "ICCV 4". Además, similares conclusiones se alcanzaron cuando semillas de estos cultivares se sembraron en suelo infestado individualmente con cada uno de los antagonistas (*B. subtilis*, Fo 90105, o *T. harzianum*) o con combinaciones de ellos, y las plántulas se transplantaron luego a suelo infestado con *Foc* - 5.

Subvencionado por el proyecto AGF97 - 1479

### D3.24 EVALUACIÓN DE LA SUPERVIVENCIA DE *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* SOBRE EL RESIDUO INDUSTRIAL DE LA INDUSTRIA CORCHERA Y SU COMPOST.

Avilés, M.<sup>1</sup>, Ordovás, J.<sup>1</sup>, Tello, J.C.<sup>2</sup>

1. Dpto. Ciencias Agroforestales, Universidad de Sevilla. Ctra. Utrera, Km 1, 41013 Sevilla.

2. Dpto. Biología Vegetal, Producción Vegetal y Ecología, Universidad de Almería. Cañada de San Urbano, s/n, 04120 Almería.

Los residuos industriales del corcho son una fuente renovable de posibles sustratos hortícolas y silvícolas. En este trabajo se estudia el efecto del residuo industrial del corcho y su compost sobre la supervivencia de *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*. Se trata de conocer si el fitopatógeno es capaz de desarrollar actividad saprofítica en los mismos y si este puede incrementar su densidad de inóculo o instalarse ampliamente a partir de la contaminación del medio por unos pocos propágulos, sin mediar ningún ciclo de patogénesis. En definitiva, conocer si los efectos del ambiente, tanto biótico como abiótico, en estos sustratos impiden o merman ostensiblemente su supervivencia lo que caracteriza a un caso particular de supresividad.

Estos sustratos fueron empleados tanto desinfectados como no desinfectados y a su vez con un 40% (v/v) de agua, contenido de humedad típico de estos sustratos en condiciones de cultivo en contenedor y secos al ambiente del laboratorio, contenido de humedad próximo al de los lotes de residuo industrial de corcho durante su almacenamiento. La desinfección, en su caso, se llevó a cabo por tratamiento en autoclave (30 minutos a 100 °C) durante tres días consecutivos. Para la evaluación de la supervivencia de *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* sobre las distintas presentaciones de estos sustratos se aplicaron tres niveles poblacionales del hongo fitopatógeno (concentraciones iniciales de inóculo: 1.000, 10.000 y 20.000 UFC/g sustrato seco) y posteriormente se hizo un seguimiento de su evolución en el tiempo. En el análisis microbiológico se utilizó la técnica de las suspensiones-diluciones en serie sobre el medio de cultivo selectivo Komada.

Los dos tipos de corcho tuvieron un comportamiento claramente distinto frente a la supervivencia de *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici*. El residuo industrial presentó globalmente una mayor capacidad de acogida frente al hongo que el compost. Por otro lado, la capacidad de acogida del compost apenas se ve influida por la desinfección en autoclave, a la que sí es muy sensible la supervivencia del *Fusarium* sobre el residuo sin compostar. En concordancia con la menor vulnerabilidad a los tratamientos térmicos de la microflora asociada a los restos vegetales compostados. En definitiva, si los efectos del ambiente del sustrato a base de corcho compostado impiden o merman sensiblemente la supervivencia del fitopatógeno estamos ante un caso particular de supresividad, que sólo podría quedar enmascarada en el caso de una efectiva diseminación e inoculación del fitopatógeno próxima al inicio del ciclo de cultivo o durante el mismo.

### D3.25 ESTUDIO DE LA SUPRESIVIDAD A LA PUDRICION DE TUBERCULOS DE PATATA PRODUCIDA POR *Phytophthora infestans* EN SUELOS DE LOS VALLES ALTOS DE MEXICO

García Espinosa R.<sup>1</sup>, Abato Zarate M.<sup>1</sup>, Cadena Hinojosa M.<sup>1</sup>, Ferrera-Cerrato R.<sup>1</sup>, Tlapal Bolaños B.<sup>1</sup>, Cordovilla Palomares M.P.<sup>2</sup> y Tello Marquina J.C.<sup>2</sup>

1. Colegio de Postgraduados. Instituto de Fitosanidad. Montecillo, Texcoco, 56230 México.

2. Departamento de Biología Vegetal, Producción Vegetal y Ecología. Escuela Politécnica Superior. Universidad de Almería, 04120 La Cañada, Almería.

El tizón tardío o mildiu causado por *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary, es una de las enfermedades más destructivas que afectan al cultivo de patata (*Solanum tuberosum* L.). Desde que esta enfermedad se presentó como epidemia en Irlanda (1840), los agricultores utilizan elevados recursos económicos para su control. El patógeno daña hojas y tallo y, el inóculo producido cae al suelo causando la pudrición de los tubérculos en la mayoría de las zonas productoras del mundo. Sin embargo, en el Valle de Toluca (México), el porcentaje de tubérculos dañados por el patógeno es casi nulo a pesar de la abundancia de inóculo presente en el follaje. Torres (1991, Tesis de Maestría; Colegio de Postgraduados. México) describió la presencia de bacterias y hongos antagonistas en un suelo de Toluca que provocaron la inhibición de *P. infestans* por lisis hifal y/o aborto de esporangios. Para estimar si la supresividad se encontraba en otras áreas distintas del Valle de Toluca, se realizaron muestreos de suelos de diferentes áreas del eje Neovolcánico de México, entre las que se incluían parcelas sin tubérculos enfermos, parcelas con tubérculos enfermos y suelo de monte. Los resultados demostraron la presencia de suelos con diferentes grados de supresividad, la cual en muchos casos no era solo de origen biológico. De los suelos que presentaron mayor grado de supresividad se aislaron hongos, bacterias y actinomicetos que se ensayaron *in vitro* frente a *P. infestans*. El 60% de hongos y bacterias fueron antagonistas, mientras que de actinomicetos lo fueron mas de un 70%. Finalmente se trató de infectar suelo estéril con organismos antagonistas por antibiosis a *P. infestans*; se hicieron 3 ensayos, uno con hongos, otro con bacterias y otro con actinomicetos, resultando que la mezcla de actinomicetos fue la que indujo mayor inhibición en el porcentaje de pudrición producido por *P. infestans* en tubérculos de patata.

### D3.26 CONTROL DEL OÍDIO (*Erysiphe betae*) Y DE LA CERCOSPORA (*Cercospora beticola*) CON FUNGICIDAS EN REMOLACHA DE SIEMBRA PRIMAVERAL

Ayala, J.<sup>1</sup>, Bermejo, J.L.<sup>2</sup>

1. AIMCRA. Apdo. 855. 47080 Valladolid

2. AIMCRA. Apdo. 161. 13080 Ciudad Real

El Oídio –*Erysiphe betae*- y la Cercospora –*Cercospora beticola*- son las dos enfermedades foliares de la remolacha más extendidos en España y afectan respectivamente, al 50 y al 20% de la superficie cultivada.

**En condiciones de siembra primaveral el Oídio se puede considerar endémico y, aunque cada año varía su intensidad, muestra tendencia a recrudecerse. Tradicionalmente no se le consideraba importante y se relacionaba con la madurez de la planta. AIMCRA ha puesto en evidencia su incidencia en los rendimientos y ha evaluado los productos más eficaces para controlarlo. Esta información ha provocado un cambio en la percepción que los agricultores y técnicos tienen de la enfermedad y su control forma parte de los planes sanitarios. Los fungicidas sistémicos de la familia de los “inhibidores de la biosíntesis del ergosterol” IBS y el Azufre son los productos más utilizados.**

La Cercospora se ha relacionado desde siempre con graves pérdidas de azúcar, y está citada como la responsable de la desaparición del cultivo en Aragón. Cuando las condiciones climáticas le son favorables evoluciona con gran rapidez pudiendo provocar la defoliación total.

