



MANEJO INTEGRADO DE ENFERMEDADES EN POSTCOSECHA DE FRUTAS

SUGAR, D.

Oregon State University, Southern Oregon Research and Extension Center, 569 Hanley Rd., Medford, Oregon 97502 USA, david.sugar@oregonstate.edu

Las frutas de larga conservación frecuentemente padecen de enfermedades causadas por hongos patogénicos. La pera es una de las frutas más sensibles a enfermedades en postcosecha, así puede servir como modelo del desarrollo de un programa de manejo integrado. En la pera, las podredumbres típicamente aparecen después de 3-4 meses en frío y se aumentan con conservación mas larga. En EE UU el manejo tradicional es aplicar un fungicida en el campo (ziram) y otro fungicida en postcosecha (tiabendazol). Poco a poco se han introducido programas integrados contruidos de diversos métodos que en forma aditiva puedan mejorar el control de las enfermedades. A la vez, ofrecen oportunidades para aprovecharse de los mercados que prohíben los fungicidas en postcosecha o exigen producto orgánico. Una base del manejo integrado debe ser la producción de frutos que sean menos sensibles a la pudrición por su condición nutricional. Con peras que contienen más calcio y menos nitrógeno, cosechadas temprano en el rango de madurez adecuado, el productor puede entregarle al empacador frutos con menos riesgo de pudrición. También en el campo se pueden usar fungicidas nuevos, o levaduras como agentes de biocontrol, con menos uso de fungicidas o fungicidas más suaves en postcosecha. Con menos presión de patógenos, el uso de microorganismos de biocontrol en postcosecha puede ser más eficaz. También la atmósfera ambiente durante la conservación puede afectar el desarrollo de podredumbres. Bajar el oxígeno es beneficioso para mantener la condición del fruto, pero aumentar el nivel de dióxido de carbono tiene efecto también contra algunos hongos patogénicos. Combinar diversos métodos así le ofrece al productor la oportunidad para elegir los elementos del programa que correspondan a su estilo de producción y sus mercados anticipados. A la vez, combinar diversos métodos independientes debe estabilizar el programa para evitar epidemias costosas.

CP-2

MECHANISMS OF PLANT RESISTANCE TO VIRUSES

PALUKAITIS, P.

Scottish Crop Research Institute, Invergowrie, Dundee, DD2 5DA, UK

Resistance to viruses takes a number of forms, including inhibition of replication, cell-to-cell movement, systemic movement, development of an extreme or hypersensitive response at the site of infection, and tolerance of virus accumulation, with little-to-no effect on the crop. In addition, work over the 19 years has shown that resistance can be conferred by the expression of viral sequences in transgenic plants. This presentation will summarize the different forms of resistance obtained to Cucumber mosaic virus (CMV), an agriculturally important virus with the broadest host range known for any virus. CMV is an isometric virus that is transmitted by aphids and to a lesser extent through seeds. CMV also contains a satellite RNA that has also been used for protection of the plants. The genome of CMV contains five genes, expressed from its three genomic RNAs and two subgenomic RNAs. These genes encode proteins which function in replication, movement, particle formation, transmission and overcoming host defense mechanisms. The events leading to a successful infection occur quite rapidly, and appear more quickly than changes can be detected in many of the host responses. The expressed gene products can be detected within the first few hours after synchronous infection of protoplasts. In addition, systemic movement in infected plants occurs within 24 hours in some host species. Thus the complete "life cycle" of the virus and its various functions can be seen to occur in a single day. This presentation will summarize the state of knowledge concerning the roles of the various CMV-encoded proteins and their interactions with each other, as well as the molecular bases of various resistant mechanisms.

MOLECULAR BASIS OF ROOT COLONIZATION AND REGULATION OF PRODUCTION OF ANTIFUNGAL METABOLITES IN *Pseudomonas* BIOCONTROL STRAINS

LUGTENBERG, B.J.J.

Leiden University, Institute of Biology, Clusius Laboratory, Wassenaarseweg 64, 2333 AL Leiden, The Netherlands

Microbiological control of plant diseases caused by fungi is becoming more and more popular in the production of healthy food now chemical fungicides are increasingly being banned and now genetically modified resistant plants are not accepted in Europe.

Known mechanisms by which biocontrol agents act are (i) antibiosis, (ii) competition of niches and nutrients, (iii) predation and parasitism, and (iv) induced systemic resistance.

Since microbial control agents are not always effective in the field, and since this often correlates with poor root colonization, we decided 15 years ago to initiate a research programme on the mechanism of root colonization, for which tomato cv. Carmello was chosen as a model plant. Using a gnotobiotic system, in which bacterised seeds or seedlings were planted, many traits and genes required for competitive tomato root tip colonization were identified. These include chemotaxis towards root exudates components (especially towards the organic acids citric and malic acid, utilization of root exudate components, a site-specific recombinase involved in colony phase variation, prototrophy for amino acids, vitamins and nucleotides, synthesis of at least part of the O-antigen of lipopolysaccharide, a good functioning outer membrane, and protection against the harmful exudate component putrescine.

Pseudomonas chlororaphis strain PCL1391 was isolated from tomato plants growing on a field in Spain. The strain controls tomato foot and root rot, which is caused by the pathogen *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-lycopersici* (Forl). Two traits have been identified which are essential for the strain's biocontrol activity, namely production of the anti-fungal metabolite PCN (phenazine-1-carboxamide), and competitive root tip colonization as the delivery system of PCN. Quorum sensing is required for PCN production. The observed formation of biofilms on the root by biocotrol strains is thought to be relevant for establishing this quorum.

Recently, we observed that biocontrol pseudomonads also form biofilms on hyphae. The phytotoxin fusaric acid was shown to be a major chemoattractant for *Pseudomonas*.

The production of PCN and other antibiotics is subject to regulation by many environmental factors, including pH, temperature and the presence of fusaric acid. To be less dependant on antibiotic-producing strains, we have attempted to enrich for strains which act through another mechanism, namely competition. We developed a system that enriches for good colonizers and it appeared that among the selected strains a high percentage of biocontrol strains was present.

CP-4

POPULATION GENETIC STRUCTURE OF PLANT PATHOGENIC FUNGI: EVOLUTIONARY POTENTIAL AND CONSEQUENCES FOR DURABILITY OF RESISTANCE GENES AND FUNGICIDES IN AGROECOSYSTEMS

McDONALD, B.A.; GARCÍA-ARENAL, F.; ROBERTS, P.A.; LINDE, C.C.

Institute of Plant Sciences, Swiss Federal Institute of Technology (ETH) Zurich, CH-8092 Switzerland. E-mail: bruce.mcdonald@ipw.agrl.ethz.ch

Pathogen populations evolve in response to the deployment of resistance genes (R-genes) and fungicides in agroecosystems. One consequence of this evolution is the familiar boom-and-bust cycle whereby major R-genes or fungicides lose their effectiveness after being utilized over a wide area for several years. The evolutionary response of the pathogen population is affected by the mutation rate, mating/reproduction system, gene/genotype flow, effective population size, type of resistance gene, and R-gene or fungicide deployment strategy. Knowledge of pathogen population genetic structure may prove useful for predicting the evolutionary potential of pathogen populations. We will present a model for ranking pathogen evolutionary potential and show how well the model performs when applied to pathogenic fungi, viruses and nematodes. We will propose a strategy that may prove useful for deciding whether to focus on major R-gene or quantitative R-gene resistance and for extending the life expectancy of R-genes and fungicides in agricultural ecosystems.

DETECCIÓN DE INFECCIONES LATENTES DE *Monilinia* spp. E IDENTIFICACIÓN DE ESPECIES POR MARCADORES MOLECULARES

GELL, I.; CUBERO, J.; DE CAL, A.; MELGAREJO, P.

Departamento de Protección Vegetal, INIA; carretera de La Coruña Km 7,500. 28040 Madrid. E-mail: gell@inia.es

Monilinia spp. (*Monilinia laxa* y *Monilinia fructigena*) son los hongos que causan marchitez de flores, yemas, chancros en ramas y/o podredumbre de frutos en los frutales de hueso y de pepita en España. Existe una tercera especie *M. fructicola*, que no se encuentra en España, siendo un organismo de cuarentena en la Unión Europea. Las tres especies del género *Monilinia* causan una sintomatología similar en los frutales de hueso. Su identificación se realiza mediante características morfológicas y culturales que requieren al menos 7-10 días de incubación y el aislamiento del hongo desde el material vegetal.

Recientemente, se han desarrollado métodos de caracterización molecular que permiten diferenciar las tres especies de *Monilinia* en material vegetal enfermo y discriminarlas de algunos géneros fúngicos, no relacionados con la micoflora de los frutales de hueso. No hay disponible sin embargo un método que permita detectar *Monilinia* en plantas asintomáticas y al mismo tiempo determinar la especie presente.

Con el fin de obtener un método sensible para la detección de infecciones sintomáticas y latentes de *Monilinia* sp. Se secuenció el ADN ribosomal de las tres especies de este género. Estas secuencias se compararon con esa misma región en otros hongos relacionados taxonómicamente (*Botrytis*, *Sclerotinia*, *Sclerotium*) y en géneros que pueden estar presentes en la micoflora del melocotonero (*Penicillium*, *Alternaria*, *Cladosporium*, *Epicoccum*, *Aspergillus*). Se observó una secuencia común para *Monilinia* y diferente para los otros hongos que permitió diseñar una pareja de cebadores específicos para este género. Esta pareja de cebadores amplifica una región que comprende el ITS1, la subunidad ribosomal 5.8s y parte del ITS2, generando un fragmento de 250pb. La utilización de estos cebadores permitió detectar *Monilinia* sobre material vegetal asintomático aunque la poca variabilidad entre las especies del género en esa región no permitió diferenciarlas entre sí. Por ello, se diseñaron también cebadores específicos para las tres especies de *Monilinia* basándose en bandas características de cada una de las tres especies obtenidas en perfiles de rapds. Las bandas de ADN se purificaron a partir de geles de agarosa, se clonaron y se secuenciaron. Se definieron 3 marcadores específicos: uno de 300pb para *M. laxa*, otro de 400pb *M. fructicola*, y otro de 1kb para *M. fructigena*, que se verificaron con más de 100 aislados de *Monilinia*. La detección temprana de las infecciones latentes causadas por las especies de *Monilinia* puede definir el riesgo de podredumbre de fruto antes de la recolección y mejorar el control de la enfermedad.

BIOCHIP ELECTRÓNICO PARA LA DETECCIÓN Y CARACTERIZACIÓN SIMULTÁNEA DE LOS PRINCIPALES VIRUS Y BACTERIAS PATÓGENOS DE LA PATATA

RUIZ-GARCÍA, A.B.¹; OLMOS, A.²; ARAHAL, D.R.¹; ANTÚNEZ, O.¹; LLOP, P.²; PÉREZ-ORTÍN, J.E.¹; LÓPEZ, M.M.²; CAMBRA, M.².

¹Universidad de Valencia. Departamento de Bioquímica y Biología Molecular. 46100 Burjassot, Valencia. Ana.Belen.Ruiz@uv.es

²Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA). Dpto. de Protección Vegetal y Biotecnología. Ctra. Moncada-Náquera km 5. 46113 Moncada, Valencia.

Las enfermedades causadas por virus y bacterias son uno de los principales factores limitantes del cultivo de la patata. Estos agentes fitopatógenos provocan disminuciones en el rendimiento de la cosecha e importantes pérdidas económicas. Los análisis de selección de lotes de patata de siembra se realizan mediante la técnica ELISA que posee muchas ventajas por su fiabilidad, facilidad de uso y capacidad de análisis de muchas muestras en un solo ensayo. Los chips de DNA suponen una nueva y potente tecnología que puede ser de gran interés para detectar simultáneamente un gran número de patógenos en una única prueba. Uno de los soportes más novedosos dentro de este campo son los chips electrónicos, que presentan una mayor versatilidad en el análisis simultáneo de muestras que requieren diferentes condiciones de hibridación y por su capacidad de diferenciar fácilmente SNPs. En este trabajo se han desarrollado y evaluado chips electrónicos de DNA basados en la tecnología de Nanogen, capaces de detectar y caracterizar los principales virus (PVY, PVX y PLRV) y bacterias (*Ralstonia solanacearum*, *Pectobacterium carotovorum* subsp. *Carotovorum*, *P. carotovorum* subsp. *Atrosepticum*, *P. chrysanthemi* y *Clavibacter michiganensis* subsp. *Sepedonicus*) que infectan la patata. La detección de los virus analizados se llevó a cabo mediante iniciadores capaces de amplificar por RT-PCR regiones específicas de cada virus. Las secuencias de DNA obtenidas fueron analizadas mediante sondas específicas para cada uno de los virus estudiados. En el caso de PVY también se ha podido diferenciar entre diferentes razas del virus (PVY^N, PVY⁰, PVY^{NTN}), mediante sondas específicas diseñadas dentro de una región conservada entre ellas. Para la detección simultánea de todas las bacterias se han diseñado iniciadores presentes en dos regiones conservadas del RNA ribosómico 16S. Una vez amplificadas por una única PCR estas dos regiones, se procedió a la detección específica de cada una de las bacterias de interés, mediante sondas específicas. El biochip desarrollado ha permitido la detección específica de cualquiera de estos agentes fitopatógenos en muestras de patata de campo y podría ser una alternativa a los métodos hasta ahora utilizados.

Proyecto CICYT AGL2000-03954-P4

ANÁLISIS FUNCIONAL DEL GENOMA DEL VIRUS DEL CRIBADO DEL MELÓN (MNSV)

GENOVÉS, A.; NAVARRO, J.A.; PALLÁS, V.

IBMCP (UPV-CSIC) Avda. Dels Tarongers, s/n, 46022, Valencia.

El virus del cribado del melón (*Melon necrotic spot virus*, MNSV) afecta a cultivos de melón, pepino y sandía ocasionando síntomas tanto en los frutos como en la parte vegetativa lo que conlleva importantes pérdidas de producción y calidad y en los casos más graves la muerte de la planta. El MNSV pertenece a la familia *Tombusviridae*, género *Carmovirus* (Brunt y col, 1996). Su genoma está constituido por un RNA (Grna) de aproximadamente 4.3 Kb y polaridad positiva. El Grna contiene cinco pautas de lectura abierta (*open reading frames*, ORFs). En la ORF del extremo 5' se localiza una proteína de 29 kDa (p29) que termina en un codón ambar el cual podría ser leído a través para producir una proteína de 89 kDa (p89). En la región central del genoma hay dos pequeñas ORFs que codifican dos proteínas de 7kDa (p7A y p7B); el codón ambar en que acaba p7A podría ser obviado dando lugar a una proteína de 14 kDa (p14). La proteína 7ª posee propiedades de unión a RNA mientras que la 7B presenta un dominio transmembrana funcional (Navarro et al, Second European Congress of Virology; Madrid, 2004), ambas características son consistentes con el modelo de transporte célula-célula propuesto para los *Carmovirus* (Vilar y col, 2001; J. Biol. Chem.). La ORF del extremo 3' codifica una proteína de 42 kDa (p42).

A partir de un aislado procedente de Almería (MNSV-AI) se clonó el Grna completo en un vector Puc18 bajo el control del promotor de la RNA polimerasa del fago T7. Para estudiar la función de las distintas ORF en el ciclo vital del virus se realizaron construcciones del Grna con la expresión bloqueada de cada proteína y se ensayaron *in vivo* inoculando en plántulas de melón (*Cucumis melo* cv *galia*). Sólo aquellas plantas inoculadas con los transcritos del clon no mutado y de la construcción con la expresión de p42 bloqueada desarrollaron síntomas, aunque en el segundo caso de apariencia distinta al no mutado. El análisis tipo *Northern* reveló la ausencia de acumulación de RNAs virales con transcritos procedentes de p29 y p89 mutadas mientras que se detectaban sgRNA en los ensayos con las construcciones de p7A , p7B y p42, siendo menor la cantidad en las dos primeras y mayor en la última, aunque no igualaba a la del salvaje.

Los resultados obtenidos claramente sugieren la implicación de p29 y p89 en la replicación viral, de 7ª y 7b en el movimiento célula a célula y p42, además de su obvio papel estructural, albergaría muy probablemente los determinantes de patogenicidad.

DETECCIÓN PRECOZ DE *Rosellinia necatrix* EN AGUACATE MEDIANTE “PCR EN TIEMPO REAL”

RUANO-ROSA, D.¹; SCHENA, L.²; IPPOLITO, A.²; LÓPEZ-HERRERA, C.J.¹

¹ Instituto de Agricultura Sostenible. C.S.I.C. Apdo 4084. 14080 Córdoba, España. E-mail: lherrera@cica.es

² Dipartimento di Protezione delle Piante e Microbiologia Applicata, Università degli Studi, Bari, Italia

Rosellinia necatrix es el agente causal de la podredumbre blanca del aguacate. El principal método de diagnóstico de la enfermedad se realiza mediante el aislamiento del patógeno en PDA, a partir de trozos de raíces sintomáticas. Otra metodología utilizada para la detección de *R. necatrix* en suelo es la colonización de discos de hojas trampa de aguacate colocadas en la superficie del suelo a analizar. Ambos métodos de identificación presentan inconvenientes, de un cierto periodo de tiempo para establecer un diagnóstico así como las dificultades en el aislamiento del patógeno por la existencia, en algunos casos, de numerosos hongos saprofitos que pueden enmascarar el crecimiento de *R. necatrix*. Los recientes avances en las técnicas moleculares, tales como “PCR en tiempo real” sugieren su uso para la detección del patógeno tanto en raíz como en suelo, eliminando riesgos de contaminación y reduciendo el tiempo de análisis.

Se tomaron muestras, de raíces y de la rizosfera del árbol, en 47 árboles de aguacate, procedentes de 14 fincas de las provincias de Málaga y Granada. Para determinar la presencia del hongo se analizaron las muestras por dos métodos: a) aislamiento del hongo a partir de siembra de raíces en PDA (técnica convencional); y b) análisis del ADN mediante la técnica “PCR Scorpion en tiempo real” (técnica molecular). Cada muestra se analizó un mínimo de 3 veces, y se amplificaron un total de 200 extracciones, usando cebadores Scorpion (R15 Scorpion y R18) específicos para *R. necatrix*.

Utilizando el método convencional, se detectó el patógeno en 23 muestras de las 47 analizadas mientras que con la técnica molecular el resultado se amplió a 9 muestras adicionales (un 20% más). Estos resultados ponen de manifiesto que la técnica “PCR- Scorpion en tiempo real” es más sensible y rápida que la técnica convencional y permite una detección precoz de *R. necatrix* tanto en árboles sintomáticos como asintomáticos de aguacate.

Además la realización de una sola amplificación en tiempo real, en lugar de una “nested” PCR en tiempo real, fue suficiente para la detección del ADN del hongo en suelo. Esto se debió probablemente a la mejora del protocolo de extracción y purificación del ADN del suelo y/o a la alta concentración del inóculo de *R. necatrix* en esta zona de cultivo de aguacate. Por otro lado la omisión de la “nested” PCR reduce costes y riesgos de contaminaciones cruzadas, además de permitir un rápido análisis de las muestras y facilitar el uso de la “PCR en tiempo real” para cuantificar el ADN del patógeno en suelo.

DINÁMICA POBLACIONAL DEL VIRUS DEL MOSAICO DEL PEPINO (CMV) EN MELÓN Y EN LA FLORA ARVENSE

SACRISTÁN, S.; FRAILE, A.; GARCÍA-ARENAL, F.

Depto. De Biotecnología, E.T.S.I. Agrónomos, Universidad Politécnica de Madrid

Para comprender la epidemiología y la evolución de los virus de plantas es necesario conocer su ecología: para analizar la especialización de huésped e identificar los reservorios y fuentes de inóculo del virus, se necesita obtener información acerca de la dinámica y la estructura genética de sus poblaciones en los diferentes huéspedes que infecte. Durante tres años, hemos llevado a cabo un análisis de la dinámica poblacional del *Virus del Mosaico del Pepino* (CMV) en el cultivo del melón y en la flora arvense de una zona hortícola del centro de España. El cultivo del melón es uno de los principales cultivos hortícolas de la región y sobre el que cada año se producen epidemias de CMV, muy variables de un año a otro. Trabajos anteriores de nuestro grupo habían analizado epidemias de CMV en melón en esa misma zona y apuntaban a la flora arvense como posible reservorio y fuente de inóculo primario de CMV, sugiriendo un posible papel de la flora arvense en las diferencias anuales entre epidemias.

Hemos detectado CMV en la flora arvense durante todo el año, presentando la incidencia una clara estacionalidad, con máximos del 20-30% en verano y otoño. La incidencia de CMV ha mostrado correlación positiva con la cantidad de vegetación arvense, estimada tanto en su cobertura como en su biomasa. La dinámica de la incidencia de CMV en la flora arvense ha sido diferente en los distintos hábitats (parcelas de cultivo, lindes entre parcelas y eriales), que difieren en la estabilidad de su vegetación según el grado intervención humana al que se ven sometidos. No hemos encontrado relación entre la incidencia de CMV en la flora arvense y las diferencias en incidencia y en duración de las epidemias de CMV en melón. Pese a ello, no hemos detectado diferencias significativas en las frecuencias genotípicas ni de biotipos en aislados de melón y de flora arvense, lo que indica que las diferentes dinámicas poblacionales en los distintos huéspedes y hábitats no han resultado en una diferenciación de la población. Esto sugiere la existencia de migración de CMV entre huéspedes y hábitats, que impide la fragmentación de su población.

CONTROL BIOLÓGICO DEL FUEGO BACTERIANO MEDIANTE *Pseudomonas fluorescens* EPS62E

CABREFIGA, J.; BONATERRA, A.; MONTESINOS, E.

Institut de Tecnologia Agroalimentària-CIDSAV-CeRTA. Universitat de Girona. Campus Montilivi, 17071 Girona. E-mail: jordic@intea.udg.es

El fuego bacteriano, causado por *Erwinia amylovora*, es una enfermedad con gran interés económico y comercial porque afecta a plantas de la familia de las Rosáceas, tanto frutales de pepita como plantas ornamentales. El control de la enfermedad se basa principalmente en medidas de exclusión del patógeno y en el control químico que se realiza mediante derivados de cobre o antibióticos. Sin embargo, los productos químicos disponibles para el control de la enfermedad presentan en general baja eficacia o su uso no está autorizado en algunos países, como es el caso de la estreptomycin. La disponibilidad de un sistema eficaz de control biológico puede significar un avance importante en el control de la enfermedad en un futuro próximo y se plantea como una alternativa o complemento al control químico. Actualmente, en algunos países ya existen productos biológicos registrados para el control del fuego bacteriano. En el presente trabajo, se ha seleccionado la cepa EPS62e de *Pseudomonas fluorescens* entre 600 cepas de *P. fluorescens* y *Pantoea agglomerans* obtenidas de flores, frutos y hojas de plantas de la familia de las Rosáceas. La cepa fue seleccionada por su eficacia en la reducción de las infecciones producidas por *E. amylovora* en frutos inmaduros, flores y brotes en condiciones ambientales controladas, mostrando niveles de control similares a los presentados por el control químico usando derivados de cobre o antibióticos. La cepa además coloniza y sobrevive bien en heridas en frutos inmaduros, hojas y flores y reduce significativamente los niveles poblacionales de *E. amylovora* en estos órganos cuando es aplicada en tratamientos preventivos. También se han estudiado los mecanismos desarrollados por la cepa en el biocontrol del fuego bacteriano, siendo las principales la exclusión preventiva del patógeno mediante la colonización de la superficie de los órganos sensibles de la planta y el consumo de nutrientes, así como la interacción célula a célula.

ANÁLISIS DE LA DIVERSIDAD GENÉTICO-MOLECULAR DE POBLACIONES DE *Verticillium dahliae* MEDIANTE AFLPs Y SECUENCIAS DE ADN

COLLADO-ROMERO, M.¹; MERCADO-BLANCO, J.¹; VALVERDE-CORREDOR, A.¹; OLIVARES-GARCÍA, C.¹; JIMÉNEZ-DÍAZ, R.M.^{1,2}

¹*Instituto de Agricultura Sostenible, CSIC, Apdo.4084. CP 14080. Córdoba. E-mail: g62corom@uco.es*

²*ETSIAM, Universidad de Córdoba, Apdo. 3048. CP 14080. Córdoba.*

El conocimiento de la diversidad en las poblaciones de *Verticillium dahliae*, y la relación de ésta con la patogenicidad sobre el huésped, resulta de gran importancia para el control de las Verticilosis de cultivos como algodón, olivar y alcachofa a los que afecta severamente en España. En este trabajo se ha determinado la diversidad genética a nivel molecular en poblaciones de *V. dahliae* de diverso origen geográfico y procedentes de estos tres cultivos, mediante el análisis de marcadores AFLPs (amplified fragment length polymorphism) y de la diversidad existente en las secuencias de intrones de genes conservados, tales como los que codifican para la actina, beta-tubulina, calmodulina e histona-3, así como en las secuencias de ADN de algunos marcadores PCR específicos. Se han estudiado un total de 208 aislados monoconídicos procedentes en su mayoría de alcachofa (C. Valenciana), olivo (Chipre, España, Italia, Siria y Turquía) y algodón (España, Grecia, Israel, y Turquía), seleccionadas para asegurar la máxima representación de grupos de compatibilidad vegetativa (VCG1A, 1B, 2^a 2B, 4B, 6), virulencia diferencial (patotipos defoliante y no defoliante), y de perfiles PCR específicos para determinados marcadores previamente caracterizados. Los perfiles AFLP se han generado utilizando cuatro iniciadores selectivos: EcoRI-AG, -GC, -AT y -GA en combinación con MseI-C, con los que se obtuvieron un total de 489 fragmentos polimórficos. El análisis de los perfiles AFLP reveló una agrupación de los aislados correlacionada con el VCG al que pertenecen, independientemente del huésped de procedencia u origen geográfico; si bien para algunos VCGs se produjeron subgrupos correlacionados con la planta huésped o con la procedencia geográfica. La posible asociación de virulencia diferencial de los aislados con los grupos definidos mediante el análisis de AFLPs está siendo investigada. Por otra parte, el análisis de las secuencias de ADN ha revelado diversidad en las correspondientes a dos marcadores PCR. Una de dichas secuencias pudo ser asociada al VCG2B y ha permitido diseñar un iniciador específico para el VCG2B de olivo y algodón y uno de los subgrupos de VCG2B de alcachofa. Este subgrupo de alcachofa difiere en virulencia con respecto a otro subgrupo del VCG2B de dicho huésped. Por último, se han identificado marcadores AFLP específicos de cada VCG en el estudio. La clonación y secuenciación de estos marcadores permitirá diseñar nuevos iniciadores específicos de utilidad para la caracterización molecular rápida y específica de poblaciones de *V. dahliae* en plantas y suelos agrícolas, y para la evaluación de riesgos y toma de decisiones respecto del establecimiento de cultivos susceptibles en ellos.

Subvencionado por los Proyectos CICYT AGL2000-1444 y CICYT AGL2003-00503.

APLICACIONES DE *Epicoccum nigrum* EN CAMPO PARA EL CONTROL DE LA PODREDUMBRE DE LOS FRUTOS DE MELOCOTONERO EN POSTCOSECHA

LARENA, I.¹; DE CAL, A.¹; TORRES, R.²; LIÑÁN, M.¹; OCHOA DE ERIBE, X.³; BELLINI, A.⁴; DOMENICHINI, P.⁴; MANDRIN, J.F.⁵; LICHOU, J.⁵; USALL, J.²; MELGAREJO, P.¹

¹INIA.Crt.de La Coruña,Km 7,500.28040 Madrid.

²UdL-IRTA,Av.Rovira Roure 191. 25198 Lleida.

³SIPCAM Prof. Báuena 5, 46009 Valencia.

⁴SIPCAM Via Sempione 195, 20016 Milan-Italy.

⁵Ctifl, 30127 Bellegarde, France. E-mail :ilarena@inia.es

Monilinia laxa y *M. fructigena* son los hongos causantes de la podredumbre de la fruta de hueso en Europa, enfermedad que causa importantes pérdidas antes y después de la recolección. El control de la enfermedad se realiza mediante métodos sanitarios, tratamientos fitosanitarios en pre y postcosecha y adecuado manejo de los frutos cosechados. Sin embargo, la aparición de aislados resistentes a fungicidas y el interés generalizado por reducir los residuos sobre los frutos, hace necesaria la búsqueda de otros métodos de control. Se evaluó la eficacia de diferentes tratamientos de *Epicoccum nigrum*, un agente de biocontrol, en el control de la podredumbre de los frutos. Se realizaron 14 ensayos con infección natural en huertos comerciales de melocotonero en España, Italia y Francia en los años 2001, 2002 y 2003, aplicándose los tratamientos biológicos solos o en combinación con fungicidas. Los tratamientos se pulverizaron en floración y precosecha, con 3-5 aplicaciones por huerto y año. Los tratamientos biológicos constaron bien de conidias frescas de *E. nigrum* (10^6 - 10^7 conidias/ml) producidas mediante fermentación sólida, bien de productos formulados (10^6 conidias/ml). Los productos formulados se obtuvieron añadiendo diferentes estabilizantes, desecantes y adherentes a las conidias frescas antes de secarlas mediante lecho fluido. Se analizó la relación de los diferentes tratamientos biológicos sobre la dinámica de población del agente de biocontrol sobre la superficie de flores y frutos. Los tratamientos se aplicaron en bloques al azar, con 4 bloques por huerto y 4 árboles (100 frutos) por tratamiento y bloque. Los tratamientos biológicos de conidias frescas de *E. nigrum* e integrados con fungicidas en precosecha reducían significativamente la podredumbre de los frutos en postcosecha. El biocontrol se conseguía con 3-4 aplicaciones de *E. nigrum* (en floración-cuajado y precosecha), correlacionándose con la epidemiología de la enfermedad y la dinámica de población del agente de biocontrol. La población de *E. nigrum* sobre la superficie de los árboles tratados (3-4 aplicaciones) se mantenía en un nivel de 10^{4-5} , aumentando especialmente durante la época estival sobre los frutos e inmediatamente después de las aplicaciones. Los productos biológicos formulados resultaban más eficaces y sus conidias más viables y menos susceptibles a las condiciones ambientales que las conidias frescas de *E. nigrum*.

CARACTERIZACIÓN DEL GEN NSV DE RESISTENCIA AL VIRUS DE LAS MANCHAS NECRÓTICAS DEL MELÓN (MNSV)

NIETO, C.¹; TRUNIGER, V.¹; ARANDA, M.A.¹; MORALES, M.²; GARCIA-MAS, J.²; ORJEDA, G.³; SZUREK, B.³; BENDAHMANE, A.³

¹*Centro de Edafología y Biología Aplicada del Segura (CEBAS)-CSIC. Apdo. Correos 164. 30100 Espinardo. Murcia (España). E-mail: m.aranda@cebas.csic.es*

²*Laboratori CSIC-IRTA de Genética Molecular Vegetal. IRTA Centre de Cabrils. Carretera de Cabrils s/n. 08348 Cabrils. Barcelona (España). E-mail: jordi.garcia@irta.es*

³*INRA-URGV. 2 Rue Gaston Crémieux CP 5708. 91057 EVRY Cedex (Francia). E-mail: bendahm@evry.inra.fr*

La resistencia al Virus de las manchas necróticas del melón (*Melon necrotic spot virus*, MNSV) esta controlada en melón (*Cucumis melo* L.) por el gen recesivo *nsv*. Tan sólo el aislado MNSV-264, identificado recientemente, es capaz de superar la resistencia conferida por *nsv*. Nuestros resultados ya publicados han mostrado que la resistencia conferida por *nsv* se expresa en células aisladas y que el correspondiente determinante de avirulencia del virus reside en la región 3'-terminal del genoma viral. Gracias a la generación de virus mutantes puntuales que interrumpen putativas regiones codificantes hemos comprobado que el determinante de avirulencia se trata de una región no codificante incluida en el extremo 3'-no traducido (3'-UTR) del genoma del virus. Asimismo, hemos demostrado que esta región es la responsable de la capacidad del aislado MNSV-264 de infectar plantas de *Nicotiana benthamiana* y *Gomphrena globosa*, especies que normalmente no son huéspedes de MNSV. Mediante clonaje posicional y análisis de microsintetia con *Arabidopsis* hemos identificado, secuenciado y clonado un candidato para el gen *Nsv*. Con el objetivo de comprobar si este candidato se trata o no del alelo que confiere susceptibilidad a MNSV, en estos momentos estamos realizando ensayos de complementación de MNSV en melón resistente y en *N. benthamiana* mediante expresión transitoria del supuesto alelo que confiere la susceptibilidad. Para ello, hemos generado clones agroinfectivos de MNSV y clones del alelo candidato cuyas expresiones están controladas por el promotor 35S del Virus del mosaico de la coliflor. Por otra parte, dado que el determinante de avirulencia es una secuencia de RNA, estamos analizando la posible interacción física RNA-proteína entre el 3'-UTR del virus y proteínas codificadas por variantes alélicas de *Nsv*. Estos ensayos se están llevando a cabo mediante un sistema de tres híbridos de levadura.

ABORDAJE GENÓMICO Y PROTEÓMICO DE LA PATOGÉNESIS DE *Erwinia chrysanthemi*

LÓPEZ-SOLANILLA, E.; LLAMA-PALACIOS, A.; MAGGIORANI, A.; ANTÚNEZ-LAMAS, M.; RODRÍGUEZ-PALENZUELA, P.

Dpto. de Biotecnología. Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos. Universidad Politécnica de Madrid.

Erwinia chrysanthemi es un agente causal de podredumbres blandas en diversas especies vegetales. El factor de virulencia tradicionalmente más estudiado en esta bacteria son las enzimas pectolíticas que degradan la pared del hospedador y son responsables directas de los síntomas más característicos. No obstante, diversos estudios han puesto de manifiesto la naturaleza multifactorial de la virulencia en esta bacteria, y en particular la importancia de los mecanismos bacterianos de resistencia a factores de defensa de la planta tales como, péptidos antimicrobianos, estrés oxidativo, Ph ácido y otros.

La secuenciación del genoma completo de esta bacteria (www.tigr.org) ha abierto nuevas perspectivas para el estudio de la interacción de este patógeno con sus hospedadores, permitiendo un abordaje sistemático de los mecanismos moleculares implicados en el proceso. En nuestro laboratorio estamos iniciando este tipo de abordaje siguiendo tres líneas principales:

- 1.- Identificación de genes candidatos basándonos en la homología con genes estudiados en otras bacterias y, en consecuencia la construcción sistemática de mutantes en los genes correspondientes. Esta estrategia se está aplicando de momento a genes de MDR (multidrug resistance) y genes implicados en el proceso de la quimiotaxis.
- 2.- Estudio del proteoma bacteriano en respuesta a diferentes factores de la planta, empleando electroforesis bidimensional combinada con técnicas fluorométricas (DIGE) y de espectroscopia de masas (MALDI).
- 3.- Estudio del transcriptoma bacteriano en respuesta a diferentes factores de la planta, empleando hibridación de "microarrays" que contienen el genoma completo de *Erwinia chrysanthemi*.

RESISTENCIA DE CULTIVARES DE OLIVO A LA PODREDUMBRE RADICAL CAUSADA POR *Phytophthora megasperma* y *P. inundata*

RAYA-ORTEGA, M.C.; BLANCO-LÓPEZ, M.A.; TRAPERO, A.

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

Phytophthora spp. Es el principal agente causal de la podredumbre radical (PR) de olivo y junto con *Verticillium dahliae* el componente principal de la “seca” de olivos jóvenes en Andalucía. *P. megasperma* y *P. inundata* son las dos especies patógenas que con más frecuencia se han aislado de raíces necróticas de olivos afectados de “seca”. La PR de olivo se ve favorecida por el encharcamiento del suelo, por lo que las medidas de control se dirigen a evitar estas condiciones. Dada la dificultad que ello conlleva, en numerosas ocasiones, el uso de cultivares resistentes es la medida de control más recomendable. La evaluación de la resistencia a *Phytophthora* en plantas leñosas es lenta y laboriosa, debido en parte al complejo manejo de la planta. La inoculación de estaquillas de olivo sin enraizar, ha expresado diferencias de susceptibilidad entre cultivares y una correspondencia con las inoculaciones en las que se utilizaron plantones de olivo.

Estaquillas sin enraizar de olivo se dispusieron en recipientes de plástico con perlita estéril infestada con zoosporas de un aislado de *P. megasperma* y otro de *P. inundata*, a una concentración de 50.000 zoosporas/ ml. Se han evaluado un total de 34 cultivares de olivo, usando como controles de alta y baja susceptibilidad a ‘Picual’ y ‘Manzanilla de Sevilla’ respectivamente.

Aunque en general, la virulencia de ambos aislados era similar, no todas las variedades mostraron el mismo índice de susceptibilidad o resistencia frente a los aislados ensayados. Con esta salvedad, los cultivares ‘Cornicabra’, ‘Morrut’ y ‘Manzanilla de Montefrío’ destacaron por su baja susceptibilidad al patógeno, similar a la ya conocida ‘Manzanilla de Sevilla’. La mayoría de los cultivares fueron susceptibles, teniendo valores intermedios entre ‘Picual’ y ‘Manzanilla de Sevilla’, dependiendo estos valores del aislado estudiado.

Tras la realización de una serie de ensayos con extracto filtrado de cultivo, libre de *Phytophthora*, se propone la existencia de una toxina producida por el patógeno como factor responsable de la reacción sintomatológica observada en las estaquillas.

DISECCIÓN DEL DETERMINANTE DE PATOGENICIDAD DEL VIROIDE DEL MOSAICO LATENTE DEL MELOCOTONERO RESPONSABLE DE LA SINTOMATOLOGÍA CALICO

RODIO, M.E.¹; DELGADO, S.²; AMENDUNI, T.¹; HERNÁNDEZ, C.²; FLORES, R.²; DI SERIO, F.¹

¹*Dipartimento di Protezione delle Piante e Microbiologia Applicata, e Istituto di Virologia Vegetale (CNR), Università di Bari, 70126 Bari, Italia,*

²*Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas (UPV-CSIC), Universidad Politécnica, 46022 Valencia, España. E-mail: csvvfd12@area.ba.cnr.it*

Resultados recientes con un aislado italiano del viroide del mosaico latente del melocotonero (PLMVd) que induce una clorosis extrema de hojas, tallos y frutos (Peach Calico, PC), han establecido una relación causal entre esta sintomatología y variantes del RNA viroidal con una inserción de 12-13 nt en uno de los bucles de su estructura secundaria. Esta inserción adopta un plegamiento de horquilla que predominantemente presenta un tallo de cuatro pares de bases y un tetrabucle UUUU o UUAU (Malfitano, Di Serio, Covelli, Ragazzino, Hernández y Flores, *Virology*, 313: 492-501, 2003). Queda por determinar si toda la inserción, o una parte, es necesaria para la inducción del PC. Esta cuestión ha sido ahora investigada mediante: i) caracterización biológica y molecular de otros dos aislados de PC del sur de Italia, y ii) mutagénesis dirigida y bioensayos en el melocotonero GF-305. La inoculación de plantas de GF-305 con corteza de áreas con PC y de otras adyacentes asintomáticas de estos aislados indujo sintomatologías paralelas a las de los inóculos, lo que indica la presencia de variantes peculiares del PLMVd en cada uno de los dos tejidos fenotípicamente diferentes. El análisis de las progenies mostró en las nuevas variantes una inserción del mismo tamaño y en la misma posición que en el aislado original, si bien con distintas secuencias entre sí: las variantes con tetrabucle UUUU fueron mayoritarias en tejido con PC, mientras que las de tejido asintomático presentaron predominantemente tetrabucles GAAG o GAAA (además de otras variantes sin inserción). Estos resultados sugieren que el determinante del PC está restringido al tetrabucle (UUUU o UUAU) de la inserción, debiendo el resto de la misma ser capaz de formar el tallo de la horquilla. En concordancia con esta hipótesis, la sustitución por mutagénesis dirigida del tetrabucle de una variante sintomática UUUU por GAAG generó una nueva variante que se replica pero no induce síntomas.

CARACTERIZACIÓN DE UNA VARIANTE DEL CMV DETECTADA EN TOMATE

ARAMBURU, J.¹; **GALAPIENSO, L.**¹; **LÓPEZ, C.**²

¹ *Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentàries IRTA. Ctra. de Cabrils s/n. 08348 Cabrils. Barcelona. E-mail: josemaria.aramburu@irta.es*

² *UPV-COMAV. Camino de Vera s/n 46022. Valencia*

El virus del mosaico del pepino (CMV) es capaz de infectar mas de 1000 especies de plantas, entre ellas el tomate. Se transmite de manera no persistente por al menos 75 especies de áfidos y en algunas especies a través de semillas. Posee un genoma compuesto y puede hospedar un RNA satélite, que puede tanto atenuar como acrecentar los síntomas inducidos por el virus.

En 1986 se demostró que una variante del CMV que llevaba incorporado un RNA satélite fue la causa de cuantiosas perdidas económicas en tomate en la zona de Levante. Debido a que las variantes más virulentas parecen tener una desventaja en su competitividad y la presencia del RNA satélite un efecto negativo sobre la eficacia en la transmisión, determinó que la enfermedad desapareciese por sí sola en pocos años.

En el verano del 2003 se detectó en diversas explotaciones de la costa norte de Barcelona un nuevo brote de CMV infectando plantas de tomate con apariencia normal, pero que presentaban frutos decolorados en el momento de la maduración, lo cual impedía su correcta comercialización.

En este trabajo se ha realizado una caracterización biológica y molecular de varios de estos aislados de campo en comparación con otros obtenidos en distintas prospecciones de años anteriores, que se han utilizado como referencia. Todos los aislados recolectados en el 2003 tienen un patrón de bandas de dsRNA idéntico entre sí, salvo que uno de los aislados presenta un RNA adicional defectivo procedente del RNA 3. Este patrón no lleva asociado RNA satélite y es muy diferente respecto al resto de los aislados de referencia. El análisis de un fragmento de la secuencia que codifica la proteína de cubierta muestra que en estos aislados existe una homogeneidad genética mayor a la que presentan los aislados procedentes de prospecciones anteriores. A pesar de las homologías mencionadas anteriormente el comportamiento biológico de estos aislados es diferente dependiendo de los huéspedes estudiados.

RIESGOS DE LA INTRODUCCIÓN DE *Ralstonia solanacearum* EN ESPAÑA MEDIANTE ESQUEJES IMPORTADOS DE GERANIO

MARCO-NOALES, E.; BERTOLINI, E.; MORENTE, C.; LÓPEZ, M.M.

Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA). Carretera Moncada-Náquera, km 5. 46113 Moncada (Valencia). emarco@ivia.es

Ralstonia solanacearum es la bacteria causante de marchitez bacteriana que puede afectar a muchas especies vegetales, entre ellas algunas ornamentales. Esta bacteria está considerada como organismo de cuarentena en la unión europea, por lo que el material vegetal importado de países terceros se somete a estrictos controles sanitarios. Es necesario, por tanto, disponer de técnicas rápidas, específicas y sensibles, que permitan la detección de la bacteria incluso a bajas concentraciones y en material vegetal con elevada presencia de inhibidores que interfieren en las técnicas de detección, como es el caso del geranio. En este trabajo se ha detectado *R. solanacearum*, por primera vez en España, en geranios asintomáticos procedentes de Kenia. Entre abril de 2003 y enero de 2004 se analizaron 16 partidas, compuestas por tallos y pecíolos, mediante aislamiento, ELISA con enriquecimiento previo y Co-PCR. En ningún caso se aisló la bacteria directamente del material vegetal; sin embargo, 5 muestras fueron positivas mediante Co-PCR, y 3 de éstas también mediante enriquecimiento-ELISA. En uno de estos casos en que tanto el enriquecimiento-elisa como la Co-PCR fueron positivos, el extracto de geranio obtenido se inoculó en plantas de tomate, según la directiva 98/57/CE, y se consiguió reaislar la bacteria de las plantas inoculadas. Estos resultados demuestran que *R. solanacearum* puede estar presente en los geranios importados en concentraciones muy bajas o en el llamado estado viable pero no cultivable (VBNC), siendo posible su detección solamente mediante técnicas independientes del cultivo como la Co-PCR. Con el fin de determinar la sensibilidad y validez de las diferentes técnicas de detección de *R. solanacearum* y elaborar un protocolo para el análisis de muestras de geranio, no exclusivamente basado en el aislamiento, se han realizado ensayos con extractos de geranio inoculados con concentraciones crecientes del patógeno. Aunque la directiva 98/57/CE sobre el control de *R. solanacearum* exige el aislamiento de la bacteria, nuestros resultados demuestran que el cultivo como único método de detección del patógeno puede subestimar su presencia en material vegetal, lo que supondría un elevado riesgo de introducción de *R. solanacearum* en nuevas zonas. El uso complementario de la Co-PCR sería muy útil para el análisis de muestras vegetales susceptibles de contener el patógeno en cantidades inferiores al límite de detección del aislamiento en placa o en estado VBNC.

ETIOLOGÍA, DISTRIBUCIÓN, IMPORTANCIA DEL DESARROLLO EPIDÉMICO Y PÉRDIDAS ASOCIADAS A LAS ENFERMEDADES DEL ARROZ EN EL DELTA DEL EBRO

GALIMANY, G.¹; MARÍN, J.P.²; ALMACELLAS, J.³; BOADA, J.⁴; CATALÁ, M.M.⁵; MATAMOROS, E.¹; TOMÁS, A.¹; PORTA, J.¹; MONTES, F.⁶

¹*Sanitat Vegetal. DARP-Generalitat de Catalunya. Serveis territorials a les Terres de l'Ebre. Pl. d'Alfons XII, 7, 4 2a, 43500 Tortosa. E-mail: ggallimany@gencat.net.*

²*Universitat de Lleida. Avda. Alcalde Rovira Roure, 191, 25198 Lleida.*

³*Sanitat Vegetal. DARP-Generalitat de Catalunya. Serveis territorials a Lleida. Avda. Alcalde Rovira Roure, 191, 25198 Lleida.*

⁴*Sanitat Vegetal. DARP-Generalitat de Catalunya. Serveis territorials a Tarragona. Avda. Catalunya, 50, 43002 Tarragona.*

⁵*Estació Experimental de l'Ebre. IRTA. Ctra. Balada s/n, 43870 Amposta (Tarragona).*

⁶*Federación de Arroceros de Sevilla. Dpto. de Investigación. Avda. S. Francisco Javier 9, Sevilla II. 3ª M-8, 41018 Sevilla.*

El Delta del Ebro es una zona importante en España en cuanto al cultivo del arroz, con un área media cultivada en los últimos años de 23.000 ha. Se caracteriza también por ser una zona de sensibilidad agroambiental muy acusada puesto que contiene un parque natural de 7.736 ha que constituye el hábitat acuático más importante del mediterráneo occidental. Mediante el análisis de antecedentes y estudios realizados durante el año 1999, se concluyó que los agricultores de la zona tenían muy poco conocimiento de las causas de las enfermedades del cultivo, de los síntomas asociados y además se puso de manifiesto que había un uso indiscriminado de fungicidas sin una base científico-técnica suficiente que lo apoyara, lo cual comportaba un impacto ambiental importante en una zona considerada vulnerable y una eficacia del control muy baja e insatisfactoria. Por todo ello, desde el año 2000, se iniciaron estudios dirigidos a conocer la etiología de las enfermedades más importantes en el delta, la asociación de los síntomas con diferentes agentes causales, su distribución, la importancia relativa de estos entre subzonas dentro del área de cultivo y las pérdidas asociadas.

Una primera conclusión de los estudios anteriores es que han sido los hongos los causantes de la mayor parte de las enfermedades del cultivo del arroz en la zona del Delta del Ebro y durante el período estudiado. La segunda conclusión es que la patología del arroz en la zona es compleja y que se ha de tener en cuenta más de un patógeno a la hora de definir una estrategia de control. Se observó que la Helminthosporiosis estaba asociada principalmente a *Bipolaris oryzae* pero que se producían síntomas no diferenciables debidos también a otras especies encontradas, en asociación con esta, como *B. hawaiiensis* y *B. australiensis*, y a la vez se producía una dificultad en atribuir una cuantificación de intensidad de enfermedad para cada especie. Otra particularidad es que normalmente se suceden síntomas de Pyriculariosis y de Helminthosporiosis simultáneamente durante el desarrollo del cultivo lo cual condiciona también las estrategias de control a seguir. Además se produce la diferenciación de síntomas/agente causal según órgano afectado, habiéndose encontrado síntomas asociados en hoja a *Pyricularia grisea* y a diferentes especies de *Bipolaris*, en cuello de la panícula el agente causal fue casi exclusivamente *P. grisea* y en panícula los síntomas se asociaron a las especies anteriores y además a otros hongos considerados patógenos, patógenos débiles o saprofitos como *Fusarium fusarioides*, *Nigrospora oryzae* y *Epicoccum purpurascens*.

Se obtuvieron ecuaciones adaptadas al Delta de las pérdidas asociadas a Pyriculariosis y Helminthosporiosis y se cuantificaron las pérdidas, a nivel de zona de cultivo, como base de apoyo para la toma de decisiones en el control de estas enfermedades.

EL MOSAICO DE LA HIGUERA: ASOCIACIÓN CON PATÓGENOS DE ADN

GONZÁLEZ, X.¹; ALDEA, M.²; SABATER, J.³; BATLLE, A.³; ACHÓN, M.A.¹; MEDINA, V.¹

¹Dept. Producció Vegetal i Ciència Forestal. ETSEA. Universitat de Lleida. Avda. Alcalde Rovira Roure 191, 25198 Lleida.

²Dept. Ciències Mèdiques Bàsiques, Avda. Alcalde Rovira Roure 44, 25198 Lleida.

³Dept.. Protecció Vegetal, Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentàries (IRTA), 08348 Cabriels, Barcelona. medinap@pvcf.udl.es

El mosaico de la higuera está asociado con la presencia, en las células del parénquima de las hojas de las plantas enfermas, de unos corpúsculos pleomórficos con una membrana externa doble (“double membrana bodies”, DMBs) de naturaleza desconocida que han sido propuestos por varios autores como los agentes causantes de la enfermedad. Estos DMBs se han relacionado, por su morfología, con la fase inicial de la maduración de los poxvirus animales y con clamidias. Por otro lado, existen referencias de la asociación de la enfermedad con fitoplasmas del grupo “Stolbur”. La observación realizada por nuestro equipo de partículas semejantes a *Ichnovirus* (fam. *Polydnaviridae*) y *Poxviridae* en el vector *Aceria ficus* podría corroborar en parte alguna de estas hipótesis y por ello se ha iniciado el estudio de la relación de esta enfermedad con fitoplasmas y con virus de las géneros *Ichnovirus*, *Orthopoxvirus* y *Entomopoxvirus*. Se han realizado extracciones totales de ADN de planta enferma y planta sana y analizado con cebadores específicos de los patógenos mencionados o relacionados, completándose el análisis por microscopía electrónica del floema de los tejidos infectados. Únicamente se ha observado un producto de cDNA asociado a planta enferma con los cebadores específicos de “Vaccinia growth factor” (VGF) de *orthopoxvirus* y para cebadores generales de fitoplasmas. El análisis de las secuencias de los productos génicos obtenidos no revela similitudes con otros productos génicos conocidos en el primero de los casos, si en cambio para fitoplasmas, aproximándolo al grupo del “Stolbur”. Con los cebadores para *Ichnovirus*, la única diferencia obtenida es una mayor intensidad en planta enferma de dos productos de PCR. Uno de ellos presenta un porcentaje de homología superior al 80% con proteínas de stress del tipo receptor-quinasa. En los tubos cribosos de las plantas enfermas no se observan corpúsculos del tipo fitoplasma.

DIAGNÓSTICO DE *Peronospora arborescens* EN SEMILLA DE ADORMIDERA MEDIANTE PCR

LANDA, B.B.^{1,2}; MONTES, M.¹; MUÑOZ-LEDESMA, F.J.³; JIMÉNEZ-DÍAZ, R.M.^{1,2}

¹Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos y Montes, Universidad de Córdoba, Apdo. 3048, 14080 Córdoba.

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

³Alcaliber, S.A. Ctra. Carmona-El Viso del Alcor, km 1,8, Carmona (Sevilla).

El Mildiu de la adormidera, causado por *Peronospora arborescens*, ha afectado severamente el cultivo de esta planta de interés farmacéutico durante las campañas agrícolas 2001/2002 y 2002/2003. En el curso de estos años, la incidencia y severidad en los ataques por *P. arborescens* se han incrementado a medida que el cultivo se ha extendido a nuevas zonas frescas y húmedas en España o se ha incorporado al regadío. Dicha extensión geográfica de la enfermedad, unida a la distribución agregada de las plantas afectadas, sugiere que el inóculo del patógeno puede ser introducido en los nuevos cultivos en semillas infectadas. El objetivo de este trabajo es desarrollar un procedimiento de diagnóstico, basado en la PCR, para la detección de *P. arborescens* en semillas de adormidera. La naturaleza de *P. arborescens* de parasitismo biotrofo obligado dificulta la obtención de ADN fúngico de calidad PCR y libre de otro(s) ADN(s) contaminantes. El raspado de micelio de hojas de adormidera con esporulación de *P. arborescens* y extracción de su ADN mediante el sistema FastPrep® y el kit FastDNA (Q-biogene) proporcionó ADN de calidad PCR de forma rápida y reproducible. Con dicho ADN como molde se amplificaron y secuenciaron las regiones ITS1, 5,8S e ITS2 del ADN ribosómico utilizando los iniciadores universales ITS1, ITS2, ITS3, ITS4 e ITS5, y el iniciador DC6 (descrito como específico para los órdenes Peronosporales y Pythiales). Con los iniciadores ITS5/ITS4 se obtuvieron amplicones de adormidera y *P. arborescens* que diferían alrededor de 100 pb, mientras que con los DC6/ITS4 se obtuvo sólo un amplicón de *P. arborescens* de cerca de 1300 pb. Las secuencias obtenidas mostraron una similaridad >98% con dos secuencias de *P. arborescens* depositadas en los bancos de genes. Las condiciones de ensayo PCR con los iniciadores DC6/ITS4 se han optimizado y ello ha permitido detectar la presencia del *P. arborescens* en semillas de adormidera infestadas artificialmente con 0.32 a 130 esporangios/semilla. La utilidad de este procedimiento diagnóstico se ha contrastado mediante análisis de lotes de semilla utilizados para las siembras en diferentes localidades en campañas anteriores.

AISLADOS DEL *American plum line pattern virus* (APLPV) DE DIFERENTE ORIGEN GEOGRÁFICO MUESTRAN UNA BAJA DIVERSIDAD GENÉTICA

HERRANZ, M.C.¹; AL RWAHNIH, M.²; SANCHEZ-NAVARRO, J.A.¹; MYRTA, A.³; MINAFRA, A.²; PALLÁS, V.¹

¹*Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas, Universidad Politécnica de Valencia-CSIC, Avenida de los Naranjos s/n 46022 Valencia, Spain*

²*Dipartimento di Protezione delle Piante e Microbiologia Applicata, Università degli Studi and Istituto di Virologia Vegetale del CNR, Sezione di Bari, Via Amendola 165/A, I-70126 Bari, Italy*

³*Instituto Agronomico Mediterraneo Via Ceglie 9, I-70010 Valenzano, Bari, Italy*

El APLPV fue descrito por primera vez hace 60 años, en ciruelo japonés (*Prunus salicina*) cv. Shiro, en los Estados Unidos. Está ampliamente distribuido por Norteamérica (Estados Unidos, México y Canadá) pero hasta la fecha no se había demostrado su presencia en Europa y la cuenca Mediterránea. Sin embargo, el APLPV fue recientemente detectado en ciruelo japonés procedente de Palestina (Alayasa, 2001) siendo la primera vez que dicho patógeno ha sido descrito en la cuenca Mediterránea.

El APLPV es un ilarvirus y al igual que el resto de miembros de este género tiene un genoma tripartito; el RNA 1 y RNA 2 codifican las proteínas implicadas en la replicación viral y el RNA 3 es bicistrónico y codifica la proteína de movimiento (MP) y la proteína de cubierta (CP).

Los síntomas ocasionados por este virus son muy variados y dependen del cultivar. En primavera pueden observarse en ciruelo líneas difusas, bandas o anillos. Sin embargo, estos síntomas no se aprecian en verano. En algunos ciruelos japoneses el virus ocasiona un reticulado o clorosis en las venas menores produciendo la llamada 'red dorada'.

En el presente trabajo se ha llevado a cabo la caracterización de ocho nuevos aislados del APLPV de distinta procedencia; dos originarios de Estados Unidos, dos de Italia y uno de Albania, Túnez, Palestina y Líbano, siendo la primera vez que el virus ha sido descrito en los cinco últimos países. Para el estudio de sus relaciones filogenéticas se seleccionaron los genes de la MP y de la CP localizados en el RNA 3 viral.

Los resultados muestran una estrecha relación filogenética del APLPV y los principales ilarvirus que afectan a los frutales de hueso; *el virus del enanismo del ciruelo* (PDV), *el virus del mosaico del manzano* (ApMV) y *el virus de los anillos necróticos de los Prunus* (PNRSV). Además, el análisis comparado de las distintas secuencias puso de manifiesto una muy baja diversidad genética entre aislados del continente americano con los europeos o de la cuenca Mediterránea lo que sugiere un único origen común para todos ellos.

EFFECTO DE LA COMPACTACIÓN DEL SUELO Y LA DOSIS DE RIEGO SOBRE LA INDUCCIÓN DEL FALSO MAL DE PANAMÁ DE LA PLATANERA EN CONDICIONES DE CAMPO

SABADELL-GONZÁLEZ, S.; HERNÁNDEZ-HERNÁNDEZ, J.M.

Instituto Canario de Investigaciones Agrarias (ICIA)

Apto. 60, 38200 La Laguna. S/C Tenerife. Islas Canarias. España

El “Falso Mal de Panamá” (FMP), fue descrito por primera vez en Sudáfrica por Deacon *et al.* (1985) como “*Fals Panama Disease*” por su similitud con el “Mal de Panamá” (MP) y causado por *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (FOC). Estos autores observaron suelos tendentes a la compactación y con mal drenaje y aislaron especies de *Fusarium* asociadas a las plantas con FMP, pero las pruebas de patogenicidad fueron negativas. En Canarias, resultados similares fueron observados en nuestros ensayos preliminares.

Para el estudio del efecto de la compactación y de la dosis de riego sobre la inducción de síntomas de FMP, se realizó un ensayo en una parcela experimental de tamaño 1566 m² en Tenerife. El ensayo se dispuso en tres bloques al azar, dos de los cuales fueron lavados, y se les añadió estiércol a razón de 5 Kg/m². Un bloque no lavado y otro que sí lo fue, fueron compactados artificialmente alcanzando una densidad aparente media de 1,33 g/ml, mientras que en el bloque no compactado era de 1,21 g/ml. El riego se aplicó en tres dosis diferentes por bloque: 100%, 175 % y 250 % de la recomendada y dentro de cada dosis de riego y bloque se utilizaron dos tipos de material de plantación (“*in vitro*” y “aceleradas”) del cv. ‘Gran Enana’.

Al finalizar el ensayo, se han observado síntomas típicos del FMP en tres plantas del bloque 1 (compactado, no lavado, no enmendado), dos en el bloque 2 (compactado, lavado y enmendado) y una planta borde en el bloque 1 (no compactado, lavado y enmendado). También se observó lo que podría ser inicio de síntomas en zonas puntuales de la médula en plantas del bloque 1 y del 2. Se realizaron siembras de material vegetal con síntomas de las que se aislaron *F. oxysporum*, *F. subglutinans* y *F. proliferatum*. Se confirmó que los aislados FO no pertenecen al VCG 0120, y por tanto no son F.O f. sp. *cubense*. El factor bloque presentó diferencias significativas para altura y diámetro del pseudotallo, observándose los valores más altos en el bloque 3. El factor riego no presentó diferencias significativas para ninguna de las variables. Respecto a las variables de producción, se obtuvieron diferencias significativas entre bloques para las variables fecha-parición y peso-raquis, mientras que para el factor riego sólo se observaron en la variable peso-raquis. Los resultados sugieren que en la etiología del FMP pueden estar interviniendo factores del suelo como la compactación, el encharcamiento y la hipoxia, aunque no se descarta la implicación de algún agente biótico en combinación con otros factores abióticos.

APLICACIÓN DE METODOLOGÍAS DE DETECCIÓN VIRAL SOBRE UN MODELO TEÓRICO DE PRODUCCIÓN DE PLANTAS MADRES DE AJO “LIBRES DE VIRUS”

LUNELLO, P.¹; MANSILLA, C.¹; CONCI, V.²; PONZ, F.¹

¹Departamento de Biotecnología INIA Autopista A6 km 7. CP:28040 Madrid.

² IFFIVE-INTA Cam 60 cuerdas km 71/2 CP:5019. Córdoba Argentina

El cultivo de ajo se encuentra infectado por diferentes especies de virus, que forman un complejo viral causante de una enfermedad conocida como mosaico del ajo. Los miembros de este complejo pertenecen a los siguientes géneros: *Potyvirus*, *Carlavirus* y *Allexivirus*.

La infección por estos virus produce mas de un 60 % de pérdidas en el rendimiento. Debido a que las variedades de ajo cultivado comercialmente carecen de semilla botánica, estos patógenos sistémicos se propagan de generación en generación, provocando que no existan naturalmente plantas de ajo libres de virus. La única forma de salvar esta situación es mediante la extracción de meristemos y su cultivo *in vitro* para la obtención de plantas madres libres de virus. El análisis de estas plantas es de crucial importancia, debido a que presentan bajo título viral. En este trabajo se han desarrollado metodologías de diagnóstico aplicables de acuerdo a sus características, en diferentes etapas de un modelo de producción de material libre de virus de alta rentabilidad. En plantas provenientes de cultivo de meristemos y termoterapia, el incremento en la sensibilidad permitió la detección de patógenos hasta en un 25 % de plantas consideradas “sanas” por otras técnicas.

La aplicación adecuada en determinadas etapas de estas técnicas garantiza el éxito en programas de mejora de la producción en este cultivo.

MICROESPECTROSCOPIA DE INFRARROJO PARA ESTUDIAR LA RESPUESTA DE *Ulmus minor* ANTE INFECCIONES DE *Ophiostoma novo-ulmi*

MARTIN, J.A.¹; SOLLA, A.²; GIL, L.¹

¹Unidad de Anatomía, Fisiología y Mejora Genética. ETSI de Montes. Universidad Politécnica de Madrid. Paseo de las Moreras s/n. 28040. Madrid. E-mail: lgil@montes.upm.es

²Departamento de Biología y Producción de los Vegetales. Centro Universitario de Plasencia. Ingeniería Técnica Forestal. Universidad de Extremadura. Avenida Virgen del Puerto 2, 10600-Plasencia. E-mail: asolla@unex.es

La supervivencia de *Ulmus minor* ante *O. novo-ulmi*, hongo causante de la grafiosis, está determinada por factores de tipo anatómico y químico que actúan para evitar una rápida expansión del patógeno por el sistema vascular. Si el árbol responde rápidamente a la infección compartimentando el hongo, el cambium es capaz de formar un nuevo xilema funcional a salvo de los tejidos infectados. La espectroscopía de infrarrojo es una técnica analítica que permite conocer el estado metabólico de una muestra en un momento determinado.

En la primavera de 2003 se inocularon con *O. novo-ulmi* 70 brinzales procedentes de 40 *U. minor* de diferentes localidades de España. Como controles se dejaron 10 plantas sin inocular. Los marchitamientos foliares se evaluaron el día 60 tras la inoculación, agrupando los árboles en resistentes (0-33%) y susceptibles (67-100%). A los días 0 y 40 se recogieron muestras de ramillos de dos savias, las cuales fueron inmediatamente congeladas para su posterior análisis. Se practicaron cortes transversales sobre los ramillos, sobre los que realizó un estudio histoquímico y un análisis mediante un microscopio acoplado a un espectrómetro de infrarrojo de transformada de Fourier.

En las muestras del día 0 no se encontraron diferencias entre individuos susceptibles y resistentes. En las muestras del día 40 se observó la formación de una barrera de suberina tanto en individuos susceptibles como en resistentes, no así en los controles. En los resistentes se observó la formación de un nuevo xilema tras la barrera de suberina. Un análisis discriminante sobre la totalidad del espectro mostró diferencias significativas ($P < 0,05$) entre individuos susceptibles y resistentes. Los árboles resistentes mostraron mayores concentraciones de ciertos compuestos constituyentes de la pared celular lo que se tradujo en menores síntomas foliares.

GENES IMPLICADOS EN LA BIOSÍNTESIS DE MANGOTOXINA Y PAPEL EN LA VIRULENCIA DE *Pseudomonas syringae* PV. *syringae*

CAZORLA, F.M.; ARREBOLA, E.; VÁZQUEZ, M.A.; CODINA, J.C.; PÉREZ-GARCÍA, A.; DE VICENTE, A.

Departamento de Microbiología, Facultad de Ciencias, Universidad de Málaga. Campus Universitario de Teatinos s/n 29071. Málaga. E-mail: cazorla@uma.es

Pseudomonas syringae pv. *syringae* causa síntomas en una gran diversidad de plantas. La producción de fitotoxinas es un factor de virulencia en algunos patovares de *P. syringae*, ya que su síntesis incrementa la gravedad de la enfermedad, siendo éstas en parte responsables de la inducción de síntomas necróticos o cloróticos. La mayoría de las cepas de *P. syringae* pv. *syringae* (Pss) aisladas de mango producen mangotoxina, toxina antimetabolito cuya diana es la ornitina acetiltransferasa (OAT), enzima que participa en la ruta de biosíntesis de arginina y ornitina. En este trabajo se han identificado y caracterizado algunos genes implicados en la producción de mangotoxina en la cepa de Pss UMAF0158 patógena de mango. Para ello se obtuvieron mutantes defectivos en la producción de esta toxina por inserción del minitransposón miniTn5Km2. Los genes interrumpidos se localizaron en nueve mutantes Tox⁻, secuenciando las regiones flanqueantes que mostraron homología con genes de regulación bacteriana como *gacA* y *lemA* y con una péptidosintasa no ribosomal, entre otros. A partir de una genoteca de la cepa de Pss UMAF0158, se seleccionaron clones genómicos correspondientes a las regiones interrumpidas en los mutantes defectivos. Mediante ensayos de complementación de estos mutantes con los clones genómicos se restableció la producción de mangotoxina, confirmando la importancia de los genes interrumpidos en la biosíntesis de mangotoxina. El clon genómico pCG2-6 que contenía un fragmento de 10,5 kb, que restauró la producción de mangotoxina en el mutante UMAF0158-6γF6, ha sido secuenciado confirmando que uno de sus ORFs codifica una péptidosintasa no ribosomal.

Además se ha establecido el papel de la producción de mangotoxina en la virulencia de las cepas de *P. syringae* pv. *syringae*, al infectar folíolos de tomate. Así los mutantes defectivos mostraron una disminución en el nivel de los síntomas necróticos inducidos; siendo restaurada la virulencia a niveles similares a los de la cepa silvestre, al complementar dichos mutantes con los clones genómicos. Paralelamente se realizaron ensayos para determinar el posible papel de esta toxina durante la etapa epifita de la bacteria. Para ello se han realizado ensayos de colonización con la cepa silvestre y mutantes defectivos en la producción de mangotoxina.

ESTUDIO DE LOS DETERMINANTES DE PATOGENICIDAD DEL VIRUS DE LA TRISTEZA DE LOS CÍTRICOS

ALBIACH-MARTI, M.R.¹; ROBERTSON, C.²; GOWDA, S.²; SATYANARAYANA, T.²; GUERRI, J.¹; MORENO, P.¹; GARNSEY, S.M.²; DAWSON, W.O.²

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

²Citrus Research and Education Center, University of Florida. Email: remei@ivía.es

El virus de la tristeza de los cítricos (CTV), género *Closterovirus*, familia *Closteroviridae*, causa una de las enfermedades más importantes de los cítricos. El RNA genómico de CTV está organizado en 12 marcos de lectura y regiones no codificantes en ambos extremos (regiones 5'-UTR y 3'-UTR). Se conoce la secuencia completa del gRNA de varios aislados de CTV, entre ellos los aislados T30 y T36 de Florida. El primero es esencialmente asintomático, mientras que el segundo induce síntomas severos en huéspedes sensibles como lima Mexicana o *C. macrophylla*, decaimiento de plantas propagadas sobre naranjo amargo y amarilleo en plantas de semilla de pomelo o naranjo amargo (seedling yellows, SY). Para diseñar métodos adecuados de control es necesario conocer los determinantes de patogenicidad del virus, para lo cual se ha desarrollado un sistema genético que incluye las siguientes etapas: 1) se dispone de un clon de cDNA del gRNA completo de T36, cuyos transcritos de RNA son infecciosos en protoplastos de *N. benthamiana* y produce viriones normales de CTV, 2) mediante pases sucesivos a nuevos protoplastos se incrementa la concentración de viriones, 3) cuando hay suficiente concentración éstos se inoculan en cítricos mediante múltiples cortes en la corteza, 4) se construyen clones quimera T36/T30, intercambiando secuencias del clon de T36 por sus homólogas del genotipo T30, y 5) se ensayan los clones quimera repitiendo las etapas 1-3. Se dispone de 13 quimeras T36/T30 en las que se han intercambiado los distintos genes de la mitad 3' del genoma, y cuatro de ellas con las regiones p23-3'UTR, p18, p13 y p65-p61 de T36 intercambiadas por las homólogas de T30, se han ensayado en *C. macrophylla* y plantas de semilla de naranjo amargo. Las quimeras p13 y p18 inducen síntomas análogos a los de T36, p65-p61 induce síntomas más intensos y p23-3'UTR no induce SY. Se están diseñando nuevas quimeras del gen p23 y la región 3'UTR para intentar localizar los posibles motivos implicados en la producción de SY. Posteriormente se abordará el estudio de la mayor agresividad observada en la quimera p65-p61.