El retraso en el comienzo de las aplicaciones, el no respetar los calendarios de aplicación y la utilización de productos poco eficaces, condicionaban un deficiente control y, por tanto, una actitud pasiva de los agricultores. Con la evolución de las técnicas de control: puntualidad en las aplicaciones, aparición de nuevas materias activas y mezclas de fungicidas con diferente tipo de acción se consigue controlar la enfermedad en las zonas más problemáticas y a un coste razonable.

### D3.27 CONTROL DE LA PODREDUMBRE ROSA DE LAS PALMÁCEAS (AGENTE CAUSAL *Penicillium vermoesenii*) POR FUNGICIDAS Y HONGOS MICOPATÓGENOS.

Salinas, J. , Forner-Antón, L. , López-Llorca, L.V.

**Departamento de Ciencias Ambientales y Recursos Naturales. Universidad de Alicante. Apdo 99. 03080 Alicante.**

La “seca” o Podredumbre Rosa de las palmeras, conocida en la bibliografía anglosajona y americana como “*Gliocladium blight*” o “pink bud rot”, es una enfermedad que afecta a numerosas especies de palmáceas. El agente causal es el Deuteromiceto *Penicillium vermoesenii*. En España, esta enfermedad se detectó por primera vez en *Phoenix canariensis* en las Islas Canarias y en 1991 en *Washingtonia filifera* en Granada y Elche (Alicante).

*P. vermoesenii* penetra a través de heridas causadas principalmente con la poda. Los síntomas producidos por el ataque del patógeno van desde amarillamiento a necrosis locales, e incluso puede originar la muerte del huésped. La enfermedad se ha detectado tanto en plántulas de viveros así como en huéspedes adultos

El control de la enfermedad se realiza exclusivamente con tratamientos químicos. En nuestro laboratorio, en experimentos *in vitro* hemos seleccionado una serie de hongos con capacidad antagonista frente a *P. vermoesenii*. Dos de estos antagonistas, *Gliocladium virens* y *Trichoderma harzianum*, han sido ensayados en experimentos de campo, comparando su efectividad con los fungicidas: carbendazima, procloraz y metil-tiofanato para controlar la podredumbre rosa.

Los experimentos se realizaron en el campus de la Universidad de Alicante. Se seleccionaron 23 individuos, aparentemente sanos, de *W. filifera* con una altura aproximada 2,5 m y 10 m de separación entre ellos, situados en una única fila. Los tratamientos se realizaron en peciolos (5-7 por palmera) de 1 m de longitud, previa herida (3 cm de longitud y 2 mm de profundidad) transversal a los vasos y realizada con bisturí estéril a 20 cm de la base del peciolo. Los tratamientos incluyeron: agua estéril, fungicida, antagonista, *P. vermoesenii* y la aplicación de los fungicidas y antagonistas 7 días antes o después de la inoculación con *P. vermoesenii*, además de peciolos no tratados. De cada tratamiento se realizaron 5 réplicas.

La enfermedad se evaluó por la severidad de síntomas en los peciolos tratados. Además se investigó la asociación entre signos y síntomas. Los resultados obtenidos indican que *Gliocladium virens* y *Trichoderma harzianum* son al menos tan eficaces como los fungicidas utilizados para el control de *P. vermoesenii* en *W. filifera*. Los signos siempre se encontraron asociados a los síntomas.

### D3.28 EFECTO DE HONGOS MICOPATOGENOS SOBRE *Penicillium vermoesenii* AGENTE CAUSAL DE LA PODREDUMBRE ROSA DE LAS PALMACEAS

Lopez-Llorca, L.V., Forner-Antón, L., Salinas, J.

*Departamento de Ciencias Ambientales y Recursos Naturales, Universidad de Alicante, Aptdo.  
Correos 99, 03080 Alicante*

La existencia y utilización de organismos antagonistas de hongos fitopatógenos, fundamentalmente bacterias y hongos, abre nuevas posibilidades en el control de las enfermedades fúngicas de las plantas. En este sentido y debido al desconocimiento de los posibles antagonistas del agente causal de la podredumbre rosa (*Penicillium vermoesenii*) decidimos abordar el presente estudio.

Hemos estudiado el efecto de *Trichoderma harzianum* (2 cepas) y *Gliocladium virens*, dos conocidos hongos micopatógenos sobre el crecimiento colonial de *P. vermoesenii* en 5 medios de cultivos sólidos de contenido creciente en nutrientes. *T. harzianum* fue el antagonista más efectivo. Los mayores valores de inhibición se observaron en los medios más pobres en nutrientes. También se estudió el efecto del desarrollo los antagonistas fúngicos sobre el resultado de su interacción con *P. vermoesenii*. Al preinocular los antagonistas la inhibición del patógeno fue mayor que en enfrentamientos simultáneos. Sin embargo, siempre se observó reducción en el crecimiento de *P. vermoesenii*.

Finalmente se estudiaron microscópicamente las interacciones entre *P. vermoesenii* y los antagonistas a nivel celular, observándose fundamentalmente arrollamientos de hifas y crecimiento adherente. También se observaron vacuolación en el citoplasma y apresorios. Estos datos indican el potencial de los hongos antagonistas en el control de la podredumbre rosa de las palmáceas.

### D3.29 SELECCIÓN DE MICRORGANISMOS ANTAGONISTAS *in vitro* E *in vivo* PARA *Colletotrichum gloeosporioides* DEL MARACUYÁ (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*).

Bertolini, E., Peruch, L.A.M., Schroeder, A.L.

Centro de Ciências Agrárias - Universidade Federal de Santa Catarina. Depto. de Fitotecnia. Caixa Postal 476, CEP 88040-900 - Florianópolis, SC. Brasil.

La enfermedad antracnósis del maracuyá causada por el hongo *Colletotrichum gloeosporioides* es apuntada como la principal causa de pérdidas en el huerto así como en la comercialización de frutos *in natura* en Santa Catarina, Brasil. Fueron realizadas pruebas *in vitro* e *in vivo* con objetivo de seleccionar microorganismos antagonistas al patógeno *C. gloeosporioides*.

En las pruebas *in vitro* fueron evaluados 44 aislados por paridad entre los antagonistas y el patógeno en medio de cultivo PDA, incubados durante siete días. En cuanto las pruebas de selección *in vivo* fueron evaluadas en dos etapas. En la primera, todos los aislados fueron evaluados, entretanto en la segunda etapa fueron seleccionados sólo los aislados que habían reducido en 50% del área lesionada del fruto en la primera etapa. Estos frutos fueron pincelados con solución de antagonistas y del patógeno, en concentraciones de  $10^8$  UFC/ml para bacterias y levaduras, y  $10^6$  conidios/ml para hongos. El tamaño de las lesiones fue evaluado después de cuatro días de la inoculación.

En la prueba *in vitro* fueron seleccionados 13 aislados con reacciones antagonistas muy claras. Otros 11 aislados manifestaron reacciones poco claras en cuanto 20 aislados en las pruebas no demostraron ninguna reacción antagonista. En la pruebas *in vivo* de la primera etapa los resultados fueron muy variados, presentando desde la disminución hasta aumento de las lesiones. En la etapa siguiente de la prueba, donde fueron utilizados sólo los aislados que habían reaccionado mas de la mitad del área lesionada, se evaluó 12 aislados de los cuales seis redujeron significativamente comparado al testigo en el test Tuckey ( $p \leq 0,05$ ). El promedio del diámetro de las lesiones ocasionadas en frutos testigos fue de 155,3 mm. Los frutos tratados con antagonistas variaron de 75,2 a 119,8 mm que representó un nivel de control de 52 a 22%, respectivamente.

### D3.30 SELECCION DE CEPAS DE *Trichoderma* ANTAGONISTAS DE *Phytophthora cinnamomi* y *Rosellinia necatrix* PARA SU APLICACION EN CULTIVOS DE AGUACATE.

Soler, A.<sup>1</sup> Grondona, I.<sup>2</sup>, Montero, M.<sup>2</sup>, López Herrera, C.J.<sup>3</sup>, Llobell, A.<sup>1</sup> y Monte, E.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Instituto de Bioquímica Vegetal y Fotosíntesis (CSIC-Universidad de Sevilla).

<sup>2</sup> Departamento de Microbiología y Genética (Universidad de Salamanca).

<sup>3</sup> Estación Experimental de la Mayora (CSIC, Algarrobo Costa, Málaga).

El aguacate (*Persea americana* Mill) es un cultivo subtropical desarrollado fundamentalmente en la parte suroccidental de España. Uno de los principales problemas que presenta es la incidencia de enfermedades producidas por hongos patógenos tales como *Rosellinia (Demathophora) necatrix* y *Phytophthora cinnamomi*. Tradicionalmente se han aplicado fungicidas químicos en el control con resultados parcialmente satisfactorios. El control biológico se está probando como una alternativa viable a los productos químicos, sobre todo en cultivos de agricultura ecológica donde estos últimos no se pueden aplicar. Cepas de *Trichoderma* se han descrito como agentes de control biológico frente a hongos patógenos de diferentes cultivos. El efecto antagonista de *Trichoderma* se explica por tres tipos de mecanismos: competición por sustrato, antibiosis y micoparasitismo. Nuestro grupo ha llevado a cabo una selección en laboratorio de cepas de *Trichoderma* capaces de antagonizar a distintos aislados de los patógenos *R. necatrix* y *P. cinnamomi*. Los ensayos han tenido lugar mediante enfrentamientos de antagonista y patógeno en cultivos duales en placa. Se han utilizado 59 cepas de *Trichoderma*, 8 aislados de *R. necatrix* y otros tantos de *P. cinnamomi*, que presentaron distintos grados de virulencia sobre aguacate y fueron proporcionados por el CIDA de Churriana (Málaga). Se han seleccionado 16 cepas capaces de antagonizar a todos los aislados de *P. cinnamomi* y 15 cepas antagonistas para todos los aislados de *R. necatrix*. Por otra parte, se han obtenido datos acerca del mecanismo de su acción antagonista. De entre las cepas capaces de antagonizar a todos los aislados de ambos patógenos se han seleccionado 4 para llevar a cabo ensayos con plántones de aguacate en invernadero y posteriormente extender estos ensayos a cultivos de aguacate ecológico en condiciones de campo.



### D3.31 LA APLICACION DE *Trichoderma harzianum* Y *Trichoderma viride* AL AGUA DE RIEGO PUEDE CONTROLAR LA PODREDUMBRE HUMEDA DE LA LECHUGA

Campos, T. <sup>1</sup>, Roselló, J. <sup>2</sup>, Gomis, M.D.<sup>3</sup>, Hermosa, M.R.<sup>4</sup>, Grondona, I. <sup>4</sup> y Monte, E.<sup>4</sup>

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

<sup>2</sup> Estación Experimental Agraria. Carcaixent. Valencia.

<sup>3</sup> AMC Chemical -Trichodex S.A. Vicente Aleixandre 4, 3ªA. 41920 San Juan de Aznalfarache, Sevilla.

<sup>4</sup> Departamento de Microbiología y Genética, Universidad de Salamanca. Edif. Departamental. Laboratorio 208. Avda. Campo Charro s/n. 37007 Salamanca.

Algunas especies del género *Trichoderma* presentan la característica de ser buenos agentes de Control Biológico de enfermedades causadas por hongos del suelo. Entre las características más importantes de *Trichoderma harzianum* y *Trichoderma viride* destaca la capacidad de estas dos especies para competir por el espacio físico y por nutrientes, así como la colonización de esclerocios gracias a la producción de enzimas capaces de degradar paredes celulares fúngicas.

Se evaluó el control ejercido por *Trichoderma* sp. sobre el Ascomiceto *Sclerotinia sclerotiorum*, agente causal de la podredumbre húmeda de la lechuga, en una parcela de la estación Experimental Agraria de Carcaixent, parcela en la que se conocía la presencia de dicho hongo. El ciclo del cultivo fue de otoño-invierno y el cultivar "Inverna" del grupo Romanas durante los años 1996 y 1997. Los tratamientos fueron, Testigo, Solarización y aporte de materia orgánica (5Kg/m<sup>2</sup>), con 3 repeticiones, en dos subparcelas una de ellas con aplicación de *Trichoderma* spp. y la otra sin aplicación. Se suministraron 3 tratamientos de *Trichoderma*, con el agua de riego, el sistema es riego por inundación, los momentos fueron, 1º al transplante, 2º y 3º con una periodicidad de 15 días. Se contaron esclerocios por el método Adams antes y después del cultivo, se contaron número de plantas muertas a la madurez comercial de la lechuga. Los resultados del análisis estadístico indican una alta significación de la aplicación de *Trichoderma* en el control de la enfermedad, el resto de los tratamientos no mostraron efectividad.

**D3.32 ANTAGONISMO DE *Trichoderma* spp. FRENTE A *Monosporascus* sp. y *Acremonium cucurbitacearum* CAUSANTES DE COLAPSO EN MELÓN.**

Sanz, L.<sup>1</sup>, Sales, R.<sup>2</sup>, Armengol, J.<sup>2</sup>, Monte, E.<sup>1</sup>, García-Jiménez, J.<sup>2</sup> y Grondona, I.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Microbiología y Genética, Universidad de Salamanca. Edif. Departamental. Laboratorio 208. Avda. Campo Charro s/n. 37007 Salamanca.

<sup>2</sup> Departamento de Producción Vegetal. ETS Agrónomos. Universidad Politécnica de Valencia. Camino de Vera, 14. 46020 Valencia.

El colapso del melón causado por hongos es una enfermedad detectada en prospecciones efectuadas en los últimos diez años por investigadores de la Universidad Politécnica de Valencia. En un 95,2% de los casos se aisló como agente causal *Acremonium cucurbitacearum* y en un 33% *Monosporascus* sp., aunque casi siempre apareció asociado al hongo anterior. En un intento por controlar a estos patógenos hemos realizado ensayos de antagonismo *in vitro* entre distintas especies de *Trichoderma* frente a ambos patógenos.

La selección de los mejores antagonistas se llevó a cabo teniendo en cuenta la velocidad de crecimiento y la capacidad para competir por el espacio y nutrientes al enfrentarlos con los patógenos en cultivo dual sobre medio PDA. Se utilizaron 52 cepas de diferentes especies del género *Trichoderma* y se seleccionaron por separado las que presentaban mayor capacidad antagonista frente a cada patógeno.

La combinación de cepas de *T. pseudokoningii*, *T. viride* y *T. harzianum* puede resultar eficaz en el control de *Monosporascus* sp., siendo *A. cucurbitacearum* más sensible a *T. longibrachiatum*, *T. aureoviride* y *T. harzianum*. Una mezcla de cepas de *T. harzianum*, siempre que sean compatibles entre sí, puede resultar la combinación más eficaz para el Control Biológico del colapso del melón.

### D3.33 EVALUACION DE LA ACTIVIDAD ANTAGONISTA DE GRUPOS MOLECULARES DE *Trichoderma harzianum* FRENTE A *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi*

Hermosa, M.R. , Grondona, I., Monte, E., y García-Acha, I.