DIVERSIDAD PATOGENICA DENTRO DE POBLACIONES DE JOPO DE GIRASOL (*O. cumana*)

MOLINERO-RUIZ, M.L. ; MELERO, J.M.

Instituto de Agricultura Sostenible, C.S.I.C, Alameda del Obispo s/n, Apdo. 4084, 14080 Córdoba. E-mail: ag2morum@uco.es

El girasol es el cultivo oleaginoso anual más importante en España. Se ve afectado por el jopo (*Orobanche cumana*), una angiosperma holoparásita que constituye uno de los principales factores limitantes. El método más eficaz de control es la resistencia genética, pero el patógeno evoluciona hacia razas más virulentas. En la actualidad la raza F de jopo es la más extendida en España, si bien siguen existiendo poblaciones de la raza E, controlada eficazmente por el gen *Or5*. La reiterada observación de distintas reacciones en material resistente a la raza F al ser evaluado frente a ella, sugiere la diversidad de genotipos del parásito dentro de las poblaciones de campo. Se evaluó la patogenicidad de una población de la raza E (exp. I) y otra de la raza F (exp. II), cada una de ellas recogida sobre diferentes genotipos de girasol: cuatro subpoblaciones en el exp. I y seis en el exp. II. Todas las subpoblaciones se inocularon en el genotipo sobre el que se habían recogido, así como en cuatro (exp. I) y tres genotipos (exp. II), con resistencia de diferente origen a las razas E y F. Se inocularon artificialmente doce plantas (repeticiones) de cada genotipo con cada subpoblación y se mantuvieron en umbráculo entre febrero y junio de 2004. El grado de ataque por jopo, expresado como número de jopos por planta (NJP), se evaluó semanalmente hasta la senescencia de las plantas, y se anotó para cada experimento la incidencia de enfermedad (IE). Se comparó mediante ANOVA la IE y el área bajo la curva de progreso de la enfermedad (ABCPE) calculada a partir de NJP para los factores subpoblación y genotipo. Las subpoblaciones de la raza E presentaron IE y ABCPE significativamente distintas, siendo una de ellas la más virulenta para las dos variables en tres de los cinco genotipos. Una de las líneas de girasol (resistente a la raza F) resultó resistente a todas las subpoblaciones de la raza E. Por el contrario, otra línea, también resistente a raza F, fue susceptible a todas las subpoblaciones de raza E. Ésta presenta utilidad como línea diferenciadora de la raza E, y constituye la primera referencia de resistencia a raza F y susceptibilidad a E de *O. cumana*. Las subpoblaciones de la raza F también presentaron diferencias significativas tanto en IE como en ABCPE, siendo ambas mayores en el caso de subpoblaciones recogidas sobre material resistente a la raza E que en el de las recogidas sobre material resistente a la raza F. Las inoculaciones de los genotipos origen con sus correspondientes subpoblaciones F mostraron una mejor diferenciación en el ABCPE que el resto de genotipos, sugiriendo una especialización patogénica de las poblaciones del parásito en función del genotipo del huésped.

INTERACCIONES SINÉRGICAS ENTRE *Tomato chlorosis virus* Y *Tomato spotted wilt virus* EN PLANTAS DE TOMATE

GARCÍA-CANO, E.; ROSENDE, R.O.; MORIONES, E.

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

El cultivo de tomate (*Lycopersicon esculentum*) se ve afectado por virus que causan importantes pérdidas económicas, entre ellos los geminivirus, tospovirus y crinivirus. En cultivos comerciales es frecuente encontrar condiciones que favorecen las infecciones mixtas en las que la posible interacción entre virus puede manifestarse como sinergismos o antagonismos con implicaciones biológicas importantes para el control de estos patógenos. Con el objetivo de estudiar la posible interacción entre el crinivirus (género *Crinivirus*, familia *Closteroviridae*) *Tomato chlorosis virus* (ToCV), frecuentemente presente en campos de cultivo, y el tospovirus (género *Tospovirus*, familia *Bunyaviridae*) *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) se realizaron inoculaciones de ambos virus en dos variedades de tomate, la variedad Moneymaker (susceptible a los dos virus) y la variedad Anastasia (susceptible a ToCV y resistente a TSWV por portar el gen Sw-5). Dichas variedades fueron inoculadas de forma simultánea o con desfase de diez días entre la inoculación de cada virus, utilizando *Bemisia tabaci* para la transmisión de ToCV e inoculación mecánica para TSWV. Las infecciones por virus fueron confirmadas en base al desarrollo de síntomas así como por la detección de virus usando la técnica ELISA para la detección de TSWV y el análisis por hibridación molecular para la detección de ToCV. Los resultados obtenidos mostraron que en la variedad Moneymaker a los 20 días después de la inoculación simultánea se desarrolló un pronunciado sinergismo entre ToCV y TSWV llegando a causar la muerte en plantas infectadas por ambos virus. Este sinergismo no se observó de forma clara en plantas inoculadas con desfase. En la variedad Anastasia, a partir de los 30 días después de la inoculación con ToCV se observó que en el tratamiento en el cual TSWV fue inoculado con desfase de 10 días un 40% de las plantas analizadas se infectaron de forma sistémica por TSWV. Esta infección sistémica en plantas coinfectadas indica una posible ruptura de la resistencia a TSWV conferida por el gen Sw-5. Son necesarios estudios más detallados para elucidar los posibles mecanismos implicados en este tipo de interacción.

IMPLICACIÓN DEL METABOLISMO DE FENILPROPANOIDES EN LA INDUCCIÓN DE RESISTENCIA EN LOS FRUTOS CÍTRICOS FRENTE A LA INFECCIÓN POR *Penicillium digitatum*

BALLESTER, A.R.; LAFUENTE, M.T.; GONZÁLEZ-CANDELAS, L.

Laboratorio de Postcosecha. Dpto. de Ciencia de los Alimentos. Instituto de Agroquímica y Tecnología de los Alimentos (IATA-CSIC). Ap. Correos 73. Burjassot. 46100-Valencia. E-mail: lgonzalez@iata.csic.es

Las mayores pérdidas de los frutos cítricos durante la postcosecha son debidas al hongo *Penicillium digitatum*, agente responsable de la podredumbre verde. Para controlar la aparición de estas podredumbres se recurre normalmente al empleo de fungicidas químicos. Sin embargo, su uso está cada vez más limitado y por ello se están buscando métodos alternativos. Una de las aproximaciones consiste en aprovechar la capacidad natural de defensa del fruto mediante la inducción de respuestas de defensa. Nuestro grupo está interesado en conocer los mecanismos subyacentes a esta inducción de resistencia. En particular, estamos estudiando los procesos asociados a la resistencia inducida por una inoculación previa del patógeno seguida 24 horas después de un tratamiento de calor de tres días a 37°C que evita el desarrollo del patógeno. Con este tratamiento se consigue una reducción significativa en la susceptibilidad a una infección posterior.

En el presente trabajo presentaremos los primeros resultados obtenidos en la caracterización del metabolismo de fenilpropanoides en la corteza de frutos de naranja, tanto en el flavedo como en el albedo, en relación a la inducción de resistencia. En primer lugar, hemos estudiado mediante hibridación Northern el nivel de expresión de diversos genes implicados en el metabolismo de fenilpropanoides. También hemos comparado mediante HPLC la composición de distintas fracciones de compuestos fenólicos en frutos en los que se ha inducido distintos niveles de resistencia a la infección. En concreto, se han estudiado los cambios en fenoles solubles, glicosilados, esterificados y unidos a pared. Finalmente, hemos abordado el estudio de la actividad antifúngica de diferentes compuestos fenólicos, determinando el efecto que tienen algunos de estos compuestos fenólicos sobre el crecimiento *in vitro* de *P. digitatum*.

PROTECCIÓN FRENTE A *Plum pox virus* EN PLANTAS TRANSGÉNICAS DE *Nicotiana benthamiana* QUE EXPRESAN UN ANTICUERPO RECOMBINANTE CONTRA LA Nib RNA REPLICASA VIRAL

GIL, M.¹; ESTEBAN, O.¹; GORRIS, M.T.¹; GARCÍA, J.A.²; PEÑA, L.¹; CAMBRA, M.¹

¹Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA). Ctra. Moncada-Náquera km 5, 46113 Moncada (Valencia). maitegil@ivia.es

²Centro Nacional de Biotecnología (CNB). Campus de la Universidad Autónoma, CSIC, 28049 Cantoblanco (Madrid).

Se ha demostrado que la expresión constitutiva de genes o fragmentos de genes de anticuerpo (anticuerpos recombinantes o rAbs) específicos de proteínas virales puede interferir con la infección viral. Ésta puede ser una estrategia alternativa a la transformación de plantas con secuencias virales para producir plantas resistentes a virus. Se ha obtenido un anticuerpo recombinante en formato de cadena simple de fragmentos variables o scFv (scFv2A) a partir del hibridoma productor del anticuerpo monoclonal 2A que reconoce específicamente la proteína Nib RNA replicasa del virus de la sharka o *Plum pox virus* (PPV). Mediante la fusión de diferentes péptidos señal a su secuencia se generaron tres versiones del scFv2A dirigidos a diferentes compartimentos celulares: una dirigida a citosol (scFv2A), una versión nuclear (NLS-scFv2A) y una dirigida a retículo endoplásmico (6K2-scFv2A). Se transformaron plantas de *N. benthamiana* con cada una de estas versiones. El carácter transgénico de los distintos regenerantes fue analizado por PCR, la expresión del transgen por RT-PCR y la acumulación de la proteína por inmunoprecipitación-ELISA. Se seleccionaron líneas transgénicas independientes de cada una de las versiones: citosólica (2A), nuclear (NLS) y de RE (6K2) para evaluar su posible protección frente a una infección con el virus de la sharka. Para ello llevaron a cabo experimentos de desafío en los que se inocularon mecánicamente varias líneas transgénicas, así como plantas control, regeneradas pero no transformadas, con el aislado RB 3.3 / Nb de PPV a dos dosis de inóculo (5×10^7 y 2×10^7 copias RNA viral / ml), estimadas por PCR cuantitativa en tiempo real. La infección viral de las plantas desafiadas se determinó mediante evaluación visual de los síntomas a distintos periodos post-inoculación y ELISA-DASI. Se observó una reducción significativa en el número de plantas infectadas en diversas líneas transgénicas que expresaban, tanto la versión citosólica, como la nuclear y la versión dirigida al RE, con respecto a las plantas control. A menor dosis de inóculo, la disminución del número de plantas infectadas en las líneas transgénicas con respecto al control fue mayor, así como, el número de líneas que presentaron un número significativamente menor de plantas infectadas. Ésta es la primera vez que se demuestra la eficacia de una scFv anti-replicasa viral para proteger plantas contra la infección de un virus.

EFFECTO DE LA INFECCIÓN POR TOBAMOVIRUS EN EL CLOROPLASTO Y SEGUIMIENTO MEDIANTE FLUORESCENCIA DE IMAGEN PARA UN DIAGNÓSTICO PRESINTOMÁTICO

PINEDA-DORADO, M.¹; PÉREZ-BUENO, M.L.²; SAJNANI, C.¹; BENEDIKTY, Z.³; NEDBAL, L.³; GARCÍA-LUQUE, I.²; BARÓN, M.¹

¹Estación Experimental del Zaidín (Csic). Profesor Albareda, nº 1. 18008 Granada (España). E-Mail: Monica.Pineda@Eez.Csic.Es.

²Centro de Investigaciones Biológicas (Csic). Ramiro De Maeztu, nº 9. 28040 Madrid (España).

³Institute of Landscape Ecology, Academy of Sciences of The Czech Republic. Zamek 136. 37333 Nové Hradky. Czech Republic.

Análisis previos del efecto de la infección viral sobre la fotosíntesis -utilizando como sistema modelo huésped-patógeno *Nicotiana benthamiana*-virus del moteado suave del pimiento- han mostrado que el fotosistema II (PSII) –el complejo fotosintético implicado en el desprendimiento de oxígeno- constituye uno de los principales puntos de acción de la infección en el cloroplasto (Rahoutei et al., 2000. *Physiol. Plantarum* 110:286; Pérez-Bueno et al., 2004. *Proteomics* 4:418). Con objeto de definir los cambios espaciales y temporales que sufre el proceso fotosintético en la planta durante la infección viral, hemos llevado a cabo la detección de la emisión de fluorescencia de la clorofila (ChFI), aplicando técnicas de imagen (FI). ChFI roja emitida por el PSII está correlacionada negativamente con la eficiencia fotosintética, y positivamente con la generación de mecanismos de disipación de la energía no utilizada en fotosíntesis. El análisis de las imágenes obtenidas de las hojas sintomáticas y asintomáticas de plantas infectadas y control, muestra un complejo y reproducible patrón de cambios locales, que resulta de las alteraciones que sufren distintos parámetros fotosintéticos relacionados con la emisión de fluorescencia, como son el rendimiento cuántico del PSII y el quenching no fotoquímico (NPQ). NPQ mide la energía disipada fundamentalmente en forma de calor, para evitar la fotooxidación del PSII en plantas infectadas. Las diferencias encontradas en el patrón foliar de NPQ en las hojas asintomáticas de plantas infectadas con respecto a sus controles sanos podría correlacionarse con la expansión del patógeno dentro de la hoja, lo que hace que este parámetro pueda ser de gran utilidad para el diagnóstico presintomático de las infecciones.

EL FUEGO BACTERIANO EN ARAGÓN (2000-2004): EFICACIA DE LAS MEDIDAS DE CONTROL Y ERRADICACIÓN

CAMBRA, M.A.¹; PALACIO-BIELSA, A.²; GONZÁLEZ, M.L.¹; FORTANETE, J.¹

¹Centro de Protección Vegetal. Apdo. 727, 50080 Zaragoza. E-mail: mcambra@aragon.es.

²Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria de Aragón. Apdo. 727, 50080 Zaragoza. E-mail: apalaciob@aragon.es

El fuego bacteriano (*Erwinia amylovora*) es una de las enfermedades más graves que afectan a las plantas de la familia de las rosáceas, entre las que se encuentran especies de interés económico en Aragón, como el peral y el manzano. Se encuentra distribuida por la mayoría de los países europeos, ya que en ellos las medidas de erradicación no han resultado efectivas hasta la fecha.

En el año 2000, se detectaron las primeras fincas de peral y manzano infectadas por fuego bacteriano en Aragón. Inicialmente se estableció un área de seguridad de 5 km entorno a los puntos de infección, se realizaron inspecciones sistemáticas para evaluar la incidencia de la enfermedad y se adoptaron medidas de erradicación, según la legislación vigente. En el primer año, se erradicaron parcelas enteras (un total de 19'7 ha) incluso por la presencia de unos pocos árboles infectados. En los años siguientes, se ha venido adoptando una estrategia de arranques selectivos de árboles infectados. Aquellas parcelas en las que se localizan árboles enfermos se visitan semanalmente entre los meses de mayo a septiembre, lo que permite la detección precoz de síntomas iniciales, y su erradicación dependerá de la evolución de la enfermedad en las mismas. En algunos casos, no se ha detectado nuevas infecciones transcurridos más de dos años desde estos arranques selectivos. Durante el periodo 2001-2003 se ha erradicado una superficie total de 10'2 ha.

En este trabajo se presentan detalles de la distribución espacial y temporal de la enfermedad en Aragón, las medidas de erradicación adoptadas y los análisis realizados. El coste total de los equipos de inspección asciende a 536.422 euros y los costes de erradicación (arranques e indemnización a los propietarios) han sido de 467.160 euros.

Después de cuatro años, podemos concluir que la combinación de las medidas de inspección sistemática y rápida erradicación adoptadas han permitido prevenir la dispersión generalizada del fuego bacteriano en la Aragón. Por otro lado, los resultados de las Comunidades de Aragón, Cataluña, La Rioja y Navarra sugieren que si se adoptan las medidas adecuadas pueden reducirse las pérdidas económicas debidas al fuego bacteriano, al menos durante varios años.

CARACTERIZACIÓN EPIDEMIOLÓGICA DEL EMPLOMADO DEL OLIVO

ÁVILA, A.; TRAPERO, A.

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

El emplomado del olivo causado por el hongo mitosporico *Pseudocercospora cladosporioides* es una enfermedad ampliamente distribuida por toda la Cuenca Mediterránea, aunque la intensidad de sus ataques varía en función del lugar y de la climatología. La falta de estudios epidemiológicos sobre esta enfermedad ha motivado la realización de la caracterización de sus epidemias con objeto de estimar su importancia y cuantificar la relación entre la severidad de la enfermedad y la densidad y viabilidad de inóculo, y las variables ambientales. Los ensayos de campo se han llevado a cabo en 5 variedades del Banco de Germoplasma del C.I.F.A. de Córdoba durante el periodo de 2001-2004. Mediante evaluaciones periódicas, se cuantificó la curva de progreso temporal de la enfermedad, la densidad y la viabilidad de las conidias en hojas con lesiones en el árbol y en hojas caídas y las posibles estructuras de supervivencia.

La severidad de la enfermedad varió a lo largo del tiempo para cada cultivar, estando estrechamente relacionada con las condiciones climáticas del año. El periodo de infección fue desde finales de otoño hasta primavera, produciéndose las infecciones más importantes en otoño-invierno, cuando la densidad de inóculo fue más alta ($17,6-14,5 \times 10^4$ conidias/cm²). La viabilidad de las conidias estuvo también asociada a la densidad de inóculo y a las condiciones ambientales. Durante la primavera el grado de infección fue disminuyendo paulatinamente, debido a la caída de las hojas infectadas y a la no aparición de nuevas hojas infectadas. En las hojas caídas no se observó la producción de nuevas conidias y las que estaban presentes se mantuvieron viables hasta 60 días, aunque su germinación se redujo drásticamente a partir de los 15 días. Por otro lado, no se observó la presencia de ascomas del estado sexual del hongo, sin embargo se constató la presencia de estructuras que podían corresponder a espermogonios. En algunas muestras se observaron agrupamientos de micelio secundario semejantes a esclerocios. Tanto en el micelio como en las conidias se verificó la presencia de clamidiosporas. Dado su carácter biotrofo y a la ausencia de estado sexual, la producción de inóculo y supervivencia de este patógeno esta condicionada fundamentalmente a las hojas infectadas que permanecen en el árbol.

EL ENROLLADO DE LA VID EN LA D.O. RÍAS BAIXAS 1990-2004

CABALEIRO-SOBRINO, C.¹; CID, M.²; PEREIRA-CRESPO, S.¹; SEGURA, A.²

¹*Departamento de Producción Vexetal. EPS. Universidade de Santiago de Compostela. Campus Universitario s/n 27002 LUGO*

²*Departamento de Fisiología Vexetal Campus Universitario Sur, Santiago. E-mail: pvcabsob@lugo.usc.es*

En la D.O. Rías Baixas se sabe desde principios de los 90 que el enrollado de la vid (*Grapevine leafroll associated viruses*) está ampliamente extendido en los viñedos de la variedad Albariño establecidos a partir de 1980. En algunos viñedos se había detectado transmisión en campo y vectores de al menos un virus del enrollado de la vid (GLRaV-3) por lo que se decidió realizar continuar el seguimiento de varias parcelas para estudiar la epidemiología del virus en las condiciones de las Rías Baixas. En presencia de cochinillas algodonosas vectoras de GLRaV-3 - aún con poblaciones muy bajas de éstas - y con material infectado en la proximidad de plantas sanas, se ha visto que en una parcela plantada en 1980 y en dos establecidas de nuevo con cepas libres de GLRaV-3, el virus se extiende a un ritmo de entre el 5 y el 13 % anual. Una parcela con un nivel de infección del 33% en 1991 había llegado a prácticamente al 100% hacia el 2000. Por todo ello, se consideró interesante realizar una nueva prospección en la D.O. Rías Baixas tanto de virus como de vectores para comparar los datos de incidencia de GLRaV-3 y otros virus en 2003 con los de 1991/92 y también evaluar los daños producidos por el virus. Se comprobó que hay una buena relación entre la ausencia de pseudococcidos vectores en la mayoría de las parcelas con el mantenimiento de los niveles de GLRaV-3 al cabo de mas de 10 años, que siguen en torno al 40%. Los análisis de mostos realizados en 2003 indican que el nivel de daños causado por el virus es similar o superior al que se vio en los años 90. En una de las parcelas que se vienen siguiendo desde 1991 la epidemia tiene características especiales: los síntomas de enrollado son ligeros, hay avance del virus pero a niveles muy bajos (0,8% anual), la Curva de Desarrollo de la Enfermedad es prácticamente una línea, no se han encontrado vectores conocidos de GLRaV-3 y a nivel espacial se siguen manteniendo los focos iniciales, apareciendo las nuevas cepas infectadas siempre al lado de una cepa positiva, pero sólo en una zona de la parcela. Los modelos epidemiológicos que mejor describen cada una de las epidemias, pueden servir para predecir la evolución del virus en una parcela.

EPIDEMIOLOGÍA DE *Monosporascus cannonballus* EN CULTIVOS DE MELÓN, SANDÍA INJERTADA Y SANDÍA NO INJERTADA

BELTRÁN, R.; GARCÍA-PAREJO, E.; PERIS, P.; VICENT, A.; GARCÍA-JIMÉNEZ, J.; ARMENGOL, J. Instituto Agroforestal Mediterráneo. Universidad Politécnica de Valencia. Camino de Vera s/n, 46022-Valencia.

Monosporascus cannonballus Pollack et Uecker es un ascomiceto del suelo que afecta a cultivos de cucurbitáceas. En España se ha detectado en cultivos de melón (*Cucumis melo* L.), aunque en los últimos años se ha observado también un aumento en la incidencia de este hongo en el cultivo de sandía (*Citrullus lanatus* (Thunb.) Matsum & Nakai), sobre todo en aquellas parcelas en las que el cultivo no ha sido injertado sobre híbridos de *Cucurbita*.

Este trabajo presenta un estudio epidemiológico de *M. cannonballus* en una parcela en la que se plantó melón, sandía injertada sobre Shintoza y sandía no injertada, disponiéndose estos cultivos en bloques al azar, con cuatro repeticiones. Se realizaron muestreos cada 15 días desde la fecha de trasplante. Los parámetros evaluados durante el cultivo fueron la evolución de la población de ascosporas de *M. cannonballus* en suelo, el % de aislamiento de *M. cannonballus* en raíces, la curva de progresión de la enfermedad, la observación de peritecios en las raíces y la producción.

Los resultados obtenidos para melón y sandía no injertada fueron muy similares en todos los parámetros evaluados. Se produjo un descenso en la población de ascosporas en suelo a los dos meses del trasplante, coincidiendo con el inicio de los primeros síntomas en la parte aérea y con el aumento del aislamiento de *M. cannonballus* en raíces. Posteriormente se observó un incremento de la población de ascosporas a los tres meses de la fecha de plantación, cuando empezaron a aparecer los peritecios en las raíces. El porcentaje de aislamiento de *M. cannonballus* fue algo superior en el caso de la sandía no injertada. Ambos cultivos se comportaron como susceptibles al ataque de este patógeno.

Por otra parte, la sandía injertada sobre Shintoza se comportó de manera diferente a los otros cultivos, existiendo únicamente una disminución constante del nivel de ascosporas en suelo, sin aumento al final del cultivo, y no encontrándose peritecios en las raíces. Los porcentajes de aislamiento de este hongo en raíces fueron menores al de los otros cultivos.

Estos resultados suponen un avance en el conocimiento de la epidemiología de *M. cannonballus* en el cultivo de diversas cucurbitáceas, y confirman el papel de los híbridos de *Cucurbita* como patrones tolerantes a este patógeno.

Trabajo realizado dentro del Proyecto AGL2000-1809-C03-01 financiado por el MCyT

ANÁLISIS DE LA ESTRUCTURA GENÉTICA Y LA EVOLUCIÓN DE UN VIRUS DE PLANTAS EN EXPANSIÓN EPIDÉMICA: EL VIRUS DEL MOSAICO DEL PEPINO DULCE (PepMV)

PAGÁN, I.¹; FRAILE, A.¹; MALPICA, J.M.²; GARCÍA-ARENAL, F.¹

¹Departamento de Biotecnología E.T.S.I.Agrónomos, Universidad Politécnica de Madrid, 28040, Madrid, Spain

²Departamento de Biotecnología, Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria, Carretera de La Coruña Km 7.5, 28040, Madrid, Spain

El virus del mosaico del pepino dulce (PepMV) es un virus de plantas de RNA de sentido positivo perteneciente al género *Potexvirus*, descrito por primera vez en plantas de pepino dulce (*Solanum muricatum*) de Perú. Hasta finales de la década de los 90, cuando se detectaron brotes epidémicos de PepMV en varios países europeos, *S. muricatum* era el único hospedador natural conocido. En España PepMV fue detectado por primera vez en el año 2000, expandiéndose rápidamente y causando grandes pérdidas en los cultivos de tomate del SE de la península. Se ha asociado una gran variedad de síntomas a las infecciones de PepMV en plantas de tomate, sugiriendo que la rápida expansión de la población ha dado lugar a una gran variabilidad genética. En este trabajo analizamos esta hipótesis. Hemos analizado la estructura genética de PepMV a lo largo de tres años (2001-2002, 2002-2003, 2003-2004) en cultivos de tomate de Almería y Murcia. Los aislados recogidos cada campaña fueron caracterizados por su patogeneicidad en tomate y por su secuencia de nucleótidos en dos regiones genómicas: el Bloque de Genes Triple (TGB, 1201 nt) y la proteína de la cápsida (CP, 657 nt). Los resultados muestran que a pesar de la alta diversidad biológica, la población de PepMV en España es genéticamente muy homogénea. Comparaciones con aislados de tomate de PepMV procedentes de otros países europeos indican un alto grado de similitud. Así nuestros datos indican una gran homogeneidad entre las poblaciones de PepMV que infectan tomate tanto en España como en toda Europa apoyando la hipótesis de una única introducción a partir de la cual el virus se ha expandido.

LA RELACIÓN ENTRE LA INFECCIÓN CON PEPMV (*Pepino mosaic virus*) Y LA PRESENCIA DE *Olpidium sp.* EN RAÍCES, COMO CAUSA DEL SÍNDROME DEL COLAPSO DEL TOMATE

CÓRDOBA, M.C.¹; MARTÍNEZ-PRIEGO, L.¹; SAVAL, P.¹; LACASA, A.²; JORDÁ, C.¹

¹ Grupo de Virología. Universidad Politécnica de Valencia, ETSI Agrónomos. Camino de Vera s/n 46022 Valencia.

² Centro de Investigación y Desarrollo Agroalimentario. Consejería de Agricultura, Agua y Medio Ambiente. C/ Mayor s/n, 30.150 La Alberca (Murcia).

En la campaña del otoño-invierno 98-99 en la zona de Mazarrón y Águilas en Murcia (España), se produce muerte masiva de plantas de tomate en un corto espacio de tiempo.

Esta marchitez súbita terminaba en algunos casos en el colapso generalizado de la planta. Entre noviembre y abril se colapsaron unos 3500000 de plantas viéndose afectadas 600 hectáreas de invernadero. En la siguiente campaña la superficie colapsada alcanzó las 1000 hectáreas afectando tanto a cultivos protegidos como a cultivo al aire libre.

Paralelamente a la aparición de esta nueva sintomatología tuvo lugar la introducción y extensión del virus del mosaico del pepino dulce (PepMV), (Jordá *et al.*, 2001). Análisis realizados sobre las plantas colapsadas confirmaron que la aparición de este síndrome iba ligada en la mayoría de los casos a una infección por PepMV, y a una presencia en raíces del hongo *Olpidium brassicae*.

A la vista de esta relación desarrollamos 4 ensayos de invernadero, en épocas del año diferentes, con 4 aislados del virus que mostraban distinta agresividad procedentes de plantas colapsadas y fuentes de *Olpidium brassicae*. de distinto origen geográfico y de cultivo (tomate con colapso y lechuga).

Plántulas procedentes de semilla termotrada fueron transplantadas sobre sustrato estéril que había sido regado con las distintas fuentes de *Olpidium brassicae*. Estas plántulas fueron inoculadas *a posteriori* con los distintos aislados del virus. Hasta el final del ensayo las plantas fueron regadas con las distintas fuentes de *Olpidium brassicae* exceptuando los controles.

El colapso se logró reproducir en tres de los cuatro ensayos, consiguiéndose tanto en condiciones de invierno como de verano. Aunque los aislados de PepMV utilizados en los 4 ensayos fueron los mismos, el aislado que reprodujo el colapso varió dependiendo de la época del año, siendo siempre el que se mostró más agresivo. No se presenta colapso cuando el virus se encuentra solo en la planta, ni tampoco cuando sólo existe presencia de *O. brassicae*. Las plantas testigo por su parte, vegetaron correctamente.

Por todo ello, atribuimos el síndrome del colapso a la presencia de aislados de PepMV agresivos en combinación con la colonización de *O. brassicae* de las raíces. Son determinantes además las condiciones ambientales, presentándose colapso siempre, tras una bajada brusca de temperatura y una posterior recuperación de la misma.

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE AISLADOS ESPAÑOLES DE *Gremmeniella abietina*

SANTAMARÍA, O.; ALVES-SANTOS, F.M.; DÍEZ-CASERO, J.J.

Entomología y Patología Forestales. Dpto. de Producción Vegetal y Silvopascicultura. U. de Valladolid. E. T. S. de Ingenierías Agrarias. Av./ Madrid 44. 34004. Palencia. E-mail: osantama@pvs.uva.es

Gremmeniella abietina var *abietina* (Gaa) es un hongo ascomicete que causa chancros y muerte de brotes sobre un gran número de coníferas. Dentro de esta especie han sido descritas tres razas: la Asiática, la Europea (EU) y la Norteamericana (NA). La raza EU, ampliamente distribuida por Europa y Norteamérica, ha sido dividida a su vez en tres biotipos: el biotipo A, el B y el biotipo Alpino. Gaa ha sido recientemente descrita sobre *Pinus halepensis* en España, por lo que su variación genética y su posición taxonómica son desconocidas. En el presente trabajo, se han caracterizado por primera vez aislados españoles de Gaa según sus perfiles RAPD, la morfología de sus conidios y la sintomatología que provoca en la planta. Por otra parte, se estudió la variabilidad genética usando marcadores RAPD y se estableció su relación filogenética con 17 aislados procedentes de otros países comparando sus perfiles RAPD. Se aislaron 15 aislados de cuatro masas de *P. halepensis* de Palencia y Valladolid, y se obtuvieron otros 17 aislados procedentes de Canadá, Finlandia, Suiza y USA, facilitados por centros de investigación de dichos países. El ADN fue extraído según el protocolo de Möller et al. (1992). Para las amplificaciones, se utilizaron cinco oligonucleótidos (10-mers; Qiagen Operon): OPA03, OPA08, OPA12, OPC08 y OPD05. Se obtuvieron un total de 25 fragmentos de amplificación que fueron legibles y reproducibles. De éstos, los 16 que mostraron ser polimórficos, fueron utilizados en los análisis. Los resultados obtenidos mostraron como los aislados españoles estuvieron muy emparentados entre sí, ya que las distancias genéticas existentes entre ellos fueron muy bajas. Según los patrones RAPD obtenidos, la mayoría de los aislados pertenecientes a la raza EU de Norteamérica se asemejaban en gran medida a los aislados españoles. Según los perfiles RAPD generados por los aislados españoles, la morfología de sus conidios y la sintomatología que provocan en la planta, se puede indicar que los aislados españoles analizados pertenecen a la raza EU de Gaa. Dentro de los biotipos, los resultados parecen indicar que no pertenecen ni al biotipo Alpino, ni al biotipo B, y que existen similitudes entre los aislados españoles y éstos del biotipo A, sin embargo, también se observaron ciertas diferencias que impiden afirmar su pertenencia a este último biotipo.

Este trabajo fue financiado en parte por becas de la Junta de Castilla y León y por el Fondo Social Europeo.

Bean yellow disorder virus, UN NUEVO CRINIVIRUS CAUSANDO ENFERMEDAD DE AMARILLEAMIENTO EN CULTIVOS DE LEGUMINOSAS

MARTÍN, G.; SEGUNDO, E.; JANSSEN, D.; BELMONTE, A.; CANO, M.; LÓPEZ, M.C.; ORTEGA, A.; GIL-SALAS, F.M.; CUADRADO, I.M.

CIFA de Almería. IFAPA. Autovía del Mediterráneo, Km 420, La Mojonera 04745 (Almería). Email: virucifa@arrakis.es

La mosca blanca *Bemisia tabaci* es la plaga más importante en los invernaderos comerciales del sudeste español desde 1988. Durante el decenio siguiente se han introducido varios virus transmitidos por *B. tabaci*, que causan distintas enfermedades en los cultivos de solanáceas y cucurbitáceas, tales como el TYLCV (1990) y ToCV (1994) en tomate y CYSDV (1994) y CVYV (2000) en pepino y melón. Los virus transmitidos por mosca blanca eran desconocidos en cultivos comerciales de judía para consumo en fresco de la zona hasta 1995, cuando fue introducido el TYLCV-Is. Tras ser mejorado el control de la mosca blanca por los productores, los daños causados por este geminivirus se redujeron considerablemente. Sin embargo, durante el otoño de 2003 se detectó una nueva enfermedad en judía consistente en un moteado internervial y amarilleamiento en las hojas de la mitad inferior de la planta. La enfermedad también produjo pérdidas económicas considerables debido a la distorsión del fruto y a la reducción de la producción. Simultáneamente se observaron síntomas de amarilleamiento de las hojas en cultivos de guisante (*Pisum sativum* L var. *vulgare*) y tirabeque (*Pisum sativum* L var. *macroserpa*).

Los resultados de un análisis del RNA de doble cadena sugirió que esta enfermedad estaba asociada a un crinivirus que, junto con la secuenciación parcial de su genoma y con las nuevas características epidemiológicas, llevó a la descripción de lo que llamamos como el *virus del desorden amarillo de la judía*, (*Bean yellow disorder virus*). La secuencia de aminoácidos deducida de un parte de la secuencia mostró un alto porcentaje de homología con el gen de la HSP70h de crinivirus, tales como la del *Cucurbit yellow stunting disorder virus* (CYSDV) (67%), *Beet pseudo-yellow virus* (BPYV) (63%) y *Tomato chlorosis virus* (ToCV) (57%). Se ha desarrollado un test de diagnóstico mediante RT-PCR que, efectivamente, detecta la presencia del virus en judías, guisantes y tirabeques sintomáticos recolectados en el campo.

UTILIZACIÓN DE VARIANTES INESTABLES DE LA PROTEÍNA FLUORESCENTE VERDE (Gfp) EN EL ESTUDIO DE LA SUPERVIVENCIA DE *Xanthomonas* EN CÍTRICOS

CUBERO, J.¹; GRAHAM, J.H.²

¹Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA). SGYT. Dpto Protección Vegetal. Ctra de La Coruña, Km. 7,5. Madrid 28040. cubero@inia.es

²Citrus Research and Education Center (CREC), Universidad de Florida. 700 Experiment Station Rd. Lake Alfred, FL33850. USA

Xanthomonas axonopodis pv. *citrumelo* es la bacteria responsable de la mancha bacteriana de los cítricos, una enfermedad que únicamente tiene relevancia a nivel de plantas de vivero. Sin embargo es importante porque se ha usado, y se sigue utilizando, como modelo para el estudio de la canchrosis bacteriana de los cítricos, provocada por *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* y sometida a estrictas medidas reguladoras y de cuarentena.

Un aspecto fundamental para el control de estas dos enfermedades es determinar la capacidad de supervivencia de estas *Xanthomonas* en diferentes ambientes. Hasta ahora todos los estudios hechos en este sentido se han realizado en base a la detección de la bacteria mediante aislamiento y recientemente usando PCR. Sin embargo muy poco se ha hecho para su localización mediante microscopía. La mayoría de métodos clásicos de microscopía tienen el inconveniente de detectar las bacterias en cualquier condición fisiológica, incluida la no viabilidad. Entre las técnicas utilizadas, la proteína Gfp se emplea como marcador para localizar distintos patógenos en plantas. Tiene el inconveniente de ser estable durante un largo periodo de tiempo y bacterias con el gen que presentan fluorescencia no tienen que estar necesariamente activas. En este trabajo presentaremos los resultados obtenidos en estudios realizados en *Xanthomonas* transformadas con plásmidos que contienen el gen *gfp* en sus formas estable e inestable. La inestabilidad se consiguió mediante la adición a la proteína nativa de una cola de aminoácidos que la hace sensible a la acción de proteasas en el interior de la bacteria. Esta modificación permite que se produzca la degradación del Gfp inmediatamente después de la expresión de su gen. Así, solo aquellas bacterias que son activas aparecen fluorescentes en las preparaciones al microscopio. La transcripción del gen detectada mediante retrotranscripción-PCR en tiempo real estuvo directamente relacionada con la fluorescencia en las cepas que contenían un plásmido con *gfp* inestable. Sin embargo, en las cepas con el *gfp* estable no existió esta relación debido a que siguió existiendo fluorescencia aun no habiendo transcripción/expresión del gen. Las cepas obtenidas con los *gfp* estables e inestables se inocularon en plantas de *Swingle citrumelo*, se mostrarán los resultados obtenidos mediante microscopía confocal en la superficie e interior de las mismas.

HONGOS IMPLICADOS EN LOS DECAIMIENTOS DE LA VID

SANTIAGO, Y.; MARTÍN, M.C.; MORENO, C.M.; MARTÍN, M.T.; COBOS, R.; URBEZ, J.R.; PELÁEZ, H.

Departamento de Protección Vegetal. Instituto Tecnológico Agrario de Castilla y León. Ctra. Burgos Km. 119, 47071 Valladolid. E-mail: pelrivho@jcyl.es

Los estudios acerca de los decaimientos de la vid, Yesca, Eutipiosis y Enfermedad de Petri, se han intensificado durante los últimos años debido al incremento de la presencia de cepas afectadas en diferentes países, por la prohibición de los tratamientos con arsenito sódico, hasta ahora el único producto eficaz contra este tipo de enfermedades. Los síntomas externos de Yesca y Eutipiosis se diferencian tanto por la época en que estos aparecen como por el aspecto de los mismos. Los síntomas de Eutipiosis se observan durante los meses de mayo y junio. Los brazos afectados presentan brotes raquíuticos con hojas más pequeñas de lo normal y aspecto clorótico. Los síntomas de Yesca aparecen en los meses de Julio y Agosto. En las hojas de las cepas afectadas se observan unos amarilleamientos y decoloraciones internerviales que comienzan desde el borde llegando finalmente a necrosarse. La otra forma de manifestación de la Yesca se conoce con el nombre de forma rápida o apopléjica. En este caso se produce un decaimiento brusco de la cepa que se seca y muere en unos días. Los síntomas de Petri suelen describirse en plantas jóvenes presentando retrasos en el crecimiento, brotes raquíuticos con hojas pequeñas y cloróticas y agostamiento prematuro.

Los muestreos se realizaron entre los años 2000-2003 en las DD.OO. de Castilla y León y se seleccionaron parcelas con diferentes tramos de edad, sistema de conducción y tipo de poda, con el objeto de establecer qué tipo de relación existía entre estas variables y el desarrollo de los decaimientos. El porcentaje de parcelas afectadas por Eutipiosis fue del 50-80% y de Yesca fue del 25-35%. Sin embargo a pesar de que la mayoría de las parcelas presentan decaimientos de la vid, el número de cepas afectadas por parcela fue bajo, del 3,5-5% de Eutipiosis y del 0,6-1,3% de Yesca.

Los hongos aislados de muestras tomadas de plantas que presentaban síntomas externos indican hasta el momento la existencia de un complejo de ocho hongos relacionados con dichas enfermedades de los que destacan por su mayor presencia *Botryosphaeria* spp.; *Phaeoacremonium* spp.; *Phaeomoniella chlamydospora*, *Fomitiporia punctata* y *Cylindrocarpon* spp..

SINTOMATOLOGÍA Y HONGOS ASOCIADOS A ENFERMEDADES DE LA MADERA DE VID EN CATALUNYA

LUQUE, J.¹; GARCÍA-FIGUERES, F.²; TORRES, E.²; CAMPRUBÍ, A.¹; CALVET, C.¹; ESTAÚN, V.¹

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

²Laboratori de Sanitat Vegetal, Dep. Agricultura, Ramaderia i Pesca, Generalitat de Catalunya. Via Circulació Nord, Tram VI, 08004. Barcelona. E-mail: fgarciafigueres@gencat.net

La yesca y la eutipiosis son dos de las ‘enfermedades de la madera’ de la vid más extendidas en Catalunya, aunque de ellas todavía se tiene un conocimiento fragmentario. Con objeto de determinar la relación entre los síntomas externos e internos y los hongos asociados a estas enfermedades, en 2003 se realizaron diversos muestreos en 6 DOs de Catalunya y se estudió la micoflora de las plantas afectadas. El 69% de las plantas analizadas mostraron síntomas externos típicos de eutipiosis, un 16% se consideraron afectadas por yesca, y el 15% restante presentaron apoplejía, un síntoma que se relaciona indistintamente con ambas enfermedades. En cuanto a síntomas internos, en plantas afectadas por eutipiosis se advirtió mayoritariamente la existencia de necrosis sectoriales (75%), aunque también se apreciaron signos propios de la yesca (46%). Igualmente, el 83% de las plantas afectadas por yesca presentó alguno de los síntomas internos característicos, aunque en el 66% de ellas también se apreció alguna necrosis sectorial.

Eutypa lata, el agente causal de la eutipiosis, se aisló con éxito del 26% de las plantas con necrosis sectorial. Sin embargo, del mismo tipo de lesión se aisló *Botryosphaeria obtusa* en un porcentaje aún mayor (46%). De otras necrosis vasculares, inespecíficas y distintas de las sectoriales, se aislaron *Phaeomoniella chlamydospora* (28%), *B. obtusa* (23%), *E. lata* (14%) y *Phaeoacremonium aleophilum* (6%). En cuanto a los hongos asociados a síntomas internos de yesca, *P. chlamydospora* se aisló del veteado pardo de la madera en un 71% de los casos, y *Fomitiporia mediterranea* se aisló del 51% de las plantas con podredumbre blanda. Finalmente, otras especies identificadas durante el muestreo se incluyeron en los géneros *Cryptovalsa*, *Fusarium*, *Fusicoccum*, *Phialophora* y *Phomopsis*, entre otros.

A modo de conclusión, se constata la frecuencia con la que a menudo coinciden, en una misma planta, síntomas internos y hongos asociados a las dos enfermedades estudiadas.

VARIABILIDAD GENÉTICA DE LOS AISLADOS ESPAÑOLES DEL VIRUS DEL AMARILLEAMIENTO NECRÓTICO DEL HABA (FBNYV)

NAVARRO, E.; RUIZ, L.; CASTRO, S.; ROMERO, J.

Departamento de Protección Vegetal, INIA. Carretera de La Coruña Km 7,0. 28040-Madrid

El virus del amarillamiento necrótico del haba (*Faba bean necrotic yellow virus*, FBNYV) es un miembro del género Nanovirus que afecta principalmente a leguminosas y ha sido encontrado en Oriente Medio y Norte de África causando importantes pérdidas económicas. Recientemente se ha detectado en cultivos de haba en España y la enfermedad se ha establecido en los campos de la región de Murcia mediante transmisión por pulgones. El genoma del FBNYV está compuesto por múltiples componentes circulares de DNA de cadena sencilla, cada uno con 1 Kb de tamaño. Aunque se han llegado a describir hasta 12 componentes asociados a infecciones con FBNYV, el número y tipos integrantes del genoma del virus no han sido determinados con exactitud hasta el momento. Con el fin de realizar una caracterización serológica y molecular de los aislados españoles del virus, se recolectaron muestras de habas con síntomas de infección viral: amarillamientos, necrosis y deformación de hojas. Se seleccionaron algunas de las que resultaron positivas para FBNYV y se estudió su reacción frente a una batería de AcMos (Amablemente cedidos por el Dr. J. Vetten, BBA, Alemania), observando distintos serotipos que revelaban la existencia de epítomos variables en la proteína de la cápsida. Algunos de estos aislados fueron caracterizados a nivel molecular, secuenciando ocho de sus componentes genómicos y comparándolos entre sí y con los aislados sirio y egipcio previamente descritos en el banco de genes. Análisis filogenéticos revelaron que todos los aislados españoles excepto uno (11D) formaban un grupo diferente de los aislados de Siria y Egipto, diferenciándose en un 5-22 % a nivel nucleótido, según el componente analizado. El aislado 11D en cambio, guardaba mayor homología con los aislados de la base de datos que con los de su misma localización geográfica. Podría tratarse de una variante genotípica minoritaria en la población, que se habría mantenido en baja frecuencia por un proceso de selección o podría estar relacionado con un suceso fundador que estableciera el virus en España.

INCREMENTO DE PRODUCCIÓN DE MANDARINA TRAS LA APLICACIÓN DE VYDATE 10L EN UNA PARCELA COMERCIAL INFESTADA CON *Tylenchulus semipenetrans*

VERDEJO-LUCAS, S.¹; **PASTOR, J.**²; **SORRIBAS, F.J.**³; **PONS, J.**²; **ORNAT, C.**³; **BUÑOL, J.**¹; **BARCELÓ, F.**²; **VIERA, A.**¹

¹IRTA, Crta. de Cabrils s/n, 08348 Cabrils

²EEE- IRTA, 43870 Amposta

³ESAB-UPC Comte d'Urgell 187, 08036 Barcelona

Se evaluó el efecto de Vydate 10L (Oxamilo 10% p/v) sobre las densidades de población de *Tylenchulus semipenetrans* y la producción de mandarina cv Hernandina en una parcela comercial de 8 años de edad con infestación natural del nematodo. El diseño experimental fue bloques estratificados al azar con 5 repeticiones por tratamiento. Los tratamientos fueron Vydate 10L (60 l/ha y año) y control no tratado. El nematicida se aplicó durante dos años consecutivos vía riego por goteo siguiendo un programa anual de dosis fraccionadas en 7 aplicaciones que se realizaron a intervalos de 3 semanas comenzando a primeros de abril. En cada fecha de aplicación, el agua de riego se acidificaba con ácido fosfórico hasta conseguir un pH de 5.5 aproximadamente. Las densidades poblacionales del nematodo en suelo y raíces se determinaron pre-tratamiento nematicida en marzo 2002 y post-tratamiento en marzo 2003 y 2004. Para determinar el efecto del nematicida sobre la producción, se recolectaron los frutos en una sola pasada y se determinó el número de kilos por árbol, peso medio de los frutos y calibre de los mismos. Las densidades del nematodo pre- tratamiento nematicida en 2002 eran 790 hembras / g raíz, 11.410 huevos / g raíz y 5.100 juveniles / 250cm³ suelo. El nematicida reducía el número de hembras por gramo de raíz y de juveniles por 250 cm³ de suelo en un 53% y 28%, respectivamente un año después de iniciarse las aplicaciones. Las diferencias en producción entre las parcelas tratadas con Vydate 10L y no tratadas se revelaron al segundo año de iniciar la aplicación con un incremento en el número de kilos por árbol del 55% y en el número de frutos por árbol del 53%. El incremento de producción compensó el coste de las aplicaciones del nematicida (producto + jornales) y produjo un beneficio adicional de 2.330 euros por hectárea. Este ensayo continúa en curso para verificar los resultados obtenidos y evaluar la eficacia del nematicida a largo plazo.

LA DESINFECCIÓN DEL SUELO Y LA INCIDENCIA DEL COLAPSO DEL TOMATE

GUERRERO, M.M.¹; BARCELÓ, N.¹; MARTÍNEZ, M.A.¹; HITA, I.¹; MARTÍNEZ, M.C.¹; ABADÍA, A.²; PELLICER, C.²; LACASA, A.¹

¹ *Biotechnología y Protección de Cultivos*, ² *Recursos Naturales, IMIDA, Mayor s/n, 30.150. La Alberca (Murcia)*.

La aparición del síndrome de la marchitez o colapso de las plantas de tomate fue precedida de la expansión del virus del mosaico del pepino dulce (Pepino mosaic virus, PepMV) en los tomates de Murcia. Los estudios epidemiológicos pusieron de manifiesto que el virus y la colonización de las raíces por *Ospidium brassicae* eran los elementos comunes a todas las plantaciones afectadas. Dado que, tanto el virus como el hongo, permanecen en el suelo en los restos del cultivo, se planteó un ensayo de desinfección del suelo con bromuro de metilo en combinación con el injerto de las plantas sobre el patrón Beaufort. Se llevó a cabo en un invernadero comercial, mono cultivo de tomate desde hace más de 20 años, donde los 3 últimos cultivos habían sido fuertemente afectados por el síndrome. Las variantes estudiadas fueron: desinfección del suelo y testigo no desinfectado y plantas injertadas o sin injertar; diseño de bloques al azar con 3 repeticiones por variante. La evaluación se realizó en base a: número de plantas con marchitez y con colapso, porcentaje de plantas contaminadas por PepMV y por *O. brassicae*, altura de las plantas y producción comercial. La desinfección redujo en un 50% la proporción de plantas marchitas no injertadas (41% no desinfectado, 20% desinfectado), no influyendo en las injertadas, de las que se marchitaron algunas de las que franquearon el patrón (2,7% no desinfectado, 5% desinfectado); la reducción fue mayor para las plantas colapsadas no injertadas (22% no desinfectado y 2,7% desinfectado). La desinfección no influyó en el inicio del marchitamiento, que no sucedió hasta que más del 50% de las plantas estuvieron infectadas de PepMV. El inicio de la infección no tuvo relación con la desinfección, pero si la progresión de la incidencia de la virosis (fue menor en lo desinfectado en el momento de aparecer las primeras plantas marchitas, 2 de mayo, 45% frente a 85%). Aunque mayor, la producción comercial, no fue significativamente mejorada por la desinfección; sucediendo lo mismo con el desarrollo de las plantas. Todas las plantas que se marchitaron o que se colapsaron estaban infectadas por el virus y las raíces habían sido colonizadas por el hongo. Pese a los resultados de la desinfección, no se llegan a alcanzar los niveles de control del síndrome que se obtienen mediante el injerto.

ACCIÓN DE LOS ANTIBIÓTICOS CERULENINA Y BREFELDIN A SOBRE LA REPLICACIÓN DE *Lettuce infectious yellows virus* (LIYV) EN PROTOPLASTOS DE *Nicotiana benthamiana*

NG, J.¹; MEDINA, V.²; FALK, B.W.¹

¹ Dept. of Plant Pathology, 1 Shields Ave. University of California, Davis, CA 95616, USA.

² Dept. Producció Vegetal i Ciència Forestal. ETSEA. Universitat de Lleida. Avda. Alcalde Rovira Roure 191, 25198 Lleida. medinap@pvcf.udl.es

Lettuce infectious yellows virus (LIYV), miembro tipo del género *Crinivirus*, es un virus de genoma bipartido. El LIYV-ARN1 (8118nt) reúne los genes implicados en la replicación viral, mientras que en el LIYV-ARN2 (7193nt) se encuentran genes implicados en su difusión y dispersión. Los ARNs defectivos de su ARN2 replican en *trans* con su ARN1. Se ha puesto a punto un sistema de estudio visual de su replicación al microscopio confocal, mediante protoplastos cotransfectados por el ARN1 de LIYV y un transcrito de un ARN defectivo del ARN2 de LIYV, conteniendo el gen que determina la proteína verde fluorescente (GFP). Se ha utilizado este sistema para el estudio de la acción de dos antibióticos en la replicación de LIYV: un inhibidor de la biosíntesis *de novo* de lípidos, la cerulenina, y un antibiótico destructor del aparato de Golgi, brefeldin A, usando como control protoplastos transfectados con ARN de *Tobacco mosaic virus* (TMV). Tras las transfecciones se han realizado conteos del número de células fluorescentes a las 24, 48 y 72 horas y analizado su morfología, el contenido de ARN por Northern y los efectos citopatológicos. La cerulenina disminuye drásticamente la replicación de LIYV y ligeramente la de TMV sin comprometer la viabilidad de las células. Brefeldin A también parece disminuir la cantidad de ARN en LIYV probablemente como consecuencia de la destrucción del sistema excretor celular y de la plasticidad celular. Otros resultados, como la potenciación de la transfección que ejerce el etanol, disolvente utilizado para la disolución de ambos antibióticos, y las similitudes y diferencias con otros virus de plantas y animales encontradas por otros autores, para estos mismos antibióticos, serán comentados.

FACTORES PREDICTIVOS A LA SUPRESIÓN DE LA FUSARIOSIS VASCULAR DEL TOMATE EN SUSTRATOS

BORRERO, C.; CASTILLO, S.; ORDOVÁS, J.; TRILLAS, M. I.; AVILÉS, M.

Dpto. de Ciencias Agroforestales. Escuela de Ingeniería Técnica Agrícola. U. de Sevilla.
Ctra. Utrera Km 1, s/n. 41013. Sevilla. E-mail: aviles@us.es

Las fusariosis vasculares son enfermedades importantes sin un buen control químico. No obstante, el control biológico y el manejo de la fertilización pueden ser alternativas eficientes en su control. Un sistema que puede integrar estas estrategias es el cultivo sin suelo con sustratos formulados con composts que muestran supresividad natural a la fusariosis vascular. El objetivo de este trabajo fue encontrar variables bióticas o abióticas que sirvieran como parámetros predictivos de la supresividad de un sustrato. Para ello se realizaron tres ensayos con el patosistema: *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (raza 2) / tomate 'Roma' en distintos sustratos (dos composts de residuos agroindustriales, turba rubia, fibra de coco y vermiculita). Antes de los ensayos se midió en los sustratos densidad aparente, pH, conductividad eléctrica, actividad y biomasa microbiana y por los perfiles de consumo de carbono se caracterizaron sus comunidades microbianas. Al final de los ensayos, con el fin de elucidar los mecanismos envueltos en la supresividad, se midieron nutrientes en sustrato y en planta y las densidades poblacionales de distintos grupos de microorganismos cultivables. Se encontró una regresión altamente significativa entre pH, actividad microbiana y severidad. De manera que mientras más alto el pH y la actividad microbiana menor severidad. Esta relación integra el efecto de la disponibilidad de nutrientes y el grado de microbiostasis, dos factores clave en este patosistema. El efecto de la disponibilidad de nutrientes, en gran parte determinada por el pH dada la idéntica fertirrigación de los sustratos, se constata en las altas correlaciones positivas encontradas entre la severidad y la concentración de varios nutrientes en planta como Fe, Cu y P. Por otro lado, a mayor actividad microbiana más intensa será la microbiostasis. En este fenómeno la comunidad microbiana funciona como un todo independientemente de su composición (sumidero de nutrientes). Esto es congruente con el hecho de que el perfil de consumo de fuentes de carbono diferenció distintas estructuras en las comunidades microbianas en cada sustrato. Aunque tampoco podemos descartar la acción específica de determinados grupos de microorganismos dado que se encontró correlaciones inversamente proporcionales entre las densidades poblacionales de actinomicetes oligotrofos y celulolíticos y la severidad. En posteriores estudios con otros sustratos se ha confirmado el valor predictivo del pH y la actividad microbiana.

DESARROLLO DE UN SISTEMA PARA DETECTAR LA REPLICACIÓN DEL BEGOMOVIRUS *Tomato yellow leaf curl sardinian virus* (TYLCSV)

LUNA, A.P.; MORILLA, G.; CASTILLO, A.G.; BEJARANO, E.R.

Área de Genética, Facultad de ciencias, Universidad de Málaga. Campus de Teatinos s/n, 29071-Málaga. E-mail: analuna@uma.es

Tomato yellow leaf curl Sardinian virus (TYLCSV) es un begomivirus transmitido por la mosca blanca *Bemisia tabaci*, que infecta varias especies de solanáceas, incluidas tomate, *Nicotiana tabacum* y *N. benthamiana*. Los begomovirus son virus de DNA cuyo genoma esta formado por una molécula circular de DNA de cadena sencilla. El genoma de TYLCSV contiene 6 marcos abiertos de lectura que codifican para proteínas implicadas en la replicación (Rep y REN), en el control de la transcripción de los genes del virus (Trap), en el movimiento y encapsidación (CP), etc.

La replicación del DNA del virus se lleva a cabo mediante un mecanismo dual que implica dos sistemas de replicación: uno por círculo rodante y otro mediado por recombinación. Se sabe que la proteína Rep es esencial para la replicación. Esta proteína reconoce una secuencia específica en el origen de replicación del virus e introduce un corte en una estructura en lazo que sirve de cebador para el inicio de la replicación. Los demás elementos necesarios para la replicación son de origen celular.

A partir de datos obtenidos en el laboratorio, hemos construido un casete de expresión de GFP inducible por la presencia de Rep. Mediante transformación se han generado plantas transgénicas de *N. benthamiana* en las que se induce la expresión de GFP cuando son infectadas por TYLCSV. Creemos que el patrón de GFP observado correlaciona con la replicación del virus en la planta y es dependiente de la presencia de Rep. Se ha realizado un estudio temporal y espacial de la expresión de la GFP en estas plantas al ser infectadas por TYLCSV. Además se mostrarán los patrones de expresión obtenidos al infectar estas plantas con otras especies de virus que producen una enfermedad similar en tomate (TYLCV, TYLCMaIV). Por último se mostrará que la expresión de la GFP se inhibe cuando se silencia mediante VIGS (Virus induced gene silencing) la proteína PCNA (proliferating cell nuclear antigen) indispensable para la replicación del virus.

PAPEL DE LA RESISTENCIA DE LA PLANTA Y DE LA VIRULENCIA DEL PATÓGENO EN LA RECUPERACIÓN DE OLIVOS JÓVENES DE LA MARCHITEZ CAUSADA POR *Verticillium dahliae*

LÓPEZ-ESCUDERO, F.J.; BLANCO-LÓPEZ, M.A.

Departamento de Agronomía, ETSIAM, Universidad de Córdoba, Apdo. 3048, 14080, Córdoba, España. E-mail: ag2loesj@uco.es y mblanco@uco.es

La recuperación es un fenómeno natural asociado a mecanismos complejos que permiten a los árboles superar daños y decaimientos. Estos mecanismos pueden ser igualmente activados tras las infecciones causadas por patógenos vasculares como *Verticillium dahliae*. La recuperación natural de las verticilosis, descrita en numerosos huéspedes leñosos del patógeno (almendro, melocotonero, arce o pistacho), se observa en elevado porcentaje en olivo, en plantaciones afectadas por la Verticilosis del olivo (VO). El árbol responde activamente, produciendo nuevas capas de tejido que reemplazan el xilema viejo, dañado o enfermo. En este trabajo se ha evaluado y cuantificado la recuperación natural de la VO en plantas inoculadas por inmersión radical con *V. dahliae*, durante 12 semanas en cámara de ambiente controlado. La recuperación se caracterizó por la remisión de síntomas en las plantas tras alcanzar un valor determinado de severidad, y dependió claramente de la virulencia del aislado empleado. El porcentaje de plantas recuperadas inoculadas con un aislado menos virulento no defoliante (62.7%) fue significativamente mayor que el de las inoculadas con uno más virulento defoliante (18.3%). A las 12 semanas de la inoculación (sdi), las plantas se transplantaron a macetas de mayor tamaño en condiciones de umbráculo, y el progreso de las infecciones se determinó periódicamente hasta las 127 semanas. Independientemente del aislado empleado, ninguna de las plantas recuperadas mostró nuevos síntomas de marchitez, ocurriendo nuevos crecimientos vegetativos. *V. dahliae* sólo pudo ser aislado de plantas recuperadas 19 sdi, pero no de ninguna de las plantas recuperadas procesadas entre los 69 y 127 sdi. Los porcentajes de aislamiento fueron significativamente más altos en cultivares susceptibles (84,6%) que en resistentes (33.3%). La recuperación de la VO podría estar asociada a la colonización discontinua del patógeno conferida por la resistencia del cultivar, y ser permanente en ausencia de nuevas infecciones. Por ello, es un mecanismo natural importante que podría complementar la resistencia del cultivar, particularmente en suelos con baja densidad de inóculo de aislados de menor virulencia.

CARACTERIZACIÓN Y LOCALIZACIÓN EN UN MAPA GENÉTICO DE ANÁLOGOS A GENES DE RESISTENCIA (RGAS – ‘RESISTANCE GENE ANALOGS’) EN ALBARICOQUERO (*Prunus armeniaca* L.)

SORIANO, J.M.; ROMERO, C.; VILANOVA, S.; LLÁCER, G.; BADENES, M.L.

*Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias, Carretera Moncada-Náquera Km 4.5
46113 Moncada, Valencia, Spain, Tf: 34 96 342 40 00, Fax: 34 96 342 40 01, e-mail:
jsoriano@ivia.es*

En este trabajo se han clonado y caracterizado secuencias de ADN de albaricoquero que presentan homología con la clase NBS-LRR ('Nucleotide Binding Site-Leucine Rich Repeat') de genes de resistencia. Para ello se ha usado un protocolo de PCR con cebadores degenerados que provienen de las regiones conservadas del dominio NBS. Un análisis de restricción de los clones obtenidos nos permitió seleccionar 86 no redundantes para su secuenciación y posterior análisis. Las secuencias de estos clones se agruparon en 6 familias distintas y a partir de la secuencia consenso de cada una de ellas se desarrollaron cebadores específicos de RGAs basados en las regiones no conservadas del dominio NBS. Estos cebadores se utilizaron para desarrollar marcadores tipo AFLP-RGAs mediante un protocolo modificado de la técnica de AFLPs ('Amplified Fragment Length Polymorphism') donde uno de los marcadores 'standard' se sustituye por otro específico de RGAs. Mediante este procedimiento se obtuvieron 27 marcadores polimórficos, a partir de 26 combinaciones distintas de cebadores, y 15 de ellos se situaron en un mapa genético de albaricoquero, previamente construido con la población F₂ derivada de la autopolinización del cultivar 'Lito'. Tres de estos marcadores se localizan en el grupo de ligamiento 1, donde también se situó, aunque de manera provisional, el carácter de resistencia PPV ('Plum Pox Virus'). Los marcadores AFLP-RGAs identificados pueden resultar útiles en la mejora asistida e incluso en la clonación basada en mapas de genes de resistencia en albaricoquero.

CULTIVO DE OLIVO *in vitro* COMO MODELO DE ESTUDIO DE LA TUBERCULOSIS

RODRÍGUEZ-MORENO, L.; PÉREZ-MARTÍNEZ, I.; RAMOS, C.

Área de Genética, Facultad de Ciencias, Universidad de Málaga. Campus de Teatinos s/n, 29071-Málaga. E-mail: crr@uma.es

La tuberculosis o roña del olivo, enfermedad causada por la bacteria *Pseudomonas savastanoi* pv *savastanoi* (Pss), está extendida por todas las zonas de cultivo del olivo. Su síntoma más característico, la producción de tumores en troncos, ramas y brotes, es debido a la hipertrofia e hiperplasia de los tejidos vegetales que se origina por la producción bacteriana de fitohormonas tras la penetración del patógeno en la planta a través de heridas. Actualmente, el estudio de los factores implicados en la sintomatología de esta enfermedad se realiza mayoritariamente inoculando explantes de 2 años de edad y observando los síntomas que aparecen de 2-3 meses después de la inoculación. Con el objetivo de disponer de una metodología que permita realizar estos ensayos de una forma más rápida y reproducible, en este trabajo hemos abordado la utilización de plantas de olivo cultivadas *in-vitro* como modelo de estudio de la tuberculosis. Plantas de olivo variedad Arbequina cultivadas *in-vitro* se inocularon a través de una herida producida en el tallo con 10^7 - 10^8 ufc de distintos aislados de Pss y, tras la aparición de los primeros síntomas visibles, las cepas se clasificaron en dos tipos: 1) productoras de tumores en tallos y hojas y, 2) productoras de cavernas necróticas en el tallo. En ambos casos, e independientemente de la densidad inicial de inóculo utilizada, el número de células del patógeno alcanzada dentro de los tejidos vegetales se estabilizó en aproximadamente 10^8 ufc tras 7-14 dpi. Como cabía esperar, la aparición de los primeros síntomas visibles fue dependiente del número de células inoculadas, siendo de 8-9 días en las plantas inoculadas a alta densidad celular y sufriendo un retraso de 2-3 días en las plantas inoculadas a baja densidad (10^4 ufc). Tal como se ha descrito previamente utilizando plantas adultas, mutantes de *P. savastanoi* defectivos en la síntesis de ácido indolacético y/o citoquinina mostraron también menor virulencia en el sistema *in-vitro*.

PERSISTENCIA Y TRANSMISIÓN DE MICOVIRUS EN POBLACIONES DEL HONGO ENDOFÍTICO *Epichloë festucae*

ROMO-VAQUERO, M.¹; LEUCHTMANN, A.²; GARCÍA-CRIADO, B.¹; ZABALGOGEAZCOA, I.¹

¹Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología de Salamanca, CSIC, Cordel de Merinas 40-52, 37008 Salamanca (España).

²Geobotanisches Institut ETH, Zollikerstrasse 107, CH-8008 Zürich (Suiza). Email:izabalgo@usal.es.

En poblaciones naturales de *Festuca rubra* una media del 70% de las plantas están infectadas por el hongo endofítico *Epichloë festucae*. En aislados de este hongo se han detectado dos micovirus: EfV1 tiene un genoma de 5,2Kb de RNA de doble cadena (RNAbc) y está encapsidado en partículas esféricas de 50nm; EfV2, posee un genoma no encapsidado de 3,2Kb de RNAbc. La presencia de estos virus de forma conjunta o independiente se hace patente en todas las poblaciones analizadas, y en el caso particular de dos de ellas se ha confirmado que una media del 76% de los aislados de *E. festucae* están infectados. Al comparar el crecimiento *in vitro* de cultivos con virus y sin virus se observó un mayor crecimiento en los aislados sin virus. A pesar de esto, los virus son persistentes: aislados infectados han sido mantenidos durante años en el laboratorio sin que se haya observado la pérdida de virus; además, distintos aislados pertenecientes al mismo linaje clonal de *E. festucae* suelen estar infectados por los mismos virus. En dos poblaciones se ha observado que aislados genéticamente distantes están infectados por virus. Esto indica la posible existencia de un mecanismo de transmisión horizontal de virus. Para comprobar la transmisión a través de conidios se analizaron 42 cultivos monoespóricos obtenidos a partir de un aislado infectado por EfV1 y EfV2; en todos ellos se detectó RNAbc vírico, confirmándose la transmisión por medio de conidios. Para verificar la transmisión de virus via ascoesporas se realizaron varios cruzamientos entre aislados infectados y libres de virus. De los cruzamientos se obtuvieron ascoesporas que dieron lugar a cultivos en los no se detectaron virus; esto supone que el proceso de ascoesporogénesis es una barrera para la transmisión vírica. Estos resultados indican que la anastomosis entre distintos aislados podría ser un mecanismo de transmisión de virus, pero que hay que descartar la transmisión por vía sexual a ascoesporas.

DINÁMICA ESPACIO-TEMPORAL DE EPIDEMIAS DE LEPRAS (*Phytophthora leproides*) EN CULTIVOS DE REMOLACHA AZUCARERA DE SIEMBRA OTOÑAL

JORDÁN-RAMÍREZ, R.¹; JIMÉNEZ-DÍAZ, R.M.^{1,2}; NAVAS-CORTÉS, J.A.¹

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

²Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos y Montes, Universidad de Córdoba, Apdo. 3048, 14080 Córdoba. E-mail: jnavas@cica.es

La Lepra, causada por el hongo *Phytophthora leproides*, es una enfermedad de creciente importancia y expansión en los cultivos de remolacha azucarera de siembra otoñal del suroeste de España. El desconocimiento de la epidemiología de la enfermedad ha dificultado en gran medida el desarrollo de medidas de control suficientemente efectivas. Por ello el objetivo de este trabajo ha sido estudiar la dinámica en espacio y tiempo de las epidemias de Lepra en remolacha de siembra otoñal.