*Departamento de Microbiología y Genética, Universidad de Salamanca/CSIC. Edificio Departamental. Laboratorio 208. Avda. Campo Charro s/n. 37007 Salamanca.*

*Trichoderma* es un hongo ampliamente distribuido en la naturaleza que actúa como micoparásito, compite bien por el alimento y el espacio, produce antibióticos y posee un sistema enzimático capaz de atacar a una amplia gama de patógenos. En particular la especie *T. harzianum* destaca como agente de control biológico de muchos hongos fitopatógenos, constituyendo una alternativa a los pesticidas químicos de uso común en agricultura. Sin embargo, el concepto de especie es muy impreciso y los criterios morfológicos o fisiológicos no son suficientes para caracterizar cepas dentro de *T. harzianum*.

La caracterización molecular de 17 cepas de *Trichoderma* (16 de ellas *T. harzianum*) a partir de marcadores endógenos de sus DNAs (RFLPs, RAPD-PCR y secuencias ITS de las regiones adyacentes al gen rRNA 5.8S) nos han permitido establecer distintos grupos moleculares. El uso de los mismo evita la aplicación de marcadores o transformaciones con DNAs exógenos que invalidarían la aplicación biotecnológica de estas cepas en ambientes naturales.

Existen cinco grupos moleculares dentro de *T. harzianum*, de los cuales sólo tres incluyen cepas consideradas como buenos agentes de control biológico. El estudio de la capacidad antagonista de cepas representantes de cada uno de estos tres grupos frente al patógeno *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi*, aislado de clavel, nos ha permitido detectar diferencias de comportamiento entre los mismos.

La posibilidad de establecer una correlación entre la pertenencia de una cepa a un determinado grupo molecular y su capacidad antagonista como agente de control biológico, exhibiendo un determinado mecanismo, facilitará la labor de selección de cepas pudiendo así preparar mezclas de agentes de control biológico más potentes y específicas para el control de determinados patógenos.

### D3.34 ESTIMULACION BIOLÓGICA DEL CRECIMIENTO DE REMOLACHA AZUCARERA EN TRANSPLANTE

Hermosa, M.R. <sup>1</sup>, Gomis, M.D. <sup>2</sup>, Redondo, J. <sup>3</sup>, Montero, M. <sup>1</sup>, Monte, E. <sup>1</sup>, Rico, C. <sup>3</sup> y Grondona, I. <sup>1</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Microbiología y Genética, Universidad de Salamanca. Edificio Departamental. Laboratorio 208. Avda. Campo Charro s/n. 37007 Salamanca.

<sup>2</sup> AMC Chemical.-Trichodex S.A. Vicente Aleixandre 4, 3ªA. 41920 San Juan de Aznalfarache, Sevilla.

<sup>3</sup> Sociedad Cooperativa General Agropecuaria ACOR. Paseo Isabel la Católica 1. 47001 Valladolid.

La utilización de microorganismos para potenciar el crecimiento en plantas es un fenómeno bastante conocido y extendido en bacterias, hasta el punto de hablar de las PGPR para referirse a aquellas rizobacterias capaces de colonizar raíces y producir beneficios en los cultivos. En los últimos diez años han surgido numerosos trabajos que avalan la capacidad de algunos hongos, como es el caso *Trichoderma* para inducir crecimiento en plantas, incluso en mayor medida que las PGPR. En particular, especies de *Trichoderma* parecen facilitar el efecto de bacterias saprofitas y de hongos micorrízicos, pudiendo tener estos hechos interés en la aplicación práctica del control biológico.

Varios mecanismos se han sugerido para explicar esta estimulación que algunos microorganismos producen sobre el crecimiento en plantas, como el control de patógenos menores, la producción de hormonas o vitaminas como respuesta por parte de las plantas, o la conversión de material no utilizable en formas que puedan ser utilizadas por la planta.

Durante la campaña 1997/98, se estudió el efecto de dos formulaciones de *Trichoderma* spp. sobre la producción de azúcar de remolacha, sembrada por el procedimiento de transplante desarrollado por ACOR, en Alcazarén (Valladolid). La semilla utilizada fue de la variedad Riposte (SES Ibérica) y las fechas de transplante y arranque fueron 25-4-97 y 29-8-97, respectivamente.

Con una de las dos formulaciones ensayadas (mezcla de *T. harzianum* y *T. viride*) se obtuvo un incremento del número de raíces (7.1%), peso de las mismas (27.7%) y producción de azúcar (16.5%), siendo el rendimiento económico (pesetas/Ha) un 12.5% superior al testigo.

El uso de extractos celulares de *Trichoderma* spp. y de formulaciones con células viables de este hongo, tanto en presencia como en ausencia de patógenos, es prometedor pero depende en gran medida del manejo que se haga del cultivo.

### D3.35 CONTROL BIOLÓGICO DE *Rhizoctonia solani* EN REMOLACHA AZUCARERA DE SIEMBRA TRADICIONAL Y DE TRANSPLANTE. COMPATIBILIDAD DE TRICHOMIC® CON GAUCHO Y TACHIGAREN

Gomis, M.D. <sup>1</sup>, Hermosa, M.R. <sup>2</sup>, Redondo, J. <sup>3</sup>, Rico, C. <sup>3</sup>, Grondona, I. <sup>2</sup> y Monte, E. <sup>2</sup>

<sup>1</sup> AMC Chemical.-Trichodex S.A. Vicente Aleixandre 4, 3ªA. 41920 San Juan de Aznalfarache, Sevilla.

<sup>2</sup> Departamento de Microbiología y Genética, Universidad de Salamanca. Edificio Departamental. Laboratorio 208. Avda. Campo Charro s/n. 37007 Salamanca.

<sup>3</sup> Sociedad Cooperativa General Agropecuaria ACOR. Paseo Isabel la Católica 1. 47001 Valladolid.

*Rhizoctonia solani* es el principal patógeno fúngico de la remolacha de siembra primaveral (en el norte), ocasionando graves pérdidas de rendimiento de las cosechas con la consiguiente disminución en la producción de azúcar.

Entre los antagonistas más importantes de este patógeno cabe destacar determinadas cepas de *Trichoderma harzianum* y *T. viride* que, combinadas en la formulación líquida TRICHOMIC® (AMC Chemical), han sido refrendadas por nosotros como agentes de control biológico en ensayos de campo.

Durante la campaña 1996/97, se realizaron dos ensayos de control biológico con TRICHOMIC®, en Nava de Arévalo (Ávila), mediante siembra tradicional y transplante, resultando esta última la más eficaz (con incrementos de 13.9% en peso de raíces, 2.5% en polarización y 16.4% en kg de azúcar/Ha).

En la campaña 1997/98 se realizaron dos ensayos con TRICHOMIC® sobre remolacha transplantada. Pese a que se lograron incrementos de peso de las raíces de hasta un 15.4%, la polarización fue inferior a la del testigo y no se detectaron diferencias significativas entre variables cuando se evaluó el rendimiento económico de estos ensayos.

En la misma campaña 1997/98, se sembraron de forma tradicional semillas Riposte, pildoradas por SES Ibérica para este ensayo, con Tachigaren, Gaucho y TRICHOMIC®. Todos los parámetros registrados en este ensayo (número y Tm de raíces/Ha, porcentaje de polarización y kg de azúcar/Ha) fueron significativamente ( $P < 0.01$ ) superiores al estándar con Gaucho usado como testigo. Asimismo el rendimiento económico fue un 18.5% superior respecto al mismo testigo. El hecho de que las cepas de *T. harzianum* y *T. viride* formuladas en TRICHOMIC® sean compatibles con un fungicida como Tachigaren y un insecticida como Gaucho, de uso habitual en la protección de semillas de remolacha, les abre enormes posibilidades de éxito en el control integrado dentro de este cultivo.

### D3.36 SENSIBILIDAD DEL COMPLEJO DE ESPECIES DE *Colletotrichum* CAUSANTES DE ANTRACNOSIS DE FRESA A LOS FUNGICIDAS DE USO HABITUAL EN EL CULTIVO

Suárez, M.B.<sup>1</sup>, Grondona, I.<sup>1</sup>, García-Acha, I.<sup>1</sup> y Monte, E.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Microbiología y Genética. CSIC/Universidad de Salamanca. Edificio Departamental. Avda. Campo Charro s/n 37007 Salamanca.

El cultivo de fresa es altamente dependiente de fumigantes químicos polucionantes como el bromuro de metilo y de pesticidas químicos que ayudan a mantener el rendimiento de las cosechas a niveles competitivos. Dentro de estos últimos se vienen empleando en el cultivo de fresa fungicidas del tipo de los benzimidazoles, dicarboximidas, ditiocarbamatos y compuestos inorgánicos para el control de los principales patógenos fúngicos del cultivo como *Botrytis cinerea*, *Colletotrichum acutatum*, *Phytophthora cactorum*, y *Rhizoctonia solani*.

Se sabe que las cepas de *Colletotrichum*, causantes de antracnosis en fresa, son resistentes a Benomilo, un benzimidazol de amplio uso como fungicida en este cultivo. De hecho en EEUU no hay ningún fungicida registrado como efectivo.

Hemos hecho un estudio de la sensibilidad de 76 aislamientos de *Colletotrichum*, procedentes de los cinco continentes, a diferentes fungicidas, con el objetivo de establecer diferencias en su sensibilidad, y de poder llevar a cabo un posterior control integrado con disminución de las dosis de agentes químicos.

El medio de cultivo utilizado fue Patata Dextrosa Agar (PDA) adicionado o no (control) con diferentes fungicidas: Benomilo (50%), Carbendazima (50%), Fosetil-Al (80%), Iprodiona (50%), Tiram (80%), y Cobre (100%). Las concentraciones utilizadas se seleccionaron en función de las dosis a las que habitualmente se utilizan en el campo.

Los inóculos utilizados fueron discos de agar procedentes de placas de PDA sembradas con las diferentes cepas de *Colletotrichum* después de siete días de incubación a 24°C en oscuridad. Los ensayos se realizaron por triplicado para cada aislamiento de *Colletotrichum* y fungicida. Los porcentajes de inhibición radial respecto al control se midieron a los 7, 14 y 21 días de incubación a 24°C en oscuridad.

La respuesta a Benomilo y Carbendazima fue similar, observándose claras diferencias entre los distintos aislamientos y presentando en general una mayor resistencia a Carbendazima. La respuesta fue más homogénea en el caso de Iprodiona y Fosetil-Al. En presencia de Cobre o Tiram la inhibición del crecimiento fue mayor para los aislamientos de *C. fragariae* y *Glomerella cingulata* que para los de *C. acutatum*.

### D3.37 EFECTO DE LA ADICIÓN DE DOS FUNGICIDAS AL SUSTRATO DE CULTIVO EN EL ESTABLECIMIENTO Y DESARROLLO DE LA SIMBIOSIS MICORRIZA ARBUSCULAR

X. Fontanet<sup>1</sup>, A. Camprubí<sup>2</sup>, C. Calvet<sup>2</sup> y V. Estaún<sup>2</sup>

1. Escola Agrària de Manresa. DARP. C/ St. Joan d'en Coll 9. 08240 Manresa.

2. Departament de Patologia Vegetal . Centre de Cabrils. IRTA. Crtra de Cabrils, s/n 08348 Cabrils (Barcelona).

La integración de la tecnología de las micorrizas en las prácticas habituales de hortofruticultura hace necesaria la evaluación de los efectos de los tratamientos fitosanitarios más utilizados sobre el establecimiento y desarrollo de la simbiosis. Metalaxyl y propamocarb son dos fungicidas de uso corriente como preventivos de enfermedades de cuello y raíz que se añaden de forma habitual a los sustratos de cultivo en viveros hortofrutícolas y también en el cultivo de plantas ornamentales. En este estudio se añadieron los fungicidas al sustrato antes de la inoculación con hongos formadores de micorrizas y del trasplante de plantones del híbrido de melocotonero x almendro GF677 micropropagado. Los hongos utilizados fueron *Glomus mosseae* (BEG nº12) y *Glomus intraradices* (BEG nº72). *G. intraradices* no se vió afectado por ninguno de los fungicidas ensayados. El fungicida metalaxyl, sin embargo, afectó negativamente a la colonización de las raíces por *G. mosseae* y disminuyó la actividad rizosférica medida como actividad esterasa.

#### D4.1 CONTROL BIOLÓGICO DE *Heterodera schachtii* EN EL CULTIVO DE REMOLACHA AZUCARERA EN CASTILLA Y LEON

Redondo García, J.

*Sociedad Cooperativa General Agropecuaria ACOR - Pº de Isabel la Católica nº 1 - 47001-Valladolid*

Cuando en 1943 se empleó con éxito el DD para el control de *Heterodera schachtii* se pensó que se había resuelto el problema. Actualmente, todos estamos convencidos de que es ilusorio controlar de una forma eficaz y rentable esta plaga con pesticidas químicos, amén de los graves problemas medioambientales que su uso acarrea. Debido a esto, urgía encontrar otros métodos de control; con la utilización de plantas nematocidas y variedades resistentes lo hemos conseguido.

Con plantas nematocidas comenzamos a trabajar en 1983. El grupo que mejor ha funcionado ha sido el de los *Raphanus* y concretamente *Raphanus sativa* subespecie *oleifera* comercializado con el nombre de Pegletta.

El conocimiento del ciclo biológico de este nematodo en Castilla y León (López Robles 1989) nos ha permitido el uso de esta planta en el otoño sin necesidad de regarla y no ocupando sitio en la rotación. De esta forma conseguimos una reducción media de la población de *H. Schachtii* de un 62%.

En el año 1993 comenzamos a trabajar con las variedades resistentes o tolerantes, con las que se esta consiguiendo buenos resultados, aunque no son definitivos.

En todas las variedades utilizadas se ha observado una reducción de la polarización con respecto al testigo, así como un menor rendimiento industrial de la remolacha, consiguiéndose los aumentos de producción solamente por un aumento del peso de la remolacha.

También se ha visto, que en el caso de no haber ataque de *H. schachtii*, o ser este ligero, que la producción de estas variedades se reduce en un 15-20% con respecto a una variedad convencional, lo cual puede limitar un poco su uso.

**Todo lo expuesto anteriormente nos aconseja ser cautos a la hora de recomendar estas variedades aunque pensamos que pueden ser el futuro de la lucha contra esta plaga.**

**Como conclusión, podemos decir que la lucha biológica nos ofrece soluciones dentro del manejo integrado para evitar los daños de *H. schachtii* en el cultivo de la remolacha. Una rotación de tres a cuatro años con la siembra de una planta nematocida o la utilización de variedades de remolacha tolerantes o resistentes, puede ser suficiente para mantener los nematodos a niveles que no causen daño económico.**



#### D4.2 NIVEL DE INFESTACION Y DAÑOS PRODUCIDOS POR *Heterodera schachtii* EN EL CULTIVO DE LA REMOLACHA AZUCARERA EN CASTILLA Y LEON

Redondo García, J.

**Sociedad Cooperativa General Agropecuaria ACOR -Pº de Isabel la Católica nº 1 - 47001-Valladolid**

En el cultivo de la remolacha azucarera, es *Heterodera schachtii*, junto con la rizomanía el mayor problema fitopatológico, siendo al que más tiempo y recursos hemos dedicado.