Las investigaciones se han llevado a cabo en condiciones de campo durante las campañas agrícolas 2001/02 y 2002/03, en parcelas experimentales con diferentes variedades comerciales de remolacha en localidades de las zonas centro y sur de la provincia de Sevilla. Se realizaron observaciones sobre el desarrollo de síntomas de Lepra a intervalos de 2-4 semanas durante todo el ciclo del cultivo. Para el conjunto de variedades de remolacha y localidades estudiadas, la incidencia de enfermedad fue máxima en el mes de enero, en que se alcanzan los mayores niveles de infección en hoja, y decreció drásticamente en febrero y comienzo de marzo asociada con la necrosis y caída de las hojas sintomáticas. A partir de mediados de marzo, y hasta la recolección en julio se observó el desarrollo de tumores en la corona radical, cuya incidencia aumentó de forma progresiva hasta alcanzar niveles similares a los máximos de infección foliar observados en el mes de enero. En general, la distribución espacial de las plantas con síntomas de Lepra mostró un patrón aleatorio, existiendo no obstante áreas en las parcelas con desigual nivel de incidencia de enfermedad y una mayor incidencia asociada con las líneas de siembra.

Nuestros resultados indican que el desarrollo de epidemias de Lepra puede reflejar en gran medida la distribución del inóculo del patógeno en el suelo en el momento de la siembra, por lo que las estrategias para el control de la enfermedad deben ir dirigidas preferentemente a la reducción del inóculo inicial y/o la eficiencia de éste en causar infección.

Investigación subvencionada por el proyecto AGL2002-01418 y apoyo técnico de AIMCRA

INDUCCIÓN DEL ESTADO VIABLE PERO NO CULTIVABLE (VBNC) EN *Erwinia amylovora* POR COBRE

ORDAX, M.¹; MARCO-NOALES, E.¹; LÓPEZ, M.M.¹; BIOSCA, E.G.^{1,2}

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

²Depto. Microbiología y Ecología, Universidad de Valencia, Apdo 46100, Burjassot, Valencia. E-mail: ordax@ivia.es

El sulfato de cobre, utilizado para el control de *Erwinia amylovora*, afecta negativamente a la cultivabilidad de diversas especies bacterianas fitopatógenas, algunas de las cuales entran en el denominado estado viable pero no cultivable (VBNC). En dicho estado, las células pierden su capacidad de formar colonias en medio sólido, aunque responden a métodos de determinación de la viabilidad independientes del cultivo. En este sentido, el estado VBNC se ha propuesto como una estrategia de supervivencia bajo condiciones adversas, lo que explicaría, al menos en parte, la reaparición de infecciones en plantas tratadas con cobre. Con el fin de estudiar si este metal induce la entrada en el estado VBNC de *E. amylovora*, ésta se inoculó a una concentración de 10^7 ufc/ml en el medio mineral AB suplementado o no con distintas concentraciones de cobre (0.005, 0.01 y 0.05 mM Cu^{2+}). A lo largo de 3 meses, se determinó tanto el número de células cultivables en medio King B sólido, como el de células totales y viables mediante dos métodos de determinación de la viabilidad (Live&Dead y reducción de CTC). Los recuentos de células totales y viables se mantuvieron constantes en todos los casos. Sin embargo, en presencia de cobre la cultivabilidad en medio King B sólido descendió por debajo del límite de detección, siendo esta reducción mucho más rápida a las concentraciones más altas de cobre, en las que no se detectaron células cultivables ya a las 24 h. Se evaluó también la patogenicidad de estas células estresadas en peras inmaduras. Las células VBNC sólo fueron capaces de producir síntomas durante los 5 primeros días. En ausencia de cobre, cuando el único factor de estrés fue la escasez de nutrientes, la cultivabilidad llegó a estabilizarse en 10^4 ufc/ml, y la patogenicidad también se mantuvo a lo largo de todo el período de experimentación. El cobre, por tanto, induce la entrada de *E. amylovora* en el estado VBNC. Para ensayar la posible reversión de este estado en *E. amylovora* se utilizó King B líquido en agitación, basándose en estudios que han demostrado la recuperación de células VBNC mediante el aporte de nutrientes en forma líquida. Así, se consiguió recuperar la cultivabilidad de las células en medio sólido, incluso 3 meses después de su entrada en dicho estado. El conocimiento del efecto del cobre sobre *E. amylovora* y el estudio de la importancia del estado VBNC en el ciclo biológico de la bacteria podrían contribuir a optimizar las estrategias de control del fuego bacteriano.

MODELOS CUANTITATIVOS PARA DESCRIBIR LAS INTERACCIONES ENTRE TEMPERATURA Y DENSIDAD DE INÓCULO DE RAZAS DE *Fusarium oxysporum* f.sp. *ciceris* EN CULTIVARES DE GARBANZO

NAVAS-CORTÉS, J.A.¹; MÉNDEZ-RODRÍGUEZ, M.A.¹; LANDA, B.B.^{1,2}; JIMÉNEZ-DÍAZ, R.M.^{1,2}

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

²Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos y Montes, Universidad de Córdoba, Apdo. 3048, 14080 Córdoba. E-mail: jnavas@cica.es

La aplicación extensa y eficiente de cultivares resistentes para el control de la Fusariosis Vascular del garbanzo (FVG) requiere el conocimiento previo de la raza de *Fusarium oxysporum* f.sp. *ciceris* (Foc) prevalente y su densidad de inóculo en el suelo. Además, la marcada influencia de la temperatura del suelo sobre este patosistema hace necesario conocer las interacciones de ésta con la virulencia de la raza del patógeno y su densidad de inóculo, a fin de optimizar la toma de decisión en las estrategias para el control de la FVG. En este trabajo hemos desarrollado modelos para cuantificar el efecto de cada uno de estos componentes en el patosistema Foc/garbanzo, así como de sus interacciones en cultivares de garbanzo, utilizando las razas 0 y 5 de Foc que difieren en virulencia sobre los cvs. P-2245 y PV-61.

El desarrollo temporal de la intensidad de la FVG se ajustó al modelo de Weibull. El período de incubación (PI) y la tasa de progreso de la enfermedad fueron expresados como funciones Weibull de la temperatura de incubación, mientras que el área bajo la curva de progreso de enfermedad estandarizada (ABCPEE) fue expresada como función Beta de la temperatura del suelo. Ello permitió ajustar superficies de respuesta para cada combinación raza de Foc-cultivar de garbanzo, que relacionan funcionalmente la variación del PI, tasa de progreso de enfermedad y ABCPEE en función de la densidad de inóculo de Foc y la temperatura de suelo. Los modelos indican que los valores umbrales de densidad de inóculo de Foc y temperatura del suelo necesarios para el desarrollo de epidemias severas de FVG, dependen de la virulencia de la raza del patógeno y en segundo término de la susceptibilidad del cultivar de garbanzo a ella. Así, para las razas 5 y 0 se alcanzaron valores intermedios de las variables dependientes citadas en los cvs. PV-61 y P-2245 a 24±2°C y 26±2°C, respectivamente. Por otra parte, los valores umbrales de densidad de inóculo para la raza 5 más virulenta fueron de 1 a 5 ufc/g suelo en P-2245 y 10 a 100 ufc/g suelo en PV-61. En cambio, para la combinación Foc-0 y cv. P-2245 dichos umbrales fueron de 5 a 20 ufc/g suelo.

La utilización de los modelos desarrollados en este trabajo facilitará la mejor elección del lugar de siembra en función de la raza del patógeno presente en el suelo, su densidad de inóculo, la resistencia del cultivar de garbanzo y las condiciones ambientales, minimizando así el riesgo de epidemias severas.

ESTUDIO DE LAS POBLACIONES DE *Cryphonectria parasitica* EN CASTAÑOS DE GALICIA

AGUÍN, O.; MANSILLA, J.P.; PINTOS, C.

Estación Fitopatológica Do Areeiro. Excmá Diputación Provincial de Pontevedra Subida a la Robleda s/n 36153.Pontevedra. E-mail: efa@efa-dip.org

El castaño es una especie forestal de gran importancia en la economía gallega destacando por su buen aprovechamiento tanto para madera como para producción de fruto. Una de las enfermedades más graves que afecta a esta especie y que provoca graves pérdidas se conoce con el nombre de chancro y está causada por *Cryphonectria parasitica*. En la actualidad se sabe que este patógeno se encuentra prácticamente en todos los castañares de Galicia pero no existen estudios de localización y distribución. El objetivo de este trabajo, realizado en colaboración con la consellería de Medio Ambiente de la Xunta de Galicia, es conocer la distribución de *Cryphonectria parasitica* en las masas de castaño en Galicia, detectar la posible presencia de cepas hipovirulentas y conocer la estructura y diversidad de los grupos de compatibilidad vegetativa. Se realizó un muestreo en las cuatro provincias gallegas, visitando 130 ayuntamientos e inspeccionando 1060 puntos. En total se recogieron 466 muestras sintomáticas de corteza de castaño. En laboratorio y, tras un proceso de desinfección superficial, el material vegetal se sembró en el medio de cultivo PDAMB. La virulencia de los aislados se determinó por el análisis de las características morfológicas y por extracción del dsRNA. El estudio de la compatibilidad vegetativa de los aislados de *C. parasitica* se llevó a cabo en el medio PDAG. Los grupos de compatibilidad se confrontaron con cepas de referencia europeas de los grupos EU1 al EU64. La mayoría de las muestras de corteza estaban afectadas por cepas virulentas de *C. parasitica*, detectándose dos cepas hipovirulentas en la provincia de Lugo. Aunque se encontraron 8 grupos de compatibilidad vegetativa, el 70 % de los aislados perteneció a un único grupo. Sólo el tipo de compatibilidad denominado E (8% de los aislados) fue compatible con una cepa de referencia europea, la EU1. Este trabajo ha sido cofinanciado con fondos FEOGA de la Unión Europea.

RT-PCR A TIEMPO REAL PARA LA DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DEL VIRUS DE LA SHARKA EN PULGONES

OLMOS, A.; BERTOLINI, E.; GIL, M.; CAMBRA, M.

Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA). Dpto. de Protección Vegetal y Biotecnología. Carretera Moncada-Náquera Km 5. 46113 Moncada, Valencia.
aolmos@ivia.es

La viruela (sharka en búlgaro) de los frutales de hueso, está causada por el *Plum pox virus* (PPV). Este virus se transmite de forma no persistente por pulgones que dispersan la infección. Todavía no se ha estimado el número de viriones que es capaz de adquirir un vector o la carga viral mínima que un vector necesita para ser infectivo, empleando las herramientas disponibles. Por este motivo, se ha desarrollado un protocolo que permite la cuantificación de dianas virales a partir de pulgones individuales escachados en papel. La extracción de las dianas se realizó con Triton X-100 al 0.5%, empleándose directamente 5 µl como muestra para la PCR a tiempo real mediante la química TaqMan. Su optimización requirió el diseño de nuevos iniciadores, sondas internas y el alineamiento de las secuencias de PPV disponibles en bases de datos. Para establecer la curva patrón se insertó una secuencia diana específica de PPV en el pGEM-T bajo el promotor T7. Los transcritos generados *in vitro* a partir de este vector se purificaron, fueron cuantificados y se estimó el número de copias. El método fue evaluado utilizando pulgones recolectados en campo y se comparó la capacidad de detección del método con nested RT-PCR en un solo tubo cerrado. Se estudió la adquisición de virus por pulgones vectores (*Myzus persicae*) y no vectores (*Aphis nerii*) de PPV a diferentes tiempos. El análisis de pulgones de campo mostró que la sensibilidad alcanzada por la PCR a tiempo real fue similar a la de nested RT-PCR en un solo tubo cerrado. Los resultados del estudio de los tiempos de adquisición indicaron que a mayor tiempo se detectaron menor número de *M. persicae* portadores de PPV. Además se observó que los pulgones no vectores *A. nerii* fueron capaces de adquirir PPV. La cantidad de viriones acarreados por los pulgones varió entre 1 y 1032 unidades. Además, el método se comparó con ELISA-DASI empleando el anticuerpo monoclonal 5B-IVIA. Para ello se prepararon diluciones seriadas de extractos de *Nicotiana benthamiana* infectada y se buscó establecer algún tipo de relación entre valores ELISA y número de dianas. Ambos parámetros pudieron asociarse, en un determinado rango, mediante dos funciones matemáticas.

***Erwinia persicina*, PATÓGENO DE LA JUDÍA (*Phaseolus vulgaris* L.) EN EL SUDESTE ESPAÑOL**

GONZÁLEZ, A.J.¹; TELLO, J.C.²; DE CARA, M.²

¹Laboratorio de Fitopatología. SERIDA. Carretera de Oviedo s/n, 33300 Villaviciosa. Asturias. e-mail: anagf@serida.org.

²Dpto. de Producción Vegetal. Escuela Politécnica Superior. Universidad de Almería.

En noviembre de 2003 se observó en el cultivo de judía verde del sudeste español una patología, de etiología desconocida, que consistía en manchas cloróticas y necróticas en hojas y deformación de las vainas. En 2004 se realizó un análisis bacteriológico de muestras de hojas y vainas de la variedad "Donna" procedentes de Granada de las que se aisló una bacteria fermentativa como única o mayoritaria en todas las muestras analizadas. Para comprobar el poder patógeno de esta bacteria, se seleccionaron tres aislamientos. El método utilizado fue la pulverización, mediante un aerógrafo, de una suspensión bacteriana del cultivo de una noche (10^8 - 10^9 ufc/ml) sobre plántulas de judía variedad "Andecha" (cuatro plantas por inoculación). Las plántulas se mantuvieron tapadas durante 48h con una bolsa de plástico transparente. El ensayo se repitió dos veces. En las plantas infectadas artificialmente se reprodujeron los síntomas mostrados por las muestras analizadas, incluida la deformación de una parte importante de las vainas que aparecen curvadas en las plantas inoculadas y no en las testigo. De las zonas dañadas se aisló una bacteria con características idénticas a la inoculada.

La identificación del patógeno se realizó mediante la secuenciación del gen que codifica el ARN ribosomal 16S (ADNr 16S). La secuencia obtenida se comparó con las registradas en bancos de datos (www.ncbi.nlm.nih.gov). El mayor porcentaje de homología (99%) se obtuvo, en los tres casos, con el ADNr 16S de *Erwinia persicina*. Por ello, la bacteria causante de esta patología pudo asignarse claramente a esta especie.

E. persicina fue descrita en 1981 como responsable de una infección en judía en EEUU. También se describió en tomate, plátano y pepino en Japón. Se ha notificado su presencia en una muestra clínica en EEUU y en una alimentaria en Alemania; sin embargo, esta es la primera descripción de este patógeno causando enfermedad en judías en España y, por lo que conocemos también en Europa.

IDENTIFICACIÓN DE DOS MOLÉCULAS DE CARACTERÍSTICAS SIMILARES A LOS VIROIDES EN DOS ESPECIES DE GÉNEROS AFINES A LOS CÍTRICOS

BARBOSA, C.; SERRA, P.; DURÁN-VILA, N.

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

Un estudio dirigido a evaluar la susceptibilidad-resistencia de especies de cítricos y géneros afines a viroides, permitió identificar *Eremocitros glauca*, *Atalantia citroides* y *Microcitrus australis* como especies candidatas en las que pudieran hallarse fuentes de resistencia. Cuando dichas especies se inocularon con una mezcla artificial de las cinco especies de viroides que infectan a los cítricos (viroide de la exocortis de los cítricos - CEVd, viroide de la hoja curvada de los cítricos - CBLVd, viroide del enanismo del lúpulo - HSVd, viroide III de los cítricos - CVd-III y viroide IV de los cítricos - CVd-IV), no se detectó ninguno de ellos mediante los métodos de análisis habituales. Sin embargo, en *A. citroides* y en *M. australis* se identificaron dos RNAs de características similares a los viroides, que no hibridaron con sondas específicas para cada uno de los viroides inoculados. Dichos RNAs, a los que tentativamente hemos denominado viroide de *A. citroides* (AcVd) y viroide de *M. australis* (MaVd) no se detectan en los controles no inoculados ni en las plantas madre del Banco de Germoplasma utilizadas como fuente de material vegetal para la propagación de dichas especies.

El análisis por sPAGE de AcVd y MaVd muestra que presentan distinta movilidad electroforética, que en ambos casos es intermedia a la de las formas circulares de HSVd y CVd-III. Los trabajos en curso para su caracterización han permitido demostrar que las preparaciones purificadas de AcVd son infecciosas y contienen RNAs con movilidades electroforéticas características de las formas circulares y lineales de los viroides.

BIOCONTROL EN POSTCOSECHA DE CEREZA MEDIANTE FILTRADOS PROTEICOS DE *Trichoderma* spp.

ALONSO, J.¹; SOTELO, C.E.¹; ALIQUE, R.¹; GÓMEZ, M.I.²; DE LA VIÑA, G.²; AZPILICUETA, A.²; MONTE, E.³; LLOBELL, A.⁴

¹Instituto del Frío (CSIC). C/ José Antonio Novais, 10. Ciudad Universitaria 28040-Madrid, España. E-mail: jalonso@if.csic.es.

²Newbiotechnic S.A. Parque Científico – Tecnológico “Isla de la Cartuja”. Avda. Américo Vespucio no. 69, 41092 – Sevilla, España.

³Centro Hispano-Luso de Investigaciones Agrarias. Universidad de Salamanca.

⁴Instituto de Bioquímica Vegetal y Fotosíntesis (CSIC)-Universidad de Sevilla. Avda. Américo Vespucio s/n, 41092 Sevilla

Las pérdidas económicas debido a enfermedades postcosecha en cereza representan un problema de gran importancia con vistas a garantizar la competitividad de estos frutos en el mercado nacional e internacional. Actualmente no se dispone de ningún fungicida químico ni de ningún agente de biocontrol aprobado por el registro europeo para su aplicación en postcosecha. *Trichoderma* spp. son conocidas por ser eficientes productores de enzimas líticas que han mostrado un alto potencial para controlar efectivamente a los hongos patógenos. En este contexto, hemos evaluado la capacidad de dos filtrados proteicos de *Trichoderma* (NBT-T54 y NBT-T58), en su capacidad de biocontrol de las enfermedades causadas por los hongos patógenos más importantes responsables de las pérdidas que se producen en postcosecha de cereza son *Penicillium expansum*, *Botrytis cinerea* y *Monilia fructigena*, primeramente a escala de laboratorio, utilizando infecciones artificiales de los frutos y, posteriormente, a escala semi-industrial en colaboración con la Agrupación de Cooperativas Valle del Jerte. Los filtrados proteicos fueron seleccionados por su capacidad fungicida y de inducción de resistencia sistémica en plantas, y se caracterizaron bioquímicamente. Los frutos fueron inoculados artificialmente con suspensiones de 15, 35 y 50 conidios / μ l de *P. expansum*, *B. cinerea* y *M. fructigena* respectivamente. Después de 1 h a 20°C, fueron tratados con los filtrados proteicos NBT-T54 y NBT-T58 a concentraciones de 10 o 50 ppm, durante 30 s y se almacenaron a 20 °C. Diariamente se determinó el número de frutos infectados y el diámetro de las lesiones. NBT-T54 y NBT-T58 ralentizaron el desarrollo de las infecciones y el tamaño de las lesiones producidas por *M. fructigena*, mientras que NBT-T58 10 ppm ralentizó el desarrollo de las infecciones de *P. expansum*. La aplicación de los tratamientos a escala semi-industrial fue realizada mediante nebulización. Los resultados obtenidos ponen de manifiesto la inducción de mecanismos de resistencia en los frutos tratados con los filtrados proteicos de *Trichoderma* NBT-T54 y NBT-T58 y que estos extractos no afectaron desfavorablemente la calidad de los frutos de cereza.

CARACTERIZACIÓN DE *Cylindrocarpon cylindroides* COMO POTENCIAL AGENTE DE CONTROL BIOLÓGICO DEL NEMATODO DE LOS CÍTRICOS, *Tylenchulus semipenetrans*

VIERA, A.¹; VERDEJO-LUCAS, S.¹; GENÉ, J.²; SORRIBAS, F.J.³

¹Protección Vegetal, IRTA, Crta de Cabrils s/n, 08348 Cabrils, Barcelona.

²Universitat Rovira i Virgili, 43201 Reus, Tarragona.

³ESAB-UPC Comte d'Urgell 187, 08036 Barcelona.

Cylindrocarpon cylindroides se encontró parasitando huevos, hembras y estadios vermiformes de *Tylenchulus semipenetrans* en un 21% de las 48 parcelas de cítricos muestreadas en Cataluña, siendo ésta la primera vez que se cita esta especie fúngica como antagonista del nematodo de los cítricos. El objetivo de este trabajo fue caracterizar el potencial de *C. cylindroides* como agente de control biológico del nematodo. Las parcelas donde se había detectado el hongo se muestrearon una segunda vez para determinar los niveles poblacionales del nematodo y el porcentaje de parasitismo fúngico. El número de hembras y huevos por gramo de raíz oscilaba entre 257 y 448 ($x = 320$), y 8.080 y 22.540 ($x = 12.930$), respectivamente, mientras que el número de juveniles (J2) en suelo variaba entre 2.010 y 19.020 J2 por 250 cm³ de suelo ($x = 9.485$). El porcentaje de huevos parasitados oscilaba entre 0,2 y 4,3% ($x = 1,97\%$). *Cylindrocarpon cylindroides* coexistía con otros hongos como *Paecilomyces lilacinus* y *Verticillium fungicola* en las parcelas de cítricos. Se determinó la tasa de crecimiento diario de cinco aislados seleccionados del hongo en PDA, CMA y agar-agua comprobándose que los aislados no diferían en cuanto a su tasa de crecimiento y que crecían más rápido en CMA (6,73 mm día⁻¹) que en agar-agua (5,74 mm día⁻¹) o PDA (3,93 mm día⁻¹). Sin embargo, la producción de esporas fue mayor en PDA ($53,8 \times 10^4$ cm⁻²) que en agar-agua ($4,1 \times 10^4$ cm⁻²) o CMA ($1,4 \times 10^4$ cm⁻²). Los aislados se incubaron a 5, 10, 15, 20, 25, 30, y 35° C, observándose el mayor desarrollo micelial entre 15 y 25° C. La temperatura de 35° C resultó letal para todos los aislados mientras que 30° C y temperaturas inferiores a 10° C eran subóptimas. *Cylindrocarpon cylindroides* producía más esporas en PDA a 10 y 30° C que a 25° C, la temperatura óptima de crecimiento micelial. La mayoría de los aislados produjeron pigmentos difusibles en PDA. Se ha comprobado que el hongo es capaz de colonizar la rizosfera de cítricos mediante inoculaciones controladas *in vitro*. En la actualidad, se está determinando la capacidad de *C. cylindroides* de parasitar huevos del nematodo en plántulas de cítricos en condiciones de invernadero.

EFFECTO DE TRATAMIENTOS QUÍMICOS SOBRE LA DINÁMICA DE LAS POBLACIONES EPÍFITAS DE *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*, CAUSANTE DE LA TUBERCULOSIS DEL OLIVO, Y SOBRE LA ENFERMEDAD

QUESADA, J.M.¹; PENYALVER, R.¹; SALCEDO, C.I.¹; RUIZ, M.L.²; LÓPEZ, M.M.¹

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

²Laboratorio Agroalimentario. Pintor Goya, 8. 46100 Burjassot, Valencia

La tuberculosis del olivo está causada por la bacteria *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* (Pss). Los síntomas más característicos son la formación de tumores en tronco, ramas y brotes. Las principales medidas de control de la tuberculosis son los tratamientos con derivados del cobre. Se ha evaluado el efecto de varios tratamientos químicos sobre las poblaciones epífitas de Pss y la enfermedad que causa, así como sobre la producción de aceitunas y la calidad del aceite de oliva. En una parcela experimental con olivos de las variedades 'Arbequina' y 'Picudo', se han evaluado, desde 2001, los siguientes tratamientos: oxiclورو de cobre (Cu 50%), sulfato cuprocálcico (Cu 20%+Mancozeb 8%) y el inductor de resistencia Bion® (Novartis). Se realizó un diseño al azar con dos bloques de 10 olivos para cada tratamiento. Las poblaciones epífitas de Pss se cuantificaron por separado en tallo y hoja en cada estación en los medios PVF-1 y King B, en muestras asintomáticas de 5 olivos por bloque. Además, se evaluó el número de tumores por planta, la producción y la calidad del aceite de oliva en cada tratamiento.

Los dos tratamientos cúpricos redujeron, tanto la proporción de muestras en las que se aisló Pss del total de muestras analizadas, como las poblaciones epífitas de Pss en las dos variedades, después de 5 aplicaciones. El número de tumores por tratamiento fue más bajo en las plantas tratadas con los derivados cúpricos, que en los olivos control. Solamente los olivos tratados con oxiclورو de cobre tuvieron una producción mayor que las plantas control. El tratamiento con Bion® disminuyó la proporción de muestras en las que se aisló Pss del total de muestras analizadas y sus poblaciones epífitas, pero solamente en 'Picudo'. El número de tumores por tratamiento en las olivos tratados con Bion® fue similar al de las plantas control en ambas variedades, pero en los olivos tratados se observó una producción mayor que en los controles. No se observó un efecto de la enfermedad ni de los tratamientos preventivos, en los parámetros fisicoquímicos de calidad del aceite de oliva evaluados.

EFFECTIVIDAD DE TRES ESPECIES DE *Glomus* COMO AGENTES DE BIOCONTROL DE LA “SECA” DEL PIMIENTO INDUCIDA POR *Verticillium*

GOICOECHEA, N.; GARMENDIA, I.; AGUIRREOLEA, J.

Departamento de Fisiología Vegetal. Facultades de Ciencias y Farmacia. Universidad de Navarra. c/Irunlarrea s/n 31008-Pamplona. E-mail: niegoi@unav.es

Verticillium dahliae Kleb. es un patógeno vascular que provoca drásticas pérdidas en la producción de pimiento. Su control es difícil, ya que puede sobrevivir en el suelo durante años bajo diferentes formas de resistencia. Por otro lado, las crecientes restricciones en el uso de productos químicos inducen a buscar otras alternativas para controlar la enfermedad causada por este patógeno que, además, sean respetuosas con el medio ambiente. Una de estas alternativas sería la utilización de técnicas de biocontrol. En este sentido, numerosos estudios han constatado que la asociación simbiótica entre las raíces de las plantas superiores y los hongos micorrízico-arbusculares (MA) no sólo desempeña un papel esencial en la nutrición vegetal sino que también puede proteger a las plantas contra diversos patógenos edáficos.

Por todo ello, el objetivo del presente trabajo fue evaluar la influencia de tres especies de *Glomus* – *Glomus mosseae* (Nicol. and Gerd.) Gerd. and Trappe, *Glomus intraradices* (Schenck and Smith) y *Glomus deserticola* (Trappe, Bloss and Menge)- sobre el desarrollo de la enfermedad de la “seca” o “tristeza” inducida por *Verticillium* en plantas de *Capsicum annuum* cv. Piquillo. Los resultados mostraron notables diferencias entre estas especies de hongos MA como agentes de biocontrol de la “seca”. La severidad de la enfermedad, en términos de crecimiento vegetativo y producción de fruto, fue mayor en las plantas colonizadas por *G. intraradices* que en el tratamiento no micorrizado. Por otro lado, *G. mosseae* favoreció el desarrollo vegetativo de las plantas de pimiento y adelantó el comienzo de la floración. Sin embargo, no mostró una clara capacidad bioprotectora contra la enfermedad. Únicamente las plantas colonizadas por *G. deserticola* mostraron tasas de producción más elevadas que aquéllas no micorrizadas y ello a pesar de que el tratamiento micorrizado recibió una fertilización fosforada más baja. Además, este incremento en la producción se observó tanto en las plantas sanas como en las enfermas. Los resultados sugirieron que una toma específica de fósforo más alta en las plantas asociadas a *G. deserticola* pudo contribuir a paliar el efecto negativo de *Verticillium* sobre la producción.

Este trabajo está financiado por la Fundación Universitaria de Navarra y Gobierno Vasco (AE-2000)

EFFECTO DE LA DINÁMICA DE POBLACIÓN DE *Penicillium frequentans* SOBRE EL BIOCONTROL DE *Monilinia* sp. EN HUERTOS COMERCIALES DE MELOTONEROS

GUIJARRO, B.¹; TORRES, R.²; OCHOA DE ERIBE, X.³; USALL, J.²; MELGAREJO, P.¹; DE CAL, A.¹.

¹Departamento de Protección Vegetal. INIA. Carretera de La Coruña Km 7,5. 28040 Madrid.

²UdL-IRTA, Av. Rovira Roure 191. 25198 Lleida.

³SIPCAM Prof. Báguena 5, 46009 Valencia. E-mail: bguijarr@inia.es

Penicillium frequentans es un agente de biocontrol eficaz contra la marchitez de brotes causada por *Monilinia laxa* en huertos experimentales de melotonero. Para ampliar la eficacia de *P. frequentans* frente a la marchitez de flores, yemas, chancros en ramas y/o podredumbre de frutos causada por el patógeno en los frutales de hueso es necesario mejorar su estabilidad y persistencia en el microambiente en el que actúa, mediante su formulación y un adecuado calendario de tratamientos. Para ello se estudió el efecto de distintos aditivos (estabilizantes, adherentes y desecantes) y el momento idóneo de aplicación de los mismos sobre la rehidratación, estabilidad y adherencia de conidias de *P. frequentans*. Los coadyuvantes se aplicaron bien durante la fermentación o bien antes del secado del producto (con o sin desecantes) mediante lecho fluido. Glucosa (10%), glicerina (10%), glutamato sódico (10%) y alginato sódico (2%) mejoraron significativamente la viabilidad de las conidias almacenadas a tª ambiente durante un año. Conidias de *P. frequentans* formuladas con alginato sódico (2%) o carboximetilcelulosa (2%) aumentaron su adherencia a la superficie de los frutos. Se evaluó la eficacia de diferentes tipos de conidias de *P. frequentans* en seis huertos comerciales de melocotoneros y nectarinas de la provincia de Lérida durante las campañas 2001 (conidias frescas 10⁶ conidias/ml), 2002 (conidias secas 10⁷ conidias/ml), y 2003 (conidias formuladas 10⁷ conidias/ml). Los tratamientos se aplicaron en floración y precosecha con 3-5 aplicaciones por huerto y año. Los controles constaban de árboles sin tratar o pulverizados con un fungicida. Se analizó la relación de los diferentes tratamientos sobre la dinámica de población del agente de biocontrol sobre la superficie vegetal. Los tratamientos se aplicaron en bloques al azar, con 4 bloques por huerto y 4 árboles (100 frutos) por tratamiento y bloque. Las conidias formuladas aplicadas en floración y precosecha reducían la podredumbre de los frutos en postcosecha. La población de *P. frequentans* se mantenía en un nivel de 10⁵⁻⁶, aumentando especialmente durante la época estival sobre los frutos e inmediatamente después de las aplicaciones con conidias formuladas. Las conidias formuladas resultaban más eficaces sobre la podredumbre de los frutos y se mantenían más viables y menos susceptibles a las condiciones ambientales que las conidias frescas de *P. frequentans*.

UTILIZACIÓN DE POSIBLES ANTAGONISTAS EN EL CONTROL DE LA FUSARIOSIS DEL ESPÁRRAGO

BASALLOTE, M.J.¹; CORPAS, C.¹; MELERO, J.M.²

¹CIFA "Las Torres-Tomejil", IFAPA, Apdo. Oficial, 41200 Alcalá del Río (Sevilla) E-mail: ;

²Instituto de Agricultura Sostenible - CSIC, Apdo. 4084, 14080 Córdoba. E-mail: mariaj.basallote@juntadeandalucia.es

La rentabilidad del espárrago está estrechamente ligada con la longevidad y productividad del cultivo. El decaimiento prematuro de las plantaciones asociado con la fusariosis es una de las causas que la limitan. El control de la enfermedad es muy difícil debido a la prolongada supervivencia del patógeno en el suelo. Por ello, las medidas de lucha deben orientarse hacia una protección más duradera del material de siembra que la aportada por los tratamientos fungicidas realizados previamente a la plantación. Se ha sugerido, por tanto, el uso de microorganismos antagonistas que pueden ocupar el nicho de los aislados patógenos de *Fusarium*. Esta investigación ha tenido por objeto la selección de microorganismos antagonistas de la rizosfera y el rizoplaneo de plantas de espárrago, determinando su eficacia como agentes de biocontrol frente a la fusariosis.

Se efectuaron prospecciones en 11 plantaciones de espárrago afectadas por la fusariosis, en las principales zonas productoras andaluzas. En dichas inspecciones se tomaron muestras de plantas sintomáticas para corroborar la relación de *Fusarium* spp. Con los síntomas observados, y de plantas asintomáticas con objeto de recuperar los microorganismos asociados a rizosfera y rizoplaneo. La patogenicidad de los aislados de *Fusarium* recuperados fue evaluada *in vitro* en experimentos en ambiente controlado. Para una primera selección, se realizaron cultivos duales de los aislados de *Fusarium* que resultaron patógenos *in vitro* frente a los posibles antagonistas, obtenidos de plantas asintomáticas, del mismo campo. Además, se incluyeron dos aislados de *Trichoderma* de distinta procedencia los microorganismos que resultaron más efectivos fueron: *Trichoderma* sp. (22%), *Penicillium* sp. (56%) y *Aspergillus* sp. (22%), destacando *Trichoderma* sp. Por su mayor proporción de aislados antagonistas (83%).

En un experimento *in vitro* para evaluar la capacidad antagonista de 25 posibles agentes de biocontrol seleccionados, se inocularon plantas de dos semanas de edad con una suspensión de 10^7 conidias/ml de cada uno de los aislados fúngicos. Una semana más tarde, se aportó a cada planta 1 ml de suspensión de 10^5 conidias/ml de un aislado de *F. oxysporum* o *F. proliferatum* de virulencia intermedia. Los resultados obtenidos han mostrado una reducción notable en la severidad de los síntomas en las plantas de espárrago pre-inoculadas con 6 aislados de *Trichoderma* sp., incluidos los 2 no procedentes de espárrago, 4 de *Penicillium* sp. y uno de *Aspergillus* sp.

SUPERVIVENCIA EN LA RIZOSFERA DE AGUACATE Y CAPACIDAD DE BIOCONTROL DE AISLADOS BACTERIANOS ANTAGONISTAS FRENTE A *Rosellinia necatrix*

PLIEGO, C.³; GONZALEZ, M.A.³; CAZORLA, F.M.²; PÉREZ-JIMÉNEZ, R.M.³; RAMOS, C.¹

¹Área de Genética, Universidad de Málaga, 29071-Málaga, España, E-mail: corr@uma.es

² Departamento de Microbiología, Universidad de Málaga, 29071-Málaga, España; (3) IFAPA-CIFA-Málaga, CAP-Junta de Andalucía, Cortijo de la Cruz s/n; 29140-Churriana, Málaga, España

Estudios recientes sobre el comportamiento de cepas bacterianas en ambientes naturales han puesto de manifiesto la importancia de la competencia con otros microorganismos para la colonización eficiente de un determinado nicho ecológico. En este sentido, la colonización de la rizosfera de plantas por bacterias es un factor crucial para su utilización como inoculantes en agricultura sostenible. Con el objetivo último de controlar biológicamente la enfermedad fúngica que afecta más seriamente a cultivares de aguacate en la costa sur de España, la podredumbre blanca causada por *Rosellinia necatrix*, se aisló una colección de cepas bacterianas capaces de establecerse y sobrevivir en la raíz de plántulas de aguacate cultivadas *in-vitro*. La capacidad antagonista de estos aislados se analizó *in-vitro*; 10 de ellos inhibieron el crecimiento del hongo. Se estudiaron además dos características relacionadas con la capacidad de células bacterianas de colonizar la rizosfera; a) movilidad ('swimming', 'swarming', 'twitching') y b) producción de homoserinas lactonas (AHLs), involucradas en la regulación por 'Quorum Sensing'. Todos los aislados analizados mostraron al menos dos tipos de movilidad y tres de ellos produjeron AHLs detectables mediante inducción del promotor del operón lux de *Vibrio fischeri*. De entre las actividades antagonistas probadas, todas las cepas mostraron al menos una de las siguientes: producción de lipasas, quitinasas, celulasas, β -glucanasa, compuestos volátiles, antibióticos, sideróforos. En la actualidad, estamos analizando la capacidad de estos aislados de controlar biológicamente la infección de plántulas de aguacate por *R. necatrix* y la supervivencia en la rizosfera de los mismos a lo largo del tiempo. Con el objetivo de determinar la localización de las células bacterianas en raíces de aguacate, hemos marcado algunas de las cepas antagonistas con la gfp; el patrón de colonización lo analizaremos mediante microscopía de epifluorescencia y laser confocal.

ACTIVIDAD DE COMPUESTOS QUÍMICOS ESTIMULADORES DE DEFENSAS EN EL CONTROL DEL FUEGO BACTERIANO

RUZ, L.; MORAGREGA, C.; MONTESINOS, E.

Institut de Tecnologia Agroalimentaria-CeRTA-CIDSAV. Universitat de Girona. Campus de Montilivi. 17071. Girona. E-mail: lruz@intea.udg.es

El fuego bacteriano es una enfermedad muy grave causada por la bacteria *Erwinia amylovora*, que afecta a plantas de la familia de las Rosáceas. El control químico de la enfermedad es muy poco efectivo en plantas afectadas, por lo que sólo es eficaz preventivamente. De los compuestos químicos disponibles únicamente presentan eficacia los antibióticos (estreptomicina, kasugamicina, y oxitetraciclina) y derivados cúpricos. Con su aplicación se pretende disminuir la presencia de inóculo o inhibir la multiplicación de *E. amylovora*. Los nuevos productos estimuladores del sistema natural de defensa de la plantas (SAR) (fosetil-Al, etefon y benzotiadiazol), son productos químicos que aunque no presentan actividad antimicrobiana directa o la presentan sólo a altas concentraciones, reducen de manera significativa la severidad de la enfermedad, mostrando una eficacia moderada. Se ha evaluado la eficacia de diferentes productos químicos en el control de la enfermedad en peral, en condiciones de ambiente controlado. Su eficacia depende de la dosis y del intervalo de tiempo entre la aplicación del producto y la inoculación de la bacteria, ya que son necesarios varios días para inducir completamente las defensas de la planta. La eficacia del fosetil-Al y del benzotiadiazol en el control del fuego bacteriano, se puede mejorar cuando se combinan con antibióticos a la mitad de la dosis recomendada. Esta combinación puede realizarse de forma simultánea o separada en el tiempo. La aplicación simultánea es más práctica y fácil de realizar en campo, pero la aplicación por separado, permite un mejor nivel de control de la enfermedad, ya que se optimiza el momento de aplicación para cada uno de ellos. Los estudios histológicos y moleculares realizados mostraron que ni benzotiadiazol, ni fosetil-Al, ni etefon indujeron cambios estructurales en los tejidos de peral 7 días después de su aplicación. No obstante, después de la inoculación de *E. amylovora*, se observó una desorganización celular en las plantas tratadas con fosetil-Al y etefon, mientras que en las plantas tratadas con benzotiadiazol estas alteraciones tisulares se manifestaron de forma retardada. Entre algunos de los marcadores moleculares de SAR en manzano, sólo la quitinasa y β -1,3-glucanasa fueron inducidas en peral por benzotiadiazol y etefon, respectivamente.

DIVERSIDAD GENÉTICA DE LOS BEGOMOVIRUS ASOCIADOS CON LA ENFERMEDAD DEL RIZADO AMARILLO DEL TOMATE EN ITALIA Y ESPAÑA

GARCÍA-ANDRÉS, S.¹; ACCOTTO, G.P.²; NAVAS-CASTILLO, J.¹; MORIONES, E.¹

¹Estación Experimental "La Mayora", CSIC. 29750 Algarrobo-Costa, Málaga; ²Instituto de Virología Vegetal, CNR, 10135 Torino, Italia.

Los begomovirus (Género *Begomovirus*, familia *Geminiviridae*) asociados con la enfermedad del rizado amarillo del tomate (TYLCD) causan importantes daños económicos en los cultivos de tomate de Italia (Sicilia y Cerdeña) desde 1989 y de tomate y judía verde en el sur y sudeste peninsular español desde 1992. En Italia se han identificado dos cepas del begomovirus *Tomato yellow leaf curl Sardinia virus* como agentes causantes de las epidemias de TYLCD, la cepa tipo (TYLCSV) y la cepa Sic (TYLCSV-Sic). Sin embargo, se desconoce la predominancia o distribución de estos virus en las regiones afectadas. En el caso de España se han identificado diferentes begomovirus [*Tomato yellow leaf curl Sardinia virus* (TYLCSV), *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV) y *Tomato yellow leaf curl Málaga virus* (TYLCMaIV)] como causantes de las epidemias. Aunque se han realizado estudios de la variabilidad de las poblaciones de estos virus, la posible aparición de nuevas especies y el gran dinamismo de las poblaciones hace que en la actualidad se desconozca la estructura y la diversidad genética de los virus asociados con TYLCD en las diferentes regiones afectadas, aspectos esenciales para el diseño de estrategias de control duraderas.

Para caracterizar la estructura de las poblaciones de begomovirus presentes se han realizado muestreos al azar en las principales áreas de cultivo de tomate en Sicilia y Cerdeña en Italia, entre los años 1999 y 2003, y de tomate y judía en Almería, Málaga y Murcia en España, en el año 2003. Mediante análisis por hibridación molecular se han detectado las muestras infectadas por begomovirus asociados con TYLCD. A partir de las muestras infectadas, se han tomado muestras al azar en Italia y en España para el clonaje del genoma *quasi*-completo de los begomovirus presentes en ellas y el estudio de la secuencia de la región intergénica de uno de los clones obtenidos. Se presentarán en este trabajo los resultados obtenidos para tomate.

En todas las zonas muestreadas en Sicilia se detectaron aislados de las especies TYLCSV y TYLCSV-Sic durante la epidemia de 1999 que incluso se encontraron cohabitando en muchos invernaderos. También, en algunos casos, se detectaron ambas especies coinfectando una misma planta de tomate. En el año 2002 se detectó por primera vez la presencia de otra especie de begomovirus no descrita hasta ese momento en Italia, el TYLCV, apareciendo ya en un 50% de las muestras analizadas. Este año fue posible detectar TYLCSV, TYLCSV-Sic y TYLCV en una misma zona geográfica, incluso infectando los tres una misma planta. La situación en España aparece más compleja debido a la presencia de aislados de las especies TYLCSV, TYLCV, y TYLCMaIV, y de recombinantes entre ellos. En este trabajo se discutirán las posibles implicaciones de estos resultados en la dinámica de las poblaciones de los virus asociados con la enfermedad del rizado amarillo del tomate.

BEGOMOVIRUS QUE INFECTAN BATATA EN ESPAÑA

LOZANO, G.¹; NÚÑEZ, A.¹; VALVERDE, R.²; NAVAS-CASTILLO, J.¹

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

²Department of Plant Pathology and Crop Physiology, Louisiana State University, Baton Rouge, Louisiana, USA

La batata (*Ipomoea batatas*) es un cultivo propenso a acumular virus debido su propagación vegetativa. El sinergismo entre el crinivirus *Sweet potato chlorotic stunt virus* (SPCSV), y el potyvirus *Sweet potato feathery mottle virus* (SPFMV) causa la "enfermedad vírica de la batata" (SPVD), que constituye problema grave en amplias zonas de África. Durante la pasada década, se han observado plantas de batata que mostraban síntomas similares a SPVD en las principales zonas de cultivo españolas. Muestreos llevados a cabo durante el verano de 2002 en Málaga, Tenerife y Lanzarote, demostraron la presencia de SPCSV y SPFMV (Plant Disease 88: 428-428, 2004). En estos muestros, se observaron también síntomas distintos a los asociados a SPVD y similares a los causados por begomovirus (amarilleo de las nerviaciones y deformación de hojas). Se recogieron brotes de 21 plantas de batata que fueron injertados en los indicadores *I. setosa* o *I. nil*. Dos semanas después, se analizaron los nuevos brotes por PCR utilizando oligonucleótidos específicos para la secuencia del gen que codifica la proteína de la cápsida de los begomovirus que infectan especies del género *Ipomea*. Se obtuvieron fragmentos del tamaño esperado (823 pb) para la mayoría de las plantas analizadas. Los productos de PCR fueron clonados y al menos 10 clones de cada muestra se analizaron mediante RFLP. Se secuenciaron un total de 45 clones que pertenecían a 9 grupos definidos por RFLP. Los datos de secuenciación permitieron agrupar los aislados españoles en tres especies diferentes de begomovirus: i) *Sweet potato leaf curl virus*, ii) *Ipomea yellow vein virus*, una especie descrita previamente sólo en poblaciones de *I. indica* en España, y iii) un nuevo begomovirus no descrito previamente. La secuenciación completa del genoma del nuevo begomovirus clarificará su posición taxonómica y proporcionará herramientas para futuros estudios de su biología y epidemiología.

DETECCIÓN DEL VIRUS DEL MOSAICO DE LA LECHUGA EN *Myzus persicae* Sulzer Y SUS IMPLICACIONES EPIDEMIOLÓGICAS

MORENO, A.¹; BERTOLINI, E.²; OLMOS, A.²; DUQUE, M.¹; CAMBRA, M.²; FERERES, A.¹

¹ Centro de Ciencias Medioambientales, C.S.I.C., Serrano 115 Dpto., 28006 Madrid. E-mail: aranzazum@ccma.csic.es

² Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA), Carretera Moncada-Náquera km 5, 46113 Moncada, Valencia.

Una de las principales enfermedades de la lechuga está causada por el virus del mosaico (*Lettuce mosaic virus*, LMV). Este virus pertenece al género *Potyvirus* y es transmitido de forma no persistente por muchas especies de pulgones, siendo el más extendido en dicho cultivo en nuestro país. Para adoptar medidas de control es necesario conocer la abundancia relativa del vector (actividad vectorial) y su capacidad para transmitir el virus en campo (propensión vectorial). En el caso de los virus transmitidos de manera no persistente, es bien sabido que no todos los individuos portadores (virulíferos) son realmente transmisores, y por tanto, para estudios epidemiológicos, es importante conocer la relación existente entre ambas variables. Así, la detección del virus en el vector de una manera fiable y reproducible puede permitir evaluar el riesgo de aparición de epidemias. La detección de virus transmitidos de forma no persistente en sus vectores, es errática mediante técnicas inmunológicas, debido al bajo título viral, lo que requiere el uso de técnicas moleculares. En este trabajo, se han puesto a punto las técnicas IC-RT-PCR e IC-RT-Nested-PCR para la detección de LMV en material vegetal y en *Myzus persicae*, especie que resultó ser la más eficaz en la transmisión experimental de LMV. Además, se han ensayado diferentes inmunoglobulinas en el proceso de inmunocaptura, empleándose anticuerpos específicos de: LMV, *Plum pox virus* y generales para *Potyvirus*. La sensibilidad de ambos métodos aumentó cuando se usaron anticuerpos específicos del virus, aunque fue posible la detección viral utilizando los otros anticuerpos. La sensibilidad alcanzada por IC-RT-Nested-PCR fue al menos 100 veces superior a la de IC-RT-PCR. Actualmente se están realizando ensayos paralelos de transmisión y detección del virus en especies de pulgones vectores y no vectores. Esta información será empleada en el futuro para evaluar los riesgos de epidemias de LMV en base a la proporción de transmisores una vez identificada la especie de vector presente y conocido el número de insectos portadores del virus.

MANIPULACIÓN GENÉTICA DE *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*, VARIABILIDAD ENTRE AISLADOS NATURALES

PÉREZ-MARTÍNEZ, I.; MATAS, I.M.; RAMOS, C.

Área de Genética, Facultad de Ciencias, Universidad de Málaga. Campus de Teatinos s/n, 29071-Málaga. E-mail:crr@uma.es

La bacteria *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* (Pss), es el agente causal de la tuberculosis del olivo, enfermedad cuyos síntomas más característicos, debidos a la producción bacteriana de fitohormonas en los tejidos vegetales, se presentan en forma de tumor o agalla en tallos, ramas y troncos. Hasta la fecha, la biología molecular de la formación de tumores por aislados bacterianos pertenecientes a esta especie, se ha estudiado mayoritariamente utilizando cepas de *P. savastanoi* aisladas de tumores de adelfa (*P. savastanoi* pv. *nerii*), sin embargo, pocos estudios han abordado esta patología con aislados de olivo. Este trabajo se ha dirigido a caracterizar la accesibilidad a manipulación genética de cepas de Pss utilizando herramientas moleculares comunes en otras *Pseudomonads*. En primer lugar, se probó a 23 cepas de Pss con diferente origen, 13 de ellas aisladas en España, la capacidad de captar mediante conjugación el plásmido de amplio espectro de huésped pBBR1-MCS2. 13 cepas mostraron frecuencias de conjugación mayores a 1×10^{-5} y fueron seleccionadas para analizar su capacidad de aceptar transposones (mini-Tn5 con diferentes genes marcadores: lux y gfp). Las cepas Españolas resultaron ser las más recalcitrantes y solo 5 del resto de las cepas aceptaron todas las construcciones probadas (frecuencias de transposición 1×10^{-5} - 1×10^{-10}); estas se seleccionaron para analizar su capacidad de aceptar el plásmido pBBR1-MCS2 mediante electroporación. Las frecuencias de transformación obtenidas cuando el plásmido se aisló de *E. coli* DH5 α oscilaron entre 1×10^2 - 1×10^5 transformantes/ μ g de ADN, sin embargo, esta frecuencia mejoró hasta 4 órdenes de magnitud cuando el mismo plásmido procedía de una cepa de Pss o de una cepa de *E. coli* carente de todos los sistemas de modificación/restricción descritos. La estabilidad de este plásmido en ausencia de presión selectiva varió entre estas cinco cepas, aunque 3 de ellas lo mantuvieron al 100% durante más de 90 generaciones.

DIVERSIDAD GENÉTICA Y PATOGÉNICA EN *Verticillium dahliae* QUE INFECTA ALCACHOFA EN LA COMUNIDAD VALENCIANA

OLIVARES-GARCÍA, C.¹; COLLADO-ROMERO, M.²; GIMÉNEZ-JAIME, A.³; MERCADO-BLANCO, J.²; BEJARANO-ALCÁZAR, J.⁴; RODRÍGUEZ-JURADO, D.¹; ARMENGOL, J.³; PÉREZ-ARTÉS, E.²; GARCÍA-JIMÉNEZ, J.³; JIMÉNEZ-DÍAZ, R.M.^{1,2}

¹ ETSIAM, Universidad de Córdoba, Apdo. 3048, 14080 Córdoba. ag1jdir@uco.es

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

³ Instituto Agroforestal Mediterráneo, Univ. Politécnica, Camino de Vera s/n, 46022. Valencia

⁴ CIFA "Alameda del Obispo", Apdo. 3092, 14080 Córdoba.

La estructura genética y diversidad patogénica en las poblaciones de *Verticillium dahliae* determina la utilización eficiente de la resistencia en el huésped como estrategia de control de las Verticilosis de cultivos. En este trabajo, hemos: a) investigado dicha estructura en *V. dahliae* que infecta alcachofa en la Comunidad Valenciana mediante análisis de la diversidad en grupos de compatibilidad vegetativa (VCG); b) evaluado la diversidad molecular en los VCGs identificados y; c) determinado si existe asociación entre VCG y virulencia de los aislados sobre alcachofa y algodón. Un total de 109 aislados monoconídicos de *V. dahliae* de alcachofa en las provincias de Alicante, Castellón y Valencia se asignaron a VCGs mediante complementación auxotrófica de sus mutantes espontáneos no utilizadores de nitrato (*nit*) con testores *nit* universales de los VCG1A, 2A, 2B, 3, 4A, y 4B. De 109 aislados estudiados, 0,9% se asignaron al VCG1A, 28,4% al VCG2A, 66,1% al VCG2B, 2,8% al VCG4B, y dos aislados (1,8%) resultaron autoincompatibles. De los 72 aislados asignados al VCG2B, 21 no complementaron con los testores universales y se asignaron al subgrupo VCG2Ba, pero lo hicieron con aislados del VCG2B de alcachofa compatibles con aquéllos (VCG2Bu). Además, los perfiles de amplificación en análisis PCR duplex segregaron a los aislados del VCG2B en dos grupos, de manera que los del VCG2Ba produjeron un solo perfil mientras que los del VCG2Bu produjeron el perfil PCR del VCG2Ba, u otro perfil de amplificación que comparten con los VCG2A y VCG4B y es característico de *V. dahliae* no defoliante de algodón y olivo. El aislado del VCG1A amplificó los marcadores característicos del patotipo defoliante, uno de los cuales forma parte del perfil PCR del VCG2Ba. Los aislados del VCG2B (VCG2Ba y VCG2Bu) fueron más virulentos sobre alcachofa que los del VCG2A, y dentro del VCG2B existieron diferencias de virulencia asociadas con el marcador molecular. Por el contrario, los aislados del VCG1A fueron los menos virulentos de los ensayados en alcachofa. Dicho patrón de virulencia de *V. dahliae* asociado a VCGs cambió en algodón; siendo los aislados del VCG1A más virulentos que el resto y los del VCG2Bu más virulentos que los del VCG2Ba; sin embargo, las diferencias de virulencia sobre alcachofa asociadas al marcador molecular se mantuvieron en algodón. Subvencionado por el Proyecto CICYT AGL2000-1444.

EVOLUCIÓN ESPACIO TEMPORAL DE LAS ENFERMEDADES DE MADERA EN VID EN LA D.O. "VINOS DE MADRID"

REDONDO, C.¹; TELLO, M.L.¹; GAFORIO, L.¹; MATEO-SAGASTA, E.²

¹ Instituto Madrileño de Investigación Agraria y Alimentaria (I.M.I.A.). Autovía del Nordeste A-2, km 38.200, 28800 Alcalá de Henares, Madrid

² Cátedra de Patología Vegetal. E.T.S.I.Agrónomos. Universidad Politécnica de Madrid. Avd. Ciudad Universitaria s/n. 28040 Madrid.

La epidemiología de las enfermedades de degradación de la madera de vid ha sido uno de los aspectos fitopatológicos menos conocidos en el estudio de estas patologías. Existen importantes limitaciones que dificultan el análisis epidemiológico de la enfermedad, como son el comportamiento errático de la aparición de la sintomatología o la lentitud de progresión de la misma. Por ello, para la obtención de resultados fiables se requiere que el estudio de parcelas sintomáticas sea continuado y realizado durante amplios periodos. Ampliando los trabajos iniciados en años anteriores, en el presente estudio, se ha definido la distribución en el tiempo y en el espacio de las cepas sintomáticas, basándonos en los planos en bidimensionales de las parcelas construidos durante años sucesivos en viñedos afectados por la enfermedad.

Se han definido dos tipos de parámetros evaluadores de la enfermedad, los síntomas presentes en hojas y frutos, propios de los muestreos de verano, y las necrosis y presencia de carpóforos durante el invierno. Ha sido estudiada la progresión de la enfermedad comparando entre sí muestreos realizados en todos los ciclos estacionales.

Se observa un aumento significativo de la incidencia de la enfermedad en los últimos años, tanto en el número de viñedos afectados como en la cantidad de plantas enfermas en los mismos. También se ha constatado la importancia de la meteorología de cada periodo de estudio en la aparición de síntomas, detectándose correlaciones significativas entre algunas variables climatológicas y epidemiológicas.

La distribución de las cepas sintomáticas en el espacio sigue, en general, patrones aleatorios entre cepas adyacentes y agregados cuando consideramos superficies de mayor tamaño. La distribución espacial de la enfermedad sugiere que la dispersión de las conidias ha de realizarse a través del viento, generando eventos de infección a larga distancia, con gradientes de dispersión secundarios.

VIRULENCIA DIFERENCIAL DE LOS PATOTIPOS DEFOLIANTE Y NO DEFOLIANTE DE *Verticillium dahliae* SOBRE ESPECIES UTILIZADAS COMO CUBIERTAS VEGETALES EN OLIVAR

BEJARANO-ALCÁZAR, J.; RODRÍGUEZ-MORCILLO, V.; CABEZA-FERNÁNDEZ, E.

CIFA "Alameda del Obispo". Instituto de Investigación y Formación Agroalimentaria y Pesquera. Apdo. 3092. 14080 Córdoba. E-mail: jose.bejarano@juntadeandalucia.es

Los sistemas de manejo del suelo en el olivar basados en la siembra de cubiertas vegetales vivas en el centro de las calles, contribuyen a reducir las pérdidas de suelo causadas por la erosión y a mejorar la calidad de la producción obtenida. Sin embargo, la utilización de especies susceptibles a la Verticilosis podría favorecer el mantenimiento y multiplicación de las poblaciones de *Verticillium dahliae* en plantaciones de olivar. En este trabajo hemos evaluado la reacción de especies de elevado interés potencial como cubiertas vegetales, incluyendo gramíneas espontáneas: *Bromus diandrus*, *B. madritensis*, *B. rubens* y *Hordeum murinum*; y crucíferas cultivadas y silvestres: *Brassica carinata* (col de Etiopía), *B. rapa* spp. *rapa* (nabo forrajero), *Eruca vesicaria*, *Moricandia moricandioides*, *Raphanus sativus* (rábano) y *Sinapis alba*, a la infección por aislados representativos de los patotipos moderado no defoliante (ND) y severo defoliante (D) de *V. dahliae*. Como testigos de susceptibilidad conocida se incluyeron los cvs Acala SJ-2 y Crema 111 de algodónero, caracterizados como susceptible y tolerante a la Verticilosis en condiciones de campo, respectivamente. La inoculación de las plantas se realizó por inmersión del sistema radicular en una suspensión ajustada de conidias.

Los dos aislados, D y ND, de *V. dahliae* fueron patógenos sobre algodónero y las diversas especies de crucíferas investigadas. El patrón de virulencia varió según la especie estudiada. El aislado D fue significativamente más virulento que el ND en algodónero y en *R. sativus*, mientras que ambos aislados fueron similarmente virulentos en el resto de las especies de crucíferas. El aislado D causó en los dos cvs de algodónero síntomas foliares muy severos, incluyendo defoliación y muerte de las plantas, en contraste con el aislado ND que indujo en ambos cvs síntomas moderados sin defoliación. *B. carinata*, *B. rapa* spp. *rapa*, *E. vesicaria*, *M. moricandioides*, *R. sativus* y *Sinapis alba* se mostraron resistentes o moderadamente resistentes a la infección por los dos aislados, y desarrollaron síntomas foliares muy leves o leves tras la inoculación. Ninguno de los dos aislados indujo síntomas externos en las especies de gramíneas estudiadas, aunque ambos patotipos fueron reaislados con frecuencias moderadas o elevadas de la raíz y parte aérea de todas las especies al final de los experimentos. Hasta este momento, en suelos infestados naturalmente por *V. dahliae* no hemos detectado plantas enfermas de ninguna de las especies de gramíneas y de crucíferas evaluadas, y los intentos de aislar el patógeno de plantas de estas especies no han tenido éxito. Estos resultados sugieren que aunque estas especies podrían actuar como huéspedes sintomáticos o asintomáticos de los patotipos D y ND de *V. dahliae* en condiciones de elevado potencial de inóculo, posiblemente desempeñan un papel epidemiológico escasamente relevante en campos comerciales en relación al incremento de inóculo del patógeno.

Subvencionado por el Proyecto CAO00-019-C5-5

LOCALIZACIÓN DEL VIRUS DE LOS ANILLOS NECRÓTICOS DE LOS *Prunus* (PNRSV) EN LOS GRANOS DE POLEN DE ALBARICOQUERO: IMPLICACIONES EN SU TRANSMISIÓN POR POLEN Y POR SEMILLA

AMARI, K.¹; BURGOS, L.¹; PALLÁS, V.²; SÁNCHEZ-PINA, M.A.¹

¹CEBAS-CSIC, Campus Universitario de Espinardo, P.O. Box 164. 30100 Espinardo-Murcia.

²IBMCP (UPV-CSIC). Avda. de los Naranjos s/n. 46022 Valencia. España. E-mail: spina@cebas.csic.es.

El virus de los anillos necróticos de los *Prunus* (PNRSV) se transporta por el polen y la semilla y puede infectar a la mayoría de las especies de *Prunus*. La transmisión del PNRSV en la naturaleza ocurre durante los periodos de floración y polinización. Como hemos demostrado previamente, el PNRSV se localiza en el interior de los granos de polen de nectarina, lo que justificaría la transmisión vertical del virus en este árbol. Además, el virus puede reducir en un 30% el crecimiento de los árboles infectados y entre un 25 y 56% el rendimiento. En este trabajo, hemos usado árboles de albaricoquero de la variedad *Búlida* sanos e infectados. Los estudios se han realizado mediante hibridación molecular no radioactiva tipo "dot-blot" e hibridación *in situ* (HIS) al microscopio óptico. La sonda dig-RNA empleada se transcribió a partir del clon pPN-890 que corresponde al cDNA completo del RNA 4 del PNRSV. La HIS se realizó sobre cortes de 7 µm de material incluido en parafina y fijado en Karnovsky. El PNRSV se localiza en todos los órganos de las flores infectadas incluyendo pétalos, anteras, polen y ovarios. La presencia del virus en la superficie y en el interior de los granos de polen infectados fue demostrada por hibridación molecular. La HIS mostró la presencia del PNRSV en el citoplasma de las células vegetativa y generativa, alrededor del núcleo generativo. Además, el RNA del virus ha sido detectado, mediante HIS y "whole-mount" HIS, en las aperturas de los granos de polen maduros. Experimentos de germinación *in vitro* mostraron un porcentaje de germinación del 27% para el polen infectado frente a un 64% para el polen proveniente de árboles no infectados. El estudio mediante tinción con azul de anilina de pistilos sanos polinizados con polen infectado, puso de manifiesto un retraso de alrededor de 24 horas en el proceso de germinación comparado con el de los controles sanos. En resumen, la presencia del PNRSV en los granos de polen de albaricoquero no produce la inhibición total de su germinación ya que estos tubos polínicos son capaces de alcanzar el óvulo y fecundarlo. El retraso, de 24 horas, observado en la germinación de los granos de polen infectados no debe ser un factor limitante en la fecundación normal lo que llevaría a la transmisión viral a la siguiente generación. Trabajo financiado por el proyecto BIO2002-04099-C02-01 (DIGICYT-FEDER) del Ministerio de Ciencia y Tecnología.

RESISTENCIA GENÉTICA AL VIRUS DEL AMARILLO Y ENANISMO DE LAS CUCURBITÁCEAS (CYSDV)

ARANDA, M.A.¹; AGUILAR, J.M.²; MARCO, C.F.²; FRANCO, M.²

¹Centro de Edafología y Biología Aplicada del Segura (CEBAS)-CSIC. Apdo. correos 164. 30100 Espinardo. Murcia. E-mail: m.aranda@cebas.csic.es

²Estación Experimental "La Mayora"-CSIC. 29750 Algarrobo-Costa. Málaga. E-mail: j.m.aguilar@eelm.csic.es

El Virus del amarilleo y enanismo de las cucurbitáceas (CYSDV) es causante de la enfermedad del amarilleo que afecta cultivos de cucurbitáceas de España y otras partes del mundo dando lugar a graves pérdidas económicas. CYSDV pertenece al género *Crinivirus* (familia *Closteroviridae*), es transmitido por la mosca blanca *Bemisia tabaci* y su genoma consiste en dos moléculas de RNA monocatenario de sentido mensajero (RNAs 1 y 2). Nuestro grupo viene trabajando durante los últimos años en diversos aspectos relacionados con el control de CYSDV mediante el uso de resistencia genética del huésped. Así, hemos caracterizado desde el punto de vista fisiológico las resistencias a CYSDV que portan diversas entradas de melón y de pepino, hemos generado plantas transgénicas resistentes a CYSDV y hemos analizado la variabilidad genética de poblaciones naturales de CYSDV. Precisamente, estos dos últimos aspectos son los que se tratan en esta ponencia.

El módulo de resistencia que portaba la construcción de DNA utilizada para la transformación de plantas contenía, como elemento esencial, un fragmento de DNA de unos 700 pares de bases complementario a una región del RNA1 de CYSDV y su repetición invertida. En plantas de 10 de las 28 líneas supuestamente transgénicas caracterizadas, los síntomas de la enfermedad presentaron menor gravedad. De éstas, solamente las plantas de una línea de melón mostraron un menor nivel de acumulación de CYSDV que los correspondientes controles. Esta depresión de la acumulación de CYSDV estuvo asociada a la falta de detección de mRNA del transgén y a la detección de pequeños RNAs que hibridaron de forma específica con una sonda del transgén, aspectos que son consistentes con una resistencia al virus mediada por silenciamiento génico a nivel de RNA.

Por otra parte, hemos analizado la variabilidad genética de una población natural de CYSDV muestreada en Almería durante un periodo de ocho años. Para ello, hemos secuenciado aproximadamente el 14% del genoma de 35 aislados en cinco regiones genómicas distintas. El resultado más notable del trabajo consiste en que la población de CYSDV resultó ser muy homogénea. Además, los valores de diversidad y las relaciones entre las diversidades nucleotídicas en posiciones no sinónimas y sinónimas obtenidos para cada región genómica considerada por separado parecen indicar que el grado y la dirección de la selección son diferentes para las distintas regiones del genoma consideradas.

PLANTAS DE *Nicotiana benthamiana* TRANSFORMADAS CON REPETICIONES INVERTIDAS DE LA REPLICASA DE PMMoV EXHIBEN ELEVADA RESISTENCIA FRENTE A LA INFECCIÓN POR PMMoV

VARGAS, M.; BARAJAS, D.; ATENCIO, F.A.; GOYTIA, E.; TENLLADO, F.; DÍAZ-RUIZ, J.R.
 Departamento de Biología de Plantas, Centro de Investigaciones Biológicas, CSIC.
 Ramiro de Maeztu, 9. 28040, Madrid

El silenciamiento génico post-transcripcional (PTGS) es un mecanismo de degradación de RNA dependiente de homología de secuencia, que actúa como un sistema natural de defensa en plantas frente a infecciones virales. Se conoce además, que el RNA bicatenario (dsRNA) constituye el inductor de esta respuesta de defensa adaptativa y altamente conservada en la evolución. El dsRNA puede ser producido in vivo por la acción de RNA polimerasas dependientes de RNA celulares sobre un sustrato viral, o bien ser resultado del apareamiento intramolecular de regiones del RNA genómico viral. Alternativamente, el dsRNA puede ser expresado de forma estable por transgenes que codifican la transcripción de secuencias virales dispuestas en repetición invertida. Por tanto, la transformación genética de plantas con este tipo de construcciones representa una alternativa más eficiente para la obtención de resistencias a infecciones virales basadas en PTGS.

Comunicamos en este trabajo la generación de líneas transgénicas de *Nicotiana benthamiana* en las cuales se ha introducido un transgén que contiene una repetición invertida de la región 54-kDa del gen de la replicasa del virus del moteado suave del pimiento (PMMoV). La expresión de esta construcción produce la acumulación estable en la planta de un transcrito capaz de formar una estructura de RNA bicatenario. En ensayos de protección frente a PMMoV, cerca del 80% de estas líneas T0 regeneradas mostraron resistencia frente al virus. Por el contrario, construcciones dispuestas en repetición directa, que codifican la misma región del virus pero sin capacidad de hibridar intramolecularmente, mostraron resistencia al virus en tan solo un 10% de las líneas T0 regeneradas. La resistencia a PMMoV estuvo asociada con la acumulación de pequeños RNAs de 21 y 25 nt, característicos del PTGS, en un estadio previo a la infección viral. Se ha caracterizado una línea T2 en homocigosis, IR4, que expresa el RNA bicatenario. Esta línea ha sido sometida a títulos crecientes de inóculo viral en la hoja y a elevada presión de inóculo vía floema, mediante la utilización de injertos. En todos los casos, las plantas transgénicas mostraron un fenotipo de resistencia hasta el final del ciclo vital. Cuando estas plantas fueron inoculadas con otros tobamovirus, como TMV o ToMV, mostraron total susceptibilidad, indicando esto la alta especificidad en el mecanismo de defensa basado en PTGS.