**Cuando en 1983, comenzamos a trabajar en este problema, nos encontramos con la no existencia de datos sobre infestaciones en Castilla y León, por lo que nuestro trabajo ha tenido dos vertientes: Determinar el nivel de infestación y evaluar los daños producidos por esta plaga.**

La primera evaluación de los niveles de infestación la presentamos en 1988, modificándola definitivamente en 1992 quedando de la forma siguiente

| NIVEL | H + J <sub>2</sub> por 100 gr./suelo | Pérdidas azúcar/ha en % |        |        |
|-------|--------------------------------------|-------------------------|--------|--------|
|       |                                      | Media                   | Máximo | Mínimo |
| 0     | 0                                    | 0                       | 0      | 0      |
| 1     | 1 a 150                              | 0                       | 0      | 0      |
| 2     | 151 a 300                            | 1,9                     | 8,3    | 1,5    |
| 3     | 301 a 500                            | 6,6                     | 10,2   | 3,4    |
| 4     | 501 a 800                            | 19,4                    | 25,1   | 7,7    |
| 5     | 801 a 1500                           | 26,9                    | 29,1   | 11,7   |
| 6     | 1501 a 2500                          | 42,0                    | 53,8   | 14,7   |
| 7     | más de 2500                          | 54,2                    | 81,0   | 18,6   |

A la vez que evaluábamos las pérdidas, hemos podido hacer un mapa de la infestación en Castilla y León, calculando el porcentaje de cada uno de los niveles y la superficie afectada, teniendo en la actualidad el 68,2% de las tierras dedicadas al cultivo de remolacha (unas 57.000 has) con problemas de *H.schachtii*, siendo muy grave en el 18,5% (15.500 has).

**Esta infestación, produce una disminución de producción de unas 220.300 Tm de remolacha, lo que supone el 4,5% de la producción de Castilla y León, que traducido a ptas. son más de 1.800 millones que deja de percibir el remolachero castellano-leonés por culpa de esta plaga.**

#### **D4.3 EFECTO DE LA SOLARIZACION DEL SUELO SOBRE LA ENFERMEDAD PRODUCIDA POR EL NEMATODO *Ditylenchus dipsaci* EN EL CULTIVO DEL AJO.**

Andres Yeves, M<sup>a</sup> Fe<sup>1</sup> y Olivares Cobo, Miguel<sup>2</sup>.

1. *Dpto de Protección Vegetal. Centro de Ciencias Medioambientales. CSIC. Serrano 115 dpdo. Madrid 28006.*

2. *Dpto de Sanidad Vegetal. COOPAMAN. Las Pedroñeras. Cuenca.*

En España la enfermedad producida por *D. dipsaci* constituye la segunda en importancia en el cultivo del ajo, originando graves pérdidas económicas que afectan especialmente a la Comunidad de Castilla-La Mancha donde se concentra aproximadamente el 40% de la producción nacional de esta hortícola. Respecto a las estrategias y medidas de control en la lucha contra esta especie patógena, se ha comprobado que cuando el origen de la enfermedad proviene de la infestación del suelo es muy difícil eliminar totalmente las poblaciones del nematodo. Los métodos culturales de rotación no siempre resultan eficaces debido a que no reducen las poblaciones del nematodo en el suelo a un nivel suficiente y en un tiempo relativamente corto, como para permitir al agricultor cultivar la planta hospedadora con una frecuencia que resulte rentable. Por otra parte diversos estudios realizados en Israel (Siti et al. 1982) e Italia (Greco et al. 1990 y 1992) demuestran que la aplicación del método de solarización resulta eficaz para el control del nematodo y aumenta considerablemente la producción del cultivo.

Por ello, se ha realizado un estudio experimental para determinar los efectos de la aplicación de la solarización del suelo sobre la enfermedad producida por *D. dipsaci* en el cultivo del ajo y en la producción en las condiciones térmicas en la provincia de Cuenca.

El ensayo experimental se llevó a cabo en una parcela de Mota del Cuervo que inicialmente presentaba un alto nivel de infestación natural, aplicando los siguientes tratamientos: 1. Solarización del suelo ( con polietileno transparente durante 60 días). 2. Tratamiento químico (realizado en el momento de la siembra con Oxamylo, tanto en formulación líquida como en formulación granulada). 3. Testigo no tratado. La siembra se realizó con una variedad de ajo autóctona (Morado de Mulvico) altamente sensible al nematodo, en microparcelas de 3,5 m x 4 m distribuidas en bloques al azar con cinco repeticiones para cada tratamiento.

La solarización del suelo naturalmente infestado durante 60 días redujo espectacularmente el nivel de población del patógeno hasta una profundidad de 50 cm. Los tratamientos de solarización y control químico retrasaron el comienzo de la enfermedad y la tasa de progreso de la incidencia de plantas muertas fue superior en las parcelas no tratadas mientras que en las solarizadas y en las sometidas a tratamiento químico con formulación granulada fue muy próxima a cero.

#### D4.4 EFECTO DE UN TRATAMIENTO DE SANIMUL EN EL CULTIVO DE CÍTRICOS DE LEVANTE.

Lara López, M<sup>a</sup>. P. <sup>1</sup>; Pastrana, M<sup>a</sup>. A. <sup>2</sup>; Bello, A. <sup>2</sup>; García Bernal, J.E. <sup>1</sup> y Soler, J.M<sup>a</sup> <sup>1</sup>

(1) – Rhône-Poulenc Agro, Centro de Investigación Agrícola, 41209 – Torre de la Reina (Sevilla)

(2) – C.S.I.C. Centro de Ciencias Medioambientales, Departamento de Agroecología, C/ Serrano 115 dpdo 28006 –Madrid.

Con este trabajo hemos pretendido conocer el efecto que el producto Sanimul tiene sobre el cultivo de Cítricos, por un lado, controlando las poblaciones de nematodos, y por otro, mejorando la producción.

Este trabajo se ha llevado a cabo en tres fincas y en 4 variedades de cítricos, de la zona de Alicante, donde se habían detectado poblaciones muy elevadas de *Tylenchulus semipenetrans*, y durante dos años se han realizado controles de cosecha y muestreos de nematodos.

Cada parcela constaba de 30 árboles dispuestos en 3 filas (10 árboles/fila), una era testigo y dos tratadas con Sanimul a 30 l/ha. Los muestreos de nematodos se realizaron en primavera y otoño y las aplicaciones en primavera, inmediatamente después del muestreo; las aplicaciones se realizaron con inyectores a 30 atmósferas de presión, a una profundidad de unos 15 cms y en las proximidades de los goteros, asegurándonos así de que el producto llegaba a todo el bulbo del árbol.

Los resultados que obtuvimos fueron muy positivos, pues reducían las poblaciones de *Tylenchulus semipenetrans* desde un 75'4 % hasta un 98'2 %, y la cosecha se incrementaba en ocasiones hasta un 140'7 %.

#### **D4.5 EFECTO DE ALGUNOS FUNGICIDAS SOBRE LOS HONGOS FORMADORES DE MICORRIZAS (MA) EN PLANTAS DE TOMATE**

Jaizme-Vega, M.C. y Rodríguez Rancel, M.

*Dpto. Protección Vegetal. I.C.I.A., Apartado 60. 38200 La Laguna, Tenerife*

Se estudió el efecto de cinco materias activas antifúngicas sobre el hongo simbiote *Glomus mosseae*, con el fin de seleccionar fungicidas compatibles con el empleo de micorrizas. Con este fin se desarrolló un cultivo de tomate en maceta al que aplicamos por empapamiento dos dosis (la recomendada por la casa comercial y el 50% de la misma) de 5 fungicidas: himexazol, propamocarb, metalaxil, thiram y oxiclóruo de cobre.

El seguimiento de los efectos fungicidas se efectuó en tres fechas distintas (5, 19 y 33 días después de la aplicación química) determinando diversos parámetros físicos de las plantas, así como la evolución de la colonización micorrícica. Esta medida se realizó mediante dos técnicas (vital y no vital) con el fin de precisar la actividad metabólica de la micorriza, además de la extensión del desarrollo fúngico.

Tres de los cinco fungicidas estudiados (himexazol, propamocarb y metalaxil) no influyeron sobre el desarrollo general de la planta de tomate, y no tuvieron consecuencias negativas sobre el efecto micorriza. Por el contrario, el thiram y el oxiclóruo de cobre actuaron negativamente sobre el crecimiento de las plantas, micorrizadas o no, reduciendo considerablemente la colonización y la actividad metabólica de los hongos MA.