ESPECIFICIDAD DE LA FATIGA DEL SUELO EN INVERNADEROS DE PIMIENTO

GUERRERO, M.M.¹; MARTÍNEZ, M.A.¹; BARCELÓ, N.¹; MARTÍNEZ, M.C.¹; ROS, C.²; LACASA, A.¹

¹ IMIDA, Mayor s/n. 30.150 La Alberca (Murcia)

² Programa de Colaboración FECOAM-CAAMA, Caballero, 13, 30.002 Murcia

El suelo de los invernaderos de pimiento de Murcia y Sur de Alicante se desinfectan todos los años con bromuro de metilo para el control de los patógenos (*Phytophthora capsici* y *Meloidogyne incógnita*) y para paliar el efecto depresivo producido por la reiteración del monocultivo (en más del 90% de los invernaderos) en el mismo suelo. La fatiga acumulada en estos suelos parece estar relacionada con el número de años en que el cultivo se reitera. Cuando se deja de realizar la desinfección en suelos de largo historial de monocultivo, los descensos en el desarrollo de las plantas y en la producción son superiores al 20% en el primer cultivo, en relación al suelo desinfectado. La próxima retirada del uso del bromuro de metilo para la desinfección de suelos, abre expectativas de nuevas estrategias para el control de los patógenos y para paliar los efectos de la fatiga. Con el fin de establecer estrategias sostenibles de manejo de estos suelos, en particular, de los no contaminados de patógenos, se han realizado estudios encaminados a conocer las características del efecto depresivo producido por la fatiga, en particular la especificidad. En invernaderos con diferentes antecedentes de antigüedad en el cultivo de pimiento (de 20 años a 5 años) se tomaron muestras del suelo; fracciones de estas muestras fueron desinfectadas con BrMe (98:2 a 60 g/m² con PE) o en autoclave a 120°C durante 1 hora, dejando una fracción sin desinfectar. Se realizaron bioensayos en cámara climatizada (23± 1°C; 45-60% HR en el periodo iluminado y 85-100% en el periodo oscuro de la jornada, fotoperiodo 14:10) utilizando el pimiento, el apio y la lechuga como plantas indicadoras que se cultivaron en el suelo de las distintas fracciones; se midió la altura de las plantas, el peso fresco y el peso seco tras un periodo fijo de desarrollo. La fatiga parece mostrarse específica para el pimiento en relación al apio, ya que, para el primer indicador, el desarrollo y el peso de las plantas aumenta al desinfectar el suelo, mientras que para el apio las plantas más altas y de mayor peso se obtuvieron en el suelo no desinfectado, habiendo diferencias significativas entre los dos tipos de desinfección; el historial próximo del suelo incide de forma proporcional en la respuesta obtenida en las fracciones desinfectadas y no desinfectadas. Cuando se utilizó la lechuga como indicador, la respuesta no fue tan clara como para el apio, influyendo el historial próximo del suelo de forma diferencial en las fracciones, de modo que no en todos los suelos las plantas de mayor tamaño y peso se obtienen en la fracción no desinfectada. La especificidad que la fatiga presenta frente al pimiento parece sería de naturaleza biológica, al desaparecer el efecto depresor cuando se desinfecta drásticamente el suelo con un biocida total.

IMPLEMENTACIÓN DE UNA ESTRATEGIA DE CONTROL INTEGRADO DE LA FUSARIOSIS VASCULAR DEL GARBANZO EN LA CUENCA MEDITERRÁNEA

LANDA, B.B.^{1,2}; NAVAS-CORTÉS, J.A.²; JIMÉNEZ-DÍAZ, R.M.^{1,2}

¹Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos y Montes, Universidad de Córdoba, Apdo. 3048, 14080 Córdoba.

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

La utilización de cultivares resistentes y el adelanto de la fecha de siembra es la estrategia más práctica y económicamente eficiente para el control de la Fusariosis Vascular del garbanzo (FVG) (*Fusarium oxysporum* f.sp. *ciceris*) en la Agricultura Sostenible. Sin embargo, dicha eficiencia y su aplicabilidad pueden verse comprometidas por la existencia de razas del patógeno altamente virulentas (resistencia raza-específica), y/o una elevada densidad de inóculo del patógeno en el suelo. Investigaciones anteriores demostraron la potencialidad de algunos agentes de control biológico (ACBs) para suprimir el desarrollo de la FVG en condiciones controladas, y que dicha supresión es influida por la naturaleza del genotipo de garbanzo, la densidad de inóculo de la raza del patógeno, y sus interacciones con el ambiente. En este trabajo se realizaron experimentos durante 3 años en campo para determinar la eficiencia de una estrategia de manejo integrado de la FVG, que combina la elección de la fecha de de siembra (enero, febrero y marzo), con la utilización de líneas de garbanzo (ICCV4, PV61, CA252 y CA 255) con resistencia parcial a la raza 5 del patógeno altamente virulenta, y el tratamiento único o combinado de la semilla y el suelo con ACBs (*Bacillus* spp., *Pseudomonas fluorescens* y un aislado no patogénico de *F. oxysporum*). Los resultados confirmaron el adelanto de la fecha de siembra como medida eficiente para retrasar el inicio y disminuir el desarrollo de las epidemias de la FVG, y paralelamente incrementar el rendimiento del cultivo. En las condiciones ambientales menos favorables para el desarrollo de la enfermedad (siembras en enero), el tratamiento con los ACBs contribuyó escasamente al control de la enfermedad. Sin embargo, dicho tratamiento en condiciones ambientales altamente favorables para el desarrollo de la FVG (siembras en febrero y marzo) contribuyó significativamente a retrasar el desarrollo de la enfermedad, e incrementar la emergencia de plantas y el rendimiento del cultivo. Nuestros resultados demuestran la importancia de integrar diferentes medidas de control, parcialmente efectivas por si solas, para contribuir a un control eficiente de la FVG y aumentar el rendimiento del garbanzo, en las condiciones que prevalecen en las áreas de cultivo de clima mediterráneo.

EFFECTO DE LA BIOFUMIGACIÓN CON SOLARIZACIÓN SOBRE LA MICOFLORA DEL SUELO EN CULTIVOS DE PIMIENTO EN INVERNADERO

MARTÍNEZ, M.A.¹; GUERRERO, M.M.¹; MARTÍNEZ, M.C.¹; BARCELÓ, N.¹; ROS, C.²; LACASA, A.¹; TELLO, J.C.³

¹ IMIDA, Mayor s/n. 30.150. La Alberca (Murcia).

² Programa de Colaboración FECOAM-CAAMA, Caballero, 13, 30.002 Murcia.

³ Producción Vegetal, Edificio CITE-II B, Universidad de Almería, Ctra. San Urbano s/n. 4.120 Almería.

La biofumigación con solarización o sola se presenta como un método de desinfección de suelos, basado en la acción de los compuestos volátiles que se generan en el proceso de biodescomposición de la materia orgánica sobre los patógenos de los cultivos. Su uso se está generalizando en cultivos de pimiento y tomate realizados en invernaderos del Sureste peninsular, donde se llevan a cabo prácticas de producción integrada y de agricultura ecológica. La implantación de esta forma de actuación sobre el suelo es reciente y se conoce poco acerca de sus efectos y sobre la sostenibilidad. Los suelos de los invernaderos de la zona antes mencionada y que se destinan al cultivo de pimiento se desinfectan todos los años para el control de los patógenos (*Phytophthora capsici* y *Meloidogyne incognita*) y para paliar los efectos depresivos de la fatiga del suelo motivada por el monocultivo ininterrumpido que se viene haciendo desde hace más de 15 años. En un invernadero experimental, con el suelo contaminado por *M. incognita*, donde se cultivaba pimiento por séptimo año consecutivo, se estableció un ensayo de bloques al azar con tres repeticiones por tratamiento, para evaluar el efecto de la reiterada desinfección del suelo mediante biofumigación con solarización (B+S) (al tiempo que se reducía la cantidad de enmienda orgánica utilizada de 7 kgm² de estiércol fresco de oveja + 3 kg/m² de gallinaza el primer año, a 2 kg/m² + 0,5kg/m² respectivamente el quinto año), en comparación al bromuro de metilo (BrMe). Se midió la evolución de la micoflora total y fusárica de la rizosfera de las plantas a lo largo del cultivo, la evolución del desarrollo de las plantas, y, la producción comercial. La biofumigación con solarización provoca una reducción de la micoflora del suelo que resulta tanto más drástica cuanto más se reitera, siendo a partir del tercer año de reiteración similar a la del BrMe. Sin embargo, la recolonización de la rizosfera de las plantas a lo largo del cultivo y la acumulación al final del mismo muestran tendencias diferentes, tanto en aspectos cualitativos (predominio de *Fusarium solani* en BrMe) como cuantitativos (2000 UFC/g de *F. solani* en el BrMe y de 100 a 650 UFC/g de *F. solani* en los B+S). Las producciones comerciales en B+S fueron similares a las del BrMe; solo las plantas del B+S de primer año fueron más bajas que las del BrMe.

EVALUACIÓN DE LA EFICACIA DE PROGRAMAS DE APLICACIÓN DE AZUFRE EN EL CONTROL DE OIDIO EN FRUTO DE FRESA EN LA PROVINCIA DE HUELVA

BLANCO, C.; DE LOS SANTOS, B.; BARRAU, C.; PORRAS, M.; ARROYO, F.T.; ORTEGA, J.; ROMERO, F.

I.F.A.P.A., C.I.F.A. "Las Torres-Tomejil", C.I.C.E. -Junta de Andalucía, Cta. Sevilla-Cazalla, Km 12,2. 41200-Alcalá del Río, Sevilla

Sphaerotheca macularis (Wall. ex Fries) Jacz. f. sp. *fragariae* (Peries) es el agente causal del oidio o cenizo en fresa. Este patógeno se considera de distribución mundial, apareciendo la enfermedad en todas las zonas de cultivo. Afecta de forma importante a los rendimientos de cosecha, ya que ocasiona necrosis, defoliación en hojas, y síntomas en frutos, que los hace no aptos para su comercialización. Son especialmente severas las infecciones en plantas cultivadas en invernaderos y micro-túneles. Las medidas de control de la enfermedad se basan en el uso de plantas libres de inóculo, prácticas culturales y uso de fungicidas químicos.

Los ensayos de campo se realizaron en la Finca Experimental "El Cebollar" (Moguer, Huelva). El periodo de estudio comprendió desde Octubre a Mayo en dos años consecutivos (2001 y 2002). Se testó la eficacia en el control de oidio de dos programas de aplicación foliar de azufre micronizado: S1, ocho aplicaciones a dosis baja y S2, dos aplicaciones a dosis alta. Se utilizaron plantas de fresa de los cultivares "Andana" y "Camarosa". La incidencia de oidio en fruto fue determinada según porcentaje de frutos maduros afectados sobre el total de los recogidos semanalmente. Se realizaron ANOVAs para los datos de incidencia en producción temprana, tardía y sobre el total. La separación de medias se llevó a cabo según el test de Tukey.

Los tratamientos de azufre afectan de forma significativa al desarrollo de oidio en fruto de fresa durante el periodo temprano de cosecha, así como a su incidencia en el total. En el periodo temprano, los tratamientos redujeron la incidencia de la enfermedad entre el 80 y el 90%. Valores que disminuyeron hasta el 34-57% en el primer año, y entre el 67-83% en el segundo, al analizar los datos correspondientes a producción acumulada total.

La incidencia de la enfermedad varía significativamente según el cultivar durante el periodo tardío del primer año ("Andana" 43,12% y "Camarosa" 13,20%) y el temprano del segundo ("Andana" 19,17% y "Camarosa" 32,81%), así como al analizar la producción acumulada total en el primer año, siendo la incidencia en "Andana" del 33,12%, mientras que en "Camarosa" fue del 9,82%.

BIOCONTROL DE LA FUSARIOSIS Y VERTICILIOSIS VASCULAR EN TOMATE CON DIFERENTES FORMULADOS DE *Penicillium oxalicum*

SABUQUILLO, P.; MELGAREJO, P.; DE CAL, A.

Departamento de Protección Vegetal. CIT-INIA. Carretera de La Coruña km 7. 28040. Madrid. E-mail: melgar@inia.es

La fusariosis y verticiliosis vascular en tomate es controlada, tanto en invernadero como en campo (Larena et al., 2003), cuando las plantas son tratadas 7 días antes del trasplante (De Cal et al., 1999) con *Penicillium oxalicum*. Este agente de biocontrol induce resistencia frente a *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* (De Cal et al., 1997), regenerando o prolongando la actividad del cambium mediante la formación de xilemas adicionales en las plantas tratadas (De Cal et al., 2000).

La producción en masa de *P. oxalicum* se realiza en fermentación sólida con un rendimiento de 10^8 conidias/g de sustrato y una viabilidad superior al 80%. Estas conidias se secan en lecho fluido manteniendo el 50% de viabilidad a los 180 días de almacenaje (Larena et al., 2003), siendo muy hidrofóbicas y capaces de reducir la enfermedad en un 40%.

Para diseñar los formulados que mejoren la estabilidad de las conidias secas y su solubilidad en agua se han aplicado aditivos de distinta naturaleza química (mezcla de tw 80 y leche desnatada, alginato sódico, sacarosa y cloruro sódico) en los distintos pasos del proceso de obtención de conidias: antes de la fermentación y antes del secado.

Para comprobar la efectividad de los formulados, estos se han aplicado en invernadero y en campo, distribuidos en bloques aleatorios y con cuatro repeticiones por tratamiento. Dos ensayos se realizaron en invernadero, uno en Madrid y otro en Valencia, donde se inoculó de forma artificial *Fusarium*. Y el otro ensayo se realizó en Aranjuez (Madrid) donde en años anteriores se había detectado *Verticillium*. En Valencia se utilizaron semillas de tomate de la variedad Muchamiel y en Aranjuez y en el invernadero de Madrid la variedad San Pedro. En todos los casos se transplantaron 10 plantas por tratamiento y bloque, previamente tratadas en semilleros con cuatro formulados de conidias de *P. oxalicum* (6×10^6 esporas por gramo de sustrato). La incidencia de la enfermedad fue evaluada cada 15 días hasta 120 días después del trasplante. La población de *P. oxalicum* fue analizada en suelo y en la rizosfera, tres muestras por formulado, en términos de cfu por gramo de raíz. Las plantas de invernadero tratadas con FOR3 (adición de 60% sacarosa antes del secado) controlaban la enfermedad en un 75% mientras que las tratadas con FOR1 en Valencia (adición de mezcla antes de la fermentación), controlaban la enfermedad en un 48%. En campo, la verticiliosis fue reducida en un 72% cuando las plantas eran tratadas con FOR4 (adición de alginato sódico antes del secado). Con todos los formulados se obtuvieron poblaciones, en suelo y rizosfera, de *P. oxalicum* estables y efectivas.

LA SECUENCIACIÓN DEL AISLADO P-121 DEL VIRUS DE LA PSORIASIS DE LOS CÍTRICOS (CPSV) REVELA DIFERENCIAS NOTABLES ENTRE LAS ESPECIES DEL GÉNERO *Ophiovirus*

MARTÍN, S.; LÓPEZ, C.; GARCÍA, M.L.; NAUM-ONGANÍA, G.; GRAU, O.; FLORES, R.; MORENO, P.; GUERRI, J.

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

El virus de la psoriasis de los cítricos (CPsV) es la especie tipo del género *Ophiovirus*, no asignado a ninguna familia viral. Este género engloba virus que infectan plantas, cuyos viriones presentan una morfología característica, genoma segmentado formado por RNAs de cadena simple y polaridad negativa, encapsidado por una proteína capsídica de 43-50 KDa. Sólo se conoce la secuencia completa de dos ophiovirus, la del aislado CPV-4 de CPsV, formado por tres segmentos y la del virus de las venas grandes de la lechuga (MLBVV) que contiene 4.

En este trabajo se ha obtenido la secuencia completa del aislado P-121 de CPsV. La comparación entre las secuencias de los aislados de CPsV mostró una baja identidad nucleotídica (81%) pero una organización genética idéntica y altas identidades aminoacídicas (del 87 al 94%). Las identidades nucleotídicas y aminoacídicas de los aislados de CPsV con MLBVV fueron bajas (del orden del 40% y del 22 al 38%; respectivamente). La comparación con las secuencias aminoacídicas disponibles de otros ophiovirus con las de CPsV mostraron que éstos están más relacionados entre sí que con CPsV.

A diferencia de otros virus de cadena simple y polaridad negativa los extremos 3' y 5' de CPsV no mostraron complementariedad; además los extremos 5' terminales de la cadena viral de los ophiovirus CPsV y MLBVV están menos conservados entre sí que en otros géneros de virus de cadena simple y polaridad negativa.

Se ha propuesto la creación de una nueva familia, Ophioviridae, (Naum-Onganía *et al.*; 2003) para englobar este género. En vista de las diferencias de secuencia encontradas entre CPsV y el resto de ophiovirus, y de otras diferencias biológicas y moleculares descritas en la literatura, se discuten las relaciones taxonómicas dentro de esta familia.

VIROIDE DE LA EXOCORTIS DE LOS CÍTRICOS Y VIROIDE DEL ENANISMO DEL LÚPULO: EFECTO DEL HUÉSPED EN LA VARIABILIDAD

BERNAD, L.; DURÁN-VILA, N.

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

En cítricos se han descrito cinco viroides distintos. El CEVd y el HSVd son los agentes causales de la exocortis y la caquexia, respectivamente. Ambos viroides se presentan como infecciones latentes en la mayoría de especies utilizadas como patrones y especies comerciales, pero inducen síntomas específicos en especies sensibles. Los viroides se encuentran en sus huéspedes como poblaciones mas o menos heterogeneas de variantes de secuencia (haplotipos) que se ajustan al modelo de quasiespecies. En estudios anteriores se determinó la estructura poblacional de un aislado de CEVd y dos aislados de HSVd mantenidos en un huésped experimental, el cidro Etrog. En el presente trabajo se describe la influencia del huésped en la estructura de las poblaciones de estos aislados de CEVd y HSVd.

El naranjo amargo inoculado con CEVd se comportó como portador asintomático, mientras que *Poncirus trifoliata* desarrolló los síntomas característicos de la exocortis. La estructura de la población de CEVd recuperada de estos huéspedes difirió considerablemente de la caracterizada en cidro Etrog que había sido utilizada como inóculo. La población recuperada en *P. trifoliata* fue muy homogénea y tanto el haplotipo dominante como la mayoría de los recuperados en este huésped presentaban un cambio característico (A->G) en la posición 314, mientras que la población recuperada en naranjo amargo fue muy heterogénea y no presentaba dicho cambio.

El naranjo amargo inoculado con los dos aislados de HSVd se comportó como portador asintomático, mientras que *P. trifoliata* resultó sensible a ambos y tangelo Orlando resultó sensible a un aislado y tolerante al otro. La estructura de las poblaciones de estos dos aislados de HSVd recuperados de los tres huéspedes estudiados difirió de la caracterizada en cidro Etrog.

PATOGENIA DE VARIAS ESPECIES DE *Pythium* EN JUDÍA E INFLUENCIA DEL CULTIVAR EN LA SEVERIDAD DE LA ENFERMEDAD

SERRANO, Y.¹; GUIRADO, M.L.¹; MELERO, J.M.²; GÓMEZ, J.¹.

¹Centro de Investigación y Formación Agraria de La Mojonera. Autovía del Mediterráneo, Sal. 420. 04745. La Mojonera. Almería. micocifa@arrakis.es

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

Para valorar el poder patógeno de *Pythium aphanidermatum*, *P. irregulare*, *P. volutum*, *Pythium* grupo *P* y *Pythium* sp. se inocularon plantas de los cultivares de enrame Emerite, Donna, Nuria y Maite, representativos de los cuatro tipos de judía más cultivados en la agricultura intensiva del sudeste peninsular. Los experimentos se realizaron en cultivo sin suelo, utilizando como sustrato perlita, en un invernadero multitúnel con cubierta de polietileno situado en el CIFA de La Mojonera. Con un diseño factorial de parcelas divididas, se realizaron dos experimentos. Las plantas se inocularon a los 17 y 21 días de la siembra cuando tenían entre seis y ocho hojas verdaderas en la campaña de primavera de 2002 y en la de otoño-invierno de 2002 / 03, respectivamente.

El poder patógeno de *P. aphanidermatum* y de *Pythium* sp. se manifestó en primavera, causando marchitez, hipertrofia y estrías necróticas en la base del tallo, necrosis del sistema radicular y la muerte de las plantas. Sin embargo en el experimento realizado en otoño-invierno, la patogenia de *P. aphanidermatum* sólo se manifestó causando la necrosis del sistema radicular. *Pythium* sp. causó necrosis en el sistema radicular y la muerte de un bajo porcentaje de las plantas inoculadas.

El resto de las especies de *Pythium* inoculadas (*P. irregulare*, *Pythium* grupo *P* y *P. volutum*), reflejaron su poder patógeno causando solo necrosis en el sistema radicular en los dos experimentos.

De las cuatro variedades de judía estudiadas, Emerite fue la más susceptible, menos sensible resultó Donna, mientras que Nuria y Maite resultaron tolerantes. La mortalidad media en el experimento de primavera fue del 34.0% en Emerite, 12.2% en Donna, 4.2% en Maite y del 0.3% en Nuria, aunque tanto el aislado de *P. aphanidermatum* como el y de *Pythium* sp. causaron la muerte de todas las plantas del cv. Emerite inoculadas.

En el experimento realizado durante la campaña de otoño-invierno solamente el aislado de *Pythium* sp. fue capaz de causar la muerte del 11% de las plantas del cv. Emerite, inoculadas.

CONTROL DE LAS PRINCIPALES ENFERMEDADES EN POSTCOSECHA DE CÍTRICOS MEDIANTE LA INTEGRACIÓN DE MÉTODOS

VIÑAS, I.; PLAZA, P.; TORRES, R.; LAMARCA, N.; USALL, J.

Àrea de postcollita. CeRTA. Centre UdL-IRTA. Avda. Rovira Roure 191, 25198 Lleida.

E-mail: ivinas@tecal.udl.es

En postcosecha de cítricos las principales enfermedades son las causadas por el *Penicillium digitatum* y *P. italicum*. Para controlar estas enfermedades se ha generalizado el uso de productos químicos de síntesis. La utilización masiva, continuada y en algunos casos poco controlada de estos productos ha generado una serie de problemas graves como son la aparición de cepas fúngicas resistentes a los productos químicos y el incremento de residuos en los frutos, con el consecuente incremento de los riesgos para la salud humana y el medio ambiente. Toda esta problemática ha incentivado los estudios de métodos alternativos a los productos habituales, que por sí solos o en combinación garanticen una eficacia similar a los fungicidas sintéticos, sin los problemas que estos generan y a un coste razonable.

El objetivo del presente trabajo es la evaluación de diversos métodos biológicos, químicos y físicos, estudiando su posible integración, para conseguir un control máximo de los mohos causales de podredumbres. Las experiencias fueron planificadas desde un punto de vista práctico para que sea posible una rápida implantación en el sector. Así pues, se ha estudiado la efectividad del agente de biocontrol *Pantoea agglomerans* CPA-2, el bicarbonato sódico y el efecto del calor (agua caliente y curado) en condiciones de central hortofrutícola. De los ensayos realizados, se observa que el formulado de *P. agglomerans* CPA-2 se consolida como un antagonista efectivo en el control de las podredumbres en cítricos y que la mejor combinación ensayada es la formada por bicarbonato sódico al 3% aplicado en baño a 40°C durante 1,5 minutos y la aplicación del agente de biocontrol *P. agglomerans* (CPA-2) a la concentración de $2 \cdot 10^9$ ufc/ml durante 30 segundos, obteniéndose un nivel de control similar al fungicida imazalil. La aplicación del curado a una temperatura de 40°C durante 18 horas y con una HR del 90% se presenta también como una alternativa eficaz.

BIOLOGÍA Y MÉTODOS DE CONTROL DEL HONGO *Pleospora allii* (TELEOMORFO DE *Stemphylium vesicarium*)

LLORENTE, I.; VILARDELL, A.; MONTESINOS, E.

Institut de Tecnologia Agroalimentària-CeRTA-CIDSAV. Universitat de Girona. Avda Lluís Santaló s/n, 17071 Girona. E-mail: Isidre.llorente@udg.es

La estemfiliosis del peral causada por el hongo deuteromiceto *Stemphylium vesicarium* es una de las enfermedades de mayor importancia económica en el cultivo del peral en determinadas zonas frutícolas Europeas. El reservorio invernante de este hongo corresponde al ascomiceto *Pleospora allii*. En el presente estudio se determinó la capacidad patogénica de *P. allii* en peral mediante la inoculación de ascas y ascosporas en hojas de peral *ex vivo* bajo condiciones ambientales controladas. Se concluyó que *P. allii* es capaz de producir infecciones en peral y por consiguiente puede ser responsable de las infecciones primarias que se observan en campo. También se realizaron ensayos, bajo condiciones de ambiente controlado con el fin de determinar el efecto de la temperatura y del tiempo en la germinación de *P. allii*. Se observó que el intervalo óptimo de temperaturas está entre 15 y 22 °C, y la velocidad de germinación es elevada (50 % de las esporas germinadas en 60 min.). Además se ha realizado un seguimiento en campo de la evolución del número de peritecas y de su maduración en hojas peral, así como de la dinámica de liberación de las ascosporas. Para ello se realizaron varios ensayos en fincas experimentales. Se observó que el número de peritecas visibles se incrementa hasta finales de Enero o inicios de Febrero. A partir de este momento y hasta finales de Abril, coincidiendo con la maduración y liberación de las ascosporas, el número de peritecas disminuye. La captura de ascosporas en el aire se realiza a partir de Enero y se prolonga hasta Mayo, observándose las mayores concentraciones entre los meses de Marzo y Abril. Finalmente se ha evaluado la eficacia del control del inóculo primario presente en el suelo en la fase invernal mediante el uso de diferentes métodos: mecánico (troceado y aspirado del material vegetal), químico (derivados cúpricos, urea a diferentes concentraciones) y biológico (diversos preparados comerciales a base de *Trichoderma* spp.), así como un testigo sin tratar. La eficacia se evaluó teniendo en cuenta el número total de esporas capturadas. Se concluyó que en general, los métodos mecánicos son los que han presentado la mayor reducción de los niveles de esporas, los diferentes productos biológicos a base de *Trichoderma* spp. presentan un eficacia variable y los tratamientos químicos convencionales presentan una baja eficacia de control.

Financiado por el proyecto INIA RTA03-56.

EVALUACIÓN DE MÉTODOS DE SEGUIMIENTO Y CONTROL DE LAS INFECCIONES DE MOTEADO *Spilocaea pomi* Fr. (*Venturia inaequalis*)

BATLLORI, LL.¹; VILARDELL, P.²; VILAJELIU, M.²; LLORENTE, I.³

¹Servei de Sanitat Vegetal, DARP, Generalitat de Catalunya.

²IRTA – Fundació Mas Badia.

³INTEA, Universitat de Girona.

El moteado del manzano y del peral constituye una de las enfermedades que mayores daños y perjuicios económicos producen a las plantaciones comerciales de estas especies frutales, en particular en las áreas más húmedas de producción.

En el póster se exponen los resultados de tres ensayos. En el primero de ellos se comparan dos tesis de reducción de inóculo primario (*S. pomi*) consistentes en aspirado de hojas y aplicación de *Trichoderma spp.* respecto un testigo no tratado. El número de esporas capturadas (0.02 esporas/cm²) en la tesis de aspirado (retirada de las hojas del suelo) fue significativamente menor por comparación a las tesis *Trichoderma spp.* (0.18 esporas/cm²) y el testigo no tratado (0.49 esporas/cm²).

En el segundo ensayo se muestran los resultados del primer año de validación del modelo RIMpro (*applescap management program* by Marc Trapman) por comparación con la curva de liberación de las esporas de *V. inaequalis* obtenida con un captosporas Burkard. Se constató el buen ajuste entre la modelización a partir de los datos climáticos suministrados por una estación meteorológica automática (Campbell Scientific Ltd) y el número de esporas capturadas por el muestreador aéreo. Así mismo se comparan las alertas de infección de moteado detectadas por la *Estació d'Avisos de Girona* y los momentos de riesgo de infecciones secundarias según el modelo de Mills incorporado por el *applescap management program*.

Finalmente, en el tercer ensayo, se muestran los resultados de la aplicación de varias estrategias de control de moteado basadas en las siguientes tesis: tratamientos de infecciones primarias, tratamientos de infecciones primarias y secundarias (ambas tesis según modelo RIMpro) y tratamiento según alertas de infección de moteado informadas por la *Estació d'Avisos de Girona* respecto una tesis testigo. Todas las tesis tratadas mostraron buena eficacia en el control de la enfermedad de la enfermedad.

PROBLEMÁTICA FITOSANITARIA DE LA PATATA TEMPRANA EN ANDALUCÍA OCCIDENTAL: I HONGOS

ANDÚJAR, E.¹; MORERA, B.¹; ORTEGA, M.G.¹; PÁEZ, J.I.²; VEGA, J.M.²; MONTES, F.²

¹ Asociafruit. ² Servicio Sanidad Vegetal-Junta de Andalucía.Laboratorio de Sanidad Vegetal de Sevilla. Apdo121. 41089 Montequinto (Sevilla). E-mail: patologia.lsvse.cap@juntadeandalucia.es

Dada la importancia de Andalucía como principal productora de patata temprana de Europa y la preocupación del sector por los problemas fitosanitarios que afectaban al cultivo, se estableció en 1997 un convenio de colaboración entre el Laboratorio de Sanidad Vegetal de Sevilla (Junta de Andalucía) y Asociafruit. Dentro de este convenio se estudió el estado sanitario de la patata de siembra y las enfermedades micóticas que afectaban al cultivo. Estado sanitario de la patata de siembra. Casi toda la semilla de patata temprana que se siembra en Andalucía procede de Holanda, Alemania, Escocia, Francia y Reino Unido. Entre 2001 y 2004 se han analizado y evaluado la intensidad de enfermedades fúngicas en 91 lotes de semillas en prospecciones al azar y 125 en prospecciones dirigidas a lotes con problemas, con similares resultados. Los porcentajes de lotes infectados por distintos hongos fitopatógenos fueron: 61% de *Helminthosporium solani*, 55% de *Rhizoctonia solani*, 32% de *Colletotrichum coccodes*, 11% de *Spongospora subterranea*, 13% de *Fusarium sulphureum*, 3% de *Verticillium* spp. y 2% de *Phytophthora infestans*. Los porcentajes permanecieron a lo largo de los años. Destacó la incidencia de sarna pulverulenta (*Spongospora subterranea*) en lotes procedentes de Escocia; así, entre los 24 lotes escoceses de las campañas 2002 y 2003, la sarna pulverulenta estuvo presente en el 67% de los casos. Enfermedades durante el cultivo. En los últimos 8 años se analizaron 649 muestras que presentaban problemas. Los hongos más frecuentes fueron *P. infestans* y *R. solani*, siendo el primero el principal problema de la patata temprana en Andalucía. Otros hongos encontrados con cierta frecuencia fueron *C. coccodes*, *A. solani*, *V. dahliae* y *F. sulphureum*. Hay que destacar la detección de *Sclerotium rolfsii* y *Macrophomina phaseolina* como causantes de importantes problemas puntuales en la patata de consumo en distintas campañas: el primero encontrado los años 1998 y 2001, y el segundo en la campaña 2003. De tubérculos de consumo con síntomas de “podredumbre rosa” se aislaron *P. cryptogea* y *P. erythroseptica*. Esta última se aisló en 1997 y 1998 en distintas localidades de la provincia de Sevilla. Esto supone, que nosotros sepamos, la primera cita de este patógeno en España. *P. erythroseptica* crece bien en medio de cultivo, es homotática con anteridio en posición anfigina, produce hinchamientos hifales angulares o redondeados en medio líquido y forma esporangios no papilados. La típica constricción que aparece en algunos esporangios facilita el diagnóstico de la especie.

PROBLEMÁTICA FITOSANITARIA DE LA PATATA TEMPRANA EN ANDALUCÍA OCCIDENTAL: II BACTERIAS

ANDÚJAR, E.¹; FLORES, R.²; MORERA, B.¹; ORTEGA, M.G.¹; MONTES, F.²

¹ Asociafruit. ² Servicio de Sanidad Vegetal de la Junta de Andalucía

Laboratorio de Sanidad Vegetal de Sevilla. Apdo121. 41089 Montequinto (Sevilla)

E-mail: patologia.lsvse.cap@juntadeandalucia.es

Dentro del convenio establecido entre el sector de patata de ASOCIAFRUIT y el Laboratorio de Sanidad Vegetal de Sevilla, se estudió el estado sanitario de la patata de siembra respecto a la presencia de bacterias fitopatógenas y a las enfermedades bacterianas que afectan al cultivo.

Estado sanitario de la patata de siembra. La patata de siembra utilizada en andalucía, que procede en su mayoría de holanda, alemania, escocia, francia y reino unido, fue analizada exhaustivamente entre 2001 y 2004, evaluando la presencia de erwinias pectolíticas (*Erwinia carotovora carotovora*, *Erwinia carotovora atroseptica* y *Erwinia chrysanthemi*) en la piel del tubérculo. El método de detección se basa en aislamientos microbiológicos de organismos vivos en la piel de los tubérculos sanos. Por ello, la existencia de *erwinia* spp. No implica la aparición de la enfermedad. De un total de 216 lotes (91 de prospecciones al azar y 125 de muestras recibidas con problemas), se encontró alguna bacteria del género *erwinia* en el 33% de los casos (66 muestras).

También se evaluó la incidencia y severidad de sarna común (*Streptomyces scabies* principalmente) en los tubérculos. En el total de 216 lotes de patata de siembra detectamos *streptomyces scabiei* en el 29% (63 muestras). La incidencia varió según los años en el caso de sarna común, reflejando las condiciones del cultivo en los países de origen; así, en 2004 encontramos *Streptomyces* en el 83 % de las muestras.

En ninguno de los lotes se detectó la presencia de bacterias de cuarentena (*Clavibacter michiganensis sepedonicus* y *Ralstonia solanacearum*).

Enfermedades durante el cultivo. Durante las últimas 4 campañas se analizaron 303 plantas y tubérculos que presentaron problemas. En 66 casos se detectaron algunas de las enfermedades causadas por erwinias: pie negro (en general asociado a *E. c. atroseptica*), podredumbre blanda de tubérculos (generalmente asociada a *E. c. carotovora*) y “pie negro aéreo” (“aerial stem rot”; causado por *E. chrysanthemi*). Esta última tuvo una incidencia especialmente alta en la campaña 2002, causando graves pérdidas en algunas parcelas. Hay que destacar que en 20 de 102 partidas cosechadas de tubérculos para consumo se observaron síntomas de sarna común.

En ninguno de los las muestras se detectó la presencia de bacterias de cuarentena (*Clavibacter michiganensis sepedonicus* y *Ralstonia solanacearum*).

PROBLEMÁTICA FITOSANITARIA DE LA PATATA TEMPRANA EN ANDALUCÍA OCCIDENTAL: III FISIOPATÍAS Y VIROSIS

ANDÚJAR, E.¹; MORERA, B.¹; ORTEGA, M.G.¹; MUÑOZ, C.²; VEGA, J.M.²; MONTES, F.²

¹ Asociafruit .

² Servicio de Sanidad Vegetal de la Junta de Andalucía

Laboratorio de Sanidad Vegetal de Sevilla. Apdo121. 41089 Montequinto (Sevilla).

E-mail: patologia.lsvse.cap@juntadeandalucia.es

En el marco del convenio de colaboración entre el laboratorio de sanidad vegetal de sevilla (junta de andalucía) y asociafruit, se decidió estudiar también el estado sanitario de la patata de siembra respecto a la presencia de enfermedades provocadas por agentes abióticos y por virus, y a su incidencia en el cultivo.

Fisiopatías en la patata de siembra. La patata de siembra utilizada en andalucía que procede en su mayoría de holanda, alemania, escocia, francia y reino unido, fue analizada entre 2001 y 2004, evaluando la presencia y severidad de distintas fisiopatías en los tubérculos. Se analizaron 216 lotes, 91 de prospecciones al azar y 125 de muestras recibidas con problemas. Las fisiopatías más frecuentes fueron las siguientes: marca de uña, 40% (agrietamiento de la piel en zonas donde han recibido golpes de recolección los tubérculos muy turgentes); enverdecimiento, 16% (causado por la exposición de tubérculos al sol); golpes y magulladuras, 15% (causados por daños en recolección poco cuidadosa); piel inmadura, 11% (causada por recoger los tubérculos antes de que su ciclo se haya completado); y lenticelosis, 8% (causada por un exceso de humedad en el campo o en el almacén).

Enfermedades durante el cultivo. Se estudió la presencia de fisiopatías en 303 plantas y tubérculos. En las plantas de campo (250), las fisiopatías más frecuentes fueron “gangrena menuña” (o moteado) en el 28% de los casos y la brotación retorcida (“coiled sprout”) en el 6%. La “gangrena menuña” es una enfermedad conocida en la zona desde hace al menos 20 años y cuya etiología era desconocida. En la actualidad, nuestros estudios la relaciona con una presencia elevada de ozono en las capas bajas de la atmósfera y esto se refleja en un moteado muy característico.

Entre los tubérculos cosechados (48), las fisiopatías más abundantes fueron: corazón hueco (12%), lenticelosis (6%) y tubérculos secundarios (6%).

La incidencia de virosis en el cultivo de patata en andalucía no ha representado un problema grave (los más frecuentes son plrv y pvv), aunque ha imposibilitado la producción de patata como semilla certificada en nuestra comunidad.

PA-4

CARACTERIZACION DE AISLADOS DE PVY PROCEDENTES DE TOMATE

ARAMBURU, J.; GALIPIENSO, L.; SENMARTI, J.

Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentàries I.R.T.A. Ctra. de Cabrils s/n. 08348 Cabrils. Barcelona. E-mail: josemaria.aramburu@irta.es

El virus Y de la patata (PVY) perteneciente al genero de los Potyvirus, que es el mas numeroso dentro de los virus vegetales, posee un único genoma de RNA de simple cadena encapsidado en una partícula de forma alargada y flexuosa. El virus se transmite mecánicamente y de forma natural por medio de diversas especies de áfidos de manera no persistentes, afectando principalmente y de manera importante a patata, pimiento, tabaco y tomate.

Los diferentes aislados de PVY se han clasificado en diversos grupos en función del huésped del que se han obtenido y de los síntomas que produce. Así, en patata se han propuesto los grupos O, N y C y más recientemente una variante más agresiva del grupo N denominada NTN. En pimiento se han clasificado en tres patotipos en función de su capacidad para sobrepasar ciertos genes de resistencia. Otros autores agruparon diversos aislados de PVY obtenidos en diferentes especies hasta en 7 patotipos basándose en su capacidad para infectar diversos genotipos de tomate. Se ha propuesto otra alternativa que introduce el concepto de agrupación en restrictotipos obtenidos a partir de la secuencia de la proteína de la cápsida como una metodología más sencilla y uniforme.

En este trabajo se ha realizado un estudio comparativo de características biológicas, serológicas y moleculares de distintos aislamientos de PVY obtenidos de plantas de tomate durante tres campañas diferentes en el Noreste de España. En los cultivos de exterior donde en ocasiones la incidencia del PVY llega a superar el 75% se diferencia básicamente dos tipos de síntomas: mosaicos en hojas apicales y lesiones necróticas en hojas intermedias, no afectando el fruto en ningún caso; sin embargo, al tener en cuenta los diferentes criterios de comparación nuestros resultados muestran una gran diversidad entre los diferentes aislados de PVY que resulta difícil agrupar, aunque, por otra parte, permiten extraer algunas conclusiones acerca de la procedencia de estos aislados.

DETECCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE PATÓGENOS DE ARN ASOCIADOS CON EL MOSAICO DE LA HIGUERA

BENITO, A.¹; SERRANO, L.¹; DURÁN-VILA, N.²; MEDINA, V.¹; SEGARRA, J.¹; ACHÓN, M.A.¹

¹Dept. Producció Vegetal i Ciència Forestal. ETSEA. Universitat de Lleida. Avda. Alcalde Rovira Roure 191, 25198 Lleida.

²Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias. IVIA. Apartado Oficial. 46113 Moncada. Valencia. achon@pvcf.udl.es

El mosaico de la higuera (FM) es una enfermedad ampliamente distribuida por todo el mundo, que afecta a todos los cultivares de higuera de interés comercial y es transmitida por el ácaro eriófito *Aceria ficus*. Sus síntomas son: mosaico asociado a las nervaduras, mosaico anular, moteado y lesiones holonecroticas que pueden alcanzar al fruto. El agente causal de la enfermedad aun no se ha podido aislar y se ha postulado que podría pertenecer a uno de los siguientes géneros de virus de plantas: *Rymovirus*, *Tritimovirus*, *Alexvirus*, *Trichovirus*, *Nepovirus* y *Tenuivirus*. También se ha propuesto que el inductor de la misma podría ser un viroide.

Los estudios encaminados a caracterizar biológica y molecularmente una posible entidad viral de ARN y/o viroide han mostrado la asociación de esta enfermedad con un virus alargado y flexuoso de 950nm de longitud que presenta una porción aparentemente desencapsidada de unos 230nm y que es de escasa transmisión mecánica a especies herbáceas. Las pruebas serológicas y de ultramicroscopía indican que esta enfermedad podría estar asociada a más de una especie viral. Los análisis mediante RT-PCR han permitido amplificar específicamente un fragmento del genoma del virus anteriormente mencionado. El análisis de la secuencia del cDNA muestra que es poliadenilado y presenta una ligera homología de secuencia con la de un virus asociado a una enfermedad de idénticas características al FM. No se ha detectado ningún viroide asociado con la enfermedad.

DETECCIÓN DE AISLADOS VIRALES DEL GÉNERO *Fabavirus* MEDIANTE RT-PCR CON INICIADORES CONSERVADOS

FERRER, R.M.¹; LUIS, M.S.²; GUERRI, J.¹; MORENO, P.¹; RUBIO, L.¹

¹Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA), 46113 Moncada, Valencia

²Servicio de Investigación Agroalimentaria (SIA), 50080 Zaragoza

El género *Fabavirus*, de la familia *Comoviridae*, comprende dos especies virales denominadas virus del marchitamiento del haba 1 y 2 (*Broad bean wilt virus*, BBWV-1 and BBWV-2). Estos virus se transmiten por pulgones, afectan a una amplia gama de especies de interés agronómico (legumbres, alcachofa, lechuga, tomate, tabaco, pimiento, etc.) y están distribuidos por todo el mundo, ocasionando a veces graves epidemias. Los viriones son isométricos y contienen dos proteínas capsídicas (LCP y SCP), y su genoma consiste en dos moléculas de ARN monocatenario de sentido positivo (RNA 1 y RNA 2) de unas 6 y 4 kb, respectivamente. El análisis de las secuencias nucleotídicas parciales o completas de 12 aislados de BBWV-2 y 4 aislados de BBWV-1 (disponibles en la base de datos GenBank) sugiere una gran variabilidad genética para estos virus, lo que podría dificultar su diagnóstico. En este trabajo se diseñaron iniciadores degenerados a partir de distintas zonas conservadas del genoma viral y se ensayaron distintas condiciones de RT-PCR. Los mejores resultados se obtuvieron con iniciadores que se encontraban dentro del gen que codifica SCP y que amplificaban un fragmento de DNA de unos 400 nt. Mediante este análisis se detectaron BBWV-1 y BBWV-2 en muestras de haba, lechuga, espinaca, pimiento y plantas ornamentales y herbáceas procedentes de España, Italia, Alemania, Republica Checa, Siria, China, y Estados Unidos. El análisis de las secuencias nucleotídicas de estos productos de PCR reveló que había alrededor de 65% de identidad nucleotídica entre aislados de BBWV-1 y BBWV-2, y un 80% entre algunos aislados dentro de cada especie. La amplificación mediante RT-PCR con estos iniciadores conservados constituye una herramienta rápida y fiable de diagnóstico de fabavirus. Así mismo, los productos de RT-PCR obtenidos permiten llevar a cabo análisis de la variación genética y la posibilidad de descubrir nuevas especies del género *Fabavirus*.

DETECCIÓN DE LA RAZA DEL VIRUS DEL MOTEADO DE LA PARIETARIA QUE INFECTA TOMATE (PMOV-T) MEDIANTE HIBRIDACIÓN MOLECULAR Y RT-PCR EN MUESTRAS DE PLANTACIONES COMERCIALES DE CATALUÑA

GALIPIENSO, L.¹; ARAMBURU, J.¹; HERRANZ, M.C.²; PALLÁS, V.²

¹ Departamento de Protección Vegetal, IRTA. Centro de Cabrls (Barcelona)

² Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas (IBMCP) (UPV-CSIC). Valencia

El Virus del moteado de la parietaria (PMoV) es un Ilarvirus que fue detectado por primera vez en plantas de parietaria (*Parietaria officinalis*). Posteriormente se aisló en plantas de tomate sugiriéndose que podría tratarse de una raza del virus a la que se denominó PMoV-T (Lisa et al., 1998. Ninth Conference of the I.S.H.S. V.V.W.G., Recent Advances in Vegetable Virus Research, 3-5.). En esta especie ocasiona raquitismo en la planta y mosaicos necróticos en hojas. En los frutos aparecen anillos necróticos con deformaciones, abultamientos y grietas, lo que impide su comercialización. Esta sintomatología es muy similar a la presentada por las plantas infectadas por el virus del bronceado del tomate (TSWV), el virus del mosaico del pepino (CMV) o el virus Y de la patata (PVY) con los que frecuentemente aparece formando infecciones mixtas. Hasta la fecha no se dispone de antisueros comerciales contra el PMoV, por lo que es importante el desarrollo de métodos específicos y sensibles para su detección.

En el presente trabajo, se ha puesto a punto la detección del PMoV-T en plantas de tomate mediante hibridación molecular no radiactiva y RT-PCR. En ambas técnicas se utilizaron extractos de RNA total de diferentes tejidos de la planta, además de impresiones de tejido en el caso de la hibridación molecular. Se observó que la distribución del virus no era homogénea en la planta determinándose el material mas apropiado para la detección del mismo. Ambas técnicas utilizadas resultaron específicas y sensibles permitiendo la detección de PMoV-T en plantas de campo infectadas. Además, la simplicidad de la técnica de hibridación molecular con impresiones de tejido podría facilitar el análisis masivo de muestras de campo necesario para la realización de estudios epidemiológicos.

DESARROLLO DE METODOLOGÍAS DE DIAGNÓSTICO DE ALTA SENSIBILIDAD PARA LA DETECCIÓN DEL FIJIVIRUS DEL MAL DE RÍO CUARTO

GIMÉNEZ-PECCI, M.P.¹; LUNELLO, P.; PONZ, F.

Departamento de Biotecnología INIA Autopista A6 km 7. CP:28040 Madrid.

¹ IFFIVE-INTA Cam 60 cuerdas km 71/2 CP:5019. Córdoba Argentina

El virus del Mal de Río Cuarto (*Mal de Río Cuarto virus*) es un miembro del género *Fijivirus* (1) que causa epidemias en cultivos de maíz en Argentina, generando cuantiosas pérdidas. Las disminuciones en el rendimiento se estimaron en la última epidemia en 120 millones de dólares (2), con 300.000 ha afectadas. En Argentina este cultivo significa un ingreso anual en exportaciones de 900 millones de dólares siendo el segundo productor a nivel mundial. La enfermedad causada por este virus fue detectada en la década del 60 y se ha dispersado progresivamente, infectando en la actualidad una amplia gama de gramíneas silvestres y cultivadas (3). Es transmitido por *Dephacodes kuscheli* y *D. haywardi* (4) en forma persistente y propagativa. El genoma está representado por 10 segmentos de RNA de doble cadena. En este trabajo se presenta el desarrollo de dos alternativas de diagnóstico molecular: IC-RT-PCR convencional (5) e IC-RT-PCR cuantitativa con tecnología TaqMan®(6). Los fragmentos amplificados corresponden al segmento S10 que codifica para la proteína externa de la cápsida. Mediante estas técnicas se amplificaron fragmentos virales a partir de plantas sintomáticas de diferentes regiones geográficas y de diferentes hospedantes. El desarrollo de estas tecnologías incrementa notablemente la sensibilidad de los métodos serológicos utilizados hasta el momento. El incremento de la sensibilidad permite la posibilidad de detectar el patógeno en infecciones tempranas, en reservorios alternativos y directamente en el vector.

Este trabajo ha sido financiado por INTA Argentina, INIA España, CABBIO y FONCYT

(1) Nome *et al.*, 1981. *Phytopathology* 101:7-15; (2) Lenardón *et al.*, 1997, *Plant Disease* 82(4):448; (3) Laguna *et al.*, 2000. *Fitopatología* 35 (1):41-49; (4) Velazquez *et al.* 2003. *Journal of Phytopathology* 151: (11) 669. (5) Nolasco *et al.*, 1993. *J. of Virological Methods* 45: 201-218. (6) Lunello, *et al.*, 2004. *J. of Virological Methods* 118:15-21.

ETIOLOGÍA DEL COLAPSO DEL TOMATE

GUIRADO, M.L.¹; RODRÍGUEZ, J.M.¹; SERRANO, Y.¹; SÁEZ, E.²; LACASA, A.³; GUERRERO, M.M.³; GÓMEZ, J.¹

¹Centro de Investigación y Formación Agraria de La Mojonera. Autovía del Mediterráneo, Sal. 420. 04745. La Mojonera. Almería. micocifa@arrakis.es

²Laboratorio de Sanidad Vegetal. El Ejido. Almería.

³IMIDA. C/ Mayor s/n, 30150. La Alberca (Murcia). Alfredo.Lacasa@carm.es

El colapso o muerte súbita del tomate es una enfermedad caracterizada por una marchitez más o menos reversible y muerte de las plantas que causa importantes pérdidas en los cultivos del sudeste de la península ibérica. Epidemiológicamente, la enfermedad está muy asociada al virus mosaico del pepino dulce (PepMV) y al hongo *Olpidium brassicae*. El objetivo del experimento fue determinar el poder patógeno de un aislado de PepMV y de otro de *O. brassicae*, obtenidos en Almería y de la inoculación conjunta con ambos.

El experimento se realizó en un invernadero tipo túnel y cubierta de polietileno situado en el CIFA de Almería. El cultivo de tomate cv. Daniela se realizó en sacos con perlita. Con diseño experimental de tres bloques completos al azar, las parcelas elementales estuvieron constituidas por filas de 30 plantas. Las inoculaciones con el PepMV, con *O. brassicae* y con ambos a la vez se realizaron el 15 de enero de 2004 a los 57 ddt. Sirvieron como testigo un mismo número de plantas sin inocular. Además de anotaciones semanales sobre los síntomas observados en las plantas, se realizaron tres análisis para detectar la infección por PepMV y uno, al término del cultivo, para detectar la presencia de *O. brassicae* en el sistema radicular de las plantas. Se valoró también la producción total y comercial.

Los primeros síntomas de enfermedad, consistentes en la marchitez de las plantas, se observaron el 3 de febrero a los 19 días de la inoculación. La marchitez, frecuentemente reversible, alcanzó al 16, 51, 49, 1, 19, 33 y 12% de las plantas inoculadas con *O. brassicae*+PepMV y al 12, 42, 48, 3, 23, 41 y 11% de las inoculadas con PepMV, en las observaciones de síntomas realizadas entre los 76 y 126 ddt. Por el contrario en las parcelas de plantas inoculadas con *O. brassicae* o en las del testigo no inoculado, hasta esa fecha, no se observaron síntomas. Las diferencias observadas entre las parcelas inoculadas con *O. brassicae*+PepMV o con PepMV y las no inoculadas fueron estadísticamente significativas para las observaciones realizadas a los 76, 83, 90, 105, 112 y 126 ddt. La muerte de algunas de las plantas ocurrió a partir de los 112 ddt y alcanzó al término del experimento al 36, 29, 14 y 16%, de las inoculadas con *O. brassicae*+PepMV, con PepMV, con *O. brassicae* y las testigo, respectivamente. Ni la incidencia de *Botrytis cinerea*, ni las producciones comercial y total fueron estadísticamente significativas entre los tratamientos.

CARACTERIZACIÓN DE RNAs DEFECTIVOS DERIVADOS DEL RNA 3 DE UN AISLADO DEL VIRUS DEL MOSAICO DEL PEPINO

LÓPEZ, C.¹; GALIPIENSO, L.²; ARAMBURU, J.²; NÚEZ, F.¹

¹UPV-COMAV. Camino de Vera s/n 46022. Valencia. E-mail: clopez@upvnet.upv.es

²IRTA. Ctra. de Cabriels s/n. 08348 Cabriels. Barcelona.

El análisis de los RNAs bicatenarios (dsRNAs) de diversos aislados de campo del virus del mosaico del pepino (CMV) obtenidos a partir de tomate ha puesto de manifiesto la presencia, en uno de ellos, de un dsRNA que no corresponde a ninguno de los tres RNAs de longitud genómica, ni al RNA subgenómico a partir del cual se expresa la proteína de la cápsida. Las primeras observaciones apuntaron a que podría tratarse de un RNA defectivo (D-RNA). Los D-RNAs derivan de los RNAs virales por deleciones simples o múltiples de secuencias internas y contienen todas las señales requeridas para su acumulación aunque son incapaces de replicarse en la ausencia del virus auxiliar. Hasta la fecha, sólo han sido caracterizadas molecularmente dos D-RNAs asociadas al aislado Fny de CMV, las cuales derivaron del RNA 3 por simples deleciones del gen 3a que codifica la proteína de movimiento.

El dsRNA extra de nuestro aislado fue eluído de geles de poliacrilamida, amplificado mediante RT-PCR, clonado y secuenciado. El análisis de su secuencia ha revelado que se trata de una mezcla de D-RNAs con deleciones simples y múltiples. En algunas moléculas se ha producido una delección de 309 nucleótidos (nt) que afecta a la región del gen 3a, en otras la delección es de 357 nt y afecta al gen de la proteína de la cápsida, mientras que en un tercer tipo se presentan en la misma molécula las dos deleciones. No sabemos cual es el mecanismo que ha generado estos D-RNAs, aunque el cambio de molde de la polimerasa ("copy choice") parece ser el más probable.

Muchos de los RNA defectivos caracterizados en otros grupos de virus vegetales tienen carácter interferente y con frecuencia modulan la patogenicidad de estos últimos. Será necesario llevar a cabo estudios adicionales para tratar de determinar si algo similar pudiera suceder en este aislado de CMV y que su fenotipo pudiera estar determinado, al menos en parte, por la existencia de estos RNAs defectivos interferentes.

CARACTERIZACIÓN BIOLÓGICA DE UN AISLADO ESPAÑOL DEL VIRUS DEL MARCHITAMIENTO DEL HABA-1 (BBWV-1) PROCEDENTE DE PIMIENTO. MÉTODOS DE DETECCIÓN. RESULTADOS PRELIMINARES

LUIS-ARTEAGA, M.¹; ESCRIU, F.¹; SAGRARIO, J.¹; FERRER, R.M.²; RUBIO, L.²

¹Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria de Aragón. Apdo. 727, 50080 Zaragoza.

²Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias. Apdo. Oficial, 46113 Moncada, Valencia.

Los virus del marchitamiento del haba (*Broad bean wilt virus*, BBWV-1 y BBWV-2) pertenecen al género *Fabavirus*, familia *Comoviridae*. Su distribución geográfica comprende países de los cinco continentes. Su gama de huéspedes es amplia e incluye especies cultivadas y silvestres pertenecientes a varias familias botánicas, entre ellas muchos cultivos hortícolas de importancia económica como haba, guisante, judía, pimiento, tomate, berenjena, lechuga, alcachofa, espinaca, apio, zanahoria, perejil, etc. En España, BBWV-1 se ha encontrado infectando pimiento desde 1981 en varias zonas: Logroño, Murcia, Zaragoza, Huesca, León y Castellón.

En este trabajo se ha realizado la caracterización biológica del aislado Ben de BBWV-1, procedente de Benicarló (Castellón), por inoculación mecánica en una gama de 25 especies indicadoras pertenecientes a 9 familias. Se observó infección sistémica en 20 especies, de las que 13 mostraron además reacción local (lesiones, anillos y/o círculos cloróticos o necróticos). Tres especies mostraron reacción local sin infección sistémica y sólo dos especies no mostraron ningún tipo de reacción. La ausencia de infección sistémica se verificó por retroinoculación en *Vigna unguiculata* L.Walp, *N. megalosiphon* Heurck e Muell. y *Solanum melongena* L. "Cerna Krazavitz", y/o ELISA-DAS utilizando un antisuero comercial de BBWV-1 (Loewe). Se ha observado que tanto los síntomas locales como los sistémicos son irregulares y que frecuentemente no aparecen en todas las plantas inoculadas de la misma especie. También se ensayó la detección del virus en las plantas infectadas mediante inmunopresión directa e indirecta en membranas de nitrocelulosa. Se detectó el virus en la mayoría de plantas con síntomas y, en algunos casos, se superó la sensibilidad obtenida por ELISA-DAS en plantas asintomáticas o con síntomas poco visibles. La inmunopresión indirecta fue la técnica más sensible y la que proporcionó resultados más claros. Los resultados de este trabajo aportan información valiosa para comparar el aislado español con otros aislados de BBWV-1 descritos en el mundo y conocer el papel de las especies susceptibles como reservorio del virus, así como sobre métodos eficaces para su diagnóstico en campo, contribuyendo al estudio de este virus y de su epidemiología.

VARIABILIDAD GÉNÉTICA EN LA PROTEÍNA DE CUBIERTA DE DOS VIRUS ASOCIADOS CON LA ENFERMEDAD DE LAS VENAS GRANDES DE LA LECHUGA E IDENTIFICACIÓN DE HUÉSPEDES ALTERNATIVOS ENTRE LAS MALAS HIERBAS PRESENTES EN EL CAMPO

NAVARRO, J.A.¹; TOROK, V.A.²; VETTEN, H.J.²; BOTELLA, F.³; MARUHENDA, A.⁴; SASTRE, P.⁴; SÁNCHEZ-PINA, M.A.⁵; PALLÁS, V.¹

¹IBMCP (UPV-CSIC) Avda. dels Tarongers, s/n, 46022, Valencia.

²BBA, Messeweg 11/12, 38104 Braunschweig, Alemania.

³UMH. Avda. Ferrocarril, s/n, 03202. Elx.

⁴PRIMAFLOR S.A.T., La Estacion 2, 04640. Pulpí.

⁵CEBAS (CSIC). Campus Universitario de Espinardo, 30100 Murcia.

El virus Mirafiori de las venas grandes de la lechuga (*Mirafiori lettuce big-vein virus*, MLBVV) es el agente causal de la enfermedad de las venas grandes de la lechuga aunque frecuentemente las plantas enfermas presentan un segundo virus denominado por este motivo virus asociado de las venas grandes de la lechuga (*Lettuce big-vein-associated virus*, LBVaV). En este trabajo se han obtenido las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de las proteínas de cubierta (CP) de varios aislados de ambos virus procedentes de diferentes países. La comparación de las secuencias de la CP de los aislados de ambos virus mostró un elevado grado de similitud. El análisis filogenético de la secuencia de nucleótidos de la CP de LBVaV no reveló un agrupamiento significativo de acuerdo con el origen geográfico de los aislados. El análisis filogenético de las secuencias de la CP de MLBVV mostró la presencia de dos grupos, que se denominaron como A y B, aunque tampoco se observó una relación con la expresión de síntomas o con el origen geográfico de los aislados. Además, se ha estudiado la capacidad de las malas hierbas más importantes presentes en los campos de producción de lechuga españoles para actuar como huéspedes de ambos virus. La única especie capaz de ser infectada con ambos virus y transmitirlos de nuevo a plantas de lechuga mediante su vector de transmisión natural, el hongo *Olpidium brassicae*, resultó ser *Sonchus oleraceus*, perteneciente a la familia de las compuestas. Las secuencias de las CP de ambos virus aislados de esta mala hierba de forma natural mostraron un elevado grado de similitud con las secuencias de los aislados de lechuga. Estos datos sugieren que *Sonchus oleraceus* es una especie que podría permitir la persistencia de la enfermedad en periodos en los que no existiese producción de lechugas.

ETIOLOGÍA DE UNA ENFERMEDAD DE LA PIMIENTA (*Piper nigrum*, L.) EN LA ISLA DE SANTO TOMÉ

PAGÁN, I.; REQUENA, A.; FRAILE, A.; GARCÍA-ARENAL, F.

Departamento de Biotecnología E.T.S.I.Agrónomos, Universidad Politécnica de Madrid, 28040, Madrid, Spain

El cultivo de la pimienta (*Piper nigrum*) proporciona una importante fuente de ingresos a los pequeños agricultores de los países tropicales. Sus características lo hacen compatible con la conservación del medio rural. Por ello, los programas internacionales de cooperación favorecen su desarrollo. En la isla de Santo Tomé (África ecuatorial) las plantaciones de pimienta se encuentran afectadas por una enfermedad que causa mosaico, reducción de la lámina foliar y enanismo de las lianas, acompañado de un descenso grave de la producción. En las plantas infectadas se detectaron partículas virales baciliformes que reaccionan con un antisuero contra el virus del moteado amarillo de la pimienta (PYMV, género *Badnavirus*) de Sri Lanka. Análisis de PCR de plantas sintomáticas y asintomáticas con cebadores universales del género *Badnavirus* muestran correlación entre presencia de un amplicón y síntomas de la enfermedad. PYMV se ha identificado como el agente causal de una enfermedad similar en varias regiones de Sri Lanka, Malasia, Tailandia y Filipinas. No existe información sobre la secuencia del genoma de PYMV. A partir de partículas virales purificadas se ha determinado la secuencia de nucleótidos completa de un aislado de PYMV de Santo Tomé. El genoma consta de 5783 pb y contiene 4 ORFs en la hebra positiva, el tamaño y disposición de estos es similar al de otros miembros del género: el ORF1 tiene una longitud de 246 nt, el ORF2 de 408 nt, el ORF3 de 4359 nt y el ORF4 de 459 nt. Mientras el resto de ORFs están poco conservados entre los virus de este género, la secuencia de aminoácidos del ORF3 contiene la mayoría de los motivos conservados entre las proteínas de los badnavirus: aspartil proteasa, transcriptasa reversa y ribonucleasa H. Dentro de la región intergénica está también presente el putativo sitio de unión del tRNA de metionina, altamente conservado entre los miembros del género. Estos resultados apoyan la inclusión de PYMV dentro de género *Badnavirus*, perteneciente a la familia *Caulimoviridae*. La determinación de la secuencia de nucleótidos de otros aislados permitirá desarrollar métodos de detección específicos.

REPRODUCCIÓN *in vitro* DEL SÍNDROME DEL DECAIMIENTO POR TRISTEZA EN PLANTAS DE NARANJO DULCE INJERTADO SOBRE NARANJO AMARGO

ROMÁN, M.P.; JUÁREZ, J.; ARREGUI, J.M.; ORTEGA, C.; CAMBRA, M.; NAVARRO, L.

Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA). Carretera Moncada – Náquera Km 5. 46113 Moncada, Valencia. mroman@ivia.es

El virus de la tristeza de los cítricos (*Citrus tristeza virus*- CTV) es el causante de la enfermedad viral más grave de los cítricos: la tristeza. La enfermedad está presente en todas las zonas cítricas del mundo con una incidencia variable y hasta ahora ha causado el decaimiento y muerte de más de 100 millones de árboles injertados sobre naranjo amargo. En este trabajo se ha puesto a punto un método *in vitro* para reproducir el síndrome de tristeza y así evaluar el potencial de aislados de CTV de causar decaimiento. Plantas de naranjo amargo procedentes de semilla cultivadas *in vitro* de aproximadamente 10 cm de longitud fueron decapitadas y posteriormente microinjertadas con brotes de naranjo dulce (6 mm de longitud) infectados con los aislados de CTV T- 300, T- 302 y T- 388, de diferente agresividad. El cultivo se realizó en cámara de cultivo con una temperatura constante de 25°C y una intensidad luminosa de 45 $\mu\text{E m}^{-2} \text{seg}^{-1}$ durante 16 horas. Se logró reproducir el síndrome de decaimiento lento y colapso (a los 7 meses del cultivo) en plantas infectadas con el aislado de CTV T- 300. El estudio anatómico de las plantas infectadas reveló cambios en los tejidos del tallo del naranjo dulce y de las raíces del naranjo amargo. Se observó una sobreproducción de floema y una degeneración precoz de éste. Se observó un crecimiento secundario anormal en el xilema tanto en el tallo como en la raíz de plantas cultivadas *in vitro* de 7 meses de edad. La raíz de las plantas infectadas con el aislado T- 300 presentó un desarrollo hipertrófico con engrosamientos, acanaladuras y acorchamientos que se correspondieron con graves daños al nivel del estele (rupturas de hasta el 50%), por lo que se consideró no funcional, dada su discontinuidad. El menor o mayor grado de afección en los tejidos se relacionó directamente con el estado físico de las plantas. Las plantas infectadas con los aislados de CTV T- 302 y T- 388, murieron entre los 7 y 60 días y 7 y 20 días, respectivamente, observándose necrosis de la yema, sin afectar la unión del injerto. En las plantas infectadas con CTV se observó una línea de abscisión en el naranjo dulce, en la unión del injerto, que precedió al decaimiento. Es la primera vez que se logra reproducir el decaimiento y muerte de plantas infectadas sobre naranjo amargo fuera de condiciones naturales. El método abre la posibilidad de evaluar el potencial de aislados de CTV de causar decaimiento en campo.

ANATOMÍA DE LA CORTEZA DE ÁRBOLES AFECTADOS POR LA MUERTE SÚBITA DE LOS CÍTRICOS EN BRASIL

ROMÁN, M.P.¹; JUÁREZ, J.¹; CAMBRA, M.¹; DURÁN-VILA, N.¹; MORENO, P.¹; AYRES, J.²; BOVÉ, J.M.³

¹Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA). Carretera Moncada-Náquera Km 5. 46113 Moncada, Valencia. mrroman@ivia.es

²Fundecitrus, Av. Dr. Adhemar Pereira de Barros, 201, CEP 14807-040, Araraquara, SP, Brasil.

³Institut Nationale de la Recherche Agronomique y Université de Bordeaux 2, IBVM, BP 81, 33883 Villenave d'Ornon cedex, France.

Una nueva enfermedad, denominada Muerte Súbita de los Cítricos (MSC), está tomando proporciones alarmantes en Brasil debido a la rapidez con la que las plantas afectadas entran en decaimiento, colapso y muerte. La enfermedad, que parece diseminarse por el pulgón *Toxoptera citricida*, afecta principalmente a los árboles de naranjo dulce y algunos mandarinos injertados sobre lima Rangpur y sobre limonero Volkameriano. La enfermedad es grave ya que en el estado de Sao Paulo, principal zona citrícola del mundo, se cultivan más de 200 millones de árboles sobre lima Rangpur. Con la finalidad de contribuir al estudio de la etiología de MSC se han estudiado anatómicamente cortezas de arriba y debajo de la unión de árboles de naranjo dulce injertado sobre los patrones lima Rangpur y limonero Volkameriano (con síntomas de MSC) y de mandarino Cleopatra (tolerante a la enfermedad), recolectadas de zonas afectadas y de zonas donde no se ha detectado la enfermedad. Así también, se analizaron cortezas de plantas que fueron injertadas por aproximación a árboles afectados con MSC. El estudio reveló importantes cambios anatómicos a nivel del floema, tanto en el naranjo dulce como en los patrones lima Rangpur y limonero Volkameriano. Se observó una sobreproducción de floema y una degeneración precoz de éste. Los elementos floemáticos, aún en las zonas más jóvenes del floema, se observaron obliterados, colapsados y con células cromáticas. Así las plantas afectadas con MSC presentaron una corteza de mayor grosor y una reducción notable del floema funcional. Los síntomas anatómicos fueron más intensos en los árboles con mayor afección. Los mismos cambios anatómicos se observaron en plantas de lima Rangpur y limón Volkameriano injertadas por aproximación a naranjo dulce injertado sobre lima Rangpur, afectado por MSC. No se observó sobre corteza de mandarino Cleopatra ningún cambio anatómico. Mandarino Cleopatra puede considerarse como un patrón tolerante a MSC, que se muestra como una enfermedad de combinación, transmisible por injerto y capaz de inducir cambios anatómicos similares a los que provoca el virus de la tristeza de los cítricos en árboles injertados sobre patrón naranjo amargo.

PROTOCOLO DE RT-PCR MÚLTIPLE PARA EL DIAGNÓSTICO Y CARACTERIZACIÓN DE LOS VIRUS “SOIL BORNE” DE LA REMOLACHA

RUBIES, C.; RATTI, C.; RESCA, R.; BIANCHI, L.; PALAUDELMÀS, M.

DiSTA, Via Filippo Re 8, 40126 - Bologna, Italia. E-mail: crubies@agrsci.unibo.it

El cultivo de la remolacha azucarera está afectado por cuatro virus transmitidos por el suelo mediante el vector Plasmodioforal *Polymyxa betae*. El más difundido es *Beet necrotic yellow vein virus* (BNYVV), agente de la rizomania, enfermedad que causa graves pérdidas en las principales áreas de cultivo de la remolacha. El genoma de BNYVV posee cuatro moléculas de RNA, aunque se han descrito aislados con 5. Los aislados se clasifican en tres tipos distintos: A, B y los que contienen un quinto RNA se denominan tipo P.