#### D4.6 DINAMICA POBLACIONAL DE LOS NEMATODOS FITOPARASITOS EN PLATANERA (*Musa acuminata*, subgrupo *Cavendish enana*) TRAS LA APLICACIÓN DEL PRODUCTO ORGANICO “CoACTYL” EN CANARIAS.

Iglesias Llorente M.J.<sup>1</sup>, Hernández Minguillón M.A.<sup>1</sup>, Jordana Buttica R.<sup>1</sup>, Garcia-Mina Freire J.M.<sup>2</sup>

1. Departamento de Zoología y Ecología, Facultad de Ciencias, Universidad de Navarra, Pamplona 31080 Navarra.

2. Departamento I+D, Inabonos S.A. grupo Roullier. C. Ferrocarril sn. 31012 Pamplona.

La platanera es un cultivo parasitado por varias especies de nematodos, en la plantación estudiada fueron diferenciadas 4 especies: *Meloidogyne incognita*, *M. javanica*, *Pratylenchus goodeyi* y *Helicotylenchus erythrinae*, con biologías y dinámicas muy diferentes. Es por ello que se eligió el cultivo del plátano para ver el efecto del producto orgánico CoActyl, que había sido probado con éxito en campos de tabaco parasitados por *Meloidogyne* sp.

En Canarias de forma habitual se realizan dos aplicaciones de nematicidas a lo largo del año en primavera (P) y otoño (O), sobre cuatro de los tratamientos se hacen aplicaciones extras de ácidos húmicos o Fertil-Actyl, un tercio se aplica en primavera 15-20 días después del nematicida o el CoActyl y el resto fraccionado a lo largo del año. Siguiendo esta pauta de manejo se han ensayado 5 tratamientos: A (Etoprofos P + Fenamiphos O + ácidos húmicos), B (CoActyl bajo badana P + Fenamiphos O), C (CoActyl bajo badana P + CoActyl bajo badana O + Fertil-Actyl), D (CoActyl bajo badana P + Fenamiphos O + Fertil-Actyl) y E (CoActyl sobre badana P + Fenamiphos O + Fertil-Actyl). El CoActyl ha sido aplicado de dos formas diferentes “bajo badana” y “sobre badana”. Tres de los tratamientos han sido complementados con un bioestimulante el Fertil-Actyl, como sustituto de los ácidos húmicos abonado habitual. La cuantificación de los nematodos se hace en raíz para *Meloidogyne* spp y *Pratylenchus goodeyi* y en suelo para las tres especies (en *Meloidogyne* no se han separado los juveniles pertenecientes a las dos especies y se ha tratado como *Meloidogyne* spp).

En los resultados vemos que no hay el mismo efecto para las tres especies. La aplicación del CoActyl tiene un efecto similar al tratamiento químico, reduciendo las poblaciones, para *Pratylenchus goodeyi* en raíz. La aplicación de CoActyl reduce más la poblaciones en raíz de *Meloidogyne* spp que el tratamiento químico. En cuanto a la forma de aplicar el CoActyl no se ven grandes diferencias, salvo para *Pratylenchus goodeyi* en raíz donde al final del tratamiento quedan poblaciones más bajas cuando se aplica sobre badana, puede ser que el compuesto se mantenga más tiempo en el suelo y por tanto su acción sobre la planta. El Fertil-Actyl parece actuar sobre la planta huésped y con ello afectar a la dinámica poblacional descrita para *Pratylenchus goodeyi* en raíz. También se observan diferencias para *Meloidogyne* spp y *Helicotylenchus erythrinae* en suelo al aplicar el bioestimulante. Podemos decir que posiblemente el producto no tiene una acción nematicida, sino actúa en la relación planta-patógeno, mejorando la capacidad defensiva de la planta.

#### D4.7 EFECTO DEL PRODUCTO ORGANICO “CoACTYL” SOBRE LA PRODUCCION Y EL DESARROLLO VEGETAL EN PLATANERA (*Musa acuminata*, subgrupo *Cavendish enana*) PARASITADA POR NEMATODOS EN CANARIAS.

Garcia-Mina Freire J.M.<sup>1</sup>, Jordana Butticaiz R<sup>2</sup>., Iglesias Llorente M.J<sup>2</sup>., Hernández Minguillón M.A<sup>2</sup>.

1. *Departamento I+D, Inabonos S.A. grupo Rollier. C. Ferrocarril sn. 31012, Pamplona.*

2. *Departamento de Zoología y Ecología, Facultad de Ciencias, Universidad de Navarra, Pamplona 31080 Navarra.*

Una de las plagas más importantes en platanera en Canarias corresponde a los nematodos, estos causan daños en el sistema radicular disminuyendo de esta forma el desarrollo vegetal y la producción. Una misma plantación puede estar parasitada por varias especies de nematodos de biología diferente. Es por ello que se eligió este cultivo para ver el efecto del compuesto orgánico CoActyl, que había sido probado con éxito en cultivo de tabaco parasitado por *Meloidoyne* spp.

En Canarias de forma habitual se realizan dos aplicaciones de nematicidas a lo largo del año en primavera (P) y otoño (O), sobre cuatro de los tratamientos se hacen aplicaciones extras de ácidos húmicos o Fertil-Actyl, un tercio se aplica en primavera 15-20 días después del nematicida o el CoActyl y el resto fraccionado a lo largo del año. Siguiendo esta pauta de manejo se han ensayado 5 tratamientos: A (Etoprofos P + Fenamiphos O + ácidos húmicos), B (CoActyl bajo badana P + Fenamiphos O), C (CoActyl bajo badana P + CoActyl bajo badana O + Fertil-Actyl), D (CoActyl bajo badana P + Fenamiphos O + Fertil-Actyl) y E (CoActyl sobre badana P + Fenamiphos O + Fertil-Actyl). El CoActyl ha sido aplicado de dos formas diferentes “bajo badana” y “sobre badana”. Tres de los tratamientos han sido complementados con un bioestimulante el Fertil-Actyl, como sustituto de los ácidos húmicos abonado habitual.

El ensayo se realiza para conocer el efecto del CoActyl sobre el desarrollo vegetal y la producción en la platanera y cual puede ser la mejor forma de aplicarlo. También veremos como afecta la aplicación del Fertil-Actyl al cultivo.

**Los peores resultados tanto para producción como desarrollo vegetal son para el tratamiento A, únicamente compuestos químicos, complementados con ácidos húmicos. La aplicación doble de CoActyl da los mejores resultados para cuatro de los ocho parámetros medidos. La aplicación de CoActyl bajo badana tiene mejor efecto que sobre badana, posiblemente permite una mejor asimilación del producto por la raíz.**

**La aplicación del bioestimulante Fertil-Actyl tiene un efecto beneficioso en producción y desarrollo vegetal, siendo aún mejor los resultados en los tratamientos con CoActyl.**

#### D4.8 CONTROL INTEGRADO DEL NEMATODO FORMADOR DE QUISTES, *Heterodera schachtii*, EN REMOLACHA AZUCARERA

Ayala, J.<sup>1</sup>, Salazar, A.<sup>2</sup>

1. AIMCRA. Apdo. 855. 47080 Valladolid

2. CIMA. Apdo. 46. 01080 Vitoria

**Se ha estudiado la influencia de la fecha de siembra, de la variedad y del nematicida (Aldicarb) sobre los rendimientos y la calidad de la remolacha y sobre la población de *Heterodera schachtii* (Hs)**

Los primeros resultados muestran una gran influencia de la variedad, tanto sobre la población final de los nematodos, como sobre la producción y la calidad de la remolacha. La fecha de siembra tiene efecto sobre los rendimientos pero no sobre la tasa de multiplicación del nemátodo, mientras que el nematicida retrasa la primera invasión de H.s.