La presencia del virus de la remolacha transmitido por el suelo (*Beet soil borne virus*, BSBV), el virus Q (*Beet virus Q*, BVQ) y el virus del mosaico de la remolacha transmitido por el suelo (*Beet soil borne mosaic virus*, BSBMV) se han descrito en la mayoría de las áreas asociados a BNYVV, aunque el último solamente se ha identificado en Estados Unidos.

El objetivo de este trabajo ha sido encontrar un método y/o modificar el protocolo de retrotranscripción-reacción en cadena de la polimerasa múltiple (RT-PCR) para caracterizar no sólo los tipos A, B y P de BNYVV, sino que también permita a la vez diagnosticar y caracterizar BSBV, BVQ, BSBMV y su vector *P. betae*.

Todos los cebadores diseñados y ensayados en 107 muestras han amplificado los fragmentos genómicos esperados: 178 bp del RNA2 de aislados del tipo B de BNYVV, 323 bp del RNA2 de tipo A de BNYVV, 593 bp de aislados del RNA5 de BNYVV, 456 bp y 678 bp del RNA2 de BSBV, 521 bp del RNA3 de BVQ, y 261 bp del genoma de *P. betae*. No se ha amplificado ningún fragmento de extractos de planta sana o de plantas infectadas con otros virus relacionados. Los tamaños de los fragmentos amplificados difieren suficientemente de tamaño como para utilizar este método en la detección rutinaria de estos virus y es aplicable a un gran número de muestras.

PARARETROVIRUS ENDÓGENOS (EPRVS) EN PLANTAS HORTÍCOLAS: VARIABILIDAD DE EPRVS EN PIMIENTO

RUIZ, L.; NAVARRO, E.; CASTRO, S.; ROMERO, J.

Departamento de Protección Vegetal, INIA. Carretera de La Coruña Km 7,0. 28040-Madrid

Recientemente se han descrito numerosas secuencias de pararetrovirus integradas en el genoma de diversas especies de importancia agronómica como banano, petunia y tabaco, secuencias, que han sido denominadas pararetrovirus endógenos (EPRVs). Trabajos recientes sugieren que EPRVs existen en diferentes estados de actividad potencial en distintas especies cultivadas. EPRVs pueden ser solo componentes neutrales del genoma de las plantas o pueden ser infecciosos, expresando partículas virales y causando graves enfermedades en plantas. Con la finalidad de conocer si EPRVs están presentes en plantas hortícolas, analizamos por PCR, diferentes variedades de pimiento, tomate y berenjena, utilizando cebadores diseñados a partir de la secuencia descrita de EPRVs en *Nicotiana tabacum*. Las amplificaciones obtenidas fueron clonadas y secuenciadas, mostrando poseer una alta similitud con otros EPRVs descritos en otras plantas. Análisis filogenéticos de 34 secuencias obtenidas en pimiento nos han permitido hacer un estudio de variabilidad de EPRVs en tres especies comerciales: *Capsicum tetragonium* Mill, *Capsicum chinense* Jacquin cv. y *Capsicum annum* L. var *annuum* L. El análisis mostró dos grupos bien diferenciados: un primer grupo presentaba un 60% de homología con el genoma de *Lycopersicum sculentum* y un segundo grupo que mostraba un alto porcentaje de identidad con el virus del aclaramiento de las venas del tabaco (*Tobacco vein clearing virus*, TVCV) (70%) y con EPRVs insertadas en el genoma de *Solanum tuberosum* (entre 54-76%). Dos secuencias representativas de cada uno de los grupos fueron usadas como sondas en un análisis de "Southern blot" del DNA genómico de las tres especies de pimiento. El resultado del análisis manifestó la presencia de una sola copia cuando utilizamos como sonda la secuencia homóloga al genoma de *L. sculentum*. Por el contrario, el resultado de la hibridación con la sonda homóloga al genoma de TVCV mostró la presencia de muchas bandas, lo que sugiere la existencia de más de una copia en el genoma de las especies de pimiento estudiadas. Secuencias de EPRVs-like en el genoma del pimiento tienen una pequeña variabilidad que parece ser independiente de la especie analizada. La posibilidad de formar partículas virales será discutida.

IDENTIFICACIÓN DE UN NUEVO HUÉSPED DE *Amaranthus leaf mottle virus*, CARACTERIZACIÓN MOLECULAR Y TAXONÓMICA DE ESTE POTYVIRUS

SEGUNDO, E. ¹; MARTÍN, G. ¹; JANSSEN, D. ¹; GIMENEZ, E. ²; RUIZ, L. ¹; VELASCO, L. ¹; ORTEGA, A. ¹; BELMONTE, A. ¹; CUADRADO, I.M.

¹CIFA "La Mojonera", IFAPA, Autovía del Mediterráneo, Km 420, La Mojonera (Almería).
virucifa@arrakis.es

²Dpto. de Biología Vegetal (Universidad de Almería)

El género *Potyvirus* (familia *Potyviridae*) constituye el género más grande y económicamente más importante de virus de plantas. Muchos de los miembros de este genero causan pérdidas importantes en cultivos agrícolas. Los virus de esta familia tienen un genoma RNA de cadena sencilla de sentido positivo de aproximadamente 10kb y con un poly-(A) en su extremo 3'. El potyvirus *Amaranthus leaf mottle virus* (AmLMV) está caracterizado biológica, microscópica y serológicamente y se ha encontrado como huésped natural en *Amaranthus deflexus* y *Cirsium arvensis*. Aunque este virus nunca se ha encontrado en plantas cultivadas, su rango de huésped y variabilidad ha sugerido a ciertos autores que es un patógeno potencial para cultivos, fundamentalmente de las familias *Leguminosae* o *Chenopodiaceae*. En el presente trabajo se describe un nuevo aislado de dicho virus obtenido de un nuevo huésped, *A. viridis*, en Andalucía oriental. Por medio de cebadores oligonucleotídicos de potyvirus y RT-PCR se ha realizado la primera secuenciación parcial del genoma de esta especie (1777 nucleótidos que comprenden parte de la inclusión nuclear b, la capsida completa y el extremo 3' no codificante). La secuencia aminoacídica muestra una identidad del 53% al 73 % con potyvirus, y la secuencia de nucleótidos del extremo 3' no codificante una identidad del 19 al 52 % con potyvirus, siendo en ambos casos PVY (*Potato virus Y*) el virus con el que presenta más similitud. El estudio taxonómico a partir de la secuencia de este virus encuadra a AmLMV como especie en el grupo de los potyvirus y próximo a PVY.

DETECCIÓN DE NUEVOS VIRUS EN CEREALES DE INVIERNO ASOCIADOS A UN BROTE EPIDÉMICO DEL *Barley yellow dwarf virus*

SERRANO, L.; MARSINACH, M.; ACHÓN, M.A.

Area de Protecció de Conreus, Centre UdL-IRTA Alcalde Rovira Roure 177, E-25198 Lleida. Achon@pvcf.udl.es

En la primavera del 2003 en los campos de cebada de la provincia de Lleida se observó una sintomatología severa que se caracterizaba por un enanismo acusado, un fuerte amarilleo generalizado y una prematura senescencia. Estos síntomas podían extenderse por todo el campo o localizarse áreas muy extensas del campo sin un patrón determinado. Se recogieron un total de 106 muestras procedentes de 15 campos y se analizaron por ELISA en su modalidad TAS y/o DAS con todos los antisueros comerciales contra todos los cereales de invierno descritos y también se analizaron para los principales nematodos que afectan a estos cultivos. Los resultados de estos análisis asocian esta sintomatología con la infección en un 94 % de las muestras con *Barley yellow dwarf virus* (BYDV), en infecciones simples, dobles o múltiples con *Barley mild mosaic virus* (BaMMV), *Barley yellow mosaic virus* (BaYMV), *Wheat dwarf virus* (WDV) y *Wheat stripe mosaic virus* (WSMV).

La detección serológica, por primera vez en España, de BaYMV, WDV y WSMV se ha podido confirmar molecularmente para los dos primeros. El análisis de las secuencias obtenidas de los genomas parciales de estos virus revelan una mayor homología de los aislados españoles con aislados europeos que con los de otras partes del mundo. Probablemente la no amplificación del genoma de wsmv sea debido al avanzado estado de senescencia en que se encontraban las muestras. No se ha detectado ningún nematodo asociado a la sintomatología descrita.

DETECCIÓN DE *Grapevine virus B* ASOCIADO A SÍNTOMAS DE MADERA RIZADA (*CORKY BARK*) EN VID CV. NAPOLEÓN EN MURCIA

VELASCO, L.; GARCÍA, B.; HITA, I.; PADILLA, V.

Departamento de Biotecnología y Protección Vegetal. Instituto Murciano de Investigación y Desarrollo Agrario y Alimentario (IMIDA). c/ Mayor s/n. 30150 La Alberca – Murcia. E-mail: leonardo.velasco@carm.es

Durante una serie de prospecciones realizadas en parcelas de vid para uva de mesa cv. Napoleón se observaron plantas que manifestaban síntomas característicos de la madera rizada y más específicamente de madera acorchada (*corky bark*). La etiología del complejo de la madera rizada (*Rugose wood*, RW) que incluye a *corky bark* se atribuye en la literatura a miembros del género *Vitivirus* entre los que se encuentran *Grapevine virus A* (GVA) y *Grapevine virus B* (GVB). A este último se le ha responsabilizado de causar la madera acorchada en vid.

Un total de 18 plantas de 9 parcelas diferentes mostrando síntomas de madera rizada fueron analizadas mediante RT-PCR con cebadores específicos para GVA (H7038 y C7273) y GVB (H6980 y C7439), resultando todas positivas para GVB (producto de 460 bp) y ninguna para GVA. Extractos de dos de las plantas sintomáticas se inocularon mecánicamente en las indicadoras *Nicotiana benthamiana* y *N. clevelandii*. Sólo en *N. clevelandii* aparecieron síntomas de infección: puntos necróticos en tallo que evolucionaron a necrosis sistémica y deformación en las hojas. A partir de estas indicadoras se realizaron extracciones de ácidos nucleicos y las posteriores RT-PCR con los cebadores de GVB resultaron positivas (aislados M5 y M9). Los productos de la amplificación se clonaron en el vector pGEMT-Easy (Promega) y la secuenciación de los mismos arrojó los siguientes datos: La identidad nucleotídica fue del 81 % en 416 pb de la región correspondiente al ORF que codifica para la proteína RbP (RNA binding protein) de ambos aislados respecto a la secuencia X75448 presente en el EMBL/NCBI. La secuencia de aminoácidos deducida presentó una identidad respecto a X75448 del 85 % y 84 % en los aislados M5 y M9, respectivamente. En ambos casos la similitud fue del 93 % frente a X75448.

La secuenciación de estos aislados está extendiéndose actualmente a otras regiones del genoma. Por otro lado, se está analizando la secuencia de más aislados para determinar la variabilidad existente. Por último, se está procediendo a la inoculación en diversas indicadoras para establecer el rango de huéspedes dadas las diferencias que parecen existir entre los diferentes aislados descritos en diferentes localizaciones.

VIROSIS DE LA VID. REALIDAD Y LEGISLACIÓN

PADILLA, V.; HITA, I.; PADILLA, C.V.; GARCÍA, B.; ARJONA, L.

IMIDA (Instituto Murciano de Investigación y Desarrollo Agroalimentario). La Alberca. Murcia (ventura.padilla@carm.es)

Uno de los mayores problemas con que nos encontramos en la vid, a la hora de hacer un diagnóstico frente a virosis dirigido a establecer la certificación de la planta en cuestión, reside en una cierta incongruencia en relación a qué virus hay que considerar y cuales son realmente perjudiciales.

En este sentido presentamos este trabajo fruto de los resultados que hemos venido obteniendo desde hace años, utilizando técnicas de indexage y ELISA, en los que se han controlado gran número de posibles cabezas de clon, fundamentalmente de viníferas, procedentes de preselecciones clonales llevadas a cabo en las diferentes zonas vitícolas españolas; por lo que consideramos que dichos resultados son una imagen real de la situación sanitaria de las selecciones efectuadas en nuestro país.

En esta comunicación vamos a tener en cuenta únicamente aquellos virus motivo de polémica como son *Enrollado*, *Jaspeado*, *Mosaico del Arabis* y el *Complejo de la Madera rizada*.

Dicha controversia deriva de los siguientes hechos, recogidos en el Reglamento Técnico de Control y Certificación de Plantas de Vivero de Vid (21 de febrero de 2003), y de la Directiva Comunitaria – a punto de publicarse – que recoge los cambios efectuados en la 68/193, relativa a la propagación vegetativa de la vid y su comercialización:

- estimar solamente los tipos 1 y 3 de *enrollado* (ambas legislaciones)
- establecer la *degeneración infecciosa* como el binomio formado por las virosis *entrenudo corto infeccioso* y *mosaico del arabis* (Directiva comunitaria)
- considerar el *jaspeado* únicamente para portainjertos (Directiva comunitaria)

Por otra parte no se tiene en cuenta el *complejo de la madera rizada*, cuando nuestra experiencia nos señala que su presencia es muy abundante y sobre todo en uva de mesa.

En cuanto a resultados, los datos que ofrecemos en este trabajo corresponden a los diagnósticos vs. Virosis (FL, LR y Fk) – en el periodo 1980-1999 – de 1378 clones procedentes de preselecciones clonales, de los cuales 812 individuos resultaron exentos de dichos virus, siendo el porcentaje de infección de los 566 restantes de 8.30% (FL), 38.33% (Fk) y 53.35% (LR).

En el caso particular del *enrollado*, y en otro estudio realizado a partir del año 2000 sobre una población de 752 clones correspondientes a diferentes variedades en 14 Comunidades Autónomas, encontramos que 180 individuos estaban afectados, de los cuales 34 (18,88%) correspondía al T1, 75 (41,66%) al T2 y 71 (39,44%) al T3.

Estos resultados nos indican que el virus con mayor presencia es el *enrollado* y dentro de éste, los tipos 2 y 3, lo cuál supone una paradoja respecto a la legislación actual.

DETECCIÓN Y FLUCTUACIÓN ESTACIONAL DEL FITOPLASMA DEL STOLBUR EN VIÑA

BATLLE, A.; SABATÉ, J.; LAVIÑA, A.

Dpt. Protecció Vegetal. Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentàries (IRTA). Ctra de Cabrils s/n. 08348 Cabrils, Barcelona. E-mail: assumpcio.batlle@irta.es

El fitoplasma del stolbur, responsable de la enfermedad de la madera negra o Bois Noir de la viña, ha sido identificado en distintas áreas vitivinícolas de Cataluña, Aragón, Navarra y La Rioja. Debido a la baja concentración de este fitoplasma en plantas leñosas, la técnica de la PCR-nido es la más adecuada para su detección. Sin embargo, esta técnica implica a menudo la presencia de contaminaciones y no resulta adecuada para los controles rutinarios de material vegetal. Los objetivos de este estudio han sido, por un lado comparar los resultados obtenidos con distintas modalidades de PCR: PCR-nido, PCR-dot-blot e inmunocaptura-PCR-dot-blot y por otro determinar el mejor periodo y el mejor material vegetal para obtener una detección fiable de este fitoplasma en viña.

La extracción de ADN se realizó siguiendo el procedimiento de Ahrens & Seemüller (1992). En el caso de la inmunocaptura, las placas de PCR se tapizaban con anticuerpos para la enfermedad de Moliere (stolbur) de la casa Adgen. Las muestras se homogeneizaban en tampón PBS y se fijaban a las placas pretapizadas. La PCR-nido se llevo a cabo con los cebadores universales P1/P7, situados en el gen ribosómico 16S rDNA y el gen 23S rDNA respectivamente. La segunda etapa se llevó a cabo con los cebadores universales fU5/rU3 o con cebadores específicos para el grupo Stolbur.

Para el método PCR-dot blot se llevaba a cabo una sola PCR. Dos µl del producto de amplificación se fijaban en membrana de nylon y se hibridaban con sondas luminiscentes específicas para el fitoplasma del stolbur.

Los resultados obtenidos han mostrado que el método combinado PCR-dot blot es igual o en ocasiones más sensible que la PCR-nido. Además esta técnica puede evitar las contaminaciones que ocurren a menudo cuando se utiliza la PCR-nido. Cuando se ha utilizado la inmunocaptura se ha obtenido detección positiva en los casos de mayor concentración de fitoplasmas. Esta técnica aunque debe ser mejorada ofrece una posible vía para la simplificación del diagnostico de fitoplasmas a través de la PCR.

La fluctuación estacional de la detección de este fitoplasma se siguió en 10 plantas afectadas por la enfermedad. Las muestras se recogieron mensualmente, exceptuando el periodo después de la poda, entre enero y marzo. Se analizaron por separado el floema del tallo, yemas y hoja. Para este estudio se utilizó la PCR-nido.

El fitoplasma fue detectado en todas las partes de la planta utilizadas. La máxima detección se obtuvo en diciembre como ocurre también en otras plantas leñosas, produciéndose un aumento progresivo del número de muestras en que se detecta el fitoplasma desde abril hasta diciembre.

DETECCIÓN DE *Xanthomonas vesicatoria* EN EL CULTIVO DE PIMIENTO (*Capsicum annuum*) EN LA COMARCA DE EL BIERZO (LEÓN)

CAMPELO, M.P.¹; PALOMO, J.L.²; LORENZANA, A.¹; GÓMEZ-BERNARDO, E.M.¹; FUERTES, J.R.³

¹Laboratorio de Diagnóstico de Plagas y Enfermedades Vegetales. Fundación Chicarro-Canseco-Banciella. E. S. T. I. Agraria. Universidad de León. Avda. de Portugal, 41. 24071 León.

²Centro Regional de Diagnóstico. Junta de Castilla y León. Apdo. 61. 37080 Salamanca.³IGP Pimiento Asado del Bierzo. C/. Padre Santalla, 3 – 2º. Dcha. 24400 Ponferrada (León).

La sarna bacteriana del pimiento, causada por la bacteria *Xanthomonas vesicatoria* (Doidge) Vauterin *et al.*, es un patógeno de cuarentena incluido en la lista A2 de la Unión Europea (Directiva 2000/29/CE).

Durante el año 2003 la bacteria se detectó en varias muestras y originó graves daños en la comarca de El Bierzo (León). Los principales síntomas observados fueron manchas en hojas, debilitamiento, menor desarrollo vegetativo e intensa defoliación; el menor calibre de los frutos y la presencia de manchas en los mismos redujo y depreció considerablemente la cosecha.

Teniendo en cuenta la capacidad de transmisión por semilla de esta bacteria, se realizó una prospección oficial en la que se analizaron todos los lotes de semilla de pimiento para la campaña 2004 pertenecientes a la Indicación Geográfica Protegida (IGP) Pimiento Asado del Bierzo. En total se dispuso de 20 lotes de diferentes localidades de esta comarca.

De cada una de las partidas se germinaron 100 semillas hasta el estado fenológico correspondiente a 3 hojas verdaderas. Para la detección de *X. vesicatoria* en las plántulas se tomaron muestras de 50 hojas por cada lote, macerándose y concentrándose mediante centrifugación. Se realizaron siembras en medio de cultivo (LPGA + Cicloheximida) de las que se seleccionaron colonias con morfología típica y se caracterizaron mediante una serie de pruebas bioquímicas y PCR. Así mismo, se llevó a cabo el diagnóstico molecular mediante PCR a partir del DNA extraído siguiendo el protocolo de Leite *et al.* (1994).

Tres de los lotes analizados han dado resultado positivo para la detección de *X. vesicatoria* y, al tratarse de una bacteria de cuarentena, se tomaron las medidas necesarias inmovilizando e incinerando las partidas de siembra afectadas.

DETECCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LOS *Streptomyces* CAUSANTES DE SARNA COMÚN EN LA PATATA DE SIEMBRA IMPORTADA DEL NORTE DE EUROPA

FLORES, R.²; VELASCO, I.¹; ANDÚJAR, E.¹; ORTEGA, M.G.¹; MONTES, F.²

¹ Asociafruit .

² Servicio de Sanidad Vegetal de la Junta de Andalucía

Laboratorio de Sanidad Vegetal de Sevilla. Apdo121. 41089 Montequinto (Sevilla).E-mail: patologia.lsvse.cap@juntadeandalucia.es

Streptomyces scabiei (antes *S. scabies*) está considerado el principal agente causante de la Sarna común de las patatas, pero no el único. Se ha comprobado que otras especies de *Streptomyces* causan esta misma enfermedad en ciertos tipos de suelo o ciertas regiones geográficas. Sin embargo, la epidemiología de esta enfermedad se conoce mal porque no existen métodos rápidos y eficaces para el aislamiento y la caracterización de *Streptomyces*. Algunos de los *Streptomyces* patógenos tienen en común ciertos genes implicados en la patogenia, y se piensa que, probablemente, estos genes y la capacidad patogénica han pasado por transmisión horizontal desde *S. scabiei* a las otras especies.

En nuestro laboratorio hemos diseñado un método de PCR que permite amplificar cierta región de los genes que determinan la patogenia, y detectar *Streptomyces* patógenos en la superficie de los tubérculos. Para contrastar la validez de este método, hemos analizado unas 80 muestras de tubérculos con síntomas de Sarna común. Las muestras, tomadas en los años 2001 a 2004 de lotes de patata de siembra de importación, pertenecían a unas 20 variedades y procedían de 4 países europeos. En todas las muestras con síntomas evidentes se detectó por PCR la presencia de *Streptomyces*. Estos *Streptomyces* fueron aislados y caracterizados. *S. scabiei* fue la especie encontrada en todos los casos. Nuestros resultados sugieren que *S. scabiei* es el principal causante de Sarna común en la semilla de importación procedente de los principales países productores del norte de Europa, y que la detección por PCR puede ser un método rápido y eficaz en el diagnóstico de esta enfermedad.

***Pseudomonas viridiflava* COMO AGENTE CAUSAL DE MANCHA NECRÓTICA EN *Hebe* sp.**

GONZÁLEZ, A.J.¹; LANDERAS, E.²; RODICIO, M.R.³

¹Laboratorio de Fitopatología. SERIDA. Carretera de Oviedo s/n, 33300 Villaviciosa. Asturias, e-mail: anagf@serida.org.

²Laboratorio de Sanidad Vegetal. Consejería de Medio Rural y Pesca. c/Lucas Rodríguez 4, bajo, 33011 Oviedo. ³Área de Microbiología. Departamento de Biología Funcional. Universidad de Oviedo, c/Julián Clavería 6, 33006, Oviedo.

Durante 2003 en cultivos de vivero de *Hebe* se observaron daños consistentes en lesiones necróticas en las hojas que podían llegar a producir defoliación. Muestras con síntomas se sometieron a análisis microbiológico convencional, siembra en agar de patata y dextrosa (APD) para determinar las especies fúngicas, y en agar King B (tras la dilaceración de los tejidos) para el aislamiento de bacterias. En medio APD se aisló *Stemphyllium* sp, mientras que en King B se aisló una *Pseudomonas* del grupo fluorescente. Ante esta situación, se realizaron pruebas de patogenicidad en *Hebe*, ensayando diferentes combinaciones de patógenos: tres aislamientos fúngicos por separado y su mezcla, dos aislamientos bacterianos por separado y su mezcla, así como todas las combinaciones posibles de estas variables. En cada ocasión se inocularon cuatro plántulas mediante pulverización. Las plántulas inoculadas con las bacterias se mantuvieron durante 48 h cubiertas por una bolsa de plástico transparente, para conseguir una humedad alta y así facilitar la infección.

Los resultados mostraron que la enfermedad era causada por la bacteria. Los aislamientos de *Stemphyllium*, de forma individual o en combinación, fueron incapaces de producir daño. Sin embargo, en uno de los casos se observó proliferación del hongo sobre las hojas originando una especie de fumagina pero no necrosis. Tampoco se observó sinergia entre los microorganismos inoculados, estando los daños originalmente observados asociados únicamente a la presencia de la bacteria.

La identificación de la bacteria se llevó a cabo aplicando el esquema LOPAT complementado con pruebas como el test de oxidación/fermentación de Hugh-Leifson, la hidrólisis de esculina y gelatina y la utilización de diferentes sustratos como fuentes de carbono. El perfil bioquímico obtenido corresponde a las cepas atípicas de *P. viridiflava* BT2 previamente descritas como patógenas en otros cultivos. Para confirmar la identificación bioquímica se recurrió a una técnica molecular: amplificación-restricción del gen que codifica el ARNr 16S.

En resumen, los resultados obtenidos permitieron asociar claramente la mancha necrótica en *Hebe* a la presencia de *P. viridiflava* BT2.

***Pseudomonas viridiflava* Y *Pseudomonas syringae* CON DIFERENTES PERFILES BIOQUÍMICOS CAUSAN CAÍDA DEL BOTÓN FLORAL EN KIWÍ (*Actinidia deliciosa*)**

GONZÁLEZ, A.J.¹; RODICIO, M.R.²; MENDOZA, M.C.²

¹Laboratorio de Fitopatología. SERIDA. carretera de Oviedo s/n, 33300 Villaviciosa. Asturias, e-mail: anagf@serida.org.

² Área de Microbiología. Departamento de Biología Funcional. Universidad de Oviedo. C/ Julián Clavería 6, 33006 Oviedo.

El kiwi es el tercer cultivo frutal en importancia de Asturias tras la manzana de sidra y de mesa. El cultivo se ve afectado por una patología que ocasiona podredumbre y caída del botón floral a la cual se han asociado bacterias del género *Pseudomonas*: *P. viridiflava* y *P. syringae* (1, 2).

Para estudiar este problema se está realizando, desde el año 2000, un seguimiento epidemiológico analizando muestras de plantas con síntomas mediante técnicas microbiológicas convencionales de aislamiento e identificación. Los resultados obtenidos revelaron que diferentes perfiles bioquímicos o biotipos (BT) de las dos especies citadas afectan al kiwi produciendo los síntomas mencionados.

P. viridiflava BT2 se caracteriza por producir colonias convexas y mucosas, de color amarillo, en medio levano y por una reacción variable en la prueba de la pectinólisis de la patata (2). Genera, por tanto, un perfil LOPAT (+-v-+) que difiere del esperado para la especie (--+-+; BT1). Este biotipo fue el único presente en las muestras analizadas, no obteniéndose ningún aislamiento que correspondiese a cepas típicas de *P. viridiflava*. BT2 se asignó, de manera inequívoca, a *P. viridiflava* mediante la secuenciación del gen que codifica el ARN ribosomal 16S (ADNr 16S).

P. syringae presentó una gran heterogeneidad bioquímica, ya que el estudio de diez aislamientos reveló la presencia de ocho biotipos (BT1-BT8), que se diferenciaron en alguna de las siguientes pruebas: pigmento en medio hipersacarosado, pectinólisis, hidrólisis de la gelatina y utilización de lactato y adonitol. La adscripción de estos aislamientos a la especie *P. syringae* se realizó en base a la secuenciación del ADNr 16S.

En aislamientos representativos de diferentes biotipos se comprobó la patogenicidad en el huésped de procedencia, y se estudió el daño causado en otros huéspedes. Los resultados confirmaron el poder patógeno de todos ellos. Además, en las inoculaciones realizadas en kiwi con *P. viridiflava* BT2, se produjeron frutos deformes a partir de los botones florales que no cayeron a consecuencia de la infección. En las inoculaciones de aislamientos de *P. syringae* se observaron frutos de pequeño tamaño pero no deformes.

(1) González, A. J., y Ávila, M. 2001. Plant Dis. 85: 1287

(2) González, A. J., Rodicio, M. R. and Mendoza, M. C. 2003. Appl. Environ. Microbiol. 69: 2936-2941

COMPOSICIÓN PATOGENICA DE BACTERIOSIS DE JUDÍA-GRANO (*Phaseolus vulgaris* L.) EN CASTILLA Y LEÓN

LÓPEZ, R.; FERNÁNDEZ, S.; IBEAS, A.; ASENSIO-S-MANZANERA, M.C.; ASENSIO, C.
 Instituto Tecnológico Agrario de Castilla y León (ITACYL). Junta de Castilla y León, Ctra. Burgos Km. 119. 47071 Valladolid.

Las tres principales enfermedades de origen bacteriano que afectan al cultivo de judía a escala mundial están causadas por los patógenos: *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* (*Xcp*) y su variante *fuscans* (*Xcpf*), *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* (*Psp*) y *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* de (*Pss*). Las tres bacterias han sido identificadas en campos de cultivo de Castilla y León, sin embargo se desconoce la incidencia e importancia relativa de cada una de ellas. Así mismo, estudios recientes han demostrado la existencia en esta comunidad de una elevada proporción (68,8 %) de aislados de *Psp* no productores de faseolotoxina (Tox-), lo que contrasta con la hipótesis habitual que considera que estos aislados ocurren excepcionalmente en campo y tienen una relativa importancia epidemiológica.

Durante el verano de 2003 se llevó a cabo una prospección por las principales zonas de cultivo de judía-grano de Castilla y León con objeto de recoger muestras de planta que presentaran síntomas claros de bacteriosis. Se inspeccionaron un total de 14 parcelas localizadas en 6 provincias (Ávila, Burgos, León, Valladolid, Zamora y Palencia). Las bacterias fueron aisladas en medio semiselectivo, "Milk-Tween" Agar, siguiendo el procedimiento estándar. Este medio permite la distinción en placa de los tres patógenos en estudio incluida la variante *fuscans* de *Xcp*. Se comprobó la patogenicidad de todos los aislados recogidos mediante la inoculación en vaina con punzón a partir de cultivos puros. La identificación se realizó mediante pruebas bioquímicas y amplificación por PCR con cebadores específicos. En el caso de *Psp* todos los cebadores hasta la fecha descritos están dirigidos a la amplificación de determinadas regiones del genoma responsables de la biosíntesis de la faseolotoxina (*tox* cluster), por lo que sólo fue posible identificar, mediante técnicas moleculares, aquellos aislados de *Psp* productores de faseolotoxina (Tox+).

Se recogieron un total de 52 muestras, procedentes tanto de variedades locales como comerciales. En un 63 % de estas muestras fue posible aislar al menos uno de los tres patógenos anteriormente descritos. Un 55,8 % del total de aislados identificados se correspondió con aislados de *Psp*, de éstos un 26 % fueron identificados mediante amplificación por PCR como aislados de *Psp* productores de faseolotoxina (Tox+). Por último, un 26,5 % se correspondieron con aislados de *Xcp* y un 17,6 % con aislados de *Pss*. El análisis detallado de los datos de muestreo permitió comprobar la existencia en un mismo campo tanto de aislados de *Psp* Tox+, como Tox-, así como infecciones mixtas causadas por aislados de *Psp* y *Pss* y de *Psp* y *Xcp*, que fueron recogidos, incluso, a partir de la misma lesión. Dado que la incidencia de cualquier patógeno está muy condicionada por las condiciones ambientales, será necesario llevar a cabo sucesivas prospecciones a lo largo de varios años, con objeto de obtener una aproximación más fiable de la composición patogénica de bacteriosis de judía-grano en Castilla y León.

CARACTERIZACIÓN DE AISLADOS ESPAÑOLES DE *Pectobacterium chrysanthemi* EN PATATA

PALACIO-BIELSA, A.¹; CAMBRA, M.A.²; LÓPEZ, M.M.³

¹Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria de Aragón. Apdo. 727, 50080 Zaragoza. E-mail: apalaciob@aragon.es. ²Centro de Protección Vegetal. Apdo. 727, 50080 Zaragoza. E-mail: mcambra@aragon.es. ³Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias. Apdo. 46113, Moncada, Valencia. E-mail: mlopez@ivia.es

Pectobacterium (*Erwinia*) *chrysanthemi* es un agente causal de podredumbres blandas caracterizado por la producción de enzimas pectolíticos. Afecta a un amplio rango de plantas huéspedes, especialmente en regiones tropicales y subtropicales, aunque también puede infectar cultivos como patata y maíz en regiones templadas. *P. chrysanthemi* está considerada como un importante patógeno de patata, pudiendo inducir síntomas variables en función de las condiciones de temperatura y, fundamentalmente, de la humedad relativa.

Hasta el momento, *P. chrysanthemi* en patata solo ha sido aislada de forma esporádica en España. Los síntomas observados en campo consistieron en marchitamiento y desecación de las hojas superiores y tallos huecos, como consecuencia de la necrosis de la médula. En este trabajo se presenta la caracterización de 13 aislados obtenidos entre los años 1994 y 2003 en plantaciones comerciales de patata de Valencia y Teruel. Para ello se han utilizado técnicas bioquímicas convencionales y de determinación de biovares, ELISA con anticuerpos comerciales, PCR con iniciadores específicos y ensayos de patogenicidad. Los aislados muestran distintas morfologías de las colonias en medio King B, que no se corresponden con diferencias de patogenicidad, virulencia o biovares. Las pruebas bioquímicas muestran que los aislados obtenidos en España son muy homogéneos. En ensayos de inoculación se observaron síntomas de pudrición blanda de los tallos sin desecación de hojas. Esta discrepancia con los síntomas de campo se puede atribuir a las diferentes condiciones de humedad relativa en ambos casos.

La introducción de *P. chrysanthemi* en cultivos de patata en España parece estar relacionada con importaciones de tubérculos de siembra procedentes de países en los que el patógeno está ampliamente difundido. El incremento de la presencia de *P. chrysanthemi* confirma el riesgo de dispersión de este patógeno a través de las importaciones de patata con infecciones latentes.

IDENTIFICACIÓN DE CEPAS NO TOXIGÉNICAS DE *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* EN SEMILLAS DE JUDÍA (*Phaseolus vulgaris* L.) DE DIVERSOS ORÍGENES

RICO, A.¹; ERDOZÁIN, M.¹; RIVAS, L.¹; ORTIZ-BARREDO, A.²; RUIZ DE GALARRETA, J.I.²; MURILLO, J.¹

¹ Dpto. Producción Agraria, Universidad Pública de Navarra, 31006 Pamplona;

² NEIKER, Centro de Arcaute, Aptdo. 46, 01080 Vitoria; e-mail: JESUS@UNAVARRA.ES

El control efectivo de la grasa de la judía, causada por *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* (*Pph*), se basa fundamentalmente en la utilización de variedades resistentes o tolerantes y en la utilización de semilla libre del patógeno. Sin embargo, la certificación de la sanidad de la semilla de judía en España presenta problemas particulares debido a las características de las poblaciones locales de *Pph*. Nosotros hemos demostrado la existencia en Castilla y León de una elevada proporción (>60 %) de cepas no toxigénicas de *Pph*, que no pueden ser detectadas mediante las técnicas rutinarias para la certificación de semillas, basadas en la detección por PCR de secuencias de DNA implicadas en la síntesis de faseolotoxina o mediante técnicas serológicas utilizando anticuerpos comerciales. En consecuencia, se hace necesario el desarrollo de otras técnicas de detección y diagnóstico que sean aplicables a todas las cepas del patógeno con importancia epidemiológica, incluidas las cepas no toxigénicas. Como primer paso es necesario, igualmente, conocer cuál es la distribución e importancia de las cepas no toxigénicas, tanto en España como en otros países. Para ello, se analizó la población de *P. syringae* en 53 lotes de judías, de los cuales 22 procedieron de diversas localidades de España— en Galicia, País Vasco y Huesca —mientras que 31 lotes procedieron de otros 7 países. De cada lote se prepararon extractos acuosos que se sembraron en medios semiselectivos apropiados y las colonias fluorescentes resultantes se caracterizaron mediante el test LOPAT y diversas pruebas bioquímicas. La identidad de las putativas colonias de *P. syringae* se confirmó, además, mediante PCR con cebadores específicos de diversos genes de avirulencia y de biosíntesis de faseolotoxina, así como con pruebas de patogenicidad en judía. En dos de los lotes, procedentes de Álava, se detectó la presencia de *P. syringae* pv. *syringae*, mientras que se detectó *Pph* en otros ocho lotes. De estos últimos, se obtuvieron aislados no toxigénicos de *Pph* en tres lotes, procedentes de Álava y de Australia, mientras que en los cinco restantes (Galicia, Australia, Bulgaria, y Polonia) se obtuvieron aislados toxigénicos típicos. Estos resultados demuestran que las cepas no toxigénicas están distribuidas en otras zonas de España y, al menos, en Australia, por lo que es posible que también estén presentes en otras zonas productoras de judía. Por consiguiente, se hace necesario el desarrollar métodos universales de detección y diagnóstico que permitan la certificación de semilla libre de *P. syringae* pv. *phaseolicola*.

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE AISLADOS ESPAÑOLES DE *Erwinia amylovora*

RICO, A.¹; ORTIZ-BARREDO, A.¹; LÓPEZ, M.M.²; MONTESINOS, E.³; CABREFIGA, J.³; DONAT, V.²; LLOP, P.²; PEÑALVER, J.²; MURILLO, J.¹

¹Dpto. Producción Agraria, Universidad Pública de Navarra, 31006 Pamplona

²IVIA, Apartado Oficial, 46113 Moncada, Valencia; ³ INTEA, Universidad de Gerona, 17071 Gerona. e-mail: JESUS@UNAVARRA.ES

El fuego bacteriano, causado por *Erwinia amylovora*, es una importante enfermedad de cuarentena que afecta gravemente a peral y manzano. La enfermedad se ha detectado en España en varias ocasiones, aunque ha sido controlada con éxito. Sin embargo, no se conoce aún con certeza cuáles han sido las vías de entrada del patógeno, lo cual limita la efectividad de los actuales métodos de control. La amplificación por PCR de secuencias arbitrarias permite obtener patrones genéticos que tienen utilidad epidemiológica para el seguimiento de cepas; además es una técnica barata, rápida y simple, que permite el análisis de un elevado número de cepas. El análisis de diversas poblaciones de *E. amylovora* ha revelado un bajo polimorfismo genético, lo que reduce la utilidad de esta técnica, aunque se podrían desarrollar marcadores moleculares específicos a partir de las bandas polimórficas para el seguimiento del patógeno en la naturaleza. Con este fin, y también para evaluar su utilidad filogenética, hemos estudiado las bases moleculares de este polimorfismo. Para ello, se analizaron los patrones de amplificación por PCR con siete cebadores (ERIC, IS50, REV, CAG5, BOX, GTG5 y FOR) de 93 cepas de *E. amylovora* de distintos huéspedes y orígenes, incluido España. Este análisis reveló un número muy limitado de patrones y bandas polimórficas, que aparecieron en sólo once de los aislados. Once de las 22 bandas polimórficas observadas fueron secuenciadas y caracterizadas. Cinco de las bandas contenían ADN de secuencia conocida y que estaba presente en más del 95 % de las cepas analizadas. En los casos analizados, el polimorfismo se debía a la existencia de delecciones o a la ausencia de un plásmido nativo, pEa29. Por otra parte, seis de las once bandas se correspondieron con ADN que sólo estaba presente en la(s) cepa(s) de origen, por lo que podrían utilizarse para el diseño de marcadores moleculares específicos. La localización del ADN polimórfico se examinó mediante hibridación tipo Southern con ADN genómico y plasmídico, que mostraron que cuatro de estas bandas estaban contenidas en plásmidos diferentes al plásmido ubicuo pEa29. Estos resultados demuestran que una parte importante de la variabilidad genética encontrada en *E. amylovora* reside en elementos extracromosómicos, lo que puede limitar el valor filogenético de estos marcadores moleculares. Paralelamente, el análisis de los plásmidos nativos permitió detectar en las cepas analizadas entre uno y cinco plásmidos adicionales a pEa29, cuya distribución e importancia biológica están pendientes de dilucidar.

PCR CUANTITATIVA A TIEMPO REAL Y PCR COOPERATIVA PARA LA DETECCIÓN SENSIBLE Y ESPECÍFICA DE LOS FITOPLASMAS DEL GRUPO 16SrX EN FRUTALES DE HUESO Y PEPITA

TORRES, E.¹; BERTOLINI, E.²; MONTÓN, C.¹; VALLEJO, R.¹; MARTÍN, M.P.³; CAMBRA, M.²

¹Laboratori de Sanitat Vegetal (DARP), Generalitat de Catalunya, Via Circulació Nord, 08004 Barcelona. E-mail: ester.torres@gencat.net

²Departamento de Protección Vegetal y Biotecnología, Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA). Apdo. oficial, 46113 Moncada, Valencia.

³Real Jardín Botánico (CSIC) Pza. de Murillo 2, 28014 Madrid.

Las enfermedades causadas por los fitoplasmas afectan a un gran número de especies vegetales y en el caso de árboles frutales son especialmente preocupantes debido a su agresividad. La taxonomía clásica de los mismos está basada en los síntomas que inducen, el huésped que infectan y la especificidad de los insectos vectores. Actualmente, se fundamenta en el estudio de las secuencias del gen 16S rRNA. El grupo "Apple proliferation" (16SrX), incluye las especies asociadas con enfermedades que causan grandes pérdidas económicas en la producción de frutas en Europa. Es el caso de "Ca. Phytoplasma mali" (antes Apple proliferation phytoplasma, asociado a la proliferación del manzano), "Ca. Phytoplasma pyri" (antes Pear decline phytoplasma, asociado al decaimiento del peral) y "Ca. Phytoplasma prunorum" (antes European stone fruit yellows phytoplasma, asociado a la brotación anticipada de frutales de hueso). Debido a estas enfermedades el movimiento de material vegetal de las especies afectadas está regulado por medidas de cuarentena en Europa (Directiva 2000/29/CE, Real Decreto 2071/1993). La detección de estos patógenos está basada en "nested PCR" en dos tubos, utilizando iniciadores específicos del grupo 16 SRNA. Sin embargo, una segunda reacción de PCR, incrementa los riesgos de contaminación. En este trabajo se han desarrollado y puesto a punto dos técnicas sensibles y específicas como la PCR cuantitativa a tiempo real (Real time PCR) y la PCR cooperativa (Co-PCR), para la detección, cuantificación y caracterización de los fitoplasmas de grupo 16SrX. Co-PCR con posterior hibridación y revelado colorimétrico, permite una detección sensible como la "nested" PCR. Además, el uso de una sonda específica, permite detectar y caracterizar únicamente los fitoplasmas de cuarentena del grupo 16SrX. PCR cuantitativa a tiempo real tiene una sensibilidad similar a la "nested" PCR y permite cuantificar el número de fitoplasmas a partir de 50 por gramo de muestra. Las técnicas desarrolladas en este trabajo permiten el análisis rutinario de un gran número de muestras de forma específica y sensible para detección de fitoplasmas de frutales de hueso y pepita.

NUEVO FITOPLASMA EN *Pinus halepensis* DE LA COSTA MEDITERRÁNEA

TORRES, E.¹; MARTÍN, M.P.²; ALTABELLA, J.³; CELADA, B.⁴; GARCÍA, F.¹; MONTÓN, C.¹; SCHNEIDER, B.⁵; SEEMÜLLER, E.⁵

¹Laboratori de Sanitat Vegetal. DARP. Generalitat de Catalunya. Via Circulació Nord, Tram VI, 08004. Barcelona. E-mail: ester.torres@gencat.net

²Real Jardín Botánico, CSIC. Pza. Murillo, 2, 28014. Madrid.

³Servei de Sanitat Vegetal. DARP. Generalitat de Catalunya. Gran Via, 612, 08007. Barcelona.

⁴Servei de Sanitat Vegetal. DARP. Generalitat de Catalunya. Tarragona.

⁵Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft, Institut für Pflanzenschutz im Obstbau, D-69211 Dossenheim, Germany

Los fitoplasmas son procariotas de la clase Mollicutes que se asocian a enfermedades de plantas. Se han descrito en unas mil especies de angiospermas, en cambio solo existen algunos estudios basados en microscopia electrónica sobre la detección de fitoplasmas en gimnospermas. En Cataluña se observaron algunos pinos blancos (*Pinus halepensis*) con síntomas que inducían a pensar en una posible presencia de fitoplasmas, los pinos mostraban pérdida de dominancia apical con emisión de brotes laterales (escobas de bruja), deformación de acículas y en algunos casos incipiente seca de la rama. Se analizaron brotes con síntomas de 4 pinos de Cambrils (Tarragona) y 1 de Mont-Roig (Tarragona). También se analizaron brotes sin síntomas de uno de los pinos afectados y brotes de un pino vecino sin síntomas. Se han incluido en el estudio brotes de 4 pinos sin síntomas de otras poblaciones de Cataluña. Las muestras se recogieron durante 1999, 2000 y 2001. Los análisis por PCR demuestran la presencia de fitoplasmas en todas las muestras obtenidas de los pinos de la zona afectada, en cambio los resultados son negativos para los pinos de otros municipios. Con los iniciadores P1/P7, generales de fitoplasmas, se obtuvo un producto amplificado de 1800 bp que abarca desde el extremo 5' del gen 16S rRNA hasta la región 5' del gen 23S rRNA. Se clonaron, para secuenciar, los productos de amplificación P1-P7 de dos aislados de fitoplasmas (Pin127S y Pin190S). Las secuencias del gen 16S rRNA de los aislados analizados mostraron una similitud superior a 99.7% con el aislado de fitoplasma de pino silvestre de Alemania (PinG). Los tres aislados de fitoplasma de pino, dos españoles y uno alemán, forman un grupo homogéneo y las secuencias de otros fitoplasmas conocidos difieren de ellas como mínimo en un 5.5%, por lo que se ha propuesto su definición como una nueva especie *Candidatus* de fitoplasma. Con este trabajo se ha podido demostrar la presencia de fitoplasmas en coníferas, aunque la susceptibilidad de las gimnospermas como huéspedes se había puesto en duda debido al tamaño reducido de sus poros.

PRESENCIA DE *Phoma exigua* var. *heteromorpha* AFECTANDO A VIVEROS DE ADELFA

ÁLVAREZ, L.A.¹; ARMENGOL, J.¹; JAAFAR, L.¹; VICENT, A.¹; ARONA, M.²; PÉREZ-SIERRA, A.²; BELTRÁN, C.³; GARCÍA-JIMÉNEZ, J.¹

¹Instituto agroforestal Mediterráneo, Universidad Politécnica de Valencia, Camino de Vera s/n, 46022-Valencia.

²Protección de Cultivos, Escuela Técnica Superior del Medio Rural y Enología, Universidad Politécnica de Valencia, Avda. Blasco Ibáñez 19, 46010-Valencia.

³Sanidad Vegetal, La Alberca, C/ Mayor s/n, 30150-Murcia.

La adelfa (*Nerium oleander* L.) es un arbusto que se cultiva como especie ornamental. A finales del otoño de 2003, una nueva afección fue detectada causando daños severos en viveros de adelfa en la Comunidad Valenciana y Región de Murcia. Los síntomas observados fueron manchas foliares concéntricas, ovoides o elipsoides, defoliación en diferentes grados y necrosis de brotes. Dada la importancia del problema, el objetivo fue determinar la etiología de esta enfermedad. Se realizaron aislamientos en medio de cultivo PDAS y las colonias obtenidas se hicieron crecer en medio PCA. Los cultivos formaron picnidios a los 8 días de la siembra que fueron esféricos, a veces ostiolados, de unas 200 μm de diámetro. Las picnidiosporas eran cilíndricas, unicelulares y, en menor frecuencia, bicelulares, de 6,2 x 2,8 μm de media. La siembra de los cultivos en PDA+NaOH dio positivo en la detección del antibiótico E al virar el medio a un color verdoso que evoluciona posteriormente a rojo-marrón. La secuenciación de la región ITS del ADNr permitió la identificación de los aislados como *Phoma exigua* Desmaz. Para las pruebas de patogenicidad se utilizaron plantas de adelfa cv. Splendens Gigantium de 9 meses de edad. Se usaron dos metodologías de inoculación: mediante la pulverización de una suspensión de $1,5 \times 10^5$ conidias por mililitro sobre el follaje, y mediante la inoculación por herida de un fragmento de agar+micelio de 0,5 cm de diámetro del hongo sobre los brotes de las plantas. Las plantas fueron embolsadas y los síntomas de la enfermedad se manifestaron a partir de los 5 días de la inoculación. El hongo fue reaislado de las lesiones completando de esta forma los postulados de Koch-Pasteur. Por las características morfológicas y culturales, y la especificidad al hospedante, los cultivos se identificaron finalmente como *P. exigua* var. *heteromorpha* (Sch. et Sacc.) Noordeloos et Boerema.

DETECCIÓN EN ESPAÑA DEL TIPO A2 DE *Phytophthora infestans*

ANDÚJAR, E.¹; FLORES, R.²; PÁEZ, J.I.²

¹ Asociafruit. ² Servicio de Sanidad Vegetal de la Junta de Andalucía

Laboratorio de Sanidad Vegetal de Sevilla. Apdo121. 41089 Montequinto (Sevilla) E-mail: juanai.paez@juntadeandalucia.es

El mildiu producido por *Phytophthora infestans* es la enfermedad más devastadora del cultivo de la patata en el mundo y una de las más importantes en tomate en sitios húmedos. *P. infestans* es una especie heterotálica pero hasta la década de los 80, excepto en México, sólo se conocía el tipo A1; en 1984 aparece en Suiza el tipo A2 y en años sucesivos en diversos países de Europa. La presencia del tipo A2 implica que esta especie heterotálica podría reproducirse sexualmente, con las correspondientes consecuencias que ello conlleva. La reproducción sexual puede ocasionar recombinación genética y producir razas fisiológicas más virulentas; aparición más frecuente de resistencias a determinados fungicidas; e incremento de las fuentes de infección primaria debido a que las oosporas sobreviven en el suelo durante varios meses en ausencia de un huésped. En aquellos países donde sólo existe un tipo de compatibilidad (mating type), *P. infestans* se reproduce asexualmente y requiere de un huésped vivo para sobrevivir durante largo tiempo.

Se han estudiado distintas muestras de mildiu de patata y tomate procedentes de varias localidades del sur de España. Los cruzamientos se realizaron con las cepas de referencia de *P. infestans* procedentes de Estados Unidos, US-1 (A1) y US-8 (A2) enviadas por el Dr. William E. Fry. Se han encontrado los dos tipos de compatibilidad, tanto en los aislamientos de *P. infestans* de tomate como en los de patata, si bien en estos últimos el tipo A1 ha sido el predominante.

Hasta ahora sólo se había descrito en España la existencia del tipo A1, por tanto, esta es la primera referencia, que nosotros sepamos, de la presencia del tipo A2 en España. La caracterización genética de estos aislados es un paso fundamental para conocer la epidemiología del mildiu.

HONGOS DETECTADOS EN PLANTAS DE VIVERO DE VID ASOCIADOS A LA ENFERMEDAD DE PETRI

AROCA, A.; RAPOSO, R.

CIFOR-INIA, C^a Coruña km 7,5, 28040 Madrid

Se llama enfermedad de Petri al decaimiento y muerte de plantas jóvenes de vid causada por *Phaeomoniella chlamydospora* y *Phaeoacremonium* spp. Los síntomas de esta enfermedad, que se manifiestan en los primeros años de la plantación son: el debilitamiento de la planta, brotación retrasada, crecimiento reducido de hojas y entrenudos cortos. Internamente, la madera muestra un ligero pardeamiento y punteaduras oscuras del xilema. Los mismos hongos causantes de la enfermedad de Petri están implicados en el denominado síndrome de la Yesca, por lo que en la actualidad se postula que estas dos enfermedades constituyen dos aspectos del mismo proceso, en el cual la Yesca se desarrolla en planta adulta y cuyo inicio consiste en la invasión en los primeros estadios de la planta, de los hongos vasculares implicados en la enfermedad de Petri.

En los últimos años ha habido un aumento de la incidencia de las enfermedades en plantas jóvenes de vid, que obliga a los viticultores a replantar los viñedos que muestran signos de escaso crecimiento. Una de las hipótesis que se plantean para explicar este incremento se basa en el deficiente estado sanitario del material vegetal.

En este trabajo se presentan los resultados de una prospección realizada en material vegetal de vid listo para ser plantado en la parcela definitiva. Además de los patógenos implicados en la enfermedad de Petri, *Phaeoacremonium* spp. y *Phaeomoniella chlamydospora*, se han detectado otros hongos de madera (*Phomopsis* spp. y *Botryosphaeria* spp.) y de raíz (*Cylindrocarpon* spp.) Se describen los síntomas observados en la madera, la frecuencia de los patógenos detectados, así como la distribución de éstos en la planta.

VARIABILIDAD GENÉTICA DE *Pseudocercospora cladosporioides*, AGENTE DEL EMPLOMADO DEL OLIVO

ÁVILA, A.; TRAPERO, A.

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

El Emplomado de olivo causado por *Pseudocercospora cladosporioides* puede inducir una elevada defoliación y caída de frutos, produciendo además aceites con una elevada acidez. El conocimiento de la variabilidad poblacional del patógeno puede revelar cierta información acerca de los procesos de especiación y de su historia evolutiva, y prever su posible riesgo en el olivar. Por tanto, la caracterización de este hongo es fundamental para el desarrollo de estrategias de control apropiadas.

Se han realizado diversos estudios para determinar la variabilidad morfológica y fisiológica entre distintos aislados, sin embargo, estos criterios no son suficientemente polimórficos para identificar individuos en una población. Por eso, el estudio de la variabilidad genética de distintos aislados obtenidos de Cataluña y Andalucía, a partir de diferentes cultivares, se realizó mediante la técnica de secuenciación directa de genes que codifican a actina y calmodulina y de las regiones de ADN ribosomal (ITS1-5.8S-ITS2) y por amplificación aleatoria de las regiones microsatélites por 9 cebadores anclados (Inter Simple Sequence Repeats, ISSR).

El análisis filogenético de las secuencias alineadas se realizó usando el programa PAUP 4.0.b10. Las bandas resultantes por ISSR fueron valoradas como dialélicas (1, presencia y 0, ausencia de la banda). Se calculó la cantidad de diversidad genética y las relaciones entre las subpoblaciones con el programa POPGENE 32.

El análisis de las secuencias de 33 aislados de las regiones de los genes mostró un bajo nivel de sustituciones nucleotídicas. La mayor parte de la variación se encontró en la región ITS, proporcionando más información a nivel de población que las regiones de actina y calmodulina. En el árbol filogenético tipo Neighbor-joining, los aislados estudiados se agruparon en dos ramas pudiendo indicar la presencia de dos grupos de aislados coexistiendo en España. El estudio basado en marcadores ISSR en 59 aislados demostró también que existen bajos niveles de variabilidad, probablemente debido a la multiplicación asexual del hongo en ausencia de estado sexual.

FILOGENIA MOLECULAR DE HONGOS LIGNÍCOLAS EN ESPAÑA (COMUNIDAD DE MADRID)

BRACAMONTE, L.; MAGGIORANI, A.; RODRÍGUEZ-PALENZUELA, P.

Dpto. de Biotecnología. Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos. Universidad Politécnica de Madrid. Av. Complutense s/n 28040. Madrid. E-mail: lbracamonte@bit.etsia.upm.es

Los hongos lignícolas (Aphyllophorales-Basidiomycota) colonizan la madera y son capaces de utilizar los componentes de la pared celular de ésta como su principal recurso de energía para su crecimiento y reproducción. Su distribución geográfica es amplia, encontrándose principalmente sobre madera muerta. Algunos hongos de este grupo son patógenos forestales como *Daedalea quercina* y pueden ocasionar pérdidas económicas en industrias forestales.

Las especies de este grupo de hongos han sido clasificadas en muy diversas posiciones, ya que la taxonomía clásica es muy subjetiva e involucra la experiencia del autor. Las técnicas moleculares pueden ayudar a resolver problemas de sistemática de hongos y los análisis de secuencias de ADN han sido los más utilizados y entre ellos los más comunes son los espaciadores intergénicos (ITS).

Se han realizado varias colectas en las zonas boscosas del norte de la Comunidad de Madrid, realizándose la identificación taxonómica tradicional de carpóforos y cultivos. Se extrajo ADN de carpóforos y de cultivos. Mediante PCR se amplificaron las secuencias de los ITS usando los cebadores ITS1, ITS4, ITS2 y ITS3. Se secuenciaron y se realizó el análisis filogenético de las 29 especies determinadas.

Se amplificaron y secuenciaron especies del género *Rigidoporus* procedentes de diferentes países, utilizando los cebadores ITS1F, ITS4B, ITS5 y LR1. *Rigidoporus* ha sido asociado a la pudrición del duramen de árboles en pie de maderas tales como *Piranhea longipedunculata* Jablonsky (Euphorbiaceae) y *Clorophora tinctoria* (L.) Gaudich. (Moraceae).

Los resultados de los ITS se están empleando en la realización de árboles filogenéticos, usando el programa PAUP 3.1.1.

El objetivo principal de este trabajo es la de disponer de herramientas moleculares que sirvan para complementar estudios de sistemática tradicional en la identificación, filogenia y diagnóstico de esta familia de hongos.

DETECCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE VCGs DE *Verticillium dahliae* EN PLANTAS DE ALCACHOFA MEDIANTE DÚPLEX, “NESTED”-PCR

COLLADO-ROMERO, M.¹; MERCADO-BLANCO, J.¹; OLIVARES-GARCÍA C.²; GIMÉNEZ-JAIME, A.³; ARMENGOL, J.³; GARCÍA-JIMÉNEZ, J.³; JIMÉNEZ-DÍAZ, R.M.^{1,2}

¹Instituto de Agricultura Sostenible, CSIC, Apdo. 4084, 14080 Córdoba.
g62corom@uco.es

²ETSIAM, Universidad de Córdoba, Apdo. 3048, 14080 Córdoba.

³Instituto Agroforestal Mediterráneo, Universidad Politécnica de Valencia, Camino de Vera s/n, 460022 Valencia

La correcta identificación de variantes patogénicas de *Verticillium dahliae* y la utilización de material de plantación libre del patógeno son medidas claves para una estrategia de control integrado de infecciones sistémicas en plantas propagadas asexualmente, como las causadas por *V. dahliae* en alcachofa. Investigaciones sobre epidemias severas de Verticilosis de alcachofa en la Comunidad Valenciana han dado lugar a la caracterización de una colección de 109 aislados de *V. dahliae* de plantas infectadas, mediante asignación a grupos de compatibilidad vegetativa (VCG) y análisis dúplex-PCR utilizando iniciadores específicos de *V. dahliae* (DB19-DB22, 539-523 pb) y otros que diseñamos para la caracterización diferencial de los patotipos defoliante, D, (INTD2f-INTD2r, 482 pb, y DB19-espDEF, 334 pb) y no defoliante, ND, (INTND2f-INTND2r, 824 pb) de olivo y algodón. Además, los aislados se caracterizaron utilizando una nueva pareja de iniciadores que amplifican una secuencia de 964 pb marcadora del VCG2B de *V. dahliae*. Las amplificaciones mediante los iniciadores DB19/DB22 específicos de la especie confirmaron como *V. dahliae* a todos los aislados de *Verticillium* obtenidos de plantas de alcachofa. Asimismo, los resultados indican que: a) todos los aislados de *V. dahliae* en el estudio amplifican fragmentos de ADN marcadores con alguno de los pares de iniciadores de los patotipos D o ND; y b) que los marcadores moleculares están correlacionados con subgrupos de los VCGs identificados. Así, el marcador de 334 pb es característico de los aislados pertenecientes al VCG1A y un subgrupo del VCG2B, y el marcador de 824 pb se amplifica de los aislados en los VCGs 2A, 4B y otro subgrupo del VCG2B. Además, este último subgrupo pudo ser diferenciado de los otros VCGs por la amplificación de la secuencia de 964 pb. En este trabajo, se ha optimizado para el patosistema *V. dahliae*-alcachofa un protocolo dúplex, “nested”-PCR para la detección de *V. dahliae* en tejidos de plantas de alcachofa infectadas, utilizando plantas de alcachofa inoculadas artificialmente con aislados representativos de los VCGs identificados en nuestro estudio. El hongo se detectó en todos los casos y pudo ser asignado a uno de los subgrupos de VCGs referidos. Para confirmar la eficiencia del procedimiento de detección, se realizaron posteriores análisis empleando plantas procedentes de cultivos afectados y cuya infección por *V. dahliae* se había confirmado mediante aislamientos microbiológicos. La aplicación del protocolo dúplex, “nested”-PCR confirmó los resultados de los aislamientos e identificación microbiológica, y resultó más rápido, eficiente e informativo respecto de la caracterización de la infección a nivel de VCG del patógeno.

Subvencionado por el Proyecto CICYT AGL2000-1444.

IMPORTANCIA DE LAS GARRAS DE ESPÁRRAGO COMO FUENTE DE INÓCULO DE *Fusarium* spp.

CORPAS, C.¹; MELERO, J.M.²; BASALLOTE, M.J.¹

¹CIFA "Las Torres-Tomejil", IFAPA, Apdo. Oficial, 41200 Alcalá del Río (Sevilla) E-mail: mariaj; ²Instituto de Agricultura Sostenible - CSIC, Apdo. 4084, 14080 Córdoba. E-mail: mariaj.basallote@juntadeandalucia.es

La podredumbre de rizomas y raíces ocasionada por *Fusarium* spp. constituye una seria amenaza para el cultivo del espárrago en las principales zonas productoras. Una de las principales vías de transmisión de la Fusariosis es a través del material de plantación, que en la mayoría de los casos está constituido por garras de un año producidas en viveros comerciales. El objetivo de este trabajo ha sido determinar la incidencia de especies de *Fusarium* patógenas del espárrago en las garras.

Se han analizado un total de 24 lotes de garras de espárrago procedentes de diferentes empresas productoras, y pertenecientes a 15 cvs. distintos. Previamente a la realización de aislamientos se efectuó una evaluación de los síntomas en aquéllas. Se observaron: una coloración castaño rojiza en los tejidos internos del rizoma, lesiones de color pardo, pardo-rojizo o violeta en las raíces de almacenamiento que se correspondían, a veces, con una coloración rojiza en el cilindro central, y puntos necróticos en las zonas de inserción de las raíces absorbentes. La mayor parte de las garras evaluadas presentaron en torno al 50% de raíces de almacenamiento afectadas, y ninguno de los lotes estuvo libre de síntomas. Los aislamientos realizados de las garras indicaron una incidencia de *Fusarium* sp. comprendida entre 33-100 %, según el lote analizado.

La patogenicidad de los aislados masales de *Fusarium* sp. obtenidos de garras se evaluó en plántulas de espárrago crecidas *in vitro*, y se contrastó posteriormente en inoculaciones artificiales llevadas a cabo con aislados monoconídicos de aquellos que habían resultado patogénicos. La mayor parte de las plántulas inoculadas presentaron síntomas en raíces y/o base de los tallos, apreciándose una graduación de virulencia entre los aislados testados. La identificación de los aislados patogénicos se llevó a cabo, principalmente, utilizando el sistema taxonómico de Nelson, resultando preponderantes en los lotes de garras analizados: *Fusarium oxysporum* (13%), *F. moniliforme* (19%), *F. proliferatum* (31%) y *F. solani* (19%).

FUSARIOSIS VASCULAR DEL MELÓN CAUSADA POR *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* RAZA 1, EN EL ESTADO DE COLIMA (MÉXICO)

DE CARA, M.¹; FERNÁNDEZ, E.J.¹; BLANCO, R.¹; DIÁNEZ, F.¹; SANTOS, M.¹; TELLO, J.C.¹; ESTRADA, F.J.²; MONTOYA, S.²

¹Universidad de Almería, Dto. de Producción Vegetal. La Cañada de San Urbano s/n. 04120 Almería. E-mail: jtello@ual.es. ²Universidad Autónoma de Sinaloa. Facultad de Agronomía. Culiacán, Sinaloa, México.

Durante los años 2002 y 2003 se evaluó la gravedad de la fusariosis vascular en 1500 hectáreas de cultivo de melón en Colima (México). Pese a las desinfecciones de suelo con bromuro de metilo, las pérdidas podían alcanzar el 25% de la producción final. El estudio de plantas con necrosis vasculares marcadas, amarilleamiento y marchitez de hojas, permitió asignar el síndrome de la enfermedad a fusariosis vascular. El análisis de 4 muestras de suelos de los campos con plantas enfermas, en un medio selectivo para *Fusarium* permitió detectar la presencia de 2260 ± 357 , 179 ± 76 , 668 ± 357 , 1391 ± 256 unidades formadoras de colonias (UFC) de *F. oxysporum* por gramo de suelo respectivamente. Un total de 31 aislados se inocularon sobre plantas de melón: 7, 8, 5 y 11 aislados de la primera, segunda, tercera y cuarta muestra de suelo. La evaluación de la patogeneicidad de los mismos se llevó a cabo sobre los cultivares diferenciadores “Amarillo Canario” (sin ninguna resistencia), “Diana” (resistente a las razas 0 y 2 de *F. oxysporum* f.sp. *melonis*), “Tango” (resistente a las razas 0 y 1) y “Vulcano” (resistente a las razas 0, 1 y 2), según los criterios establecidos. Se inocularon 10 plantas por cada cultivar con una hoja verdadera, crecidas sobre vermiculita esterilizada en autoclave (60 minutos, 121°C) regándose con 200 ml de una suspensión de inóculo (10^5 UFC.ml⁻¹). Los testigos fueron los mismos cultivares sin inocular. Las plantas se mantuvieron en cámara climatizada con 16 horas de luz ($18 \cdot 10^3$ lux) y temperaturas comprendidas entre 23 y 25°C. Los 31 aislados inoculados produjeron los síntomas de decoloración del xilema, amarilleamiento foliar y marchitamiento sobre los cultivares “Amarillo Canario” y “Diana”, por lo que todos ellos fueron identificados como *F. oxysporum* f. sp. *melonis*, raza 1.

LA FUSARIOSIS VASCULAR DEL TABACO ASOCIADA A *Globodera tabacum* EN EL VALLE DEL TIÉTAR (EXTREMADURA)

ESPÁRRAGO, G.¹; RODRÍGUEZ-MOLINA, M.C.²; VERDEJO-ALONSO, E.¹; PALO, E.J.²; BLANCO, I.³

¹ Servicio de Sanidad Vegetal. Consejería de Agricultura y Medio Ambiente. Avda. de Portugal s/n, 06800 Mérida (Badajoz).

² Servicio de Investigación y Desarrollo Tecnológico. Consejería de Agricultura y Medio Ambiente. Avda. de Portugal s/n, 06800 Mérida (Badajoz). E-mail: carmen.rodriguezma@aym.juntaex.es

³ Centro Tecnológico Agroalimentario de Extremadura (CTAEX). Crtra. Villafranco a Balboa, Km 1,2. 06195 Villafranco del Gadiana (Badajoz).

El Valle del Tiétar, en Extremadura, es la principal zona de cultivo de tabaco en España. En esta zona los nematodos del género *Meloidogyne* han constituido durante mucho tiempo el principal problema fitopatológico asociado al cultivo. En el año 2001 se detectaron por primera vez poblaciones de nematodos del género *Globodera* asociadas a síntomas de amarilleamiento y marchitamiento prematuro del follaje. Una extensa prospección realizada en 2002 puso de manifiesto que *Globodera tabacum* se encuentra ampliamente distribuido en esta zona, que es además muy adecuada para su desarrollo. En el año 2003 se prospectaron en dicha zona parcelas fumigadas con nematicida y sin fumigar, y cultivadas con tres variedades de tabaco. En las plantas que presentaban síntomas típicos de Fusariosis Vascular (marchitamientos y amarilleamientos prematuros) se observaron necrosis vasculares en el tallo y en los peciolo de las hojas, y el análisis de fragmentos de los peciolo y de las venas medias de las hojas permitió aislar *Fusarium oxysporum* del sistema vascular. Se observaron plantas con Fusariosis Vascular en parcelas sin fumigar, y en algunas ocasiones en parcelas fumigadas, pero siempre en asociación con poblaciones de *G. tabacum* en el suelo. La asociación de estos dos patógenos supone un nuevo riesgo para el cultivo del tabaco en el Valle del Tiétar. De hecho, en zonas tabaqueras de EEUU la Fusariosis Vascular dejó de ser una enfermedad anecdótica para convertirse en la enfermedad más destructiva del tabaco cuando se asociaba a *Globodera* spp.

Dado que algunos autores consideran que la Fusariosis Vascular del tabaco está causada por una forma especializada de *F. oxysporum* denominada f. sp. *nicotianae*, y otros consideran que está causada por razas de *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum*, se han realizado inoculaciones de varios aislados de tabaco sobre hospedadores diferenciales para caracterizar su patogenicidad.

COMPATIBILIDAD VEGETATIVA DE *Fusarium proliferatum* PATÓGENO DE PALMERA

FERRANDO, V.¹; ABAD-CAMPOS, P.¹; ARMENGOL, J.¹; MORETTI, A.²; GARCÍA-JIMÉNEZ, J.¹

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

²Institute of Sciences of Food Production, C.N.R., Viale Einaudi, 51, 70125 Bari (Italia).

Fusarium proliferatum (T. Matsushima) Nirenberg infecta y coloniza gran variedad de plantas. Este hongo fitopatógeno productor de micotoxinas causa daños en coníferas, platanero, maíz, sorgo, trigo, espárrago y arroz, aunque también hay datos publicados de su incidencia en otros cultivos.

Durante los años 1998 al 2002, en plantas jóvenes y adultas de palmeras se observaron síntomas de marchitez y muerte, semejantes a los causados por *Fusarium oxysporum* f.sp. *albedinis* (Killian & Maire) Gordon en palmera datilera (*Phoenix dactylifera*) y *F. oxysporum* f.sp. *canariensis* en palmera canaria (*P.canariensis*). Sin embargo, en muchas de las palmeras enfermas se aisló consistentemente *F. proliferatum*, comprobándose su implicación en la enfermedad mediante test de patogenicidad.

Como precedente, en Arabia Saudí y en Italia, *F. proliferatum* ha sido identificado como el agente causal de una nueva enfermedad en palmera datilera y palma augusta (*Ravaena rivularis*), respectivamente. En España, este hongo se ha aislado de palmeras pertenecientes a los géneros *Phoenix*, *Chamaerops*, *Trachycarpus* y *Washingtonia*, procedentes de diversos viveros de la Comunidad Valenciana y dos de Cataluña.

Se ha realizado un estudio de la compatibilidad vegetativa de 41 aislados de *F. proliferatum* obtenidos de palmeras enfermas (36 españoles, 4 originales de Arabia Saudí y uno italiano) mediante la obtención de mutantes auxótrofos de la ruta del nitrato. Se han identificado 11 Grupos de Compatibilidad Vegetativa (VCGs): en la mayoría de los casos, los aislados procedentes de un mismo vivero pertenecen al mismo VCG. Del mismo modo, los individuos pertenecientes a un mismo VCG, casi siempre proceden de la misma especie hospedante. Nueve de los aislados estudiados, aún siendo autocompatibles, no han complementado vegetativamente con ningún otro aislado analizado. Dos de los aislados de origen árabe son compatibles vegetativamente con aislados españoles. Este hecho sugiere que los aislados españoles pudieran haber sido introducidos, procedentes de Arabia Saudí, mediante la importación de palmeras.

DETECCIÓN DE *Gibberella zeae* COMO CAUSANTE DE PODREDUMBRE DE TALLO EN MAÍZ

GARCÍA-BENAVIDES, P.¹; PALOMO, J.L.¹; MONTE, E.²

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

²Centro Hispano Luso de Investigaciones Agrarias. Universidad de Salamanca

En una parcela del termino municipal de Nuevo Amatos (Calvarrasa de Abajo, Salamanca,) cultivada de maíz, presentó una gran cantidad de plantas caídas durante el otoño de 2002.

Los síntomas apreciados consistían en rotura de tallos por encima del nivel del suelo, pudrición de tallos y agrietamiento de la medula con zonas deshilachadas y con una coloración rojiza en la zona afectada.

En el estudio del material vivo en laboratorio se observó la presencia de peritecios esféricos, superficiales y oscuros en los tallos afectados. En la preparación microscópica de las estructuras fúngicas se detectó la presencia clamidosporas intercalares, ascas y ascosporas que se identificaron por morfología y biometría de *Gibberella zeae* (Schwein.) Anamorfo: *Fusarium graminearum*. En el aislamiento fúngico en PDA se apreciaron macroconidias únicamente. Este patógeno que ataca a trigo, cebada, avena, centeno, maíz, trébol, alfalfa, batata y arroz, produce micotoxinas como zearalenona, deoxinivalenol, nivalenol, fusarenona-x y el tricoteceno conocido como toxina T2.

G. zeae se ve favorecido por clima húmedo y altas temperaturas. Aunque en este caso la climatología del año fue desfavorable y retrasó la recolección del cultivo, la cantidad de plantas encamadas por la enfermedad disminuyó considerablemente la producción. No hemos encontrado referencias sobre la presencia de este patógeno en plantas de maíz en España.

Un aislado fúngico de esta muestra fue confirmado por el Laboratorio Nacional de Referencia del MAPA, Departamento de Patología Vegetal. Instituto Agroforestal Mediterráneo. Universidad de Valencia.

EVALUACIÓN DE LA ESPECIFICIDAD DE LOS CEBADORES PARA LA DETECCIÓN DE HONGOS FITOPATÓGENOS DE MADERA DE VID

GARCÍA, F.¹; TORRES, E.¹; LUQUE, J.²; MARTOS, S.²

¹Laboratori de Sanitat Vegetal. Departament d'Agricultura, Ramaderia i Pesca. Generalitat de Catalunya. Via Circulació Nord, Tram VI, 08004. Barcelona. E-mail: fgarciafigueres@gencat.net

²Dep. Protecció Vegetal, Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentàries (IRTA), Centre de Cabrils, Ctra. de Cabrils s/n, 08348 Cabrils. E-mail: jordi.luque@irta.es

Las técnicas moleculares suponen una herramienta de gran utilidad para la detección y caracterización de los hongos asociados a enfermedades de la madera de vid, ya que muchos de ellos se encuentran de forma concomitante en un mismo tipo de lesión. Por ello, resulta interesante disponer de métodos moleculares que permitan la detección e identificación de todos ellos y, además, de forma directa a partir de la madera infectada. De la misma manera, es imprescindible garantizar la especificidad de los cebadores utilizados.

Los hongos aislados con mayor frecuencia en Catalunya de vides afectadas por enfermedades de madera son *Botryosphaeria obtusa*, *Eutypa lata*, *Phaeomoniella chlamydospora*, *Phaeoacremonium aleophilum* y *Fomitiporia mediterranea*. En este estudio se ha evaluado la especificidad de diversos cebadores con diana en la región ITS del ARNr; a los ya utilizados en estudios previos se han añadido otros desarrollados específicamente en este trabajo. Todos los cebadores se han ensayado de forma cruzada contra diversos aislados de las especies citadas anteriormente. Los resultados de este trabajo han permitido seleccionar los cebadores más adecuados para acometer posteriormente la identificación de los hongos patógenos directamente a partir de la madera de vid infectada.

DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE *Verticillium dahliae* KLEB, EN SUELO, AGUA DE RIEGO Y PLANTAS DE PIMIENTO MEDIANTE PCR EN TIEMPO REAL

GAYOSO, C.M.; POMAR, F.; MARTÍNEZ DE ILÁRDUYA, O.; MERINO, F.

Departamento de Biología Animal, Biología Vexetal e Ecoloxía. Universidade da Coruña.
15071 A Coruña. Email: fuenme@udc.es
CIAM. 15318 Mabegondo. A Coruña

La Verticilosis es una enfermedad vascular universalmente extendida, que suele atacar a un gran número de huéspedes. Esta enfermedad se considera el principal problema patológico del pimiento, existiendo en Galicia numerosas explotaciones dedicadas al cultivo de esta solanácea que se ven afectadas por ella. En la actualidad no se conoce todavía ningún método de control químico o cultura plenamente satisfactorio, por lo que un diagnóstico precoz puede proporcionar un control de la enfermedad más eficaz. El objeto de este estudio ha sido llevar a cabo una detección precoz y fiable de esta enfermedad con el menor coste de tiempo posible. En este estudio se ha utilizado una técnica recientemente desarrollada, PCR en tiempo real, que se emplea, entre otras cosas, para la detección y cuantificación de virus, bacterias y hongos patógenos. Es un método muy sensible y específico, que nos proporciona información tanto del crecimiento relativo como de la biomasa absoluta de *Verticillium dahliae* Kleb durante la infección de plantas de *Capsicum annuum* L. var. *annuum*. Para normalizar los resultados se amplificaron por separado el ADN del hongo y el del huésped usando cebadores específicos para cada especie y el colorante fluorescente SYBR Green. La detección del ADN de la planta proporciona una referencia endógena que sirve como control positivo interno y como ajuste de la variación introducida entre las distintas extracciones de ADN y la eficiencia de la PCR. Los datos obtenidos mediante PCR en tiempo real se corresponden con la sintomatología observada durante los muestreos en los que se recolectaron el agua de riego, el suelo y las plantas de pimiento de los invernaderos visitados.

Este trabajo ha sido financiado por el proyecto PGIDT01AGR10301PR

PATOGENIA DE *Olpidium radicale* EN SANDÍAGUIRADO, M.L.¹; SERRANO, Y.¹; SÁEZ, E.²; GÓMEZ, J.¹¹Centro de Investigación y Formación Agraria de La Mojonera. Autovía del Mediterráneo, Sal. 420. 04745. La Mojonera. Almería. micocifa@arrakis.es²Laboratorio de Sanidad Vegetal. El Ejido. Almería.

Para probar el poder patógeno de *O. radicale* se realizaron tres experimentos de inoculación con aislados monoesporangiales no portadores de MNSV. Dos de los experimentos se realizaron en primavera y uno en otoño en el CIFA de Almería en un invernadero de tipo túnel con cubierta de polietileno, en cultivo sin suelo y utilizando como sustrato perlita. Con diseño experimental de tres bloques completos al azar y utilizando 10 plantas por parcela elemental, en cada uno de los experimentos se inocularon cuatro aislados monoesporangiales de *O. radicale*. Como testigos se utilizaron un mismo número de plantas sin inocular.

Además de anotaciones semanales sobre los síntomas observados en las plantas, se realizaron análisis para detectar MNSV y CVYV y la presencia de *O. radicale* en el sistema radicular, al término de los experimentos. Se valoró también la producción total y comercial de frutos.

La inoculaciones realizadas con los seis aislados de *O. radicale* ensayados, cuatro de ellos obtenidos en melón, uno en pepino y otro de sandía, fueron capaces de infectar a entre el 90.0% y el 100% de las plantas de sandía cv. Sugar Baby inoculadas. El hongo no se detectó en las plantas de las parcelas del testigo en ninguno de los experimentos realizados. A pesar de la estrecha asociación existente entre la detección de *O. radicale* en el sistema radicular y la existencia de necrosis más o menos importantes en el mismo, debido a las dificultades encontradas para separar al hongo del MNSV, los resultados obtenidos no han servido para concluir que el hongo por si solo cause necrosis del sistema radicular, marchitez o la muerte de las plantas inoculadas. El virus se detectó en porcentajes muy amplios y variables comprendidos entre el 0.0 y 100% de las plantas inoculadas. El MNSV se detectó en algunos de los experimentos hasta en el 20% de las plantas del testigo no inoculadas y no infectadas con *O. radicale*.

Sin embargo, los resultados obtenidos indican el poder patógeno de *O. radicale* cuando este es portador del MNSV, causando, según aislados y condiciones ambientales, la reducción del volumen aparente del sistema radicular, necrosis de las raíces, necrosis en la base del tallo, estrías necróticas sobre los tallos y pecíolos de las hojas, necrosis de las nerviaciones de las hojas, manchas necróticas sobre las hojas del ápice y la marchitez y posterior muerte de las plantas. Además en algunos de los experimentos varios aislados de *O. radicale* portadores de virus fueron capaces de reducir significativamente la producción de frutos.

IDENTIFICACIÓN DE *Fusarium circinatum* EN *Pinus* spp. EN ASTURIAS

JAAFAR, L.¹; ABAD-CAMPOS, P.¹; BERBEGAL, M.¹; BELTRÁN, R.¹; GARCÍA-JIMÉNEZ, J.¹; ARMENGOL, J.¹; LANDERAS, E.²

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

²Laboratorio de Sanidad Vegetal. Consejería de Medio Rural y Pesca del Principado de Asturias. C/ Lucas Rodríguez, 4 - bajo, 33011 Oviedo. E-mail: labsave@princast.es

En primavera de 2004 se recibieron cultivos fúngicos pertenecientes al género *Fusarium* aislados de plantas de viveros de *P. pinaster*, *P. radiata* y *P. sylvestris* de Asturias que presentaban muerte de plántulas, así como aislados obtenidos de las semillas utilizadas en su plantación.

Para su identificación los aislados fueron sembrados en medio de cultivo patata dextrosa agar (PDA) y Spezieller Nährstoffarmer Agar (SNA) e incubados durante 10 días a 25 °C en oscuridad.

La identificación molecular de estos aislados se basó en el análisis PCR-RFLP del gen de la histona H3. En *Fusarium*, las regiones codificantes de esta proteína están bien conservadas y, además, la presencia de dos intrones aumenta su valor en estudios taxonómicos y filogenéticos.

Para la amplificación de la secuencia del gen H3 se empleó la pareja de cebadores H3-1a y H3-1b. La digestión simultánea del producto de la PCR se realizó con las endonucleasas de restricción *CfoI* y *DdeI*.

El análisis morfológico permitió observar, en 16 de los aislados estudiados, las características típicas de *F. circinatum* (= *F. subglutinans* f.sp. *pini*): colonias con micelio algodonoso, de color blanco-violeta y ausencia de clamidosporas en PDA; presencia de polifíalidas e hifas estériles enrolladas y ausencia de cadenas de conidios en SNA.

El análisis molecular de estos aislados presentó un patrón de restricción constituido por tres fragmentos de 250, 232 y 33 pb que es característico de *F. circinatum* y lo separa de otras especies de *Fusarium* estrechamente relacionadas.

CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA Y FISIOLÓGICA DE *Biscogniauxia mediterranea*, AGENTE DEL CHANCRO CARBONOSO DE *Quercus*

JIMÉNEZ, J.J.; SÁNCHEZ, M.E.; TRAPERO, A.

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

El agente causal del chancro carbonoso es el ascomiceto *Biscogniauxia mediterranea* (= *Hypoxylon mediterraneum*), que afecta a una amplia gama de huéspedes, aunque está asociado principalmente al decaimiento de *Quercus* spp.

Se ha determinado que el medio de cultivo más apropiado para el desarrollo *in vitro* de *B. mediterranea*, es PDA elaborado con patata natural y con Extracto de Levadura. En este medio se caracterizó la morfología de las colonias de aislados monoascospóricos de distinto origen, y se observó una alta variabilidad en la coloración de las colonias, en la distribución del color y en la textura del micelio, observándose micelio melanizado y engrosado agrupados en fibras, micelio hialino y fino formando grumos blancos y micelio melanizado y con hinchazones, asociado este último a la producción de conidióforos.

Para caracterizar las estructuras de reproducción sexual se describió la morfología del estroma, de las peritecas, ascas y ascosporas de distintos orígenes geográficos y huéspedes. La morfología observada concuerda con la descripción de Ju *et al.* (1998), para la especie *B. mediterranea*. Sin embargo, las dimensiones de las ascosporas no encajan plenamente en ninguno de los rangos establecidos por estos autores para las tres variedades descritas de esta especie, poniendo en duda la validez de este criterio para discriminar variedades, al menos en Europa. También se observó una alta variabilidad en las dimensiones de ascas y ascosporas, sin poderse establecer grupos homogéneos en función de su origen.

Se ha descrito la morfología de las estructuras de reproducción asexual formadas en cultivos *in vitro* y en ramas de encina y alcornoque. Los conidióforos mostraron una fuerte dominancia apical del eje principal, produciéndose la mayoría de las células conidiógenas en el extremo de las ramificaciones. Estos conidióforos corresponden al tipo *Periconiella* del género *Nodulisporium*, anamorfo de *B. mediterranea*. También se observó que las conidias producidas en las ramas afectadas son morfológicamente distintas a las producidas *in vitro*.

Para la caracterización fisiológica de esta especie, se calculó la tasa de crecimiento a 20°C de aislados monoascospóricos de distinto origen, y aunque hubo diferencias significativas en función del aislado, no se pudieron establecer grupos homogéneos en función de su origen, confirmando una vez más la alta variabilidad genética de las poblaciones de *B. mediterranea*.

IMPORTANCIA, DISTRIBUCIÓN Y ETIOLOGÍA DE LA PODREDUMBRE RADICAL DE *Abies pinsapo*

JIMÉNEZ, J.J.¹; SÁNCHEZ, J.E.¹; CALZADO, C.²; SÁNCHEZ, M.E.¹; NAVARRO, R.²; TRAPERO, A.¹

¹Dpto. de Agronomía, ETSIAM, Universidad de Córdoba. Apdo. 3048, 14080 Córdoba.

²Dpto. de Ingeniería Forestal, ETSIAM, Universidad de Córdoba.

Abies pinsapo es un abeto singular, que se localiza en pequeñas áreas húmedas rodeadas de bosques esclerófilos en algunas sierras del sur de España y del norte de Marruecos. En la última década se ha observado en el sur de España una alta incidencia de una podredumbre radical que afecta sólo a esta especie, provocando su muerte. En ocasiones los árboles afectados llegan a caer, incluso cuando aún mantienen acículas verdes. Se ha establecido una red de equilibrios biológicos en ecosistemas con presencia de pinsapo, mediante la que se está llevando a cabo el seguimiento fitosanitario de estas masas. Se han localizado más de 80 focos en la Sierra de las Nieves, Grazalema y en Sierra Bermeja. Se han elegido 23 focos representativos de cada zona, y se han tomado muestras de tocones y de raíces principales de árboles afectados de esta podredumbre. Algunas veces, en focos viejos se han encontrado cuerpos de fructificación, bajo las raíces principales de árboles con podredumbre, y se han identificado como el basidiomiceto *Heterobasidion annosum* (*sensu lato*). Con el material recolectado se han preparado cámaras húmedas y se han realizado aislamientos en medio selectivo (BAPS), obteniéndose consistentemente un único tipo de colonia, con conidióforos atípicos, que no se corresponden con ninguno de los anamorfos de las tres especies descritas de *Heterobasidion*. Las características especiales de estas masas forestales, únicas en Europa, ocupando localizaciones geográficas muy alejadas de otros abetales, y en unas condiciones ecológicas muy particulares, nos lleva a la consideración de que el patógeno y el huésped se han podido desarrollar como comunidades aisladas. Queda por determinar la adscripción de estos aislados de *Heterobasidion* en alguna de las especies recientemente descritas en este género, o como una nueva especie.

DETECCIÓN DE *Fusarium circinatum* EN *Pinus* spp. EN ASTURIAS

LANDERAS, E.¹; GARCÍA, P.¹; FERNÁNDEZ, Y.¹; BRAÑA, M.¹; ARMENGOL, J.²

¹ Laboratorio de Sanidad Vegetal. Consejería de Medio Rural y Pesca del Principado de Asturias. C/ Lucas Rodríguez, 4 – bajo. 33011 Oviedo. E-mail: labsave@princast.es

² Instituto Agroforestal Mediterráneo. Universidad Politécnica de Valencia. Camino de Vera, s/n. 46022 Valencia.

En enero de 2004 se recibió en el Laboratorio de Sanidad Vegetal de Asturias, una muestra compuesta por una veintena de plantas jóvenes de *P. radiata* de un vivero forestal de la zona semillado en agosto del año anterior. En el plantel, de un total de unas 120.000 unidades, aparecían unos 50 focos con 5-6 plantas afectadas que presentaban amarilleo y seca de acículas inferiores que progresaba en sentido ascendente hasta producirse finalmente la muerte de la planta. A nivel del cuello se observaba un chancro y en algunas plantas aparecían fructificaciones blanquecinas en esta zona.

El análisis de las plantas afectadas a partir de la zona límite de las lesiones en el tallo, con una desinfección suave, y sembrando paralelamente en dos medios de cultivo (PDA y Komada), permitió aislar cultivos prácticamente puros de *Fusarium* sp. en todas las plantas analizadas. Se comprobó en dichos aislados, la presencia de polifiálidas y la ausencia de cadenas de microconidios y clamidosporas, tres características morfológicas determinantes para la identificación de *F. circinatum* (= *F. subglutinans* f. sp. *pini*) y se enviaron al Laboratorio de Referencia, donde se confirmó su identificación como *F. circinatum*, tanto morfológica como molecularmente.

Se inspeccionó todo el vivero y se tomaron muestras de plantas que mostraran cualquier tipo de anomalía de todos los planteles de pino (dos de *P. radiata* y uno de cada una de las siguientes especies: *P. pinaster*, *P. nigra* y *P. sylvestris*) y de la semilla utilizada (sólo quedaba de *P. radiata* y *P. sylvestris*). En todas las muestras, excepto la de semilla de *P. radiata*, se obtuvieron aislamientos de *Fusarium* sp. “sospechosos”. Éstos se enviaron al Laboratorio de Referencia identificándose como *F. circinatum* los aislados en plantas de *P. radiata* y *P. pinaster* y semillas de *P. sylvestris*. Los aislados de plantas de *P. nigra* y *P. sylvestris* fueron identificados como *F. proliferatum*. Sanidad Vegetal adoptó inmediatamente medidas de control y erradicación sometiendo el vivero a cuarentena.

EL DECAIMIENTO DEL KIWI: UNA ENFERMEDAD CON SIMILITUDES A LA YESCA DE LA VID

LUQUE, J.¹; ADILLÓN, J.²

¹Dep. Protecció Vegetal, y ²Servei Sanitari Vegetal; Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentàries (IRTA), Centre de Cabriels. Ctra. de Cabriels s.n. 08348 Cabriels. E-mail: jordi.luque@irta.es

Desde 1999 se ha venido detectando en Catalunya, ya sea en plantaciones comerciales o experimentales de *Actinidia deliciosa*, un fenómeno de desecación parcial de ramas principales y laterales productoras. La enfermedad se caracteriza por una defoliación progresiva, una abundante emisión de chupones por debajo de la parte desecada, y una reducción drástica en el calibre de los frutos y su consiguiente inmadurez. Otros síntomas incluyen necrosis internerviales en hoja y la formación de chancros y hendiduras longitudinales en la corteza de las ramas afectadas. Internamente, los tejidos leñosos muestran dos tipos de lesiones: una necrosis parda, de consistencia dura, y una podredumbre blanda, de tonos amarillentos. El estudio de estas lesiones ha revelado la presencia de un complejo fúngico de gran similitud con el causante de la yesca de la vid, un hecho ya citado aunque no suficientemente estudiado en otras regiones productoras de kiwi como Francia, Italia, Nueva Zelanda y Chile.

El estudio fitopatológico de los tejidos afectados ha revelado la presencia de distintas especies fúngicas, cada una de ellas asociada a un tipo u otro de daño en madera. Así pues, en las zonas pardas, necróticas, se han encontrado hasta cuatro especies distintas: *Fusarium* sp., *Phaeoacremonium aleophilum*, *Phaeoacremonium inflatipes* y *Phaeomoniella chlamydospora*. En cuanto a la zona de podredumbre blanda, *Fomitiporia mediterranea* es el hongo que se ha aislado con mayor frecuencia. Ocasionalmente, también se han encontrado en estas lesiones *Ph. aleophilum* y *Pha. chlamydospora*.

Finalmente, algunas medidas profilácticas ensayadas en 2002 en una plantación comercial de kiwi de 16 años, mediante poda invernal de saneamiento, han permitido hasta el momento una buena regeneración vegetativa y una recuperación productiva paralela en una parte significativa de los árboles afectados.

PATOGENICIDAD DE *F. moniliforme* Y *F. oxysporum* SOBRE PLÁNTULAS Y SEMILLAS DE *Pinus nigra*

MARTÍN, P.; PAJARES, J.A.; DIEZ-CASERO, J.J.

Entomología y Patología Forestales. Dpto. de Producción Vegetal y Silvopascicultura. U. de Valladolid. E. T. S. de Ingenierías Agrarias. Av./ Madrid 44. 34004. Palencia. E-mail: pmpinto@pvs.uva.es

Las especies *Fusarium oxysporum* y *F. moniliforme* son conocidas como causantes de la enfermedad del damping off en viveros forestales del Norte de España; aunque tradicionalmente *F. oxysporum* ha sido considerado más virulento que *F. moniliforme*, existen evidencias del elevado poder patógeno de este último. Por ello, en este trabajo se ha estudiado la patogenicidad de *F. oxysporum* y *F. moniliforme*, aislados de plántulas de *Quercus* y *Pinus* de tres viveros de Castilla y León, sobre la germinación de las semillas y sobre la mortalidad de plántulas de *Pinus nigra*. Además, se ha analizado la influencia sobre la patogenicidad tanto del género hospedante de procedencia de los aislamientos como del vivero en el que fueron obtenidos. Asimismo, se ha estudiado el crecimiento de *Fusarium* a diferentes temperaturas con el fin de conocer la relación entre este factor y su patogenicidad.

Los resultados mostraron que los aislamientos obtuvieron el mayor crecimiento a 25° C. En las pruebas de patogenicidad, ambas especies de *Fusarium* inhibieron significativamente la germinación de las semillas (damping off de pre-emergencia) e incrementaron la mortalidad de las plántulas (damping off de post-emergencia). Por otra parte, se encontró una influencia significativa del género hospedante originario sobre la mortalidad causada por los aislados; aquellas cepas procedentes de plántulas de *Quercus* fueron más patógenas sobre *P. nigra* que las aisladas de *Pinus*.

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

EFFECTO DE LOS HONGOS ECTOMICORRÍCICOS *Boletus edulis*, *Rhizopogon roseolus*, *Laccaria laccata* Y *Lactarius deliciosus* SOBRE *Fusarium* spp. CAUSANTES DE DAMPING OFF EN PLÁNTULAS DE *Pinus nigra*

MARTÍN, P.; PAJARES, J.A.; DIEZ-CASERO, J.J.

Entomología y Patología Forestales. Dpto. de Producción Vegetal y Silvopascicultura. U. de Valladolid. E. T. S. de Ingenierías Agrarias. Av./ Madrid 44. 34004. Palencia. E-mail: pmpinto@pvs.uva.es

El empleo de hongos ectomicorrícicos comestibles (H.E.C.) puede proporcionar una adecuada protección frente a la invasión de patógenos causantes de damping off, aumentando el valor de la planta e incrementando los beneficios en el monte.

En este estudio se evaluó el posible efecto protector de los hongos micorrícicos comestibles *Boletus edulis*, *Rhizopogon roseolus*, *Laccaria laccata* y *Lactarius deliciosus* frente a las principales especies patógenas causantes de damping off, *Fusarium oxysporum* y *F. moniliforme*. Para ello se estudió, en condiciones *in vitro*, el efecto de los H.E.C. sobre el crecimiento de ambos patógenos en co-cultivos sobre medio MMN, la influencia de filtrados procedentes de los hongos micorrícicos sobre la germinación esporal de los patógenos, y finalmente, el efecto protector de los H.E.C. frente a los patógenos en la rizosfera de plántulas de la especie *Pinus nigra*.

El crecimiento de *Fusarium oxysporum* y de *F. moniliforme* no fue completamente inhibido al crecer en co-cultivo con *Boletus edulis*, *Rhizopogon roseolus*, *Laccaria laccata* y *Lactarius deliciosus*. Todos los extractos procedentes de los cuatro hongos ectomicorrícicos analizados redujeron significativamente la germinación esporal de *F. oxysporum* a las 12 horas, mientras que en el análisis a las 24 horas, sólo los filtrados de *L. deliciosus* lograron este efecto. La germinación esporal de *F. moniliforme* no se vio influida de forma significativa por ninguna de las especies micorrícicas en ningún momento. Finalmente, el tiempo de precultivo de las especies micorrícicas influyó en el efecto protector frente a *Fusarium*. Así, *L. laccata*, *L. deliciosus* y *B. edulis*, precultivadas durante dos meses, incrementaron la supervivencia de las plántulas de *P. nigra* frente a la acción de *Fusarium*.

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

IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE AISLADOS DEL GÉNERO *Botryosphaeria* EN *Vitis*

MARTOS, S.; LUQUE, J.

Dpto. de Protección Vegetal, Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentàries (IRTA).
Ctra. de Cabriels s/n 08348 Cabriels, Barcelona, España. E-mail: tmp2102@irta.es

En las últimas décadas, diversos hongos del género *Botryosphaeria* han sido relacionados, de forma creciente, con enfermedades de madera en la vid. El género *Botryosphaeria* presenta cierta controversia a nivel taxonómico debido a la dificultad en la identificación de las especies, en concreto por las similitudes morfológicas existentes entre taxones. En la actualidad, la identificación se basa principalmente en la morfología de los anamorfos.

En diversos muestreos, realizados en viñas sintomáticas de Cataluña, se aislaron diversas especies de *Botryosphaeria*; de mayor a menor frecuencia: *B. obtusa*, *B. parva*, *B. dothidea* y los anamorfos *Fusicoccum* sp. y *Diplodia* sp. Se procedió a la identificación y caracterización de los aislados de acuerdo con los caracteres morfológicos y el crecimiento en distintos medios de cultivo y temperaturas. Para completar el número conocido de especies de *Botryosphaeria* halladas sobre vid, se añadieron otros aislados procedentes del resto de España, Francia y Portugal.

La observación morfológica se realizó a partir de cultivos mantenidos en PDA y a 25 °C. Además de los caracteres morfológicos usuales (ontogenia y morfología de los conidios), se destaca la producción de pigmento observada en algunos casos: amarillo tornando a rosado para *B. lutea*, rojizo para *Diplodia* sp. y amarillo para algunos aislados de *B. parva*. Las tasas de crecimiento se estudiaron en el rango 5-35 °C y en tres medios de cultivo (PDA, CMA y MEA). Para la mayoría de aislados, la temperatura óptima de crecimiento se situó entre 25 y 30 °C, aunque se observó una cierta variabilidad entre aislados de la misma especie.

La pigmentación y las tasas de crecimiento de los aislados podrían aportar criterios taxonómicos válidos para la identificación de algunas especies de *Botryosphaeria*. Por otra parte, los resultados obtenidos también muestran algunas diferencias entre aislados de una misma especie, lo que indica asimismo el grado de variabilidad existente en *Botryosphaeria*.

ETIOLOGÍA, IMPORTANCIA Y DISTRIBUCIÓN DEL MILDUI DE LA ADORMIDERA (*Papaver somniferum*) EN ESPAÑA

MONTES, M.¹; LANDA, B.B.^{1,2}; MUÑOZ-LEDESMA, F.J.³; JIMÉNEZ-DÍAZ, R.M.^{1,2}

¹Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos y Montes, Universidad de Córdoba, Apdo. 3048, 14080 Córdoba.

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

³Alcaliber, S.A. Ctra. Carmona-El Viso del Alcor, km 1,8, Carmona (Sevilla).

La adormidera es el cultivo más importante para la industria farmacéutica en España, donde constituye la única fuente de alcaloides de uso medicinal tales como morfina, codeína y tebaína. Los rendimientos de este cultivo han venido disminuyendo durante los últimos años como consecuencia de ataques de enfermedades, algunas de las cuales son de etiología desconocida todavía. En las campañas agrícolas 2001/2002 y 2002/2003 hemos observado ataques severos de una enfermedad de etiología fúngica, diferente de la Necrosis considerada hasta ahora la enfermedad más importante de la adormidera. El objetivo de este trabajo ha sido determinar la naturaleza y distribución de esta enfermedad. Durante la campaña 2003/2004 se realizaron prospecciones fitopatológicas en las principales áreas de cultivo de adormidera en España, incluyendo las provincias de Albacete, Córdoba, Málaga, Sevilla y Toledo, en las que se constató la incidencia de la nueva enfermedad en todas las provincias y campos muestreados. Los síntomas de la enfermedad incluyen amarilleamiento, abullonamientos y deformaciones del limbo foliar, que progresan hasta ocasionar necrosis generaliza de los tejidos afectados y finalmente muerte de la planta.

Observaciones microscópicas de tejidos de plantas sintomáticas indicaron la formación de esporangióforos, esporangios y oosporas características del biotrofo obligado *Peronospora arborescens*, que es el agente causal del Mildiu en especies del género *Papaver*.

La patogenecidad de *P. arborescens* en adormidera se demostró mediante inoculaciones artificiales de plántulas en distintos estadios de desarrollo (desde cotiledones hasta roseta con 8-10 hojas verdaderas) con una suspensión de esporangios del hongo. Los síntomas en hojas característicos del Mildiu se desarrollaron entre los 5-7 días después de la inoculación y reprodujeron la sintomatología observada en campo en los primeros estadios del cultivo. La incubación de plantas afectadas en condiciones de oscuridad y humedad elevada favoreció la esporulación del hongo en los tejidos afectados y dio lugar a la formación de esporangióforos, esporangios y oosporas en los tejidos infectados.

CARACTERIZACIÓN FISIOLÓGICA Y PATOGENICA DE AISLADOS DE *Colletotrichum* spp. CAUSANTES DE LA ANTRACNOSIS DEL OLIVO

MORAL, J.; TRAPERO, A.

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

La Antracnosis del olivo o "Aceituna jabonosa", causada por *Colletotrichum acutatum* y *C. gloeosporoides*, es una enfermedad ampliamente distribuida en todas las regiones olivareras y que puede ocasionar graves epidemias. Estos patógenos causan desecación de ramas, defoliación, podredumbre y momificado del fruto, todo ello agravado por producir un deterioro notable en la calidad del aceite. De ahí, que en este trabajo se intenten esclarecer algunas características fisiológicas y patogénicas de estas dos especies.

Utilizando 20 aislados de las dos especies se estudió la capacidad de hidrolizar la caseína en CHM (Medio de Hidrólisis de la Caseína), y la inhibición por Benomilo en el medio PDA con 5 ppm del fungicida. Con seis aislados se realizaron pruebas de patogenidad sobre frutos separados de los siguientes huéspedes: olivo 'Hojiblanca', fresón 'Camarosa', naranjo 'Lane Late', almendro 'Guara', manzano 'Golden'; y además, sobre hojas de adelfa. Las aceitunas se inocularon con una suspensiones de 10^6 y 5×10^5 conidias ml^{-1} y otra de micelio sin conidias. En los restantes huéspedes se usó un bloque de PDA con el patógeno. Todos los ensayos se incubaron a 23°C en cámara húmeda, utilizándose testigos correspondientes a cada método de inoculación. Los resultados han demostrado que los aislados de *C. acutatum* se diferenciaron de los de *C. gloeosporoides* por hidrolizar la caseína y por una mayor resistencia al Benomilo. En los ensayos de patogenidad en aceituna cabe destacar que los aislados que no procedían de olivo resultaron también patogénicos, causando lesiones necróticas, pero no el síndrome de "Aceituna jabonosa" característico de los aislados procedentes de olivo. El micelio demostró capacidad infectiva ya que se produjo infección aunque de severidad inferior. En los restantes huéspedes, la mayoría de los aislados se mostraron patogénicos, pero las diferencias de virulencia entre ellos resultaron muy acusadas. Ello fue especialmente destacado en el caso de la naranja, donde los aislados no procedentes de naranja apenas indujeron síntomas; en el otro extremo, todos los aislados resultaron altamente virulentos sobre almendra, con pequeñas diferencias entre ellos. En fresón, la mayoría de los aislados se mostraron patogénicos, especialmente algunos que procedían de olivo, lo que deja abierta la posibilidad de que se produzcan infecciones cruzadas. Los otros dos huéspedes del ensayo se están evaluando y todavía no se pueden extraer conclusiones definitivas.

COMPARACIÓN DE MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO DE *Verticillium dahliae* EN OLIVO: AISLAMIENTO EN MEDIO DE CULTIVO Y PCR

MORERA, B.¹; PÁEZ, J.I.²; MONTES, F.²

¹Servicio de Producción Agrícola. ² Servicio de Sanidad Vegetal.
Laboratorio de Sanidad Vegetal. Apdo121. 41089 Montequinto (Sevilla)
E-mail: patologia.lsvse.cap@juntadeandalucia.es

El aislamiento de *Verticillium dahliae* en medio de cultivo está muy asociado a la presencia de síntomas, siendo la primavera y principios de verano la mejor época para su aislamiento. Plantas de olivo asintomáticas pueden estar infectadas por el patógeno y por ello es necesario el desarrollo de métodos de diagnóstico adecuados para la detección en las mismas.

El objetivo de este trabajo era poner a punto un método para la detección de *V. dahliae* que pueda ser utilizado en el programa de certificación de plantas de olivo en Andalucía. En los últimos años se han descrito algunas parejas de iniciadores de PCR utilizados para el diagnóstico o la caracterización de las distintas especies de *Verticillium*. Entre los métodos de PCR descrito nos decantamos por el de Li *et al.* (1994, App. Environ. Microbiol. 60:4324-4331). Este método consiste en una "nested-PCR" que amplifica una región de 140 pb de ADN mitocondrial solo en el caso de que se trate de *V. dahliae* y no de otro hongo, incluyendo otras especies de éste género (*V. albo-atrum*, *V. tricorpus*, *V. fungicola* y *V. lateritium*). Para comprobar la eficacia de este método se comparó con el de aislamiento en medio de cultivo y se observó su comportamiento en las distintas estaciones del año en muestras de olivos infectados naturalmente, con y sin síntomas.

Se usó el método con ADN extraído de cultivos monospóricos y de material vegetal de varias plantas con síntomas de verticilosis, obteniéndose en todos los casos el fragmento de ADN esperado. Para comparar los dos métodos se analizaron 560 muestras de las cuales 441 eran asintomáticas, 74 tenían síntomas frescos y 45 síntomas antiguos y estaban muy secas. El método de PCR resultó claramente más eficaz en la detección del patógeno en muestras asintomáticas (96% frente al 12%) y en muestras sintomáticas muertas (100% frente al 19%). En las muestras sintomáticas vivas la frecuencia de detección por PCR (96%) es algo mejor que por aislamiento en medio de cultivo (85%). El número de positivos obtenidos por PCR, aunque era mayor que por cultivo, también sufría un descenso en los meses de invierno y verano, siendo por tanto la primavera y el otoño las fechas más adecuadas para la detección de este patógeno.

El método de PCR resultó ser más sensible que el de aislamiento en medio de cultivo por lo que se propone su uso en el Plan experimental para la obtención y control de variedades certificadas de plantas de vivero de olivo en Andalucía.

REPERCUSIONES DE LOS DECAIMIENTOS DE LA VID EN LA CAPACIDAD PRODUCTIVA DEL CULTIVO

PELÁEZ, H.; MARTÍN, C.M.; SANTIAGO, Y.; MORENO, C.M.; MARTÍN, T.; URBEZ, J.R.

Departamento de Protección Vegetal. Instituto Tecnológico Agrario de Castilla y León. Carretera Portugal km 119. 47071 Valladolid. Tl. (34) 983414427, Fax (34) 983414780, pelrivho@jcyl.es

En este trabajo se analizan los resultados de los efectos que provocan en el potencial vegetativo y productivo de las plantas de vid en parcelas en producción, los hongos asociados a los decaimientos de la vid, que engloban los hasta ahora conocidos síntomas externos de Yesca, Eutipiosis y Enfermedad de Petri.

Las parcelas se localizaron en Castilla y León, en las Denominaciones de Origen Cigales, Rueda y Toro sobre las que se ha realizado durante la primavera y el verano de los años 2001, 2002 y 2003 una valoración de la incidencia de los síntomas externos Eutipiosis y Yesca en las principales variedades de cada una de ellas. Los parámetros evaluados están relacionados con el contenido de clorofila, la producción y la calidad del mosto. Los seguimientos se realizaron en verano en pleno desarrollo vegetativo para la valoración fisiológica o contenido de clorofila y en septiembre y/o octubre para la valoración agronómica de la producción y de la calidad del mosto obtenido. Las plantas afectadas, que presentan alguno de estos síntomas externos, han tenido de forma general pérdidas, comprendidas entre el 13 % y el 20% en el contenido de clorofila, aumentando estos porcentajes de pérdidas entre el 18% y 51 % en cuanto a la producción (kg de uva por cepa) pero, y hay que destacar, sin diferencias significativas en los principales parámetros que definen la calidad del mosto respecto a las plantas sanas.

DETECCIÓN DE *Phytophthora ramorum* EN VIVEROS ORNAMENTALES DE GALICIA

PINTOS, C.; MANSILLA, J.P.; AGUÍN, O.

Estación Fitopatológica "Do Areeiro". Excma. Diputación Provincial De Pontevedra
Subida a la Robleda s/n 36153 Pontevedra. E-mail efa@efa-dip.org

En Europa, *P. ramorum*, ha sido inicialmente descrita en Alemania y Holanda en el año 2001 como una especie nueva dentro del género *Phytophthora*, a partir de aislados de *Rhododendron* y *Viburnum* obtenidos en un periodo comprendido entre 1993 y 1999 y de los cuales se desconocía el agente patógeno. Casi a la par, en marzo de 2002, Rizzo y colaboradores identifican a *P. ramorum* como el agente causal del síndrome conocido coloquialmente en USA como "sudden oak death" SOD, el cual ha alcanzado proporciones epidémicas en la zona central y norte de California. Actualmente *P. ramorum* se encuentra encuadrada en la lista de alerta de la EPPO y pendiente de su inclusión en el listado general de este organismo, sometida de esta forma a la legislación de la Comunidad Europea bajo su decisión (2002/757/EC).

Dada la importancia del patógeno y la susceptibilidad potencial de numerosos cultivos ornamentales y forestales repartidos por toda la comunidad autónoma gallega se decidió hacer un muestreo en 82 viveros productores y comercializadores. Se tomaron muestras tanto de planta de producción propia como de planta importada, fundamentalmente de *Rhododendron* spp, *Viburnum tinus* y *Camellia japonica* así como de algunas especies forestales susceptibles. La identificación morfológica de *Phytophthora ramorum* se basó en cuatro premisas: tipo de micelio, forma y tamaño de las clamidosporas, forma, tamaño y desarrollo de los esporangios y producción de órganos sexuales. Morfológicamente, *P. ramorum*, se diferencia claramente de otras especies de *Phytophthora*, por la combinación de una serie de caracteres: esporangios grandes con un ratio longitud / anchura en torno a 2, con ramificación simpodial y caducos, clamidosporas muy abundantes fundamentalmente terminales o intercalares y temperaturas cardinales bajas, aspectos, todos ellos, cumplidos en nuestros aislados. Así mismo se utilizaron técnicas moleculares para confirmar la identificación. Un fragmento de la región ITS de ADN ribosomal se amplificó mediante nested-PCR. En la PCR cuando la muestra es positiva el análisis electroforético de la 1ª amplificación da una banda de 687 pares de bases (pb) y una de 291 pb en la segunda. De las muestras analizadas 75 han dado positivas para la identificación de *P. ramorum*, tanto por sus características morfológicas como por PCR.

EL USO DE COMPOST EN EL CONTROL DE LA FUSARIOSIS VASCULAR DEL CLAVEL

PRADOS, A.M.¹; BASALLOTE, M.J.²; LÓPEZ-HERRERA, C.J.³; VILLAMAR, L.P.¹; LÓPEZ, M.⁴; GONZÁLEZ, L.⁴; MELERO, J.M.³

¹CIFA Córdoba, Apdo 3092,14080 Córdoba. ²CIFA Las Torres, 41200 Alcalá del Río (Sevilla). ³IAS, CSIC, Apdo 4084,14080 Córdoba. ⁴CIFA Chipiona, Apdo 51, 11550 Chipiona (Cádiz). E-mail: anam.prados.ext@juntadeandalucia.es

Se ha estudiado la efectividad del uso de composts hortícola y de residuos de corcho sobre la Fusariosis vascular del clavel (FVC), mediante dos experimentos de cultivo de clavel en maceta, y en suelo de invernadero.

El experimento con macetas se realizó en sustrato (arena: limo: turba; 2:1:2, v) que se infestó artificialmente con tres aislados monoconídicos de *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* (Fod), raza 2 (A3, A4, y A7), y a las que se le aportaron diferentes dosis (10, 20%, v) de dichos composts. Como testigos se emplearon: mezcla de suelo estéril, suelo infestado sólo con A3, A4, o A7 y mezcla de suelo con diferentes dosis de composts sin aporte de Fod. El experimento se mantuvo a 15-28°C y fotoperiodo de 10 h, durante cinco meses, en un invernadero climatizado. El diseño experimental fue de bloques al azar con 5 repeticiones. Se utilizaron esquejes enraizados del cv. Exótica, susceptible a Fod. El desarrollo de la FVC se evaluó mediante lecturas semanales de síntomas aéreos de la enfermedad. Se observó que los dos tipos de composts retrasaron el inicio de la enfermedad en torno a 20 días, respecto de los tratamientos testigo inoculados sólo con Fod. Sin embargo, el compost hortícola manifestó fitotoxicidad en las plantas a las dos dosis empleadas.

El otro experimento se realizó bajo un invernadero de 700 m² del CIFA de Chipiona, infestado artificialmente con mezcla de aislados monoconídicos de Fod (raza 2). Se consideraron los siguientes tratamientos para el control de la FVC: 1) testigo no tratado, 2) 1,3-D:cloropirina, 3 y 4) aporte de compost hortícola o compost de corcho (0.09 m³/m²), y 5) compost de corcho como cultivo hidropónico. El diseño experimental fue en bloques al azar (con tres repeticiones) en parcelas subdivididas con dos cvs. de clavel, Master y Pícaro, susceptible y resistente a Fod, respectivamente. El cultivo se mantuvo durante un año y se registraron secuencialmente los síntomas de FVC y la producción de cada una de las parcelas. El sustrato de corcho como cultivo hidropónico (0.01 y 0.11% de plantas afectadas de Pícaro y Master, respectivamente) fue el tratamiento más efectivo, mientras que para los tratamientos 1-4, el porcentaje de plantas afectadas fue respectivamente 0.05, 0.14, 0.03 y 0.05% para el cultivar Pícaro, y 0.26, 0.21, 0.41 y 0.25% para el cv. Master. Los rendimientos acumulados se incrementaron con respecto al testigo en 52 y 14% en el sustrato de corcho y en menor medida 26 y 17% en las parcelas tratadas con 1,3-D:cloropirina, valores similares a los de los tratamientos con composts.

NIVEL DE RESISTENCIA DE DIFERENTES CULTIVARES DE CLAVEL FRENTE A LA FUSARIOSIS VASCULAR, EN EL SUROESTE DE ANDALUCÍA

PRADOS, A.M.¹; BASALLOTE, M.J.²; SUÁREZ-BONNET, E.³; LÓPEZ-HERRERA, C.J.³; MELERO, J.M.³

¹CIFA Córdoba, Apdo 3092,14080 Córdoba. ²CIFA Las Torres, 41200 Alcalá del Río (Sevilla). ³Instituto de Agricultura Sostenible - CSIC, Apdo 4084,14080 Córdoba.

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

La Fusariosis vascular del clavel (FVC), causada por *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* (Fod), es la enfermedad más importante del cultivo de clavel en Andalucía. Se requiere el uso de cultivares resistentes a Fod para obtener producciones que sean aceptables económicamente, aunque la utilización de dichos cultivares en el suroeste andaluz, ha mostrado resultados variables en cuanto a la resistencia a FVC.

Se han llevado a cabo tres experimentos, para evaluar la reacción de 21 aislados monoconídicos de Fod, frente a los 19 cultivares más comúnmente utilizados por los agricultores de dicha área de cultivo. Se inocularon 5-10 esquejes de clavel con los diferentes aislados de Fod, seleccionados según razas fisiológicas y virulencia, mediante la inmersión de las raíces en una suspensión de 7×10^6 conidias/planta, durante 5 minutos. Los aislados G-1, G-2, I-01, I-11 e I-21 pertenecen a la raza 1 de Fod; los aislados A3, A4, A5, A6, A7, P-39, I-02, I-12, I-22 a la raza 2; I-04, I-14 e I-24 a la raza 4; I-06 a la raza 6; I-08, I-18 e I-28 a la raza 8. Las plantas se mantuvieron en invernadero climatizado 18-30°C durante tres meses, registrándose semanalmente la severidad de síntomas.

El cultivar Nelson fue susceptible a todos los aislados de Fod. Resistente a la raza 1 fueron los cultivares Eilat, Cristal-Leila, Yellow Twin, Ivane Orange y Peachy Intermezzo. Además, Cristal-Leila e Ivane Orange fueron resistentes a las razas 8 y 6, respectivamente. Susceptibles a la raza 2 y resistentes a las razas 1, 4, 6 y 8 fueron los cultivares Eilat, Yellow Twin, y Peachy Intermezzo. Natila fue resistente a las razas 2, 6 y 8, Elsy fue susceptible a la raza 1, y Solar mostró resistencia a las razas 6 y 8.

Las inoculaciones artificiales mostraron valores de severidad de FVC más elevados que los proporcionados por las empresas comercializadoras de variedades. Estas diferencias en las evaluaciones de resistencia/susceptibilidad, podrían deberse a las razas del patógeno utilizadas, la edad de las plantas, los niveles del patógeno, los métodos de inoculación y las condiciones medioambientales.

PRESENCIA DE *Fusarium oxysporum* Y *F. proliferatum* EN CULTIVOS DE *Lilium* EN ESPAÑA

PRADOS, A.M.¹; BASALLOTE, M.J.²; MELERO, J.M.³

¹CIFA "Alameda del Obispo", IFAPA, Apdo. 3092, 14080 Córdoba; ²CIFA "Las Torres-Tomejil", IFAPA, Apdo. Oficial, 41200 Alcalá del Río (Sevilla); ³Instituto de Agricultura Sostenible - CSIC, Apdo. 4084, 14080 Córdoba. E-mail: anam.prados.ext@juntadeandalucia.es

Se observaron plantas de *Lilium* oriental con síntomas de enanismo y clorosis en invernaderos de la provincia de Cádiz. Además, se mostraron síntomas de defoliación de la parte abaxial del tallo, y de manchas y punteados necróticos en bulbos y raíces en plantas afectadas, similares a los descritos en *L. longiflorum* y en híbridos orientales y asiáticos de *Lilium*.

Obtuvimos 3, 2, y 1 aislados de *Fusarium* de plantas de *Lilium* oriental de los cvs. Coloma, Tibet y Siberia, respectivamente, cuya caracterización morfológica indicó que cuatro eran *F. oxysporum* (2 de Coloma y 2 de Tibet), mientras que los dos aislados restantes pertenecían a *F. proliferatum* (cvs. Coloma y Siberia).

Estos aislados se incrementaron en sustrato arena: harina de maíz (9:1, v) estéril durante 15 días, consiguiéndose concentraciones de $15-40 \times 10^3$ cfu.g⁻¹.

Se plantaron bulbos de *Lilium* oriental cv. Siberia, susceptible a *F. oxysporum* f. sp. *lilii*, por aislado en mezcla de suelo con sustrato infestado al 20% (v). Las observaciones semanales de síntomas realizadas en las plantas durante los 95 días de incubación en cámara de crecimiento (25°C y 12 h de fotoperiodo) indicaron que los seis aislados evaluados se mostraron patogénicos a partir de 2 meses de incubación, y alcanzaron valores altos de severidad de síntomas que incluían la muerte de las plantas. Al finalizar el experimento se transfirieron a PDA y a agar-V8 trozos de tallos con síntomas, previa desinfestación superficial, y se reaislaron de los organismos inoculados.

F. oxysporum f. sp. *lilii* y *F. proliferatum* han sido previamente referidos como patógenos de *Lilium* en los Países Bajos, mientras que en Italia, Polonia y EE.UU. sólo lo ha sido el primero.

Se agradece a Flores los Rizos su colaboración en los muestreos y la aportación de los bulbos para realizar las pruebas de patogenicidad.

MÉTODOS DE AISLAMIENTO DE *Verticillium dahliae* EN OLIVO

REYES, J.M.¹; SANTOS, M.¹; DE CARA, M.¹; SEGURA, J.M.¹; DIÁNEZ, F.¹; BLANCO, R.¹; SÁNCHEZ, J.A.²; TELLO, J.C.¹

¹Departamento de Producción Vegetal. Universidad de Almería. Cañada de San Urbano s/n. 04120, Almería. jtello@ual.es.

²Departamento de Edafología y Química Agrícola. Universidad de Almería. Cañada de San Urbano s/n. 04120, Almería.

La verticiliosis del olivar se ha extendido notablemente en la última década en la mayoría de las zonas olivareras de Andalucía. La aparición de ramas secas en olivos de un modo parcial o incluso total llegando a producir la muerte de árboles es un síntoma hoy en día muy frecuente en los olivares en regadío. Estos síntomas se suelen asociar por parte de los agricultores a la verticiliosis, pero era necesario saber, si el hongo *Verticillium dahliae* está realmente implicado en estos síntomas, o si además de éste existían otros microorganismos o factores implicados en la aparición de estos daños. Se ha venido haciendo un estudio a lo largo del año 2003, comprobándose que el porcentaje de aislamiento de *V. dahliae* en ramas de olivos enfermos recogidas en los meses estivales era nulo, sin embargo en estos mismos árboles se aísla el hongo a medida que las temperaturas van disminuyendo, por lo que el análisis no es siempre fiable y depende de la época del año en que se realice el muestreo. El análisis de las ramas enfermas se ha llevado a cabo sobre medio de cultivo PDA, encontrándose una importante mejora en la lectura de las placas y en el rendimiento analítico cuando a las rodajas obtenidas de las ramas de olivo, del diámetro de un centímetro, se les quitó la corteza, eliminando así las frecuentes contaminaciones con motivo del rico cortejo fúngico habitual en las ramas de olivo.

Palabras clave: *Verticillium dahliae*, PDA.

HONGOS ENDOFITOS ASOCIADOS A GRAMÍNEAS DE PASTOS NATURALES DEL OESTE DE LA PENÍNSULA IBÉRICA

SÁNCHEZ-MÁRQUEZ, S.¹; BILLS, G.F.²; GARCÍA-CRIADO, B.¹; ZABALGOGEAZCOA, I.¹

¹ Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología. CSIC. Salamanca.

² Centro de Investigación Básica de España. Merck, Sharp & Dohme. Madrid.

Las dehesas son ecosistemas semiáridos cuyos pastos están formados mayoritariamente por gramíneas. El objetivo de nuestro estudio es el aislamiento y la posterior identificación de las especies de hongos asociados a gramíneas silvestres de pastos naturales de la zona Oeste de la Península Ibérica. Para ello se realizó un muestreo en 18 localidades. El aislamiento de los hongos se realizó a partir de fragmentos de tallo y vaina foliar de plantas asintomáticas. Las cepas aisladas fueron identificadas mediante la observación microscópica de sus caracteres morfológicos, en algunos casos complementada con la secuenciación de la región ITS 1/5.8SrRNA/ ITS 2 del DNA ribosómico. De las quince especies de gramíneas recogidas se han aislado hongos que pertenecen a 41 taxones distintos. Además se han obtenido otros 102 aislados estériles, que no esporulan en ninguno de los medios de cultivo utilizados, y por lo tanto aun no se han podido identificar. De casi todas las gramíneas analizadas se obtuvo un número elevado de aislados pertenecientes a géneros cosmopolitas como *Cladosporium*, *Alternaria*, o *Epicoccum*. Sin embargo, la importancia de este estudio radica en que de plantas asintomáticas se han identificado varios patógenos importantes de gramíneas como *Fusarium culmorum*, *Drechslera* spp., *Phaeosphaeria nodorum*, *Gaeumannomyces graminis* y *Epichloë typhina*. También se han obtenido patógenos de insectos como *Cordyceps* spp., *Verticillium lecanii* y *Metarrhizium anisopliae*. Además se identificaron algunas especies fúngicas potencialmente productoras de micotoxinas y sustancias antimicrobianas: *Epichloë festucae*, *Neotyphodium coenophialum*, *Fusarium culmorum*, *Penicillium* spp., y *Acremonium* spp. Exceptuando los aislados del género *Epichloë*, estos resultados se basan en el análisis de un número reducido de plantas, lo cual indica la enorme diversidad de hongos que encierran estos ecosistemas. En vista de la importancia que tienen algunas de estas especies de hongos para el hombre, debido a sus características y las actividades que desarrollan, el estudio de los hongos asociados a gramíneas en pastos naturales parece encerrar un alto potencial científico.

ENFERMEDADES CAUSADAS POR HONGOS DE SUELO EN PLANTAS DE JUDÍA EN LAS PROVINCIAS DE GRANADA Y ALMERÍA

SERRANO, Y.¹; ÁLVAREZ, A.¹; GUIRADO, M.L.¹; MELERO, J.M.²; GÓMEZ, J.¹

¹Centro de Investigación y Formación Agraria de La Mojonera. Autovía del Mediterráneo, Sal. 420. 04745. La Mojonera. Almería. micocifa@arrakis.es

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

Para conocer la importancia y distribución de las enfermedades causadas por hongos de suelo en los cultivos de judía, se realizaron prospecciones fitopatológicas en 89 explotaciones comerciales de las provincias de Granada y Almería. Se analizaron varios tipos de muestras: parte del sistema radicular, hipocotilo y trozos de tallos cortados a partir de 40 cm sobre la base de las plantas. Las detecciones de los hongos se realizaron mediante la observación del material afectado en la lupa, trampas vegetales y la siembra de tejidos lesionados sobre medios de cultivos generales y selectivos.

Los hongos, potencialmente patógenos sobre judía, asociados a las plantas enfermas fueron: *Fusarium solani*, *Thielaviopsis basicola*, *Fusarium oxysporum*, *Rhizoctonia solani*, *Macrophomina phaseolina*, *Phytophthora* spp. y *Pythium* spp. Se aislaron, purificaron y conservaron 340 aislados de los organismos detectados: 63 pertenecieron a *Fusarium* spp., ocho a *Thielaviopsis basicola*, 48 a *Rhizoctonia solani*, 189 Pythiáceas, 15 pertenecientes a otros géneros de hongos y 17 aislados no pudieron ser identificados.

Para evaluar la patogenia en judía se realizaron 5 experimentos: 1 en plántulas de judía (en otoño de 2000) y 4 sobre plantas adultas: 2 en otoño (2000 y 2001), 1 en la primavera de 2001 y 1 en invierno de 2001/02.

En plántulas se inocularon 86 aislados: 50 de Pythiáceas, 14 de *Fusarium* spp., 1 de *T. basicola*, 15 de *R. solani*, 1 de *Alternaria* sp. y 5 no identificados.

De los 86 aislados inoculados, 21 resultaron patógenos, todos ellos pertenecientes a la familia de las Pythiáceas. El síntoma observado fue necrosis del sistema radicular, sin que este se tradujera en una marchitez de las plantas y sin que se reprodujeran los síntomas observados en los invernaderos comerciales.

Sobre plantas adultas se inocularon 272 aislados: 154 pertenecieron a las Pythiáceas, 58 a *Fusarium* spp., 2 a *Macrophomina* sp., 39 a *R. solani*, 1 a *Alternaria* sp., 5 a *T. basicola*, 2 a *Phytophthora* spp. y 11 no identificados.

Cinco aislados de *T. basicola* causaron síntomas generalizados de amarilleo de las hojas basales, chancro en la parte baja del tallo, necrosis negruzcas importantes en las raíces, marchitez y la muerte de las plantas, y 51 de *Pythium* spp., causaron estrías necróticas, necrosis del sistema radicular, marchitez y muerte. El resto de aislados no resultaron patógenos.

DETECCIÓN DE *Phytophthora capsici* Leon. EN PLANTAS DE PIMIENTO, SUELO Y AGUA DE RIEGO MEDIANTE PCR ANIDADA

SILVAR, C.; DÍAZ, J.*; MERINO, F.

Departamento de Biología Animal, Biología Vexetal e Ecoloxía. Universidade da Coruña. Campus da Zapateira s/n 15071 A Coruña. *Email: josefv@udc.es

Phytophthora capsici Leon. es uno de los hongos patógenos de pimiento más importantes. Dependiendo del punto de infección puede causar distintas enfermedades en la planta como son “Phytophthora Blight” (marchitez foliar) y “Phytophthora Root Rot” (podredumbre de la raíz). Esta última es la que predomina en Galicia causando importantes pérdidas en las explotaciones de pimiento, especialmente en la región de Padrón, donde este cultivo es mayoritario. Un aspecto importante a la hora de estudiar una enfermedad es el diseño de un método de diagnóstico que nos permita detectar el patógeno de una forma rápida y eficaz. Los métodos de detección tradicionales normalmente implican un importante consumo de tiempo y a menudo requieren conocimientos taxonómicos. Debido a esto, las técnicas moleculares se han revelado como una herramienta muy potente a la hora de diseñar métodos de diagnóstico. En anteriores trabajos se diseñó un método de detección de *P. capsici* basado en la técnica de la PCR. Para ello se diseñaron 2 cebadores específicos para *P. capsici* (CAPFW y CAPRV2), ambos localizados en las regiones ITS del ARNr. Ambos cebadores fueron primero probados en laboratorio para la detección de *P. capsici* en plantas, llegándose a la conclusión de que el hongo podía ser detectado a las 8h post-inoculación en muestras de tallo de plantas infectadas pero que no mostraban síntomas. En este trabajo se han empleado ambos cebadores para la detección del patógeno en muestras de plantas, suelo y agua de riego recogidas en distintas zonas de Galicia afectadas por la enfermedad. La detección se ha llevado a cabo mediante PCR anidada (nested-PCR) utilizando un par de cebadores específicos para el género *Phytophthora* en la primera PCR y los cebadores específicos para *P. capsici* en la segunda etapa. Se han obtenido resultados positivos en distintas muestras de plantas de pimiento, suelo y agua de riego.

LA FUSARIOSIS DEL PEPINO EN ALMERÍA

VELASCO, V.¹; BLANCO, R.¹; GÓMEZ, J.²; TELLO, J.C.¹

¹Dpto. de Producción Vegetal. Universidad de Almería. Carretera de San Urbano 04120. Almería.

²Centro de Investigación y Formación Agraria de La Mojonera. Autovía del Mediterráneo, Sal. 420. 04745. La Mojonera. Almería.

La podredumbre de las raíces y de la base del tallo del pepino causada por *Fusarium oxysporum* fue detectada por primera vez en Almería en 1999, sobre cultivos de pepino fuera de suelo. Poco después, la fusariosis vascular del pepino, causada también por *F. oxysporum* se manifestó en dos invernaderos con calefacción dedicados al cultivo de pepino en lana de roca. Ambas enfermedades causaron graves pérdidas en los invernaderos afectados. Con el objetivo de estudiar la evolución y de valorar la enfermedad en campo se realizó el seguimiento de un cultivo de pepino en perlita durante dos ciclos: uno en el de otoño-invierno de 2002 y el otro, en el de primavera de 2003 (cv. Azabache y Borja, respectivamente), ambos en un invernadero comercial situado en El Ejido (Almería). En el ciclo de otoño, los primeros síntomas de la enfermedad se observaron sobre plantas dispersas a los dos meses del transplante. Los síntomas fueron: necrosis de la base del tallo y podredumbre de las raíces, estrías o grietas necróticas de 5 a 15 cm de longitud sobre una de las caras del tallo, aunque con frecuencia podía alcanzar el metro, que progresando con rapidez provocaba el amarilleamiento de las hojas basales, marchitez y muerte de las plantas. Al finalizarse el cultivo el porcentaje de plantas muertas alcanzó el 26,1 %. En el ciclo de primavera, los primeros síntomas se manifestaron al mes del transplante y consistieron fundamentalmente en necrosis de la base del tallo, podredumbre del sistema radicular y, ocasionalmente, estrías sobre el tallo en el que se apreciaba con frecuencia unas masas pionnotales de color rosa a naranja. La enfermedad avanzó con gran rapidez, sobre todo entre las plantas confinadas en un mismo saco de sustrato, causando la muerte a un 54,8 % de éstas al finalizar el cultivo. El patógeno se aisló de los tejidos con síntomas de las plantas enfermas e incluso del xilema sin necrosis por encima de la lesión. Los resultados indican la diversidad de síntomas ocasionados por el patógeno que parecen depender de las condiciones ambientales y del cultivar utilizado. Los síntomas observados en los invernaderos comerciales, no permiten encuadrar con certeza a *F. oxysporum* en una de las dos formas especializadas descritas para pepino.

MUERTE DE ÁRBOLES CÍTRICOS CAUSADA POR ATAQUES DE *Phytophthora citrophthora* A TRONCO Y RAMAS PRINCIPALES

VICENT, A.¹; ÁLVAREZ, L.A.¹; GARCÍA-RELLÁN, D.¹; MARTÍNEZ-CULEBRAS, P.¹; ABAD-CAMPOS, P.¹; ARMENGOL, J.¹; GARCÍA-JIMÉNEZ, J.¹; ALFARO-LASSALA, F.²; DE LA ROSA, E.³

¹Instituto Agroforestal Mediterráneo. Universidad Politécnica de Valencia. Camino de Vera s/n, 46022-Valencia. ²Área de Protección de los cultivos. Ctra. Alicante-Valencia Km 276,5 Apdo. 125, 46460 Silla, Valencia. ³Convenio Asociación de Citricultores de la Provincia de Huelva-Consejería de Agricultura y Pesca de la Junta de Andalucía.

En otoño de 2002, se detectó una inusual mortandad de árboles de cítricos en la Comunidad Valenciana y la provincia de Huelva. La sintomatología observada fue una seca apopléjica de árboles, que en algunos casos afectaba solamente a algunas de las ramas y que iba acompañada de exudaciones gomosas en el tronco y ramas principales. Al levantar la corteza, el tejido afectado mostraba una descomposición blanda de color pardo que avanzaba en sentido ascendente y descendente, en general, a partir de las axilas de las ramas. Generalmente el patrón aparecía sano. La seca total o parcial del árbol se produjo cuando las lesiones ciñeron por completo el tronco o las ramas. Esta enfermedad afecta principalmente a la variedad Hernandina en la Comunidad Valenciana, mientras que en Huelva se presenta en diversas variedades. Dadas las características inusuales de la enfermedad y la importancia del cultivo, los objetivos de este estudio fueron estudiar su etiología y determinar diferencias de patogenicidad entre los aislados. Mediante siembras en medio selectivo PARPH se aisló consistentemente colonias de *Phytophthora* sp. Para su identificación se hicieron observaciones de la morfología del crecimiento de las colonias en medios específicos, de las características sexuales y asexuales y temperaturas cardinales. Basándose en estos criterios, 60 aislados de diferentes orígenes geográficos fueron identificados como *P. citrophthora*. Estos resultados fueron confirmados con los datos de secuenciación de la región ITS1 e ITS2 del DNAr. Aislados representativos de diversos orígenes geográficos y varietales fueron inoculados en frutos de naranja cv. Valencia Late para seleccionar los más virulentos. Posteriormente, estos aislados se inocularon mediante herida en la zona de la variedad en plántones de dos años de edad de los cultivares Clemenules, Nour, Hernandina, Nova, Fortune y naranja dulce cv. Navelina, todos ellos injertados sobre citrange Carrizo. El experimento se llevó a cabo en invernadero bajo condiciones controladas de humedad y temperatura. Las evaluaciones se hicieron a los 60 y 90 días de la inoculación y, bajo estas condiciones todos los aislados resultaron patógenos. encontrándose diferencias significativas de patogenicidad entre ellos. Estos resultados sugieren la existencia de variabilidad patogénica a nivel intraespecífico en las poblaciones de *P. citrophthora* estudiadas.

DISTRIBUCIÓN DE LA MANCHA MARRÓN DE LOS CÍTRICOS EN ESPAÑA Y CARACTERIZACIÓN DEL AGENTE CAUSAL

VICENT, A.¹; MARTÍNEZ-CULEBRAS, P.¹; ABAD-CAMPOS, P.¹; BADAL, J.¹; ASENSI, M.J.¹; ARMENGOL, J.¹; GARCÍA-JIMÉNEZ, J.¹; ALFARO-LASSALA, F.²

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

²*Servicio de Sanidad Vegetal. Ctra. Alicante-Valencia Km 276,5. Apdo. 125, 46460 Silla, Valencia.*

La mancha marrón de los cítricos causada por *Alternaria* se detectó por primera vez en España en 1998 en la provincia de Valencia. Esta enfermedad se caracteriza por producir diferentes tipos de necrosis en hojas y frutos, que afectan negativamente tanto a la cantidad como a la calidad de la producción.

Durante los años 1999-2003 se han prospectado 91 parcelas en diversas áreas citrícolas de nuestro país, habiéndose detectado la enfermedad en las provincias de Alicante, Castellón, Valencia, Tarragona, Murcia, Cádiz y Huelva. Las variedades que se han visto afectadas por la enfermedad son Fortune, Nova y Minneola. Esta enfermedad ha alcanzando en pocos años a la práctica totalidad de las áreas citrícolas españolas, causando elevadas pérdidas económicas que están limitando el cultivo de variedades susceptibles como Fortune.

Se ha realizado una caracterización de varios aislados de *Alternaria* representativos de las diferentes áreas geográficas afectadas. La caracterización morfológica se ha basado principalmente en el tipo de encadenamiento y las dimensiones de los conidios. Para la caracterización molecular se han empleado diferentes técnicas como son la comparación de las secuencias del DNA ribosómico, análisis de la secuencia del gen que codifica para la endopoligalacturonasa, RFLP mitocondrial y RAMS. Los resultados obtenidos, tanto del estudio morfológico como molecular, muestran una elevada homología entre los aislados españoles de *Alternaria* causantes de la mancha marrón.