Desde el punto de vista práctico la utilización de las variedades resistentes a los nemátodos podría permitir reducir el empleo de productos químicos para controlar H.s. y recuperar, para el cultivo de remolacha, parcelas gravemente contaminadas.

#### **D4.9 ESTUDIO DE VARIEDADES DE REMOLACHA AZUCARERA DE SIEMBRA PRIMAVERAL RESISTENTES AL NEMATODO DE QUISTE (*Heterodera schachtii* Schmidt, 1871) EN CASTILLA Y LEÓN.**

Cortés Barbero, J. ; Palomo Gómez, J.L. ; García Benavides, P.

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

El nematodo de quiste, *Heterodera schachtii* Schmidt, 1871, a niveles de infección altos, impide el cultivo de remolacha azucarera dentro de las rotaciones utilizadas en Castilla y León en regadío. Se puede constatar que el 76% de las tierras productoras de remolacha azucarera de Castilla y León, están infectadas de *Heterodera schachtii*.

La presencia de variedades comerciales de remolacha “resistentes” al nematodo, nos aporta otro sistema prometedor de lucha contra el patógeno y la posibilidad de cultivar en parcelas en las que actualmente era inviable económicamente su cultivo.

Se estudian en este trabajo, las producciones en campo infectado y sano, así como la evolución de las poblaciones de nematodos (H+J2) antes y después de cultivar remolacha. Se diseñó la experiencia en bloques al azar de seis variedades comerciales resistentes con seis repeticiones.

Se tomaron muestras de tierra del campo infectado de cada una de las parcelas elementales en un mismo punto previamente establecido y marcado antes y después de realizar los tratamientos (siembra de las distintas variedades), con objeto de realizar los análisis de niveles de infección de nematodos, (H+J2) /100 cc de muestra de suelo.

Para la extracción e identificación de los nematodos se utiliza el método Fenwick (1940) específico para la extracción de quistes.

En el campo sano, la producción de azúcar por Ha de las variedades resistentes es de aproximadamente un 30% menor que la variedad testigo no resistente. Similares reducciones presentan respecto a producción (23%) y polarización (11%) por separado.

En el campo infectado de Huerta (SA), todas las variedades resistentes dan mayor producción que la variedad sensible (Victoria) utilizada como testigo, presentando diferencia significativa al nivel del 95%. La variedad Nemadie es la de mayor producción (azúcar/ha) con diferencia significativa al 95% respecto a las demás, aunque es la de menor polarización, y calidad tecnológica.

El nivel de población medio de *Heterodera schachtii* del campo infectado ha sido de 2.088 H+J2 / 100 gr. de suelo. Todas las variedades resistentes ensayadas, reducen considerablemente los niveles de población de los nematodos. Siendo las reducciones medias, en nuestras condiciones del ensayo, superiores al 50%. Lo que supone una posibilidad futura para cultivar remolacha en estos campos muy infectados.



#### D4.10 EVALUACIÓN DE CADUSAFOS EN EL CONTROL QUÍMICO DE *Meloidogyne* spp. EN TABACO Y CULTIVOS HORTÍCOLAS.

López-Robles, J.; Fernández de Castro, G.; Sierra Hernández, E.

*Aplicaciones Bioquímicas S.L. C/Bell,3 E-37008 Salamanca.*

Los nematodos formadores de nódulos *Meloidogyne incognita*, *M. javanica* y *M. arenaria* constituyen el principal problema nematológico en las zonas termófilas continentales, del litoral mediterráneo y especialmente de las Islas Canarias, donde los cultivos hortícolas intensivos y en invernadero favorecen el desarrollo de estos patógenos por el limitado número de especies vegetales que se cultivan.

**El organofosforado Cadusafos (O-etil S,S-di secbutil fosforoditioato) (FMC Corp., Philadelphia, PA) ha sido registrado en España para el control de nematodos e insectos en los cultivos de platanera; patata; tomate y tabaco (1991), y actualmente en vías de registro para cultivos como pimiento, melón, berenjena o judía verde. Según los fabricantes, este organofosforado actúa por contacto y posee buena capacidad de penetración; además de sus propiedades nematocidas posee otras características como el no ser absorbido por la planta y poseer una solubilidad en agua baja, lo que reduce el riesgo de contaminación de los acuíferos.**

Los experimentos en el cultivo de tabaco se establecieron en la zona de La Vera (Cáceres) durante cuatro años consecutivos (1994-98). El experimento consistió en 18 tests comparativos de eficacia en campos de tabaco con dos productos ya registrados (Cadusafos y el fumigante de suelo, 1,3-dichloropropeno (1,3-D)). Los productos se aplicaron a dosis comerciales la primera y cuarta semana después del trasplante, del mismo modo se procedió en los cultivos hortícolas ensayados: pimiento; pepino; tomate y melón.

Durante el experimento se determinó la altura de las plantas a T-1 y T-2 (30 y 60 días después del trasplante); longitud de la raíz y diámetro de la zona radicular, índice de agallamiento (0-10) y cosecha en verde y en seco. Los datos se analizaron estadísticamente mediante ANOVA y Test de Rango Múltiple de Duncan. Los índices de agallamiento al finalizar el experimento demuestran que Cadusafos posee un mejor control sobre las raíces adventicias, mientras que el fumigante (1,3-D) actúa mejorando el control sobre la raíz pivotante. Los valores de los demás parámetros no difieren significativamente entre los dos nematocidas testados.

## D5.1 UTILIZACIÓN DE INTERNET COMO INSTRUMENTO DE DIFUSIÓN EN TEMAS DE FITOPATOLOGÍA FORESTAL.

Soldevilla Puga, C.

*E.U.I. Téc. Forestal . (U.P.M.). U.D. de Zoología y Patología Forestal. C/ Ramiro de Maeztu s/n. 28040 Madrid. e-mail: soldevilla @ forestales.upm.es*

La Directiva 90/313/CEE (7 / Junio/1990) y la Ley 38/1995 (13/ Diciembre/1995) española, articulan el derecho del ciudadano a la información sobre materia Medio Ambiental. Tal información debe ser publicada periódicamente, actualizada constantemente y ser plenamente accesible al ciudadano. Parece lógico buscar una alternativa más eficaz y rentable que la información escrita.

El bajo coste de elaboración, el mínimo coste de difusión (la mayor parte sufragados por los propios internautas a la hora de consultar cualquier página), la rápida actualización de la información, la posibilidad de impresión y grabado de la información, el acceso universal, la selección de los datos a analizar y la facilidad de conexión durante las 24 horas con tarifas telefónicas locales, hacen que el EMPLEO DE PÁGINAS WEB sea la mejor opción.

Cada vez es más patente la presencia en la RED de páginas WEB con contenidos técnicos que están bien estructuradas con un orden lógico, dinámicas con información textual y fotográfica, enlaces a otras páginas relacionadas, actualizadas y bien documentadas.

Después de un rastreo en la Red sobre temas de Fitopatología Forestal (400 páginas WEB), se llegó a las siguientes conclusiones:

- el 95 % son extranjeras (EEUU, Canadá, Australia y Unión Europea).
- el 65% están bien estructuradas, con una media de 2 años en la Red. En general Universidades, U.Docentes especializadas, Centros de Investigación estatales y privados.
- el 5 % son nacionales, en gran parte, Organismos Estatales como el MAPA y el MMA), Centros de Investigación (INIA, o CSIC) o Sociedades Científicas (SEF).

Ningún ejemplo de página WEB Universitaria, bien estructurada con referencias en fitopatología forestal.

Este hecho dio pie a la creación de la página WEB de la U.D. de Zoología y Patología Forestal que servirá para cubrir la falta de información sobre el tema y que estará incluida en la página de la E.U.I.T. Forestal, en la Web de la U. P. de Madrid (<http://www.upm.es>).