El presente trabajo se ha realizado gracias a la financiación aportada por la Consellería de Agricultura, Pesca y Alimentación de la Generalitat Valenciana (Proyecto de Investigación GV-CAPA00-12) y la Asociación de Citricultores de la Provincia de Huelva.

HONGOS ENDOFITICOS CLAVICIPITALES EN POBLACIONES NATURALES DE *Lolium perenne*

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

Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología, CSIC. Apartado 257, 37008 Salamanca. Email: izabalgo@usal.es

Los hongos endofíticos de los géneros *Epichloë* y *Neotyphodium* (Fam. Clavicipitaceae), infectan a un gran número de gramíneas. En general, en las interacciones gramínea-endofito, una especie de planta hospedadora es infectada por una especie de hongo endofítico. Sin embargo, en *Lolium perenne* varios tipos de endofitos han sido identificados. Algunas asociaciones gramínea-endofito son asintomáticas y los hongos se transmiten verticalmente por semilla. Interacciones de ese tipo como *Neotyphodium lolii*-*Lolium perenne* son económicamente importantes porque las plantas infectadas contienen alcaloides tóxicos para herbívoros. En pastos de monocultivo de *Lolium* estas interacciones causan problemas en ganado. Otras interacciones como *Epichloë typhina*-*Lolium perenne* se caracterizan por la formación de un estroma que esteriliza a las plantas, en este caso el hongo es un patógeno.

El objetivo de este trabajo era determinar la tasa de infección endofítica en plantas asintomáticas de *Lolium perenne* en pastos naturales de dehesas de la provincia de Salamanca. Se observó que una media del 55% de las plantas estaban colonizadas por micelio endofítico. Al estudiar en detalle los aislados obtenidos de plantas infectadas, se identificaron tres grupos morfológicos; estos tres grupos se corresponden con una clasificación basada en secuencias de rRNA. En resumen, se han identificado cuatro grupos de endofitos pertenecientes a tres especies: dos grupos de *Neotyphodium lolii*, más *Epichloë festucae* y *Epichloë typhina*. Esta última especie se identificó en plantas asintomáticas, demostrándose que esta especie no es un patógeno obligado, como se pensaba. En algunas poblaciones, varias de las especies coexisten en simpatría. Esta observación, junto con la detección de infecciones mixtas en la misma planta, podrían tener relación con la formación de especies de endofitos por hibridación.

PODREDUMBRES DE BULBOS Y RAÍCES ASOCIADAS CON *Fusarium* sp. EN EL CULTIVO DEL AJO EN ANDALUCÍA

ZURERA, C.¹; MELERO, J.M.²; PRADOS, A.M.³; BASALLOTE, M.J.¹

¹CIFA "Las Torres-Tomejil", IFAPA, Apdo. Oficial, 41200 Alcalá del Río (Sevilla);

²Instituto de Agricultura Sostenible - CSIC, Apdo. 4084, 14080 Córdoba; ³CIFA "Alameda del Obispo", IFAPA, Apdo. 3092, 14080 Córdoba. E-mail: czurera@yahoo.es

En los últimos años se ha detectado en el cultivo del ajo en Andalucía una nueva enfermedad que se manifiesta desde los primeros estadios del cultivo, alcanzando en ocasiones una incidencia del 30% de plantas afectadas. Los síntomas consisten en una disminución del vigor de las plantas, necrosis en los bordes de las hojas, seca de raíces y, necrosis o podredumbre del disco basal. Consecuencia de ello son la disminución del calibre de los bulbos y la consiguiente pérdida de rendimientos. Síntomas similares a los descritos se han referido en ajo, cebolla y puerro en diversas áreas de cultivo del mundo asociados con *Fusarium* spp. Este trabajo se ha llevado a cabo con el fin de evaluar la incidencia de las podredumbres de bulbos y raíces en campos comerciales de ajo de Andalucía, y estudiar las posibilidades de su transmisión a través de los dientes de siembra.

Se han realizado prospecciones en dos Bancos de Germoplasma (BG) establecidos en los CIFAs de Córdoba y Jaén, y en 25 campos de ajo distribuidos entre las provincias de Cádiz (1), Córdoba (6), Granada (9), Jaén (4) y Málaga (5). En los BG se detectaron síntomas de enanismo, necrosis en los bordes de las hojas de desarrollo basípeto, necrosis del disco basal y de raíces y, ocasionalmente, podredumbre de bulbos. Dichos síntomas afectaron a 44 de las 532 entradas establecidas. Los aislamientos realizados de plantas afectadas por dicha sintomatología resultaron en *Fusarium* sp. (70%), y *Penicillium* sp. (16%). En los campos inspeccionados sólo se detectaron plantas aisladas con enanismo y necrosis en hojas que se asociaron con los organismos mencionados.

Tras la recolección de los cultivos se han realizado muestreos al azar de cabezas de ajos de los dos BG y de 39 almacenes comerciales, describiéndose su apariencia y separándose los bulbos aparentemente sanos de los que presentaban algún tipo de síntomas. Posteriormente se realizaron aislamientos de ambos tipos de bulbos. Del 64 % de los lotes de ajos se aisló *Fusarium* sp. y/o *Penicillium* sp. No obstante, la incidencia de cada uno de ellos no superó el 20% en ninguno de los lotes.

APLICACIÓN DE UN MÉTODO DE EXTRACCIÓN DE ADN PARA LA IDENTIFICACIÓN DE NEMATODOS FITOPATÓGENOS POR TÉCNICAS MOLECULARES

ABELLEIRA, A.; AGUÍN, O.; BALADO, M.; MANSILLA, J.P.

Estación Fitopatológica Do Areeiro. Excm. Diputación Provincial de Pontevedra. Subida a la Robleda s/n 36153. Pontevedra. E-mail: efa@efa-dip.org

La determinación morfológica y morfométrica de nematodos fitopatógenos en los laboratorios de diagnóstico, dado el amplio rango de especies existentes, resulta complicada. En los últimos años, se han desarrollado técnicas moleculares, sobre todo para la identificación de las especies más importantes, que facilitan enormemente el diagnóstico, por lo que se están implantando para su uso rutinario. Antes de caracterizar un determinado nematodo mediante un marcador molecular apropiado, es necesario extraer su ADN, por eso se considera este paso como el más crítico a la hora de aplicar técnicas moleculares. Se han descrito distintos métodos de extracción para distintos géneros. Dada la complejidad que supone, para un laboratorio de diagnóstico, utilizar protocolos específicos de extracción para cada nematodo el objetivo de este trabajo fue evaluar la eficacia de un único método de extracción de ADN para todos los principales géneros de nematodos fitopatógenos. El protocolo estudiado fue el propuesto por Bulman y Marshall (1997) para la extracción de ADN de *Globodera*. El método se aplicó a nematodos de los géneros *Globodera*, *Heterodera* y *Meloidogyne*, probando cuatro tipos de material de partida: quistes, adultos, juveniles y huevos. Los resultados demostraron que este método de extracción permite obtener, de forma rápida, repetitiva y fiable, el suficiente material genético de nematodos de estos géneros y a partir de todos los materiales de extracción, para su utilización posterior en técnicas moleculares de identificación.

Bulman, S.R. and Marshall, J.W.1997. Differentiation of Australian potato cyst nematode (PCN) populations using the polymerase chain reaction (PCR). New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science, 25:123-129.

INFECCIONES POR NEMATODOS NODULADORES (*Meloidogyne* spp.) EMERGENTES EN ANDALUCÍA

CASTILLO, P.¹; VOVLAS, N.²; DI VITO, M.²; JIMÉNEZ-DÍAZ, R.M.^{1,3}

¹Instituto de Agricultura Sostenible, CSIC, Apdo. 4084, 14080 Córdoba. ag1cascp@uco.es

²Istituto per la Protezione delle Piante, Sezione di Bari, CNR, 70126 Bari, Italia.

³Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos y Montes, Universidad de Córdoba, Apdo. 3048, 14080 Córdoba.

Los ataques por *Meloidogyne* spp. se encuentran entre los más importantes causados por nematodos fitoparásitos en cultivos agrícolas en el mundo, tanto por su amplia distribución geográfica como por el elevado número de huéspedes afectados. De las alrededor de 60 especies que comprende el género *Meloidogyne*, hasta ahora se habían citado infectando cultivos agrícolas en Andalucía: *M. arenaria*, *M. artiellia*, *M. incognita*, *M. hapla*, *M. hispanica* y *M. javanica*. Sin embargo, muestreos sistemáticos recientes en acebuchales (*Olea europaea* sp. *sylvestris*) de más de 50 años en la provincia de Cádiz, han demostrado infecciones severas por un nuevo nematodo nodulador, *Meloidogyne baetica*. En inoculaciones artificiales en ambiente controlado, *M. baetica* no infectó tomate (cv. Roma), garbanzo (cv. UC 27) y guisante (cv. Verdone Fulminante), pero infectó y se reprodujo sobre plantones de olivo (cvs. Arbequina y Picual). Posteriores estudios histopatológicos sobre las relaciones huésped-parásito en dichos huéspedes, confirmaron la respuesta susceptible en olivo cultivado y acebuche y la reacción resistente de los huéspedes herbáceos.

Aunque *M. incognita* ha sido citado en numerosas ocasiones en Andalucía, un reciente muestreo diagnóstico en campos comerciales de espinaca (*Spinacia oleracea*) demostró infecciones severas por este nematodo en Encinarejo (Córdoba), que constituyen la primera referencia de ataques por *M. incognita* en espinaca en Europa. Estudios diagnósticos y de infección de huéspedes diferenciales confirmaron que la población de *M. incognita* que infecta espinaca en Andalucía pertenece a la raza 1. La inoculación de plantas de espinaca cv. Symphony utilizando una serie gradual de inóculo de 0 a 128 huevos + juveniles/cm³ de suelo, indicó que la infección por *M. incognita* puede reducir significativamente el crecimiento de la espinaca con densidades de inóculo de 0.5 huevos + juveniles/cm³ de suelo; pero densidades de inóculo de 32 huevos + juveniles/cm³ de suelo tienen un efecto letal sobre esta planta.

FACTORES QUE INCIDEN EN LA ESTRUCTURA GENÉTICA DE LA POBLACIÓN DE *Maize dwarf mosaic virus* (MDMV)

ALONSO-DUEÑAS, N.; ACHÓN, M.A.

Àrea de Protecció de Conreus, Centre UdL-IRTA Alcalde Rovira Roure 177, E-25198 Lleida. Achon@pvcf.udl.es

Maize dwarf mosaic virus (MDMV) está ampliamente difundido en la cuenca mediterránea y es endémico en áreas extensas del Valle del Ebro donde el maíz es cultivo predominante. Con el fin de poder establecer unas medidas adecuadas de control se está estudiando mediante RFLPs y secuencia la estructura genética de la población de MDMV analizando los genes de la proteína de cubierta (CP) y del factor de transmisión (HC). Los resultados obtenidos hasta el momento indican que la estructura de la población de MDMV es la de quasiespecie. Se ha observado una correlación positiva entre los haplotipos predominantes y su transmisibilidad por pulgones, especialmente con la mayor eficiencia de transmisión por *Rhopalosiphum maidis* (Fitch). No se ha observado un claro efecto del hospedante en la estructura y evolución de la población. Tampoco se ha observado una clara agrupación geográfica de los aislados estudiados, pero si un posible origen común de los aislados de Norteamérica y de España.

EPIDEMIOLOGÍA DE LAS VIROSIS DE POACEAS

ALONSO-DUEÑAS, N.; SERRANO, L.; ACHÓN, M.A.

Àrea de Protecció de Conreus, Centre UdL-IRTA Alcalde Rovira Roure 177, E-25198 Lleida. Achon@pvcf.udl.es

En los últimos años se está realizando un considerable esfuerzo para identificar, caracterizar y determinar los niveles de incidencia de las especies virales que afectan a los cultivos del maíz y sorgo. Hasta la fecha se han identificado y caracterizado tres especies virales *Maize dwarf mosaic virus* (MDMV), *Sugarcane mosaic virus* (SCMV), y *Maize rough dwarf virus* (MRDV). Las prospecciones sistemáticas realizadas indican una predominancia de MDMV sobre las otras especies virales estudiadas. La incidencia de MDMV oscila entre áreas, y es endémico en zonas del Valle del Ebro. La incidencia de MRDV varía entre años aunque se ha observado una área reducida donde su incidencia es elevada y constante en el tiempo. Los niveles de infección de MRDV están asociados al uso de insecticidas sistémicos y al solapamiento de los cereales de invierno con el maíz. En parcelas experimentales la aplicación de insecticidas reduce hasta un 50% la incidencia de MRDV y no tiene ningún efecto sobre la incidencia de MDMV y SCMV. La infestación de los campos con *Sorghum halepense* y la mayor eficiencia de transmisión de este virus por *Rhopalosiphum maidis* (Fitch), son los factores implicados en la incidencia de MDMV, aunque mayoritariamente el primero. El factor determinante de la baja incidencia de SCMV es la ausencia de huéspedes alternativos abundantes, y también puede contribuir la menor eficiencia de transmisión de SCMV por *R. maidis*.

IDENTIFICACIÓN DE MALAS HIERBAS RESERVORIOS DE LOS POTYVIRUS MOSAICO COMÚN Y MOSAICO COMÚN NECRÓTICO DE LA JUDÍA

CASTRO, S.; CARAZO, G.; ROMERO, J.

Departamento de Protección Vegetal, INIA. Carretera de La Coruña Km 7,0. 28040-Madrid

Los potyvirus mosaico común de la judía (BCMV) y mosaico común necrótico de la judía (BCMNV) son los principales patógenos virales de la judía grano en España. Su gama de huéspedes está delimitada a las familias leguminosae y Chenopodiaceae en ensayos de laboratorio, aunque en la naturaleza sólo son patógenos importantes de judía. El cultivo de judía grano en la zona de León esta delimitado a los meses de verano (Junio – Septiembre), no existiendo siembras de esta planta el resto del año. Con la finalidad de conocer posibles plantas reservorios de estas virosis que mantuvieran el virus en los meses de no cultivo de judía, hemos realizado durante 3 años prospecciones en búsqueda de malas hierbas con síntomas de infección viral en los valles de Cepeda y de La Valduerna en la provincia de León, zonas gran tradición en el cultivo de judía grano. Las prospecciones las realizamos en primavera, antes de las primeras siembras de judía y en el otoño al finalizar la campaña agrícola. Plantas pertenecientes a 10 familias diferentes mostrando síntomas de clorosis y mosaicos fueron recolectadas y analizadas en el laboratorio por Elisa usando el anticuerpo monoclonal Ant-poty (Adgia, USA) y posteriormente las plantas positivas a este ensayo fueron analizadas por Elisa con los anticuerpos monoclonales anti-BCMV y anti –BCMNV (generosamente donado por el Dr. J. Vetten, BBA, Alemania). 15 especies diferentes dieron positivo por Elisa con los tres antisueros , demostrando que los virus en estudio eran capaces de infectar estas especies y probablemente les servían como reservorios para pasar el invierno. Una planta que mostraba síntomas de clorosis era el espino (*Rubus sp*), síntomas que se podían apreciar durante todo el año pero que eran mas pronunciados en la primavera, esta planta parece ser el principal reservorio de estos virus en el valle de Cepeda. El que BCMV y BCMNV puedan infectar una gran variedad de plantas explicaría el porque aparecen siempre estas virosis en los cultivos de judía, a pesar de sembrar en zonas sin otros campos de judía cercanos.

EL VIRUS DEL MOSAICO DEL PEPINO DULCE (PepMV) EN CULTIVOS DE TOMATE EN ALMERÍA

CUADRADO, I.M.¹; JANSSEN, D.¹; MARTÍN, G.¹; SÁEZ, E.²; VELASCO, L.³; SEGUNDO, E.¹; CANO, M.¹; LÓPEZ, M.C.¹; GIL-SALAS, F.M.¹; BELMONTE, A.¹; ORTEGA, A.¹

¹CIFA de Almería. IFAPA. Autovía del Mediterráneo, Km 420, La Mojonera 04745 (Almería). Email: virucifa@arrakis.es. ²Laboratorio de Sanidad Vegetal Delegación Provincial de Agricultura y Pesca de Almería. ³CIFA de Murcia. IMIDA

Almería es el principal productor español de tomate cultivado en invernadero con una superficie de 8 500 ha, una producción de 817 000 t y un valor de la producción de 573 millones de €. En 2000 fue descrita la presencia de PepMV en Almería, por lo que se han desarrollado una serie de trabajos que nos permitieran conocer la incidencia de la enfermedad en Almería, desarrollar un método rápido de detección y diagnóstico, conocer la variabilidad biológica y molecular y, siendo un virus que se transmite por contacto, conocer la posibilidad de transmisión por la semilla y por el suelo.

Durante los 4 últimos años (2000-2003) se han realizado prospecciones en todas las zonas productoras de tomate de Almería. El virus se ha encontrado en todas ellas, sin embargo, la incidencia ha sido baja alcanzando el máximo de 4,9 % de plantas que mostraron síntomas de la enfermedad y 7,5 % de plantas en las que se detectó el virus. Similares resultados se han obtenido de las muestras recibidas en el Laboratorio de Sanidad vegetal, con 5,3 y 7,7 %, respectivamente. Se ha desarrollado una sonda molecular a partir de un fragmento del gen codificante para la proteína del RNA dependiente de la RNA polimerasa (RdRP) y se han ensayado distintos procedimientos de aplicación de la muestra vegetal sobre la membrana. Se han obtenido resultados similares, si bien sobresalieron los de aplicación directa del jugo de frutos y la preparación de extracto vegetal. La comparación de esta sonda con el antisuero mostró una sensibilidad similar.

Se ha estudiado la sintomatología producida mediante inoculación mecánica en distintas especies de solanáceas de distintos aislados y se ha realizado la secuenciación y comparación del gen para RdRP de 4 aislados de Almería. Ambos estudios han mostrado una gran similitud entre ellos.

El virus no ha sido detectado en semillas que han sufrido un proceso natural de desecación ni en las frescas que han sido desinfectadas con fosfato trisódico o ClH, así como tampoco en las plántulas procedentes de semillas de frutos infectados. Las plantas de tomate que se cultivaron en maceta con sustrato previamente infectado no mostraron síntomas de la enfermedad ni el virus fue detectado. Tampoco ha sido observado en campo cultivos de tomate afectados en invernaderos donde el cultivo anterior si lo estaba.

ESTADO ACTUAL DE LAS VIROSIS DE LA VID EN CASTILLA – LA MANCHA

DUQUE, C.¹; HITA, I.²; GALLEGO, B.¹; RUIZ, J.¹; GARCÍA, B.²; FRESNO, J.³; PADILLA, V.²

¹ Instituto de la Vid y del Vino de Castilla-La Mancha (IVICAM).

² Instituto Murciano de Investigación y Desarrollo Agrario y Alimentario (IMIDA).

³ Instituto Nacional de Investigación Agraria (INIA). Dpto. Biotecnología. E-mail: cduque@ozu.es

Las virosis de la vid son enfermedades que no tienen tratamiento en campo y sus efectos varían desde disminuir la longevidad de la planta, mermar la producción y calidad de la vendimia, hasta ocasionar deficiencias en el prendimiento del injerto y en el enraizamiento de estacas y estaquillas. La única solución es la prevención, plantando con material certificado en un ecosistema sin vectores que transmitan la enfermedad, ya que se ha comprobado que plantar / replantar con material vegetal en deficientes condiciones sanitarias y ante la presencia de vectores, conlleva la infección de la parcela en poco tiempo. Por todo ello, es necesario detectar la enfermedad, analizar la existencia de vectores y finalmente, en principio, arrancar aquellas cepas afectadas e incluso la plantación entera por problemas de contaminaciones posteriores.

En este trabajo, se han estudiado las virosis de las que debe estar exento el material vegetal vitícola español, según la legislación vigente española (BOE 25 febrero, 2003): *entrenudo corto infeccioso* (GFLV), *enrollado serotipos 1 y 3* (GLRaV-1 y GLRaV-3) y *jaspeado* (GFkV). Así como otras virosis aun no legisladas en España, que atacan al viñedo: *enrollado serotipos 2 y 6* (GLRaV-2 y GLRaV-6) y *mosaico del arabis* (ArMV). Las muestras se han tomado sobre hojas jóvenes en los meses de junio y julio y hojas maduras en agosto y septiembre. Los métodos utilizados han sido serológicos.

Los resultados confirman la existencia de las cuatro virosis primeras, en los viñedos castellano manchegos (GFLV, GLRaV-1, GLRaV-3 y GFkV), así como muestras positivas ante el enrollado serotipo 2 (GLRaV-2). No detectándose muestras positivas al enrollado serotipo 6 (GLRaV-6), ni al mosaico del arabis (ArMV).

Los resultados obtenidos sugieren seguir trabajando en esta línea, con objeto de detectar las virosis que afectan al viñedo y poder prevenir posibles riesgos de pérdida de material vegetal y/o de calidad en la vendimia.

NUEVA FUENTE DE RESISTENCIA A BEGOMOVIRUS CAUSANTES DE LA ENFERMEDAD DEL RIZADO AMARILLO EN TOMATE

GARCÍA-CANO, E.¹; RESENDE, R.O.²; BOITEUX, L.S.²; GIORDANO, L.B.²; MORIONES, E.¹

¹Laboratorio de Virología. Estación Experimental "La Mayora", CSIC, 29750 Algarrobo-Costa, Málaga, España y ²Departamento de Biología Celular. Universidade de Brasília, 70919970, Brasil, Embrapa Hortaliças, CP 0218,70359-970 Brasília, Brasil.

La amplia diversidad de begomovirus existentes en Brasil así como la posible introducción de especies asociadas a la enfermedad del rizado amarillo del tomate (TYLCD) supone una amenaza importante para el desarrollo del cultivo del tomate en este país. Actualmente el empleo de variedades resistentes es la estrategia de control más efectiva para minimizar los daños y pérdidas causadas por estos virus ya que el uso de otros sistemas de control no resulta efectivo. La línea de *Lycopersicon esculentum* TX 468-RG ha sido identificada como una de las mejores fuentes de resistencia a numerosos aislados de begomovirus bipartitos que infectan al tomate en Brasil. El estudio de la genética de la resistencia a estos begomovirus bipartitos realizado a partir de las poblaciones obtenidas del cruce entre el parental resistente TX 468-RG y el parental susceptible Ohio 8245 demostró la implicación de un gen recesivo en su control. Es interesante estudiar si dicha resistencia se mantiene frente a begomovirus existentes en otras regiones del mundo. El objeto del presente estudio ha sido el análisis de la posible utilización de líneas seleccionadas en Brasil para el control de TYLCD, una enfermedad causada por begomovirus monopartitos ampliamente extendida a nivel mundial. Con este objetivo se ha analizado la respuesta de tres líneas de *L. esculentum*, CNPH TX 483-1-22, CNPH TX 483-1-30 y CNPH 468-1-1-12 (esta última derivada de TX 468-RG) frente a un virus causante de TYLCD, el *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV) tanto mediante transmisión por *Bemisia tabaci* como por inoculación de clones infectivos vía *Agrobacterium tumefaciens* (agroinoculación). Además, una de estas variedades (CNPH 468-1-1-12) se agroinoculó con otras especies virales también asociadas con TYLCD (*Tomato yellow leaf curl Sardinia virus*, TYLCSV; *Tomato yellow leaf curl Málaga virus*, TYLCMaV; y la cepa Mld de TYLCV). Las inoculaciones se realizaron sobre plantas en estadio de dos hojas verdaderas y los análisis se realizaron en tres periodos distintos (otoño, invierno y primavera). Las infecciones víricas fueron confirmadas por desarrollo de síntomas así como por hibridación molecular con sonda específicas para la detección de las distintas especies. Los resultados demuestran la ausencia de síntomas así como una menor acumulación de DNA viral en las plantas analizadas que sugiere que dichas líneas también se comportan como resistentes frente a begomovirus monopartitos, bajo distintas condiciones ambientales. Estamos estudiando si el control genético de la resistencia a TYLCD en la línea CNPH 468-1-1-12 también es monogénico recesivo como en su parental TX 468-RG para los begomovirus bipartitos. Por ser este gen recesivo una nueva fuente importante de resistencia a begomovirus mono y bipartitos, las próximas etapas de trabajo se van a centrar en la búsqueda de marcadores moleculares asociados a esta resistencia.

VIRUS QUE AFECTAN CULTIVOS DE CUCURBITÁCEAS EN LA REGIÓN DE MURCIA

KASSEM, M.A.¹; SEMPERE, R.N.¹; MORENO, I.M.²; JUÁREZ, M.A.²; ARANDA, M.A.¹

¹*Centro de Edafología y Biología Aplicada del Segura (CEBAS)-CSIC. Apdo. correos 164. 30100 Espinardo. Murcia. E-mail: m.aranda@cebas.csic.es*

²*Escuela Politécnica Superior de Orihuela, Universidad Miguel Hernández de Elche, Ctra. de Beniel km 3.2, 03312 Orihuela, Alicante. E-mail: miguel.juarez@umh.es*

La comarca “Campo de Cartagena” de la Región de Murcia, es una de las áreas de cultivo intensivo de cucurbitáceas al aire libre más importantes de toda España. Con el objetivo de detectar virus de cucurbitáceas y determinar su incidencia e importancia relativa, hemos llevado a cabo muestreos en aproximadamente 30 parcelas dedicadas al cultivo de melón y calabacín en esta comarca durante 2003 y la campaña de primavera-verano de 2004. Las parcelas se eligieron sin disponer de información previa sobre ellas, y dentro de cada parcela se muestrearon plantas con posibles síntomas de virosis. Las muestras se analizaron mediante hibridación molecular para detectar la presencia del Virus del falso amarilleo de la remolacha (BPYV), el Virus del amarilleo de las cucurbitáceas transmitido por pulgones (CABYV), el Virus del mosaico del pepino (CMV), el Virus del amarilleo de las venas del pepino (CVYV), el Virus del amarilleo y enanismo de las cucurbitáceas (CYSDV), el Virus de las manchas necróticas del melón (MNSV), el Virus de las manchas anulares de la papaya (PRSV), el Virus del mosaico de la sandía (WMV) y el Virus del mosaico amarillo del calabacín (ZYMV).

Durante el año 2003 se recogieron 213 muestras de melón y 108 muestras de calabacín. En este año el virus prevalente fue CABYV, presente en el 78% de las muestras de melón y en el 88% de las muestras de calabacín. Es destacable que este virus no había sido citado con anterioridad a este trabajo en nuestro país y que, sin embargo, su extensión en la Región de Murcia alcanzó en 2003 dimensiones epidémicas. En melón, CYSDV y WMV fueron los siguientes virus en importancia (36% y 29%, respectivamente). Con frecuencias en torno al 15%-10% se encontraron BPYV, MNSV, CMV, ZYMV y CVYV. PRSV resultó ser minoritario (7%). En calabacín, los virus siguientes en importancia a CABYV fueron BPYV y CVYV (43% y 23%, respectivamente). Con frecuencias en torno al 10% se encontraron WMV y CYSDV. ZYMV y CMV fueron minoritarios y no se detectaron MNSV ni PRSV. Notablemente, el número de infecciones múltiples fue muy alto, ya que estuvo en torno al 70% tanto para melón como para calabacín.

VARIABILIDAD SINTOMATOLÓGICA Y MOLECULAR DEL PepMV

MARTÍNEZ-PRIEGO, L.¹; SEGURA, A.¹; CÓRDOBA, M.C.¹; LACASA, A.²; JORDÁ, C.¹.

¹*Grupo de Virología. Universidad Politécnica de Valencia, ETSI Agrónomos. Camino de Vera s/n 46022 Valencia.*

²*Centro de Investigación y Desarrollo Agroalimentario. Consejería de Agricultura, Agua y Medio Ambiente. C/ Mayor s/n, 30.150 La Alberca (Murcia).*

El PepMV es un virus que presenta en tomate una gran variabilidad de síntomas, éstos pueden ir desde mosaicos amarillos más o menos acusados, abullonado de hoja, filiformismo, manchado de fruto, estrías en tallo y cáliz. Para determinar si este comportamiento variable se correspondía con una variabilidad del virus a nivel genético, se llevaron a cabo estudios moleculares de distintas zonas de su genoma.

Para el estudio se seleccionaron 20 aislados del virus de diferente origen geográfico y diferente sintomatología, entre estos aislados se incluyeron también un aislado holandés y otro inglés. Los diferentes aislados fueron inoculados paralelamente en plantas de tomate Marmande cuarenteno procedentes de semillas termotratadas, y que fueron cultivadas en fitotrón bajo las mismas condiciones ambientales.

Se diseñaron 2 parejas de cebadores de dos regiones distintas del virus: una conservada como es el caso de la polimerasa (Pep3-Pep4), y una zona variable teóricamente implicada en el movimiento del virus, la zona del Triple Gen Block (TGB1-TGB2). Se amplificaron fragmentos de 623pb y 758pb respectivamente, que fueron secuenciados. Las homología de las diferentes secuencias obtenidas para cada zona se analizaron con el programa DNAMA (Institute from Plant Pathology, BBA Germany).

Para la zona de la polimerasa estudiada no se encontraron diferencias de secuencia significativas, siendo la máxima diferencia del 98%. Además al observar los síntomas de las plantas de tomate inoculadas con los diferentes aislados, los grupos de homología observados no se correspondían con una similar sintomatología.

Aunque se observó una mayor variabilidad en la zona del TGB, como era esperable, ésta no fue significativa, 97%, y además tampoco se observó correspondencia de aislados con similar sintomatología y los grupos de homología obtenidos.

Por lo tanto las diferencias de comportamiento biológico observadas no se corresponden con diferencias significativas a nivel molecular, al menos en las zonas estudiadas.

Este trabajo confirma los resultados obtenidos por otros autores que llegaron a similares conclusiones, como R.A. Mumfrot y J. Metcalfe (Archives of Virology (2001) 146: 2455-2460) quienes estudiaron la variabilidad de 15 aislados europeos en la zona de la proteína de la cápside sin encontrar tampoco diferencias de variabilidad genética significativas.

INCREMENTO DE LA INCIDENCIA DE *Southern bean mosaic virus* EN ESPAÑA EN EL PERIODO 2000-2004

SÁEZ, E. ¹; SEGUNDO, E. ⁵; JANSSEN, D. ⁵; GIL-SALAS, F.M. ⁵; HERRERO DE HARO, R. ²; VARGAS, Y. ²; FERNANDEZ-ESPINOSA, S. ³; MORALES, F. ⁴; CUADRADO, I.M. ⁵

¹Laboratorio de Sanidad Vegetal de Almería. ²CABASC. ³SCA BalernaMar. ⁴SCA "El Grupo". ⁵CIFA "La Mojonera", IFAPA, Autovía del Mediterráneo, Km 420, La Mojonera (Almería). virucifa@arrakis.es

España es el principal productor de la UE de judía para consumo en fresco, estando la producción concentrada principalmente en las provincias de Almería, Granada y Málaga, donde ocupa una superficie de 9 000 ha, con una producción de 13 500 t, y un valor de la producción de de 170 millones de Euros. En el año 2000 comenzamos a estudiar una nueva enfermedad en España que afectaba principalmente a la pérdida de calidad del fruto de esta leguminosa en las zonas productoras del poniente de Almería y colindantes de Granada. Identificamos el virus del mosaico sureño de la judía (*Southern bean mosaic virus*, SBMV) del género *sobemovirus* como el agente causante de la enfermedad, y que se transmite por contacto, suelo y semilla.

En prospecciones realizadas entre los años 2000 y mayo de 2004 hemos observado un gran incremento en la incidencia de esta enfermedad, pasando del 4% en el año 2000 al 35% en el periodo enero - mayo de 2004. Así mismo, en el último periodo, también se han visto cultivos afectados en zonas del levante almeriense, distantes de donde inicialmente apareció la enfermedad, lo que es indicativo de que el virus se está extendiendo.

Además, para ver la incidencia en un cultivo, se eligió al azar un invernadero comercial que se encontraba en fase de producción, previa a la primera recojida de fruto, y donde se observaron 815 plantas (27% del total) distribuidas uniformemente. El 25% de las plantas mostraban síntomas atribuibles a los producidos por SBMV. De una submuestra escogida aleatoriamente, el virus fue detectado mediante DAS-ELISA en la totalidad de las plantas que mostraban síntomas, así como en el 48% de las plantas que aun no mostraban síntomas. Estos datos indican la alta incidencia de la enfermedad en los cultivos de judía en Andalucía oriental, resultando ser una situación preocupante dado la pérdida de producción que esto significa, y más aun teniendo en cuenta que el virus persiste en suelo, lo cual epidemiológicamente es importante para el desarrollo de cultivos posteriores.

PB-10

EFFECTO DEL VIRUS DEL MOTEADO DEL HABA (BBMV) Y SUS RNAs DEFECTIVOS INTERFERENTES EN EL RENDIMIENTO Y PRODUCTIVIDAD DEL HABA

SANDOVAL, C.; LARENA, I.; CASTRO, S.; ROMERO, J.

Departamento de Protección Vegetal, INIA. Carretera de La Coruña Km 7,0. 28040-Madrid

El Bromovirus del moteado del haba (*Broad bean mottle virus*, BBMV) es un virus RNA de cadena sencilla cuyo genoma esta compuesto de 3 RNAs, asociados a estos se han descrito otro tipo de RNAs caracterizados como RNAs defectivos interferentes (DI-RNAs) que modifican la gravedad de los síntomas en las plantas infectadas. El efecto del BBMV con o sin DI-RNAs ha sido estudiado durante dos campañas en siembras de haba en un jaulón con malla anti-pulgón. Cada unidad experimental estuvo compuesta de 10 plantas de haba que fueron inoculadas con el BBMV sin DI-RNAs a distintos estados fenológicos y con el BBMV conteniendo DI-RNAs a 19 días después de la siembra. Las plantas fueron cosechadas al llegar a la madurez comercial y para cada repetición y tratamiento se registró: el peso total de semillas, número de semillas por vaina, número total de vainas y peso promedio de las semillas. Los resultados obtenidos mostraron un efecto del virus sobre la reducción del rendimiento que varió entre un 36 – 48 % , dependiendo del momento de la inoculación. La presencia de DI-RNAs junto al virus nos llevó a una mayor reducción de la producción, dependiendo si la partícula defectiva inoculada era de 1.9 Kb (64 % de reducción) o de 2.4 Kb (58 % de reducción). El efecto sobre la productividad fue analizado mediante los distintos componentes del rendimiento, encontrando diferencias significativas entre el número de vainas por planta y el número de semillas por vaina, no observando diferencias significativas en el peso promedio de las semillas. De estos resultados podemos concluir que el BBMV reduce de forma considerable la producción en los campos de haba y la presencia de moléculas defectivas estableció reducciones adicionales del rendimiento al aumentar la gravedad de los síntomas producidos por el virus.

***Pepino mosaic virus* (PepMV): TRANSMISIÓN POR SEMILLA Y SU CONTROL**

CÓRDOBA, M.C.¹; GARCÍA, A.¹; LACASA, A.²; JORDÁ, C.¹

¹Grupo de Virología. Universidad Politécnica de Valencia, ETSI Agrónomos. Camino de Vera s/n 46022 Valencia.

²Centro de Investigación y Desarrollo Agroalimentario. Consejería de Agricultura, Agua y Medio Ambiente. C/ Mayor s/n, 30.150 La Alberca (Murcia).

La primera detección del Pepino Mosaic Virus (PepMV) fue en el año 1974, en muestras de pepino dulce (*Solanum muricatum*) cultivado en la zona costera del Perú. Las hojas jóvenes de esta solanácea presentaban un mosaico de color amarillo característico. Sin embargo, este virus no pudo ser identificado y descrito hasta el año 1980, en que Jones y colaboradores lo clasificaron como un nuevo potexvirus que afectaba de manera exclusiva al *Solanum muricatum*. En el año 1999, el Pepino Mosaic Virus es detectado en Holanda afectando a cultivos protegidos de tomate. A partir de esta primera cita en tomate, y en un periodo de 4 años, aparecen focos de esta virosis en las principales zonas productoras de tomate de Reino Unido, Holanda, Alemania, Francia, España, Italia, Finlandia, Noruega, Polonia, Suecia, Eslovaquia, Estados Unidos, Canadá, Austria, Bélgica y Marruecos entre otros.

Se ha comprobado la presencia y transmisión del virus en las semillas de tomates infectados de forma natural con PepMV, y se sospecha que sea la semilla, el vehículo que ha llevado la enfermedad a los distintos países en que se ha detectado. De acuerdo con la Decisión de la Comisión de la Unión Europea del 27 de febrero del 2004 (Diario Oficial de la Unión Europea 2-3-2004, 264/43), las semillas de tomate han de ser sometidas a medidas de control para evitar la propagación del PepMV dentro de las fronteras de la Comunidad, mediante su inspección y limitando su libre circulación en la Comunidad Europea. Con estos antecedentes se nos plantea la necesidad de tener un método de control de la sanidad de las semillas que sea eficaz en la eliminación del virus, sencillo, rápido y que no afecte a la germinación de las mismas. Hemos realizado un estudio comparativo de la eficacia de los distintos métodos recomendados para la desinfección de semillas de tomate de agentes virales. Semillas procedentes de frutos infectados con PepMV se sometieron tanto a distintos tratamientos térmicos, como químicos de diferente agresividad, y posteriormente fueron analizadas mediante la aplicación de la técnica serológica ELISA en distintos estadios de desarrollo: semilla entera, cotiledones y tamaño de transplante.

El método mas eficaz en la desinfección de las semillas resulto ser el tratamiento con fosfato trisódico al 10%, que eliminaba totalmente la presencia del virus ya en el estadio de semilla entera.

APLICACIÓN DE LA METODOLOGÍA GIS AL ANÁLISIS DE EPIDEMIAS DE VIRUS EN TOMATE DE LA REGIÓN DE MURCIA

VELASCO, L.; SIMÓN, B.; HERNÁNDEZ, M.D.; ERENA, M.; CENIS, J.L.

Departamento de Biotecnología y Protección Vegetal. Instituto Murciano de Investigación y Desarrollo Agrario y alimentario (IMIDA). c/ Mayor s/n. 30150. La Alberca – Murcia. E-mail: josel.cenis@carm.es

Los Sistemas de Información Geográfica (GIS) son un conjunto de herramientas informáticas que permiten el manejo y análisis de gran cantidad de información con un componente espacial. Dado que los sistemas agronómicos son inherentemente espaciales, la adquisición de información epidemiológica y su tratamiento geoestadístico han de permitir el establecimiento de los patrones y tendencias espaciales de las infecciones que permitan una mejor comprensión y control de las enfermedades. (Revisado por Nadeem et al, 1999).

En esta dirección hemos abordado durante la campaña 2002-2003 un estudio preliminar que pretende aplicar estas metodologías a las enfermedades que afectan a los cultivos de tomate en la Región de Murcia. En una primera fase se ha establecido un conjunto de puntos de observación (30 parcelas en la zona de cultivo de tomate en Aguilas, Murcia). En cada punto se han tomado sus coordenadas UTM mediante GPS y se han registrado datos tales como las variedades cultivadas, tipo de estructura de las parcelas y todos los parámetros agronómicos relevantes. Se ha establecido asimismo una escala arbitraria en función de la calidad de la protección frente a la entrada de insectos, la situación y orientación de las parcelas, condiciones microclimáticas, malas hierbas, reservorios y presencia de otros cultivos en el entorno.

En una segunda fase se ha procedido al seguimiento de las plagas (*Bemisia*, *Trialeurodes*, *Frankiniella*) y enfermedades: Tomato yellow leaf curl disease (mediante sonda DNA TYLCV/TYLCSV), ToCV (sonda RNA), TSWV (ELISA y sintomatología), PepMV (sonda RNA) y otras patologías (“Torrado”, de etiología desconocida), *Botrytis*, *Oidium* (síntomas). Como software de representación y análisis se ha elegido ArcGIS (ESRI) pues permite establecer la correlación entre las variables del cultivo y la incidencia de enfermedades mediante el análisis geoestadístico: autocorrelación espacial (variogramas) e interpolación de superficies (kriging). Se desarrollarán modelos de predicción y mapas de riesgo. Se pretende continuar estos estudios en sucesivas campañas.

EFFECTO DELETÉREO DE LA MICROBIOTA NATURAL DE AGUA DE RÍO EN LA SUPERVIVENCIA DE *Ralstonia solanacearum* BIOVAR 2

ÁLVAREZ, B.¹; BIOSCA, E.G.^{1,2}; LÓPEZ, M.M.¹

¹Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA), Apdo. Oficial 46113, Moncada, Valencia. ²Depto. Microbiología y Ecología, Universidad de Valencia, Apdo 46100, Burjassot, Valencia. E-mail: balvarez@ivia.es

Ralstonia solanacearum biovar (bv) 2 es el agente causal de la marchitez bacteriana de la patata y otras solanáceas. En la última década, su introducción en Europa ha producido importantes pérdidas económicas, siendo el riego con agua contaminada una de las principales vías de diseminación en nuestro continente. *R. solanacearum* bv 2 puede sobrevivir en agua durante largos períodos de tiempo, pero en ciertos casos su supervivencia se ha visto negativamente afectada. Este efecto deletéreo se ha atribuido a la microbiota del agua, aunque no se han investigado los factores bióticos responsables. Para determinar la naturaleza de los agentes implicados (protistas y/o bacterias y/o bacteriófagos) y su influencia sobre la supervivencia de *R. solanacearum* bv 2 en agua del río Tormes, se prepararon distintos microcosmos de agua, separando algunas de las fracciones bióticas por filtración diferencial, y utilizando agua sin tratar y agua filtrada estéril como controles positivo y negativo, respectivamente. Todos los microcosmos se inocularon con la cepa española 1602.1 de *R. solanacearum* bv 2 a una concentración final de 10^7 ufc/ml y se mantuvieron durante un mes a 25° y 14° C. Se determinó periódicamente el número de bacterias totales y viables mediante el método de Kogure y de cultivables en el medio SMSA. Los recuentos de células totales, viables y cultivables de la cepa estudiada, permanecieron constantes en todos los microcosmos de agua estéril. Por el contrario, la supervivencia de *R. solanacearum* descendió rápidamente en los microcosmos con distintas fracciones bióticas del agua natural. La fracción fágica tuvo un drástico efecto negativo, provocando una disminución del número de bacterias cultivables, así como en el de viables y totales, ya en las primeras 24 horas, indicando la presencia de fagos líticos. Los protistas y otras bacterias acuáticas competidoras y/o antagonistas también mostraron un efecto negativo significativo en la supervivencia de la cepa del bv 2 en agua. Se realizaron ensayos de susceptibilidad a una colección de fagos aislados del mismo río, con una selección de cepas de *R. solanacearum* bv 2, aislados bacterianos acuáticos y cepas representativas de distintas bacterias fitopatógenas. Se observó la especificidad de los fagos ensayados frente al bv 2 de *R. solanacearum*, detectándose actividad lítica entre 14 y 31° C. Estos resultados abren nuevas posibilidades para el desarrollo de métodos de control biológico de *R. solanacearum* bv 2 mediante el uso de fagos líticos.

FACTORES QUE INFLUYEN EN EL DESARROLLO DEL MAL SECO DEL NOGAL CAUSADO POR *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis*

ARQUERO, O.¹; RODRÍGUEZ, R.¹; LOVERA, M.¹; SÁNCHEZ, M.¹; TRAPERO, A.²

¹Dpto. de Olivicultura y Arboricultura Frutal, CIFA de Córdoba. Avda. Menéndez Pidal s/n 14080 Córdoba.

²Dpto. de Agronomía, ETSIAM, Universidad de Córdoba. Avda. Méndez Pidal s/n 14071 Córdoba.

El nogal para fruto está considerado como un cultivo de alta rentabilidad y con buenas expectativas de aumento de superficie. Una de las principales limitaciones que presenta este cultivo en la actualidad, es la pérdida de cosecha debida a la enfermedad conocida como mal seco, causada por *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis*, que provoca la necrosis del fruto. En condiciones favorables, las pérdidas llegan a superar el 50% de la producción. En este trabajo se ha abordado el estudio de factores que pueden influir en la incidencia del mal seco: susceptibilidad del material vegetal (variedades y patrones), orientación y altura de la copa y presencia de pulgones (*Cromaphis juglandicola*).

Los trabajos se han llevado a cabo en el campo experimental de variedades y patrones del CIFA de Córdoba, que cuenta con los principales patrones (*Juglans hindsii* y 'Paradox') y variedades californianas ('Amigo', 'Chandler', 'Chico', 'Hartley', 'Howard', 'Sundland', 'Tehama' y 'Vina') de nogal. Los estudios se han realizado mediante la evaluación temporal de la incidencia y severidad de síntomas en folíolos, raquis y frutos.

Se ha observado distinto grado de susceptibilidad entre las variedades. Las variedades 'Chico' y 'Vina' presentaron una alta incidencia, mientras que 'Chandler' y 'Howard' se mostraron menos susceptibles. La variedad 'Hartley' presentó una baja incidencia de necrosis en hoja, aunque alta en fruto. Esta variedad ha presentado la particularidad de que, en el 90% de los frutos afectados por necrosis, el tamaño de la lesión era pequeño sin llegar a afectar ni a la cáscara, ni a la semilla. El resto de las variedades han tenido una incidencia media. Entre patrones (*Juglans hindsii* y 'Paradox') no se han detectado diferencias significativas. No se ha observado un efecto de la orientación de la copa sobre la incidencia de la enfermedad. Mientras que para la posición en la copa, las zonas menos iluminadas y poco ventiladas han tenido mayor incidencia de la enfermedad. La presencia de pulgones ha favorecido la incidencia del mal seco en las hojas, pero no así en el fruto.

IDENTIFICACIÓN DE VECTORES POTENCIALES Y HUÉSPEDES ALTERNATIVOS DE LOS ESFYP EN ESPAÑA

LAVIÑA, A.; SABATÉ, J.; BATLLE, A.

Dpt. Protecció Vegetal. Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentàries (IRTA). Ctra Cabrils s/n. 08348 Cabrils (Barcelona), España. E-mail: amparo.lavina@irta.es

European Stone Fruit Yellows Phytoplasma (ESFYP), perteneciente al grupo Apple Proliferation (AP) es el causante del Enrollamiento Clorótico del Albaricoquero (ACLR) y de otros decaimientos del género *Prunus*. En España se han observado síntomas similares a los producidos por fitoplasmas en ciruelos, melocotoneros, nectarinas y cerezos. Estos síntomas consisten en clorosis o enrojecimientos distribuidos irregularmente en el árbol (otoño), floración y brotación anticipada (invierno).

En este trabajo presentamos los resultados del estudio epidemiológico realizado en *Prunus* (*Prunus salicina*, *P. cerasifera*, *P. persica* y *P. avium*). Con el fin de estudiar los huéspedes alternativos y los vectores transmisores de la enfermedad, se tomaron muestras de rosáceas silvestres (*Prunus mahaleb*, *Crataegus monogyna* y *Rubus* sp), localizadas en los alrededores de las parcelas afectadas por ESFYP y periódicamente se capturaron insectos pertenecientes a las especies potencialmente vectoras de fitoplasmas. La identificación del fitoplasma se realizó mediante la técnica de la PCR-nido-RFLP, utilizando iniciadores universales (P1/P7) y específicos para el grupo del Apple proliferation (fO1/rO1). Las muestras que resultaron negativas con los iniciadores específicos fueron analizadas con los iniciadores universales fU5/rU3 para determinar la presencia de fitoplasmas pertenecientes a grupos distintos al del AP. El ADN amplificado fue digerido con las enzimas de restricción Rsa I o Tru I.

El único fitoplasma identificado en las parcelas de *Prunus* fue el ESFY. Se identificaron *P. mahaleb* infectados por ESFYP en los alrededores de las parcelas cultivadas, lo que indica que estos podrían estar implicados en la diseminación de la enfermedad.

Los insectos fueron capturados mediante aspiración o utilizando trampas amarillas o azules (invierno) colocadas en los márgenes o dentro de las parcelas infectadas por ESFYP. Las trampas se cambiaron semanalmente desde febrero hasta julio. Distintas especies de cicadélidos y fulgoridos fueron identificadas en todas las parcelas infectadas: *Zygina* sp., *Idiocerus*, *Empoasca* sp. y dos especies del género *Capcosylla* (*C. pruni* y *C. pulchella*). *C. pruni* esta descrito como vector de esta enfermedad en otros países y podría ser el causante de la transmisión del fitoplasma en España. *C. pulchella* y algunos individuos de *Zygina* sp. y *Empoasca* sp. fueron identificados como portadores de un fitoplasma perteneciente al grupo del AP. Ensayos para evaluar el potencial de *C. pulchella* como vector de ESFYP se están llevando a cabo.

CLASIFICACIÓN DE AISLADOS DE *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* MEDIANTE RFLP DE UN FRAGMENTO DEL GEN IAAI

MATAS, I.M.; RODRÍGUEZ-MORENO, L.; RAMOS, C.

Área de Genética, Facultad de Ciencias, Universidad de Málaga. Campus de Teatinos s/n, 29071-Málaga. E-mail: crr@uma.es

La Tuberculosis del olivo, cuyo agente causal es la bacteria *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* (Pss), está considerada como una de las enfermedades más importantes que afectan a los olivares del litoral mediterráneo. Los árboles afectados muestran tumores en troncos, ramas y brotes y, además, manifiestan una reducción en el crecimiento y alteraciones en el sabor del fruto y la calidad del aceite. En la actualidad, la detección de este patógeno en muestras vegetales se realiza mediante amplificación por PCR de un fragmento del gen *iaaL*, perteneciente a la ruta biosintética del ácido indolacético (IAA) y sus derivados (Bertolini et al. 2003, Phytopathology 93: 286-92). El fragmento del gen *iaaL* amplificado utilizando esta técnica a partir de 25 cepas de Pss de distinta procedencia, 13 de ellas aisladas en España en la Comunidad Valenciana (M. López, IVIA) y en Andalucía, se digirió con la enzima de restricción *HaeIII* (Penyalver et al. 2000, Appl. Environ. Microbiol. 66:2673-77) y los fragmentos resultantes se sometieron a electroforesis en gel de agarosa al 3%. Las cepas analizadas se clasificaron en 5 grupos diferentes según el patrón de RFLP ("Restriction fragment length polymorphism") obtenido. El producto amplificado a partir de las cepas incluidas en 2 de los grupos establecidos, al que pertenecen únicamente aislados Españoles y 1 Portugués, consistió en 2 fragmentos diferentes cuya secuencia corresponde con la del gen *iaaL* en ambos casos. No se encontró correlación alguna entre los grupos establecidos y otras características fenotípicas que varían en Pss, tales como la morfología y el tamaño de las colonias (variable entre 0,3 y 6,0 mm de diámetro tras 48 h de crecimiento en KB), el perfil plasmídico, la emisión de fluorescencia por las colonias crecidas en KB, la producción de levanos, la movilidad ("swimming, swarming y twitching"), y la producción de homoserinas lactonas implicadas en la regulación por "quorum sensing".

EFFECTO DE LA TEMPERATURA EN LA MULTIPLICACIÓN *in vitro* DE *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* Y EN EL DESARROLLO DE INFECCIONES EN NOGAL

MORAGREGA, C.; PICO, P.; MONTESINOS, E.

Institut de Tecnologia Agroalimentària – CeRTA-CIDSAV, Universitat de Girona. Avda Lluís Santaló s/n, 17071 Girona (España). concepcio.moragrega@udg.es

La bacteriosis del nogal causada por *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* es la principal enfermedad bacteriana de este cultivo y actualmente es un importante factor limitante de la producción. Su control se basa en la aplicación de derivados cúpricos durante todo el período vegetativo. Se ha observado que la reducción en el número de aplicaciones de cobre efectuadas en función del estado fenológico de los árboles tiene el mismo efecto en el control de la enfermedad que aplicaciones continuadas durante todo el período vegetativo. Sin embargo, para la racionalización de los tratamientos es necesario elaborar un modelo de predicción de la infección de *X. a. pv. juglandis* en nogal. Con este objetivo se ha determinado el efecto de la temperatura en la multiplicación *in vitro* de la bacteria y en el desarrollo de infecciones en plantas y frutos de nogal en condiciones de ambiente controlado.

Se incubaron tres aislados de la bacteria a las temperaturas de 15, 20, 25, 30 y 35 °C. A partir de las curvas de crecimiento obtenidas a cada temperatura se calculó para cada aislado el tiempo de duplicación y la velocidad de crecimiento y se determinó la temperatura óptima de crecimiento de *X. a. pv. juglandis*. La máxima velocidad de crecimiento se observó a las temperaturas de 25 y 30 °C. El efecto de la temperatura en las infecciones por la bacteria se evaluó mediante inoculaciones en plantas de nogal de la variedad Vina y frutos inmaduros (GF+45) de la variedad Chico. Las plantas, de 1-2 años, se inocularon mediante pulverización con una suspensión de 10^8 ufc/ml de un aislado virulento en las hojas más jóvenes y se incubaron durante 7-10 días a las temperaturas 10, 15, 20, 25, 30 °C, humedad relativa superior al 90% durante las primeras 48 horas, y fotoperíodo de 16 h luz. Los frutos se inocularon por microinfiltración localizada en el mesocarpo de 20 µl de la suspensión bacteriana y se incubaron a las mismas temperaturas que las plantas y HR>90%.

El análisis de la varianza indicó un efecto muy significativo de la temperatura tanto en la incidencia como en la severidad de la enfermedad. Para los dos parámetros, el aumento de temperatura produjo un incremento significativo de los niveles de enfermedad hasta un máximo (75-100% infección) a temperaturas de 25-30 °C. La evolución de la enfermedad en función de la temperatura siguió un modelo polinómico de segundo grado. La temperatura óptima para la infección de la bacteria en nogal se estimó en 27 °C.

Este trabajo ha sido financiado con el proyecto INIA-RTA02-061.

EFFECTO DE DISTINTAS CONCENTRACIONES DE *Ralstonia solanacearum* EN AGUA DE RIEGO SOBRE PLANTAS DE TOMATE

PALOMO, J.L.; GARCÍA-BENAVIDES, P.

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

Ralstonia solanacearum (Smith) Yabuuchi *et al.* es una bacteria de cuarentena incluida en la lista A2 de la Unión Europea (Directiva 2000/29/CE), que causa la podredumbre parda del cultivo de la patata. En los últimos años se han detectado algunos focos de esta enfermedad en cultivos de patata, tanto en España como en otros países europeos. Una de las vías de transmisión de la enfermedad es a través del agua de riego, por lo que ante la aparición de un nuevo foco, se debe detectar la posible presencia de la bacteria en las aguas superficiales de la zona y tomar medidas para evitar su diseminación a través del riego. En Castilla y León se ha detectado la bacteria en algunos cauces fluviales, prohibiéndose el riego de solanáceas con esta agua. Sin embargo, se conoce poco el efecto real que puede tener el riego con aguas infectadas con *Ralstonia solanacearum* sobre cultivos de patata y tomate.

Se ha efectuado un ensayo en invernadero para comprobar el efecto de distintas concentraciones de *Ralstonia solanacearum* en agua de riego sobre planta de tomate. Se utilizaron 6 concentraciones distintas de la bacteria (10^6 - 10^1 ufc/ml) así como un control negativo. Para cada concentración se utilizaron 10 plantas de tomate (cv. Roma), que se regaron con 100 ml de suspensión bacteriana, 2-3 veces por semana. Las plantas se incubaron durante 2 meses a temperaturas entre 22-28°C, observando periódicamente la aparición de síntomas. Al finalizar este periodo, todas las plantas se analizaron mediante inmunofluorescencia (IF) y aislamiento en SMSA.

Los primeros síntomas aparecieron el día 10 en las plantas regadas con las concentraciones más altas (10^6 ufc/ml). Al final del ensayo, el 100% de las plantas correspondientes a esta concentración y el 50% de las concentraciones 10^5 y 10^4 ufc/ml, mostraron síntomas característicos. En todas las plantas con síntomas se comprobó la presencia de *Ralstonia solanacearum* mediante IF y siembra en SMSA. Las plantas asintomáticas se analizaron por IF y siembra, detectándose la bacteria en las plantas correspondientes a la concentración 10^5 ufc/ml. El resto dieron resultado negativo.

ESTUDIO DE LA TRANSMISIÓN DEL FITOPLASMA CAUSANTE DEL *BOIS NOIR* DE LA VIÑA, A TRAVÉS DE DISTINTAS ESPECIES DE INSECTOS

SABATÉ, J.; LAVIÑA, A.; BATLLE, A.

Dpt. Protecció Vegetal. Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentàries (IRTA). Ctra de Cabriels s/n. 08348. Cabriels, Barcelona. E-mail: assumpcio.batlle@irta.es

Distintas especies de insectos se han citado como posibles vectores del fitoplasma del stolbur, pero en viña donde este fitoplasma causa la enfermedad de la madera negra o *Bois Noir*, únicamente ha sido demostrada la transmisión por el fulgorido, *Hyalesthes obsoletus*. Sin embargo, en las prospecciones realizadas en España, esta especie ha sido identificada en muy pocas parcelas y en poblaciones muy bajas, lo que sugiere que el vector en estas áreas debe ser otra especie.

El objetivo de este estudio ha sido determinar la evolución de las poblaciones de cicadelidos, fulgoridos y cercopidos en viñas infectadas por stolbur en un área donde la presencia de *H.obsoletus* era esporádica. Así mismo, se han realizado ensayos de transmisión a plantas de viña *in vitro* y a un medio nutritivo.

Estos ensayos se llevaron a cabo con insectos pertenecientes a especies identificadas previamente como portadoras del fitoplasma. Los insectos se capturaban vivos en campo y se mantenían en *Avena sativa* por un periodo de dos días. A continuación se colocaban individualmente en tubos eppendorf con el medio nutritivo o en el interior de los tubos que contenían una planta *in vitro* de viña. La detección del fitoplasma se realizó mediante PCR, utilizando cebadores universales (fU5/rU3) y específicos (fstol/rstol). La extracción de ADN a partir de los medios nutritivos se realizó utilizando el kit de purificación de ADN "Wizard Plus" de Promega. La extracción a partir de insectos y plantas de viña se realizó siguiendo la metodología indicada en Batlle *et al.*, 2000.

Los resultados de los muestreos llevados a cabo durante los últimos cinco años en Cataluña han mostrado que insectos pertenecientes a las familias cicadelidae, fulgoridae y cercopidae se capturan desde marzo hasta noviembre en la flora del interior y de los márgenes de las parcelas de viña. Mediante PCR se determinaron individuos positivos de las siguientes especies: *Agallia laevis*, *Adarrus taurus*, *Euscelis obsoletus*, *Hardya tenuis*, *Hyalesthes obsoletus*, *Laodelphax striatellus*, *Peragallia sinuata*, *Psammotettix striatus* y *Zyginidia scutellaris*. En el interior de las parcelas las especies con mayores poblaciones fueron: *Scaphoideus titanus*, *Empoasca vitis*, *A.laevis* y *E.obsoletus*. Mediante los ensayos a medio nutritivo se ha determinado que distintas especies son capaces de transmitir el fitoplasma del stolbur, entre las que se encuentran, *P.sinuata*, *P.striatus*, *H.obsoletus*, *H.tenuis*, *E.variegatus* y *E.obsoletus*. Los ensayos de transmisión a plantas de viña *in vitro* han indicado que *E. obsoletus* podría estar también implicado en la transmisión del stolbur a esta especie. Los ensayos de transmisión a medio nutritivo y a plantas *in vitro* se presentan como un método alternativo que permite determinar la infectividad de los insectos y su capacidad para transmitir la enfermedad.

EVOLUCIÓN TEMPORAL Y DAÑOS PROVOCADOS POR LAS LESIONES NECRÓTICAS EN FRUTO DE NOGAL (*Juglans regia*)

ARQUERO, O.¹; RODRÍGUEZ, R.¹; LOVERA, M.¹; SÁNCHEZ, M.¹; SÁNCHEZ, C.²; TRAPERO, A.²

¹ Dpto. de Olivicultura y Arboricultura Frutal, CIFA de Córdoba. ² Dpto. de Agronomía, ETSIAM, Universidad de Córdoba. Avda. Menéndez Pidal s/n 14071 Córdoba.

Durante los últimos años se ha observado una incidencia elevada de lesiones necróticas en el fruto de nogal. Estas lesiones son de tamaño variable y coloración negro-parda. Inicialmente afectan a la corteza, pudiéndose extender al resto del fruto provocando su momificado y caída. Tradicionalmente toda lesión necrótica de fruto de nogal se consideraba producida por la bacteria *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* (*X. a. juglandis*). En investigaciones realizadas recientemente sobre este tipo de lesiones, se han aislado consistentemente especies del género *Fusarium* que resultaron patogénicas en inoculaciones artificiales. En este trabajo se ha abordado el estudio de los tipos de necrosis que pueden afectar al fruto, su evolución temporal y los daños asociados. Los ensayos se han realizado en los cvs. 'Chandler' y 'Chico'. Sobre frutos marcados, se ha hecho un seguimiento y muestreo a lo largo del periodo vegetativo durante 2002, así como aislamientos secuenciales de los síntomas.

Se han observado tres tipos diferentes de lesiones necróticas en fruto: mancha, moteado y punteado. La mancha ha sido la lesión más frecuente, de forma circular o irregular, su tamaño aumenta con el tiempo, pudiendo llegar a afectar a toda la nuez, provocando normalmente la necrosis de la semilla y la caída o momificación del fruto. El moteado está constituido por manchas necróticas de forma circular, de tamaño medio, agrupadas en número igual o superior a tres. El tamaño de las manchas aumentaba poco con el tiempo. El punteado es un conjunto de manchas necróticas de tamaño pequeño, en número muy elevado que abarcaba todo el fruto. Al igual que en el moteado, este síntoma raramente provocaba necrosis de la semilla ni caída del fruto. En su evolución temporal, primero apareció la mancha, seguida del moteado y posteriormente el punteado. En los tres tipos de lesiones se ha aislado consistentemente *X. a. juglandis*, en todo el periodo vegetativo, aunque más frecuentemente en los muestreos iniciales. También se ha aislado otra especie bacteriana, aún sin identificar, y varias especies del género fúngico *Fusarium*. Estas últimas sólo se detectaron al final del periodo vegetativo, por lo que parecen actuar agravando los síntomas de *X. a. juglandis*, y originando la podredumbre completa de las nueces.

CUANTIFICACIÓN DE CONIDIOS DE *Alternaria alternata* pv. *citri* EN PARCELAS DE MANDARINO FORTUNE AFECTADAS POR MANCHA MARRÓN Y SU RELACIÓN CON DIVERSAS VARIABLES METEOROLÓGICAS

BADAL, J.; PERIS, A.; VICENT, A.; ARMENGOL, J.; GARCÍA-JIMÉNEZ, J.

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

La incidencia de la mancha marrón causada por *Alternaria alternata* pv. *citri* en mandarina Fortune podría estar directamente relacionada con la cantidad de inóculo presente en las parcelas afectadas. En estudios previos se evaluó la concentración de conidios de *Alternaria* spp. en el ambiente mediante un captador Burkard, pero esta técnica no permite distinguir las cepas de *Alternaria* saprofitas de las de *A. alternata* pv. *citri*.

Con el fin de cuantificar las cepas patógenas se realizó un estudio de exposición ambiental con placas de medio de cultivo ARSA modificado, altamente selectivo para *Alternaria* spp. Estas exposiciones ambientales se realizaron en dos parcelas situadas en las localidades valencianas de Ribarroja y Monserrat, fuertemente afectadas por la enfermedad. Todas las colonias pertenecientes a este género se inocularon sobre hojas inmaduras de mandarina Fortune, a fin de comprobar su patogenicidad. Paralelamente, se instalaron sendas estaciones meteorológicas con la que se registraron los valores de temperatura, humedad relativa, agua libre y lluvia. Todos estos datos se procesaron estadísticamente a fin de encontrar relaciones entre la cantidad de conidios de *A. alternata* pv. *citri* y las variables meteorológicas.

En el período estudiado se observó una correlación entre la cantidad de cepas de *A. alternata* pv. *citri* y la temperatura así como el total de cepas de *Alternaria* spp detectadas.

El presente trabajo se ha realizado gracias a la financiación aportada por la Consellería de Agricultura, Pesca y alimentación de la Generalitat Valenciana (Proyecto de Investigación GV-CAPA00-12).

INFLUENCIA DE LA FLORA ARVENSE DEL OLIVAR SOBRE LAS EPIDEMIAS DE VERTICILOSIS INDUCIDAS POR LOS PATOTIPOS DEFOLIANTE Y NO DEFOLIANTE DE *Verticillium dahliae*

BEJARANO-ALCÁZAR, J.; IBRAHEN MOHAMED MOUSA, Y.

CIFA "Alameda del Obispo". Instituto de Investigación y Formación Agroalimentaria y Pesquera. Apdo. 3092. 14080 Córdoba. E-mail: jose.bejarano@juntadeandalucia.es

La Verticilosis del olivo, causada por *Verticillium dahliae*, está considerada como la enfermedad más grave de este cultivo en la mayoría de los países productores. El control de malas hierbas susceptibles a la Verticilosis podría representar una medida de lucha eficaz para reducir la supervivencia, multiplicación y dispersión del inóculo del hongo en plantaciones de olivar. En este trabajo se ha investigado la susceptibilidad relativa de especies de malas hierbas de importancia en el olivar andaluz frente a aislados representativos de los patotipos moderado no defoliante (ND) y severo defoliante (D) de *V. dahliae*. Un total de nueve especies fueron seleccionadas para este estudio, pertenecientes a las familias *Compositae* (*Aster squamatus*, *Xanthium strumarium*), *Cucurbitaceae* (*Ecballium elaterium*) y *Malvaceae* (*Lavatera cretica*, *L. trimestris*, *Malva neglecta*, *M. nicaeensis*, *M. parviflora*, *M. sylvestris*). En estos experimentos se incluyeron como testigos de susceptibilidad conocida los cvs de algodónero Acala SJ-2 y Crema 111, que son susceptible y tolerante a la Verticilosis, respectivamente, en condiciones de campo. La inoculación de las plantas se realizó mediante inmersión del sistema radicular en una suspensión ajustada de conidias.

Los dos aislados, D y ND, de *V. dahliae* fueron patogénicos sobre algodónero, *X. strumarium* y las diversas especies de la familia *Malvaceae* investigadas. Diferentes patrones de virulencia de los aislados fueron observados dependiendo de la especie estudiada. El aislado D fue significativamente más virulento que el ND en los dos cvs de algodónero, en *Lavatera* spp. y en *Malva* spp., mientras que el aislado ND mostró una virulencia superior en comparación con el aislado D sobre *X. strumarium*. El aislado D causó síntomas foliares muy severos acompañados de defoliación y muerte de las plantas inoculadas en los dos cvs de algodónero, en los que el aislado ND indujo síntomas moderados sin defoliación. Los dos aislados fueron moderadamente virulentos en *X. strumarium*, aunque no se llegaron a observar plantas muertas o próximas a morir; y débilmente virulentos en *Lavatera* spp y *Malva* spp. Sólo el aislado ND fue patogénico sobre *A. squamatus*, y los valores estimados de incidencia de plantas enfermas y de severidad de síntomas fueron muy reducidos. Ninguno de los dos aislados indujo la manifestación de síntomas externos de Verticilosis en *E. elaterium*. Sin embargo, ambos aislados fueron recuperados de las plantas inoculadas de *A. squamatus* y *E. elaterium* al final de los experimentos, aunque las frecuencias de reaislamiento fueron bajas. Según nuestro conocimiento, esta es la primera cita de *A. squamatus*, *L. cretica*, *L. trimestris* y *M. nicaeensis* como huéspedes de *V. dahliae*, y de *E. elaterium* como huésped asintomático potencial del patógeno.

Subvencionado por el Proyecto PIA-03-049

DINÁMICA POBLACIONAL DE ASCOSPORAS DE *Monosporascus cannonballus* EN SUELOS DE MARJAL

BELTRÁN, R.¹; VICENT, A.¹; SALES JR., R.²; GARCÍA-JIMÉNEZ, J.¹; ARMENGOL, J.¹

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

²Escola Superior de Agricultura de Mossoró, ESAM, Caixa Postal 137, 59.600-970, Mossoró-RN, Brasil.

El ascomiceto *Monosporascus cannonballus* Pollack et Uecker es uno de los principales agentes fúngicos implicados en el colapso del melón (*Cucumis melo* L.). Sus ascosporas pueden ser cuantificadas en el suelo con un método físico de extracción mediante centrifugación en gradiente de sacarosa. *M. cannonballus* es un hongo típico de áreas de cultivo de cucurbitáceas en climas áridos o semiáridos y posee un óptimo de temperatura entre 30 y 35°C. No obstante, en la provincia de Castellón *M. cannonballus* causa daños severos en cultivos en zonas de marjal que suelen encharcarse en invierno.

El objetivo del presente trabajo fue estudiar la dinámica poblacional de las ascosporas de *M. cannonballus* durante tres años, en cuatro campos de melón localizados en un área de marjal de Castellón. En este período, dos de estos campos tuvieron cultivo de melón alternándose con períodos de no cultivo, mientras que los otros dos no fueron cultivados durante todo este tiempo y presentaron extensos períodos de encharcamiento. En todos ellos se realizó una evaluación mensual del número de ascosporas por gramo de suelo.

Los resultados mostraron que el cultivo de melón produjo un incremento en el número de ascosporas por gramo de suelo, alcanzándose el máximo siete meses después de la plantación, y un descenso posterior en los períodos de no cultivo. No se observaron diferencias estadísticas entre las zonas de líneas de cultivo y entrelíneas. En los suelos con no cultivo y encharcamiento la dinámica encontrada fue un progresivo descenso de la población total de ascosporas en los tres años de estudio.

Al final del período de tres años, se encontró inóculo viable y capaz de producir infección a plántulas de melón en los cuatro campos, demostrando que las ascosporas de *M. cannonballus* son capaces de sobrevivir durante largos períodos de tiempo en ausencia de cultivo de melón. Este estudio demuestra asimismo que *M. cannonballus* está bien adaptado para sobrevivir en suelos con una capa freática elevada durante el cultivo, o incluso en condiciones de encharcamiento estacional.

Trabajo realizado dentro del Proyecto AGL2000-1809-C03-01 financiado por el MCyT

ESTUDIO DE LA RELACIÓN ENTRE LA DENSIDAD DE INÓCULO DE *Verticillium dahliae* EN CAMPOS DE ALCACHOFA Y LA INCIDENCIA Y SEVERIDAD DE LA VERTICILOSIS

BERBEGAL, M.¹; ROYUELA, M. A.¹; ORTEGA, A.²; ARMENGOL, J.¹; GARCÍA-JIMÉNEZ, J.¹

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

² Universidad Miguel Hernández, Escuela Politécnica Superior de Orihuela, Dpto. de Tecnología Agroalimentaria. Ctra. Beniel Km. 3,2. 03312-Orihuela, Alicante

La verticilosis de la alcachofa causada por *Verticillium dahliae* Kleb. se ha convertido en los últimos años en la enfermedad más grave de este cultivo en la Comunidad Valenciana, causando importantes pérdidas económicas. Este hongo produce microesclerocios que son la principal fuente de inóculo de la enfermedad y son capaces de permanecer viables en el suelo durante al menos 12 años. La verticilosis es una enfermedad monocíclica por lo que los niveles de inóculo en el suelo (microesclerocios por gr de suelo) tienen un papel fundamental en su epidemiología.

El objetivo de este estudio fue determinar si existe una relación entre el nivel de inóculo en el suelo y la incidencia y severidad de la verticilosis de la alcachofa. Estos parámetros fueron evaluados en nueve parcelas cultivadas con alcachofa ubicadas en las principales zonas productoras de la Comunidad Valenciana. El muestreo se llevó a cabo en dos momentos del primer año de cultivo: otoño y primavera.

En cada parcela se seleccionaron veinte áreas de muestreo siguiendo un patrón en W. En cada una de estas áreas:

- Se tomaron cuatro muestras de suelo que se mezclaron para determinar la densidad media de inóculo.

- Se evaluó visualmente la severidad de los síntomas en nueve plantas situadas alrededor de los puntos de toma de suelo.

- Se valoró la incidencia y severidad de la enfermedad. Para ello se realizaron aislamientos en medio de cultivo PDAS de un total de dieciséis hojas basales tomadas de cuatro de las nueve plantas citadas anteriormente.

Los datos obtenidos se analizaron estadísticamente mediante regresión para determinar la posible correlación entre los factores estudiados. Se observó en general que una mayor incidencia y severidad de la verticilosis se correspondía con las mayores densidades medias de inóculo en las diferentes parcelas.

Trabajo realizado dentro del Proyecto AGL2000-1444-C02-02 financiado por el MCyT.

PROSPECCIÓN DE ENFERMEDADES Y PLAGAS EN MANZANO DE SIDRA EN GIPUZKOA

ETXEANDIA, A.¹; LEGORBURU, F.J.²

¹Sagarlan S. L., Bizkarre 9 bajo, 20170 USURBIL (Gipuzkoa). E-mail: sagarlan@euskalnet.net

²NEIKER, Apartado 46, 01080 VITORIA/GASTEIZ, E-mail: jlegorburu@neiker.net

El manzano de sidra es un cultivo tradicional en Gipuzkoa, con gran riqueza de variedades autóctonas. No obstante, está poco tecnificado y sus rendimientos son bajos. Se ha realizado un estudio de características agronómicas de 14 variedades entre 2001 y 2003. Entre los datos tomados se halla la incidencia de plagas y enfermedades.

Se han realizado estimaciones visuales de daños en una escala arbitraria de 0 a 4, en diferentes momentos del ciclo vegetativo. El año 2002 fue extraordinariamente húmedo, mientras que el año 2003 fue extremadamente caluroso.

Las enfermedades de mayor incidencia fueron el moteado (*Venturia inequalis*), el chancro (*Nectria galligena*) y la fitoplasmosis (*Apple proliferation phytoplasma*). En menor medida aparecieron hollín (*Gloeodes pomigena*), punteado (*Leptothyrium pomi*), fuego bacteriano (*Erwinia amylovora*), oidio (*Podosphaera leucotricha*) y podredumbre de cuello (*Phytophthora spp.*). Las plagas más importantes fueron gusano, pulgón lanígero, cicadela (vector del fitoplasma) y araña roja.

La incidencia del moteado y del chancro fue muy alta en 2002, apreciándose diferencias entre variedades, que pueden indicar una resistencia genética. Destacan Errezila, Manttoni y Udare Marroi como resistentes al moteado. El hollín, el punteado y el fitoplasma aumentan en incidencia a lo largo de la temporada de forma sigmoidea, siendo aquella mayor en 2002 y no observándose diferencias entre variedades. La de cicadela también sigue una dinámica sigmoidea, pero sin diferencias apreciables entre años ni explotaciones. Para hollín y punteado sí se apreciaron diferencias de incidencia entre explotaciones. El fuego bacteriano aparece sólo en ciertas plantaciones.

OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA DE AISLADOS MONOESPORANGIALES DE *Olpidium radicale*

GUIRADO, M.L.¹; MARTÍNEZ, I.¹; SERRANO, Y.¹; SÁEZ, E.²; GÓMEZ, J.¹

¹Centro de Investigación y Formación Agraria de La Mojonera. Autovía del Mediterráneo, Sal. 420. 04745. La Mojonera. Almería. micocifa@arrakis.es

²Laboratorio de Sanidad Vegetal. El Ejido. Almería.

Para obtener una colección de aislados masales de *O. radicale* se prospectaron invernaderos cultivados de cucurbitáceas. Se obtuvieron un total 33 aislados de plantas de melón, pepino, sandía y calabacín.

La obtención de aislados monoesporangiales de *O. radicale* se realizó con una técnica basada en la descrita por Lin y col.(1970) para *O. brassicae*. Después de liberar, cuantificar e inocular con zoosporas del aislado masal del hongo sobre nuevas plantas, las raíces de éstas, a los 3-4 días de la inoculación, fueron trituradas y filtradas, el filtrado fue dilacerado en placas de Petri con medio agar-agua. Una vez localizado, con la ayuda de un microscopio, un esporangio maduro y aislado, éste se inoculó en una nueva planta. Por este procedimiento se obtuvieron un total de 19 aislados. De los 10 obtenidos de diferentes explotaciones, cuatro fueron procedentes de melón, tres de pepino, dos de sandía y uno de calabacín.

Para caracterizar fenotípicamente los aislados obtenidos se plantearon tres experimentos de inoculación, dos de ellos sobre plantas pertenecientes a la familia Cucurbitáceas y otro sobre las especies vegetales siguientes: *Beta vulgaris*, *Brassica oleracea*, *Capsicum annum*, *Cucumis sativus* y *C. melo*, *Cucurbita ficifolia*, *C. máxima* y *C. pepo*, *Citrullus lannatus*, *Festuca pratensis*, *Lactuca sativa*, *Lagenaria siceraria*, *Lepidium sativum*, *Lycopersicon esculentum*, *Nicotiana clevelandii*, *Phaseolus vulgaris*, *Petroselinum crispum* y *P. hortense*, *Phleum pratense*, *Secale cereale*, *Solanum melongena* y *S. villosum*, *Spinacea oleracea*, *Trifolium incarnatum* y *T. pratense*, *Triticum aestivum*, *Vicia faba*, *Vigna sinensis* y *Zinnia elegans*.

Seis aislados en el primer experimento y siete en el segundo se inocularon con 10⁶ zoosporas sobre plantas de melón, pepino y sandía mantenidas con temperaturas de 24°C día y 18°C noche, durante 15 días. Después de este período, tras la toma de muestras para la detección de MNSV y estimar y ajustar de nuevo para conseguir la cantidad establecida, se realizó una nueva inoculación. Este proceso se realizó en 2 ocasiones en el primer experimento y en 4 en el segundo. Los aislados de *O. radicale* obtenidos de melón se multiplicaron bien en melón, moderadamente bien en sandía y mal en pepino. Por el contrario los obtenidos en pepino se multiplicaron bien en pepino y relativamente mal en sandía y melón.

En el tercer experimento, *O. radicale* solo se detectó en las raíces de las plantas pertenecientes a la familia de las Cucurbitáceas.

INCIDENCIA DE LA HERRAMIENTA Y ÉPOCA DE PODA EN LA AFECCIÓN DE *Sphaeropsis sapinea* (FR) DYKO & SUTTON EN PLANTACIONES DE *Pinus radiata* D. DON. ESTUDIO DE LA DINÁMICA DE ESPORULACIÓN DEL HONGO Y SU RELACIÓN CON FACTORES AMBIENTALES

ITURRITXA, E.; ORTIZ-BARREDO, A.; MURUAMENDIARAZ, A.; ASEGINOLAZA, J.; GONZALEZ DE MURILLO, M.; DE BLAS, B.; HEPPE, E.

NEIKER Instituto Vasco de Investigación y desarrollo Agrario- Nekazal Ikerketa eta Garapenerako Euskal Erakundea. Granja Modelo de Arkaute. Apdo 46. 01080. VITORIA. Gasteiz. Álava

Sphaeropsis sapinea (Fr) Dyko & Sutton (= *Diplodia pinea* (Desm.) Kickx) es uno de los patógenos más comunes en las plantaciones de *Pinus radiata* D. Don en esta comunidad. La enfermedad provocada por este deuteromiceto puede afectar a otras especies del genero *Pinus* siendo también susceptibles especialmente *Pinus nigra* y *Pinus sylvestris* (APS Press) así como otros géneros de coníferas: *Abies*, *Araucaria*, *Chamaecyparis*, *Cupressus*, *Picea*, *Pseudotsuga*, *Thuja*, *Juniperus* y *Cedrus* (Swart et al. 1987).

Entre los factores que contribuyen a agravar la enfermedad se incluyen los asociados a síntomas de estrés y debilidad en los arboles. Como medida de control frente a esta enfermedad se considera que la poda puede ayudar a reducir la dispersión del hongo. En la mayoría de los casos la poda puede mejorar el aspecto de la planta y estimular en cierta medida el vigor de esta pero en contrapartida puede favorecer la entrada del hongo a través de las heridas provocadas con esta práctica.

En este trabajo de investigación se estudia la incidencia que puede tener en este fenómeno de infección por parte del hongo a través de las heridas de poda, la herramienta de poda utilizada y la época en la que se realizan dichas prácticas, para ello se estudia la infección que se produce en dichas heridas, la velocidad de cicatrización y la dinámica de esporulación de dicho hongo en las plantaciones de *Pinus radiata* analizadas.

DESARROLLO SINTOMATOLÓGICO DE LA LEPRAS (*Physoderma leproides*) DE LA REMOLACHA AZUCARERA DE SIEMBRA OTOÑAL

JORDÁN-RAMÍREZ, R.¹; JIMÉNEZ-DÍAZ, R.M.^{1,2}; NAVAS-CORTÉS, J.A.¹

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

²Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos y Montes, Universidad de Córdoba, Apdo. 3048, 14080 Córdoba. E-mail: jnavas@cica.es

La siembra otoñal de la remolacha azucarera se practica en ciertas áreas de la cuenca mediterránea y en particular el suroeste de España. El cultivo desarrolla su ciclo vegetativo durante el invierno y primavera, lo que unido a la creciente expansión del regadío conduce a condiciones favorables para el desarrollo de la Lepra, que en la actualidad es considerada una enfermedad re-emergente en el sur de España. Sin embargo, las investigaciones sobre la ecología de *Physoderma leproides* y epidemiología de la Lepra son escasas o nulas. El objetivo de este trabajo ha sido caracterizar la fenología del desarrollo sintomatológico de esta enfermedad.

Durante las campañas agrícolas 2001/02 y 2002/03 se han llevado a cabo investigaciones en condiciones de campo en parcelas experimentales con diferentes variedades comerciales de remolacha en localidades de las zonas centro y sur de la provincia de Sevilla. Se realizaron observaciones sobre el desarrollo de síntomas en los diferentes órganos de plantas individualizadas, a intervalos de 2 a 4 semanas durante todo el ciclo del cultivo. La infección por el patógeno y primeros síntomas de Lepra ocurren en las hojas inferiores de la planta al final del invierno. Estos síntomas consisten en tumores de diversa forma y tamaño que pueden coalescer provocando el colapso de las hojas y ocasionalmente la muerte de la planta. Posteriormente, las hojas necróticas caen, apareciendo en primavera tumores en la corona radical de las plantas cuyo tamaño aumenta progresivamente durante primavera y comienzo de verano. Sin embargo, las plantas con infección foliar en invierno no resultan necesariamente en plantas afectadas en primavera. Así, para el conjunto de variedades y localidades en el estudio, entre 36 y 51% de las plantas desarrollaron síntomas en hoja pero no desarrollan tumor en corona; entre el 8 y 38% de las plantas asintomáticas en invierno presentaron tumores en corona, y entre el 26 y 41% de las plantas estudiadas mostraron síntomas de Lepra durante todo el ciclo del cultivo. Además, entre el 21 y 34% del total de plantas sintomáticas murieron durante el cultivo. Nuestros resultados sugieren que las infecciones foliares por *P. leproides* en invierno pueden indicar riesgo de infecciones en la corona de la raíz en primavera. Por ello, la aplicación de fungicidas que protejan o erradiquen la infección en invierno puede contribuir a un control eficiente de la enfermedad.

Investigación subvencionada por el proyecto AGL2002-01418 y apoyo técnico de AIMCRA

DIVERSIDAD GENÉTICA DE *Erysiphe necator* DETERMINADA POR MARCADORES AFLPS

NÚÑEZ, Y.; GALLEGO, J.; PONZ, F.; RAPOSO, R.
INIA, C^a Coruña km 7,5, 28040 Madrid

Erysiphe necator (sinónimo *Uncinula necator*), causante del Oidio de la vid, inverna como micelio en las yemas durmientes o como ascosporas en cleistotecas en la madera de la planta. Cada una de estas dos formas invernantes da lugar a su respectiva fuente de inóculo primario. Las yemas infectadas cubren de micelio blanco y denso el brote emergente a medida que éste se desarrolla, dando lugar al síntoma conocido como “brote bandera”. Las ascosporas producen lesiones aisladas y dispersas en las hojas más cercanas al tronco. La importancia relativa de cada una de estas fuentes de inóculo varía con la región y condiciones climáticas después de la brotación de la planta.

El estudio de la diversidad genética de *E. necator* ha dado lugar a resultados contradictorios. Algunos autores sostienen la existencia de dos subpoblaciones genéticamente distintas atendiendo a la fuente de inóculo primario de la que provienen, es decir, de brotes bandera o de lesiones foliares. El objetivo de este trabajo es estudiar la variación genética de la población de *E. necator* en España, para conocer la estructura poblacional.

Se ha hecho un muestreo en La Rioja, Navarra y Madrid de los dos tipos de lesiones, brotes bandera y lesiones en hojas, originadas a partir de su respectiva fuente de inóculo primario. En este trabajo se presenta el análisis genético de la población de *Erysiphe necator* determinado por AFLPs. Se han usado 63 marcadores para estimar la similitud genética y analizar la varianza molecular (AMOVA). Los resultados muestran un grado de diferenciación genética debido al origen del inóculo primario.

VIRULENCIA DE AISLADOS DE *Verticillium dahliae* EN EUROPA EN RELACIÓN CON SU DIVERSIDAD MOLECULAR, GEOGRÁFICA Y DE HUÉSPED DE ORIGEN

RODRÍGUEZ-JURADO, D.¹; JIMÉNEZ-MARTÍNEZ, R.¹; MERCADO-BLANCO, J.²; JIMÉNEZ-DÍAZ, R.M.^{1,2}

¹ ETSIAM, Universidad de Córdoba, Apdo. 3048, 14080 Córdoba. ag1jdir@uco.es

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

Verticillium dahliae infecta numerosos huéspedes anuales y perennes de interés agrícola y ornamental en Europa, pero se desconoce su diversidad en virulencia según las áreas geográficas y huésped de origen de los aislados del hongo. En los últimos años, la conveniencia de dicha información ha llevado a estudiar si la diversidad molecular en las poblaciones de *V. dahliae* en Europa puede ser correlacionada con la virulencia de los aislados, de manera que pueda servir como marcador de ésta en investigaciones sobre la epidemiología de las Verticilosis. Por ello, los objetivos de este trabajo fueron determinar si la identificación de grupos moleculares en *V. dahliae* en Europa se corresponde con agrupaciones subespecíficas de virulencia, y si el área geográfica y el huésped de origen en Europa están correlacionados con estas agrupaciones. La virulencia de un total de 38 aislados de *V. dahliae* del Norte (21) y Sur (17) de Europa, originarios de suelo (4), huéspedes anuales (26) y huéspedes perennes (8), y representativos de cuatro grupos moleculares, se determinó en plantas de olivo 'Picual' y lino 'Linda' que en estudios anteriores mostraron ser huéspedes idóneos para diferenciar niveles de virulencia (cantidad de enfermedad causada en un genotipo huésped) en *V. dahliae* en condiciones controladas. En este estudio, las relaciones entre virulencia, grupo molecular, procedencia geográfica y huésped de origen variaron con la especie huésped utilizada en los bioensayos y la naturaleza del plantón de olivo. La virulencia de los aislados sobre olivos micropropagados estuvo correlacionada significativamente con los cuatro grupos moleculares pero dicha correlación no se mantuvo sobre plantones multiplicados por estaquillado semileñoso ni sobre lino. La virulencia sobre plantones de olivo micropropagados y multiplicados por estaquillado semileñoso también estuvo correlacionada con la procedencia geográfica de los aislados, pero tal correlación fue menor sobre lino. Los aislados del Sur de Europa fueron significativamente más virulentos que los aislados del Norte de Europa. La reacción causada por los aislados de huéspedes perennes sobre plantones de olivo micropropagados fue significativamente más severa que la causada por los aislados de huéspedes anuales, pero no difirió sobre los multiplicados por estaquillado semileñoso. La virulencia de los aislados sobre lino no varió en relación al huésped de origen, pero los aislados de huéspedes anuales fueron más virulentos que los de huéspedes leñosos. Subvencionado por el Proyecto QLRT-1999-1523

RESULTADOS PRELIMINARES SOBRE LA VERTICILOSIS DEL OLIVO EN LA PROVINCIA DE GRANADA

RODRÍGUEZ, E.; GARCÍA-GARRIDO, J.M.; OCAMPO, J.A.; CAMPOS, M.

Estación Experimental del Zaidín (CSIC). C/ Profesor Albareda, 1.18008. Granada. E-mail: estefania.rodriguez@eez.csic.es

La Verticilosis del olivo es una enfermedad de origen fúngico producida por *Verticillium dahliae* que se encuentra bien establecida en olivares de las provincias de Córdoba, Jaén y Sevilla. Debido a su etiología, esta enfermedad se encuentra entre las más difíciles de combatir. Una de las particularidades del patógeno es la presencia de dos patotipos diferentes: el patotipo no defoliante (ND), con distribución mayoritaria en Andalucía y de sintomatología moderada; y el patotipo defoliante (D), de distribución más restringida, extremadamente virulento y por lo tanto más difícil de combatir. Estudios recientes muestran un avance de la enfermedad, incluyendo al patotipo defoliante, a nuevas zonas como es el caso de la provincia de Granada, poniendo de manifiesto la grave amenaza que supone esta enfermedad para el olivar andaluz. En este trabajo presentamos los resultados preliminares del estudio de la Verticilosis del olivo en la provincia de Granada. El objetivo es determinar la magnitud real del problema mediante la realización de una prospección representativa del olivar granadino junto con fichas de campo. Esta metodología nos permite determinar incidencia, causa, dispersión, distribución y tipificación de los olivares afectados.

Hasta ahora se han prospectado un total de 397 plantaciones de olivos que se corresponden con un total de 2179.97 hectáreas. El 31.7 % de las plantaciones presentaron sintomatología de Verticilosis. De ellas un 18% dio resultado negativo para *V. dahliae*, y los síntomas estaban causados por otros agentes. El 14 % restante resultó positivo. Dentro de estas plantaciones no toda su superficie resultó estar infectada por el hongo, sino que el grado de infección varió desde el 80% hasta un mínimo del 5 %. El índice medio de fue del 11%. En total, de 226.343 olivos prospectados, 958 resultaron positivos (0.5 % de los olivos muestreados). El 24 % de los aislados de *V. dahliae*, se correspondieron con el patotipo no defoliante, un 4% con el patotipo defoliante, mientras que 65 % restante no están catalogados y aun se están procesando. Los patotipos D presentes se encuentran repartidos aleatoriamente entre los diferentes sitios de muestreo lo cual indica focos distantes del patotipo agresivo.

DESARROLLO DE UN MÉTODO EFICAZ PARA LA CUANTIFICACIÓN DE *Phytophthora cinnamomi* EN MUESTRAS DE SUELO

RODRÍGUEZ, M.; SÁNCHEZ, M.E.; TRAPERO, A.

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

Algunas de las podredumbres radicales causadas por *Phytophthora* spp. no se diagnostican como tales debido al uso de métodos de aislamiento inapropiados. Este parece ser el caso de la podredumbre radical de los *Quercus* causada por *P. cinnamomi*, enfermedad en la que a menudo, la asociación entre la aparición de síntomas y la presencia del hongo en el suelo resulta muy vaga o inexistente. La detección y cuantificación de propágulos viables de *Phytophthora* spp. de suelo es difícil, debido a la presencia de antagonistas y de microflora secundaria asociada, de crecimiento más rápido en medios de cultivo.

En este trabajo se ha desarrollado un método sencillo y eficaz para la detección y cuantificación de *P. cinnamomi*, mediante la extensión de suspensiones de suelo, previamente homogeneizado y seco, en el medio de cultivo selectivo PARPH modificado, sustituyendo el antibiótico Pimaricina por Nistatina. El método de extensión en placa (EP) se ha comparado con dos de los métodos más eficaces para la cuantificación de *Phytophthora* spp.: el método del punto final de dilución de suelo (SDEP) y el método del número más probable (MPN), que combinan el uso de cebos biológicos y medios selectivos. Para ambos métodos se utilizaron como cebos biológicos trozos de filodio de eucalipto, que se sembraron en el mismo medio selectivo modificado. Tanto en muestras de suelo artificialmente infestado como en suelo natural, el método desarrollado ha resultado muy eficaz en la cuantificación de propágulos viables del hongo, obteniéndose valores de unidades formadoras de colonia (ufc) por g de suelo entre 10 y 25 veces superiores a los obtenidos por los métodos más complicados SDEP y MPN. Así, mediante el método EP hemos determinado que en el suelo de dehesas afectadas de la podredumbre radical de los *Quercus*, la densidad de propágulos de *P. cinnamomi* varía entre 30 y 130 ufc/g, valores similares e incluso superiores a los de cualquier otro patógeno de suelo no pitiáceo. Además, la utilización de muestras de suelo seco y almacenado a 4°C, indica que los propágulos detectados y cuantificados corresponden a las estructuras de resistencia del hongo, las clamidosporas.

DESARROLLO DE LAS PSEUDOTECAS DE *Mycosphaerella maculiformis* EN HOJAS DE CASTAÑO

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

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

De las enfermedades presentes en los castaños de Andalucía la mancha foliar o Socarrina es la que se encuentra más ampliamente distribuida, causando esporádicamente severas defoliaciones.

En todas las muestras de hojas afectadas de la mancha foliar se observaron conidiomas y conidias pertenecientes a la especie *Mycosphaerella maculiformis*, identificándose tanto el teleomorfo (*M. maculiformis*) como los dos estados anamórficos (*Cylindrosporium castaneicolum* y *Phyllosticta maculiformis*). Este último podría corresponderse con el estado espermático del hongo.

Para caracterizar el ciclo de patogénesis se muestrearon cada 14 días hojas infectadas caídas al suelo en la Sierra de Córdoba, desde febrero a junio de 2002. En cada muestreo se tomaron al azar 40 pseudotecas formadas en las hojas y se determinó microscópicamente su estado de desarrollo, de acuerdo a una escala 1-7, establecida con anterioridad. En cada muestreo se estableció un estado medio de desarrollo de las pseudotecas, denominado Índice de Madurez (IM). Se pudo determinar que el desarrollo se inició en febrero, produciéndose una rápida evolución durante el mes de marzo. En este mes se pasó de un IM 2 a 5, diferenciándose las ascas y ascosporas. La descarga de las ascosporas se produjo durante el mes de abril.

La evaluación de la influencia de los factores ambientales en el desarrollo de las pseudotecas de *M. maculiformis* se realizó muestreando hojas infectadas procedentes de Huelva que se colocaron en bolsas de nylon en condiciones naturales en las provincias de Almería, Córdoba, Huelva y Málaga. De febrero a julio de 2003, siguiendo la misma metodología, se determinó la evolución temporal del IM en cada una de las provincias. Se obtuvieron curvas similares de desarrollo del IM en todas las zonas, aunque desplazadas en el tiempo. Málaga es la provincia en la que el desarrollo de las pseudotecas es más temprano, produciéndose la descarga de las ascosporas a lo largo del mes de abril en todas las zonas, excepto en Almería. En esta provincia, los castaños estudiados se encuentran en altitudes superiores, por lo que el desarrollo de los diferentes estados fue más tardío, produciéndose la descarga de ascosporas en mayo. La temperatura y la lluvia son las variables climáticas que mejor se correlacionan con el desarrollo de las pseudotecas.

EFFECTO DE LA DENSIDAD DE PLANTACIÓN Y DE LA ALTURA DEL FRUTO EN EL ÁRBOL SOBRE LA INCIDENCIA DE LA ANTRACNOSIS DEL OLIVO

SANCHEZ, M.I.¹; PASTOR, M.²; TRAPERO, A.¹

¹Dpto. Agronomía, ETSIAM, Universidad de Córdoba.

²Dpto. de Olivicultura y Arboricultura Frutal, CIFA de Córdoba. Avda. Menéndez Pidal s/n, 14071 Córdoba.

La Antracnosis del olivo, causada por *Colletotrichum* spp., origina algunos años graves ataques que pueden alcanzar el 100% de las aceitunas podridas o momificadas (aceitunas jabonosas). La severidad de las epidemias depende principalmente de las condiciones ambientales durante la maduración de la aceituna. En la última década la modernización de la olivicultura en Andalucía ha llevado a plantaciones con densidades crecientes, llegando incluso hasta los 2000 olivos/ha. Ello provoca unas condiciones de crecimiento muy diferentes a las habituales con un incremento del sombreado y de la humectación foliar. En este trabajo se ha estudiado la incidencia de *Colletotrichum* spp. en frutos en una parcela experimental de la variedad 'Arbequina' (moderadamente susceptible) situada en el CIFA de Córdoba. La parcela consta de 4 marcos de plantación (1.5x3.5, 3.5x3.5, 3.5x7.0 y 7.0x7.0 m) dispuestos en 4 bloques al azar. En la plantación más densa, además de la muestra de aceitunas recogidas por la cosechadora, se tomaron manualmente dos muestras a 1.5 y 3.0 m de altura. En cada muestra se determinó la incidencia de aceitunas afectadas (lesiones visibles) y las contaminadas (infecciones latentes o infestadas), incubando estas últimas en cámara húmeda a 22°C.

La densidad de plantación influyó notablemente en la incidencia de aceitunas afectadas, variando desde 12.2% en la menos densa hasta 95.2% en la mayor densidad. Asimismo, las zonas más bajas de la copa presentaron mayor incidencia (47.6%) que la parte alta (26.8%). Por lo que respecta a las aceitunas contaminadas, los resultados fueron contrarios a los anteriores, debido al efecto del diferente tamaño muestral, aunque la proporción relativa de aceitunas contaminadas fue también superior en la densidad alta. En cualquier caso, la incidencia total de aceitunas con *Colletotrichum* (afectadas o contaminadas) fue superior en las parcelas más densas. El índice de acidez del aceite obtenido estuvo correlacionado con la incidencia de aceitunas afectadas, superando en todos los casos el valor de 1 (límite máximo para el aceite de oliva virgen extra). Estos resultados advierten sobre la extrema peligrosidad de esta enfermedad en las nuevas plantaciones superdensas.

SEGUIMIENTO DE LOS PATÓGENOS FÚNGICOS DEL MATERIAL VEGETAL DURANTE EL PROCESO PRODUCTIVO EN VIVEROS DE VID

GIMÉNEZ-JAIME, A.; CRESPO, A.; ARMENGOL, J.; GARCÍA-JIMÉNEZ, J.

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

En los últimos años se viene detectando un incremento de los problemas fúngicos de vides jóvenes en distintos países. Ante la posible implicación del sistema productivo de las plantas en estas infecciones, en este trabajo se presenta el seguimiento de seis viveros de vid para detectar los momentos en que se puede dar la infección del material vegetal.

Se realizó el seguimiento de 21 partidas en seis fases del proceso productivo:

1) Durante la conservación en cámara tras el corte de las estacas de la cepa madre, 2) Tras la hidratación de las estacas en balsa previa al injerto, 3) Tras el injerto, 4) Tras la formación del callo en lecho de turba y cámara, 5) Tras la plantación y después de 3-4 meses en campo y 6) Tras 6 meses en campo.

Las partidas se seleccionaron de forma que fueran representativas de los distintos patrones y variedades comercializados por cada vivero. Se realizaron aislamientos de cada una de las muestras en medio Agar Extracto de Malta + Sulfato de Estreptomina, posterior repicado de las colonias a Agar Patata Dextrosa e identificación de las mismas.

En la mayoría de las partidas se detectó infección en al menos una de las fases estudiadas y estuvo causada por alguno de estos hongos: *Cylindrocarpon* spp., *Phaeomoniella chlamydospora*, *Phaeoacremonium aleophilum*, *Botryosphaeria obtusa* y *Fusicoccum* spp. El porcentaje de infección fue en general bajo durante las primeras etapas productivas y aumentó considerablemente en las dos últimas, es decir, a partir de la plantación en campo. Los hongos *P. chlamydospora* y *P. aleophilum*, principales responsables de la enfermedad de Petri, se detectaron únicamente en estas dos últimas fases.

El presente trabajo se ha desarrollado en el marco del Proyecto de Investigación AGL2003-02450 financiado por el McyT.

DESARROLLO DE UN NUEVO SISTEMA PARA EL ANÁLISIS DE LA TRANSMISIÓN POR PULGONES DE POTYVIRUS

GOYTIA, E.; MARTÍNEZ, B.; FERNÁNDEZ, L.; RUIZ-FERRER, V.; VARGAS, M.; LÓPEZ-ABELLA, D.; LÓPEZ-MOYA, J.J.

Departamento de Biología de Plantas . Centro de Investigaciones Biológicas, CSIC
Ramiro de Maeztu, 9; 28040 Madrid. E-mail: elisa@cib.csic.es

Los pulgones son los vectores más importantes de virus vegetales, incluyendo el género *Potyvirus* (familia *Potyviridae*). La transmisión de potyvirus por pulgones es un mecanismo complejo en el que intervienen activamente al menos dos proteínas de origen viral: el factor de transmisión HC-Pro y la proteína de la cápsida CP. Hasta la fecha se han conseguido importantes avances en la determinación del funcionamiento de dichas proteínas así como de los dominios funcionales que intervienen en el proceso de transmisión.

La proteína HC-Pro es una proteína multifuncional con actividades no sólo en transmisión sino también en el procesamiento de la poliproteína viral, el movimiento del virus en la planta, o la supresión del silenciamiento génico post-transcripcional (PTGS), entre otras. Este hecho dificulta en muchas ocasiones la interpretación de los resultados obtenidos en estudios de transmisión basados en mutagénesis.

El presente trabajo utiliza como modelo el virus de la Sharka (PPV), un patógeno de gran importancia dentro de los Potyvirus, para desarrollar un sistema que permita la expresión de la proteína HC-Pro fuera del contexto de la infección viral mediante expresión transitoria usando *Agrobacterium tumefaciens*. Plantas de *Nicotiana benthamiana* agroinfiltradas con una construcción derivada del plásmido pCAMBIA 2300 que contenía un fragmento de 2919 nucleótidos que contiene la secuencia desde el extremo 5' de PPV expresaron la proteína HC-Pro de PPV a niveles equiparables a los presentes en una infección viral. Dichas plantas se utilizaron en experimentos de transmisión secuencial que demostraron la funcionalidad para transmisión de la proteína así expresada. También se han utilizado variantes virales, incluyendo una quimera que incorpora el HC-Pro del virus Y de la patata (PVY) en sustitución de la proteína equivalente de PPV. Los resultados obtenidos abren una nueva línea para la búsqueda de mutantes en dominios o regiones implicadas en el proceso que puedan actuar como moléculas interferentes en la transmisión.

VARIACIÓN GENÉTICA DE UNA POBLACIÓN CLONAL DE CTV

MOYA, P.; AMBRÓS, S.; GUERRI, J.; MORENO, P.

Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias. Ctra Moncada a Náquera, Km.5 CP 46113. Valencia. E-mail: pmoya@ivia.es

Los aislados del virus de la tristeza de los cítricos (*Citrus tristeza virus*, CTV), género *Closterovirus*, familia *Closteroviridae*, presentan con frecuencia una población heterogénea de variantes de secuencia que probablemente resulta de: i) la acumulación de mutaciones en el tiempo, ii) inoculaciones múltiples de los árboles en el campo por pulgones o sobreinjerto, con aislados de secuencias divergentes, y iii) distintos sucesos de recombinación. Sin embargo, se desconoce la contribución de cada uno de estos factores, y en particular, la rapidez con que pueden acumularse las mutaciones.

Recientemente se construyó un clon de cDNA del genoma completo del aislado de CTV T36, cuyos transcritos fueron infecciosos en protoplastos de *N. benthamiana* y produjeron viriones. La inoculación mecánica de éstos en lima Mexicana dio lugar a una población genéticamente homogénea (CTV-947), que puede ser utilizada para estudiar la variación genética de CTV en el tiempo o debido a cambios de huésped. Con este objetivo, a partir de la lima 947, se propagaron cuatro yemas sobre lima Mexicana y se realizaron cuatro transmisiones sucesivas a intervalos de 6 meses, por injerto a 4 plantas de cada una de las especies: lima Mexicana, naranjo dulce, pomelo y naranjo amargo. De cada planta, se sintetizó mediante RT-PCR cDNA de los genes p20 y p23 y se analizó el polimorfismo conformacional de DNA monocatenario (SSCP). Los cDNAs con perfil de SSCP diferente y algunos con el perfil predominante se clonaron, y al menos 20 clones de cada cDNA seleccionado se analizaron de nuevo mediante SSCP. Aquellos clones que diferían por su perfil y algunos con el perfil predominante se secuenciaron, y las secuencias obtenidas se utilizaron para estimar la variación genética. Se han detectado nuevas variantes de secuencia de ambos genes en la segunda transmisión por injerto, especialmente en plantas de naranjo amargo, si bien estas variantes no siempre se detectaron en sucesivas transmisiones. La transmisión continuada en naranjo amargo dio lugar a la desaparición progresiva del virus.

ANÁLISIS DE LA VARIABILIDAD GENÉTICA DE AISLADOS DE BaMMV DE DISTINTOS ORÍGENES GEOGRÁFICOS

RUBIES, C.¹; ACHÓN, M.A.²; RATTI, C.¹; MASCANZONI, E.¹; ANDRÉS, R.M.¹

¹DiSTA, Via Filippo Re 8, 40126 - Bologna, Italia. E-mail:crubies@agrsci.unibo.it

² Dep. Producció Vegetal i Ciència Forestal – ETSEA, C. Alcalde Rovira i Roure 191, 25198-Lleida, España.

El virus del mosaico suave de la cebada (*Barley mild mosaic virus*, BaMMV) pertenece al género *Bymovirus* (fam. *Potyviridae*) e induce una de las enfermedades virales más difundidas en los cultivos de cebada en Europa y Asia. La persistencia del virus en la zoósporas del vector (*Polymyxa graminis*) durante periodos superiores a 15 años reducen las medidas de control de este virus al cultivo de genotipos resistentes. Por ello los estudios de variabilidad genética de las poblaciones de este virus son indispensables. Se ha iniciado el estudio de la variabilidad de aislados de BaMMV procedentes de Italia y España mediante SSCP (*Single Strain Conformation Polymorphism*) y secuenciación. Los resultados obtenidos indican una relativa heterogeneidad de los aislados estudiados. Uno de los datos más relevantes obtenidos es homología (98,5%) observada entre un aislado español y un aislado francés; este último aislado es capaz de romper la resistencia que confiere el locus *rym5*, locus que presentan la mayoría de las variedades de cebada que se cultivan.

ANÁLISIS DE LA DIVERSIDAD GENÉTICA EN AISLADOS DE *Xylella fastidiosa* PROCEDENTES DE CAFETO Y NARANJO DULCE DE BRASIL

LANDA, B.B.^{1,2}; LOPES, J.R.S.³; ZAMBOLIM, L.⁴; JIMÉNEZ-DÍAZ, R.M.^{1,2}

¹ETSIAM, Universidad de Córdoba, Apdo. 3048, 14080 Córdoba.

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

³ESALQ-Universidad de São Paulo, Piracicaba, Sao Paulo, Brasil.

⁴Universidad Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, Brasil.

Xylella fastidiosa es una bacteria gram-negativa que coloniza el xilema de sus huéspedes, es transmitida por insectos de la familia Cicadellidae, y es patogénica en cultivos de gran importancia económica como cafeto, ciruelo, melocotonero, naranjo y viñedo. En Brasil, *X. fastidiosa* es el agente causal de la Clorosis Variegada del naranjo dulce (*Citrus sinensis*) (CVC) y de la quemazón de las hojas o “crespera” del cafeto (*Coffea arabica*) (CLS), que son cultivos estratégicos en este país. Cafeto y naranjo dulce concurren en varias regiones de Brasil, y a menudo se encuentran plantaciones de cafeto afectadas por CLS adyacentes a plantaciones de naranjo con CVC. Ello ha sugerido que ambos cultivos pueden actuar como fuentes de inóculo cruzadas y la bacteria ser transmitida por especies de vectores comunes a aquéllos. El objetivo de este trabajo fue analizar la diversidad genética en una colección de 40 aislados de *X. fastidiosa* obtenidas de árboles de cafeto y naranjo dulce con síntomas de CLS o CVC, respectivamente, en las localidades de Ervália y São Gotardo (Minas Gerais) y São Carlos y Bebedouro (São Paulo). Los aislados de *X. fastidiosa* se obtuvieron en medio PW a partir de savia de peciolo de hojas con síntomas, y la identidad específica se confirmó mediante PCR utilizando los iniciadores 272-1-int/272-2-int. La diversidad genética de los aislados de *X. fastidiosa* se determinó mediante PCR basada en secuencias repetitivas (rep-PCR) utilizando los iniciadores BOXA1R (BOX-PCR) y ERIC1/ERIC2 (ERIC-PCR), y realizando al menos dos reacciones PCR independientes por aislado. Los perfiles de amplificación obtenidos se digitalizaron, normalizaron, y analizaron con el paquete informático Bionumerics (Applied Maths, Belgium). La similitud de los amplicones se analizó mediante las curvas densitométricas aplicando el coeficiente de similitud de Pearson y el método UPGMA, y se establecieron grupos genéticos en base a la similitud obtenida entre dos repeticiones del mismo aislado. Los resultados indican que los aislados de *X. fastidiosa* procedentes de cafeto difieren de los aislados de naranjo, pudiéndose identificar dos grupos con un nivel de similitud < 70%. Los aislados procedentes del mismo huésped presentan gran uniformidad genética, especialmente en aislados de naranjo, aún proviniendo de plantas y localidades distintas.

Investigación financiada por el Proyecto ICA4-CT-2001-10005

EPIDEMIOLOGÍA DE *Sphaeropsis sapinea* (FR) DYKO & SUTTON EN EL PAÍS VASCO. MÉTODOS DE CONTROL EN *Pinus radiata* D. DON

ITURRITXA, E.; ORTIZ-BARREDO, A.; MURUAMENDIARAZ, A.; ASEGINOLAZA, J.; GONZALEZ DE MURILLO, M.; DE BLAS, B.; HEPPE, E.

NEIKER Instituto Vasco de Investigación y desarrollo Agrario-Nekazal Ikerketa eta Garapenerako Euskal Erakundea. Granja Modelo de Arkaute. Apdo 46 01080 VITORIA Gasteiz.Álava

Pinus radiata D. Don es un elemento significativo del paisaje en el Norte de España, en comunidades como Galicia, Asturias y País Vasco recubre un área total de 243.529 Ha, un 60 % de las cuales corresponden al País Vasco.

Con el objetivo de conocer la situación de las plantaciones de *Pinus radiata* D. Don con relación al hongo patógeno *Sphaeropsis sapinea* (Fr) Dyko & Sutton, los morfotipos existentes de esta especie y establecer estrategias de control se ha llevado a cabo un estudio de este hongo en plantaciones y viveros de pino Monterrey durante el pasado año. Existen evidencias de que la infección esta asociada a heridas causadas por el impacto de granizo en árboles en plantaciones y de que también se produce en tejido intacto en vivero.

Se estudian diversos metodos de control, funguicidas, organismos antagonistas y material resistente. Se han detectado diferencias significativas entre tratamientos funguicidas y en los niveles de resistencia entre plantas seleccionadas a partir de parentales sanos en áreas fuertemente afectadas en comparación a plantas sin selección previa para este carácter.

DINÁMICA Y DIVERSIDAD DE POBLACIONES VIRALES EN CIRUELOS TRANSGÉNICOS RESISTENTES A *Plum pox virus*

CAPOTE, N.; GORRIS, M.T.; MARTÍNEZ, M.C.; CAMBRA, M.

Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA). Carretera Moncada-Náquera Km 5. 46113 Moncada, Valencia. ncapote@ivia.es

El virus de la sharka, *Plum pox virus* (PPV), es uno de los virus más devastadores de frutales de hueso. Desde su detección en 1917 en Bulgaria se ha extendido por prácticamente toda Europa, la cuenca del Mediterráneo y América (Chile, USA y Canadá). El virus se transmite por pulgones de manera no persistente y por propagación vegetativa, siendo el tráfico incontrolado de material vegetal la principal causa de la dispersión del virus a larga distancia. Existen dos grupos principales de sharka que difieren en sus propiedades biológicas y epidemiológicas: el tipo Dideron o PPV-D que infecta a albaricoquero y ciruelo y rara vez a melocotonero, y el tipo PPV-M o Marcus, que presenta síntomas más agresivos en todos los huéspedes y se dispersa fácilmente en melocotonero. En un esfuerzo por conseguir variedades resistentes a PPV, se obtuvieron cinco líneas transgénicas de ciruelo europeo (*Prunus domestica*) que portaban el gen de la proteína de la cápsida (CP) de PPV. La línea C5 ha demostrado ser altamente resistente a la infección natural por PPV, permaneciendo libre de virus en zonas de alta incidencia de infección natural, a pesar de estar injertada sobre el patrón Mariana (*P. mariana*) altamente sensible a la infección por el virus. El mecanismo por el cual esta línea transgénica es resistente a PPV es un silenciamiento post-transcripcional, en el que posiblemente intervienen siRNAs (pequeños ARNs de interferencia). Para determinar si la infección de otros virus podía romper el mecanismo de resistencia natural a PPV, en mayo de 2003 se inoculaban ciruelos transgénicos C5 mediante injerto con mezclas variadas de PPV, *Prunus necrotic ring spot virus* (PNRSV) y *Apple chlorotic leaf spot virus* (ACLSV), virus estos dos últimos con potentes supresores del silenciamiento post-transcripcional. Los análisis en mayo del 2004 indicaron que el inóculo mediante injerto con PPV es capaz de romper el mecanismo de resistencia de estos ciruelos, aunque no está claro que la presencia de los otros dos virus intervenga en la supresión del silenciamiento. Para valorar el impacto ambiental que la liberación al campo de estos ciruelos transgénicos resistentes a PPV tiene sobre la dinámica y variabilidad de las poblaciones virales, se analizaron 14 aislados procedentes de ciruelos transgénicos y no transgénicos. Un análisis serológico de los mismos reveló la existencia de 3 serogrupos: el inicialmente introducido como inóculo en la finca, uno procedente de fincas de los alrededores y el tercero introducido por injerto junto con los otros dos virus. El análisis de la secuencia nucleotídica de la región más variable del genoma de PPV (3'NIB-5'CP) reveló la existencia de 7 haplotipos en la población de PPV. No se detectaron diferencias de variabilidad entre aislados procedentes de ciruelos transgénicos y no transgénicos.

CAMBIOS EN LA ESTRUCTURA GENÉTICA DE LAS POBLACIONES DE BEGOMOVIRUS QUE INFECTAN TOMATE EN ESPAÑA ASOCIADOS CON LA INCORPORACIÓN DE GENES DE RESISTENCIA

GARCÍA-ANDRÉS, S.; GARCÍA-CANO, E.; MORIONES, E.

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

La enfermedad del rizado amarillo del tomate (TYLCD) causa cuantiosas pérdidas económicas en los cultivos de tomate del sur y sudeste peninsular español desde 1992. Los principales causantes de las infecciones son aislados de las especies de *Tomato yellow leaf curl Sardinia virus* (TYLCSV) y *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV), ambas pertenecientes al género *Begomovirus* de la familia *Geminiviridae*. Con el fin de paliar los daños económicos se han introducido en España variedades comerciales de tomate resistentes a TYLCD, las cuales, limitan la acumulación viral y no desarrollan síntomas de la enfermedad en condiciones normales de infección. En este trabajo se ha estudiado la estructura de las poblaciones de los virus asociados con TYLCD durante un periodo de 5 años en cultivos comerciales de tomate en la región de Murcia, donde se ha realizado una introducción progresiva de las variedades resistentes en los últimos años. Las muestras, recogidas al azar, se analizaron por hibridación molecular con sondas específicas de TYLCV o TYLCSV. Los resultados mostraron que se estaba produciendo en esta región un desplazamiento del TYLCSV por TYLCV y que éste podía estar asociado con un comportamiento diferencial de las variedades resistentes frente a estos virus. Hemos analizado, por tanto, la posible influencia del uso de variedades resistentes en este desplazamiento. Para ello, se ha estudiado en condiciones experimentales mediante agroinoculación el comportamiento de clones infectivos de TYLCSV y TYLCV en distintas variedades comerciales de tomate susceptibles y resistentes. Se han analizado también el comportamiento de ambos virus en líneas *quasi*-isogénicas de tomate susceptible (sin gen *Ty-1*) y resistente (con el gen *Ty-1* en heterocigosis). Se obtuvieron los mismos resultados tanto en las variedades comerciales como en las líneas *quasi*-isogénicas detectándose un comportamiento distinto en las variedades resistentes y las susceptibles. La conclusión ha sido que la incorporación del gen de resistencia *Ty-1* en tomate (muy extendido en las variedades comerciales resistentes) puede estar contribuyendo al desplazamiento observado de TYLCSV por TYLCV.

RELACIÓN ENTRE LA ACTIVIDAD DE LOS ABEJORROS POLINIZADORES Y LA DISPERSIÓN DEL VIRUS DEL MOSAICO DEL PEPINO DULCE (PEPMV)

LACASA, A.; GUERRERO, M.M.; BARCELÓ, N.; MARTÍNEZ, M.A.; HITA, I.; MARTÍNEZ, M.C.; ROS, C.

IMIDA. C/ Mayor s/n, 30.150. La Alberca (Murcia). Alfredo.Lacasa@carm.es

El virus del mosaico del pepino dulce (Pepino mosaic virus, PepMV) se disemina en las plantaciones de tomate por las prácticas culturales (entutorado y destallado), por el contacto entre plantas y por los abejorros (*Bombus spp.*) utilizados para la polinización. La relación de los abejorros con las plantas se concreta en la actividad visitadora de las flores y en los contactos de reposo o aseo sobre diferentes órganos. Se ha tratado de evaluar la capacidad dispersadora del virus en base al tipo y frecuencia de los contactos de los abejorros con las plantas. Para ello, en un invernadero experimental, se inocularon mecánicamente con PepMV 10 plantas (7'75% del total) a finales de octubre, cuando las plantas tenían el primer ramillete cuajado. Doce días después se introdujo una colonia de *B. terrestris*, realizando seguimientos asiduos de la actividad y tomando datos de la frecuencia de las visitas a las flores y del tipo de contacto con los órganos de las plantas. Todas las semanas se contó el número de flores visitadas, el número de los frutos formados y se analizaron todas las plantas para PepMV por el método ELISA, así como una muestra de abejorros capturados en actividad. La progresión de la incidencia de la virosis guardó relación con la actividad visitadora, con los contactos no legales (con órganos distintos a los estambres) y con la proporción de plantas infectadas. A los 8 días de iniciada la actividad polinizadora, el 14% de las plantas estaban infestadas del virus y el 32% a los 20 días, siendo el 98% a los 80 días. A partir de finales de noviembre más del 50% de los abejorros analizados eran portadores del virus. Los máximos incrementos de la enfermedad se produjeron inmediatamente después de periodos de intensa actividad polinizadora (más del 50% de las flores visitadas) o de periodos de altas proporciones de visitas no legales. El contacto con los sépalos, hojas y tallos en plantas infectadas facilitaría la contaminación del abejorro por el virus y la infección de tejidos sanos. Los contactos para la limpieza corporal serían la forma más eficaz de contaminación, ya que el abejorro frota la superficie de la planta con el peine de cerdas de las patas posteriores donde acumulan las partículas de suciedad.

SECUENCIA PARCIAL DEL RNA 3 DE LA RAZA QUE INFECTA TOMATE DEL VIRUS DEL MOTEADO DE LA PARIETARIA (PMoV-T)

GALIPIENSO, L.¹; ARAMBURU, J.¹; HERRANZ, M.C.²; PALLÁS, V.²; SEMINAGO, R.³

¹Departamento de Protección Vegetal, IRTA. Centro de Cabriels (Barcelona)

²Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas (IBMCP) (UPV-CSIC). Valencia

³Unidad de Genómica. Servicios Cientifictécnicos, Universidad de Barcelona

El virus del moteado de la parietaria (PMoV) se detectó en España por primera vez en el año 2001 infectando plantas de tomate. Es un virus de RNA de polaridad positiva que pertenece al género *Ilarvirus* y para el que no se ha determinado todavía su modo de transmisión. Recientemente se ha depositado la secuencia del genoma en la base de datos "Genebank" de un aislado del virus obtenido de la planta *Hydrangea macrophylla*. El genoma de PMoV está dividido en tres RNAs con tamaños de 3518, 2922 y 2268 nucleótidos respectivamente. El RNA 1 y 2 codifican las replicasas P1 y P2 mientras que el RNA 3 contiene dos ORFs que codifican la proteína de movimiento (MP) y la proteína de cubierta (CP) siendo ésta sintetizada a través de un RNA 4 subgenómico. Ambos ORFs están separados por una región no codificante (IGR) de 127 nucleótidos.

En este trabajo presentamos la secuencia de la MP, CP y la IGR de 5 aislados de la raza del virus de la parietaria que infecta tomate (PMoV-T) recogidos en 5 parcelas diferentes de Cataluña. Todos ellos presentaban las mismas características biológicas, y diferían en algunos huéspedes con respecto a la variante que infecta la planta de *Parietaria officinalis*. La homología de secuencia observada entre los 5 aislados es muy elevada, lo que sugeriría una única introducción ocurrida recientemente. A pesar de que los aislados de tomate muestran aproximadamente un 92% de homología a nivel nucleotídico con el aislado de parietaria, todos ellos presentan un extremo N-terminal de la CP significativamente distinto lo que conllevaría una región líder para la traducción de la CP y una región promotora para el RNA diferentes a las del aislado de parietaria. Se discutirá la posible influencia del huésped en la modulación de la organización genómica del virus.

CONSTRUCCIÓN DE MUTANTES PORTADORES DE DELECCIONES EN GENES HRP DE *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*

LAMBERTSEN, L.¹; SANTILLI, E.²; PÉREZ-MARTÍNEZ, I.¹; BEUZÓN, C.¹; TEGLI, S.²; MURILLO, J.³; RAMOS, C.¹

¹ Área de Genética, Facultad de Ciencias, Universidad de Málaga. Campus de Teatinos s/n, 29071-Málaga. E-mail: crr@uma.es

² Dipartimento di Biotecnologie Agrarie, Laboratorio di Patologia Vegetale Molecolare, Via della Lastruccia 10, 50019 Sesto Fiorentino, Florencia, Italia.

³ Laboratorio de Patología Vegetal, Departamento de Producción Agraria, Universidad Publica de Navarra, 31006 Pamplona.

La tuberculosis del olivo, causada por la bacteria *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* (Pss), es una de las enfermedades más importantes que afecta al olivar. Su síntoma característico, la formación de tumores en troncos, ramas y brotes, es dependiente de la producción bacteriana de fitohormonas en los tejidos vegetales, sin embargo, la relevancia de otros factores en esta enfermedad está muy poco estudiada. Recientemente, se ha descrito un mutante de Pss incapaz de producir tumores en olivo que contiene una inserción de un miniTn5 en *hrcC* (Sisto et al. 2004, *Phytopathology*: 94, 484), sin embargo, la implicación de otros genes *hrp* (Hypersensitive Response and Pathogenicity) en la virulencia de este patógeno es desconocida. Con el objetivo de determinar si, al igual que en otras bacterias fitopatógenas, otros genes *hrp* son necesarios para la inducción de la enfermedad, en este trabajo hemos abordado la identificación y construcción de delecciones en algunos de ellos. Para ello, y basándonos en la secuencias de otras *Pseudomonas*, se diseñaron pares de cebadores para la amplificación de fragmentos pertenecientes a los genes *hrpA*, *B* y *Z* (operón *Z*), *hrpRS* (operon *RS*), *hrcV* (operón *J*), *hrpL* y *K*. Todos los fragmentos esperados se amplificaron mediante PCR utilizando como molde ADN total de Pss. Además, y con el objetivo de construir en Pss delecciones exactas de la región codificadora de varios genes *hrp*, se construyó el vector pUC18Not-Km, que contiene un casete de resistencia a Km flanqueado en sus extremos 5' y 3' por un sitio de clonación múltiple. La clonación en este vector de los genes localizados corriente arriba y corriente abajo del gen que se desea eliminar, facilita la construcción de delecciones exactas mediante recombinación homóloga. En la actualidad estamos procediendo a la delección de los genes *hrpZ*, *hrpA* y *hrcV* en dos cepas de Pss, la virulencia de las cepas construidas se analizará en plantas de olivo cultivadas in-vitro.

VARIABILIDAD PATOGENICA DE CEPAS DE *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*

MURILLO, J. ; RIVAS, L. ; RICO, A.

Dpto. Producción Agraria, ETS Ingenieros Agrónomos, Universidad Pública de Navarra, 31006 Pamplona; e-mail: JESUS@UNAVARRA.ES

La capacidad de *P. syringae* pv. *phaseolicola* para producir enfermedad en su planta huésped, judía, depende de la posesión de una isla de patogenicidad (PAI) residente en un plásmido nativo de alto peso molecular. La PAI puede contener hasta siete genes de efectores que confieren distintos fenotipos de virulencia y avirulencia, dependiendo de la planta huésped. De ellos, *virPphA* es esencial para la producción de enfermedad en judía, mientras que *avrPphF* es esencial para producir enfermedad en soja e incrementa la virulencia en al menos un cultivar de judía. En general, se asume que las PAIs representan material genético adquirido mediante transferencia horizontal. Sin embargo, el gen *virPphA*, pero no la mayoría de los otros genes de la PAI de *P. syringae* pv. *phaseolicola*, está altamente conservado en otros patovares de *P. syringae*. Con el fin de profundizar en el conocimiento de la evolución de genes de virulencia, nosotros hemos investigado la conservación de la organización de la PAI, mediante ensayos de hibridación tipo Southern y PCR normal y extra larga, en 22 cepas de *P. syringae* pv. *phaseolicola* aisladas de diversos huéspedes y orígenes. En primer lugar, abordamos el estudio filogenético de estas cepas mediante análisis de la secuencia de diversos genes, de inserciones de elementos transponibles y de polimorfismos de fragmentos de restricción. Este análisis nos ha permitido separar las cepas en tres putativos grupos filogenéticos, dos de los cuales han sido ya descritos por nosotros (Oguiza *et al.*, 2004. Microbiology 150:473). La adscripción de las cepas a cada grupo no está relacionada con el huésped de origen o sitio de aislamiento, pero sí con la organización de genes de virulencia. Los genes de efectores incluidos en la PAI se encontraron en todas las cepas, con las excepciones de *avrPphF* (sólo presente en las raza 1, 5, 7 y 9; ver póster de Rivas & Murillo), *avrPphC*, que no se detectó en tres cepas, y los putativos genes de efectores ORF2 y ORF3, ausentes en otras cuatro cepas. La organización de la PAI está perfectamente conservada en todas las cepas del grupo Pph1, en las que se localiza en un plásmido. Por el contrario, en el resto de las cepas sólo se conserva la posición relativa de los genes *avrD* y *avrPphF*, a la izquierda de la PAI. Sin embargo, en algunas cepas de los grupos Pph2 y Pph3 se conserva, además, la organización de otros genes de la PAI. En conjunto, nuestros datos sugieren que la PAI se heredó relativamente temprano en la evolución de *P. syringae* pv. *phaseolicola* y que en los grupos Pph2 y Pph3 ha sufrido reorganizaciones importantes que han separado físicamente sus genes constituyentes.

IDENTIFICACIÓN DE LOS BORDES DE LA REGIÓN GÉNICA DE BIOSÍNTESIS DE FASEOLOTOXINA EN *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*

MURILLO, J.¹; LÓPEZ-LÓPEZ, K.²; MATEO, N.¹; ÁLVAREZ-MORALES, A.²

¹Depto. Producción Agraria, Universidad Pública de Navarra, 31006 Pamplona;

²Depto. Ingeniería Genética, CINVESTAV, 36500 Irapuato, México

Las cepas de *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* se caracterizan por sintetizar faseolotoxina, una toxina de mucha importancia práctica, ya que el DNA implicado en su biosíntesis se utiliza como diana para la detección específica y sensible del patógeno. Además, la toxina podría tener interés biomédico por su efecto inhibitorio *in vitro* contra células cancerígenas. La faseolotoxina es un tripéptido, y produce una inhibición competitiva e irreversible de la enzima ornitina transcarbamilasa así como de la ornitina decarboxilasa, induciendo una clorosis sistémica en la planta huésped. No se sabe con certeza cuál es el papel de la faseolotoxina en el ciclo de vida de *P. syringae* pv. *phaseolicola*, aunque se especula que debe ser importante porque se ha detectado en prácticamente todas las cepas de esta bacteria. Sin embargo, se ha demostrado que la mayoría de las cepas españolas del patógeno carece del DNA necesario para la biosíntesis de la toxina. Este DNA se agrupa en una región génica (cluster *tox-argK*) que ha sido sólo parcialmente caracterizada y que también se encuentra en cepas de *P. avellanae*, *P. syringae* pv. *actinidiae* y en una cepa de *P. syringae* pv. *syringae*. No se sabe si un ancestro de *P. syringae* adquirió la capacidad de sintetizar la toxina, que fue perdiéndose en diversas patovares, o si sólo ciertas cepas lo adquirieron de manera independiente. Nosotros hemos abordado la caracterización del cluster *tox-argK* como un paso necesario para el estudio de su funcionalidad y su conservación. Mediante análisis del borrador de la secuencia del genoma de *P. syringae* pv. *phaseolicola* 1448A hemos identificado una región de ~24 kb que incluye 22 ORFs, algunas de las cuales han sido descritas previamente como esenciales para la biosíntesis de la toxina. El borde derecho del cluster está constituido por una transposasa homóloga a la de IS870 mientras que el izquierdo está delimitado por un elemento homólogo a ISPsy5, ambos presentes en esta localización sólo en las cepas Tox+. La conservación del DNA adyacente a los bordes del cluster es variable en *P. syringae* pv. *tomato* DC3000 y en *P. syringae* pv. *syringae* B728a, e indica la ocurrencia de reorganizaciones genómicas en los bordes del cluster *tox-argK* así como la delección de un fragmento de DNA continuo de aprox. 30 kb que está presente en DC3000, pero no en B728A. La conservación de los bordes del cluster es asimismo variable en otras cepas Tox+ y Tox- de diversos patovares.

LAS RAZAS DE *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* CARENTES DE *avrPphF* PROCEDEN DE UN MISMO ANCESTRO COMÚN

RIVAS, L.; MURILLO, J.

Dpto. Producción Agraria, ETS Ingenieros Agrónomos, Universidad Pública de Navarra, 31006 Pamplona; e-mail: jesus@unavarra.es

La utilización de resistencia vegetal es uno de los métodos de control de enfermedades más deseables en la agricultura moderna, aunque su utilización indiscriminada como único método de control ha conducido a menudo a la selección de genotipos del patógeno que superan esta resistencia. La grasa de la judía, causada por *P. syringae* pv. *phaseolicola* (*Pph*), se controla mediante la utilización de semilla libre del patógeno y variedades tolerantes o resistentes. En los años 40 y 50, la mayoría de las variedades de judía cultivadas en EE.UU. mostraban resistencia vertical a la grasa debido a la posesión del gen de resistencia *R1*, que es complementario del gen de avirulencia *avrPphF*. En 1964 se describió la aparición de una nueva raza del patógeno que superaba la resistencia conferida por *R1* y, posteriormente, se han descrito hasta nueve razas distintas del patógeno, cinco de las cuales (razas 2, 3, 4, 6 y 8) carecen de *avrPphF*. Los análisis realizados en los años sucesivos, hasta el presente, han puesto de manifiesto la prevalencia en campo de razas que carecen de *avrPphF*, y fundamentalmente de aislados de la raza 6. Actualmente se sabe que *avrPphF* se encuentra embebido en una *isla de patogenicidad* (PAI) plasmídica, y que confiere diversos fenotipos de virulencia y avirulencia, dependiendo de la planta huésped. El análisis del cósmido p19U1, que contiene la PAI de la cepa de raza 6 *P. syringae* pv. *phaseolicola* 1448A, ha mostrado que la pérdida de *avrPphF* se asocia a una delección de 9.7 kb. El extremo izquierdo de esta delección se corresponde con un elemento transponible quimérico derivado de la unión en fase de un transposón homólogo a Tn1492 y de uno homólogo a IS1090. La coincidencia del sitio de delección con el extremo del elemento transponible sugiere que esta delección se originó como consecuencia de un fallido evento de transposición del elemento quimérico. El sitio de delección está perfectamente conservado en 66 cepas de *Pph* procedentes de distintos huéspedes y localidades del mundo, y que representan las razas 2, 3, 4, 6 y 8. Sin embargo, seis cepas españolas mostraron una delección de 10.7 kb cuyo borde izquierdo es idéntico al de la delección mayoritaria, por lo que podría haber resultado de un evento de transposición independiente. Nuestros datos sugieren, por tanto, que las razas de *Pph* carentes de *avrPphF* proceden en su mayoría de un único ancestro común, que probablemente apareció como resultado de la presión selectiva derivada de la utilización masiva de cultivares de judía con resistencia vertical dirigida contra *avrPphF*. Este putativo ancestro se dispersó posteriormente en el ámbito mundial y sufrió diversos cambios genéticos que originaron las actuales razas del patógeno.

PATOGENICIDAD DE *Armillaria mellea*, *Armillaria ostoyae* Y *Armillaria gallica* SOBRE CONÍFERAS

AGUÍN, O.¹; MANSILLA, J.P.^{1,2}; SÁINZ, M.J.²

¹ Estación Fitopatológica Do Areeiro. Excmá Diputación Provincial de Pontevedra. Subida a la Robleda s/n 36153. Pontevedra. E-mail: efa@efa-dip.org

² Departamento de Producción Vegetal. Universidad de Santiago de Compostela. 27002 Lugo.

La podredumbre blanca de la raíz en coníferas se atribuye principalmente a *Armillaria ostoyae* y en algunos casos a *Armillaria mellea*. Esto se refleja en Galicia, donde hemos encontrado que la mayor parte de las muestras sintomáticas de *Pinus* spp. recibidas para diagnóstico estaban afectadas por *A. ostoyae*, mientras que en menor número la enfermedad estaba causada por *A. mellea*. *Armillaria gallica*, es otra especie que también ha sido referenciada en coníferas pero está considerada como patógeno de debilidad. Se llevó a cabo un experimento en cámara de cultivo para estudiar la patogenicidad de *A. mellea*, *A. ostoyae* y *A. gallica* en cuatro coníferas forestales presentes en Galicia: *P. pinaster*, *P. sylvestris*, *P. radiata* y *Pseudotsuga menziesii*. Para cada conífera, se produjo planta a partir de semilla utilizando como sustrato una mezcla estéril de corteza de pino, turba y perlita. Después de seis meses plantas, bien desarrolladas y sanas, fueron transplantadas a macetas de 500 mL con el mismo sustrato. Tras tres meses más de cultivo, se establecieron tratamientos de inoculación con cada especie de *Armillaria* por separado o combinando dos o tres, que se compararon con un control no inoculado. Durante el ensayo se hizo un seguimiento de la aparición de síntomas cuantificándose a los tres meses y al final del estudio, para cada planta, el peso de parte aérea y raíz y la biomasa de rizomorfos en el sustrato, estableciendo un índice de enfermedad. Se recogieron muestras de rizomorfos para la identificación por técnicas moleculares de la especie de *Armillaria*. Para todas las coníferas los primeros síntomas de enfermedad (decaimiento de parte aérea, clorosis de acículas..) se observaron en los tratamientos de inoculación con *A. mellea*. Tanto *A. ostoyae* como *A. mellea* y *A. gallica* redujeron el crecimiento de las especies de *Pinus* y de *Pseudotsuga*, pero sólo las dos primeras causaron síntomas aéreos de enfermedad. Algunas combinaciones de especies, por ejemplo *A. ostoyae* con *A. gallica* en *Pinus radiata*, tuvieron un mayor efecto sobre la planta que la inoculación por separado. Este trabajo ha sido financiado por la Xunta de Galicia (proyecto XUGA PGIDTO2RFO60301PR)

ENZIMAS OXIDATIVAS RELACIONADAS CON EL PARDEAMIENTO VASCULAR PRODUCIDO POR *Verticillium dahliae* Kleb. EN PLANTAS DE PIMIENTO

BLANCO, C.¹; NOVO, M.¹; POMAR, F.²; MASA, A.³; MERINO, F.¹

¹Departamento de Biología Animal, Biología Vegetal e Ecología. Universidade da Coruña. 15071 A Coruña. Email: fuenme@udc.es

²CIAM. 15318 Mabegondo. A Coruña

³Misión Biológica de Galicia. CSIC. 36143 Pontevedra

Ante el ataque por un patógeno, la planta puede sufrir una serie de cambios fisiológicos encaminados a suprimir o retardar la invasión de dicho patógeno. Entre estos cambios se pueden destacar el refuerzo de la pared celular por la formación de un depósito impermeable y la acumulación de sustancias de bajo peso molecular tales como fitoalexinas y fenoles. Los compuestos fenólicos son un grupo de sustancias ampliamente distribuidas en las plantas y cuya síntesis a menudo aumenta después de la infección por patógenos. Los vasos del xilema infectados por hongos vasculares como *Verticillium dahliae*, presentan una típica acumulación de geles producidos por la planta, que también impregnan las paredes de los vasos de forma que éstos se vuelven de color marrón. Este pardeamiento de los vasos se debe, al menos en parte, a que los geles están compuestos por polisacáridos y compuestos fenólicos. Estos últimos son fácilmente oxidados por enzimas de las plantas o de los microorganismos. Debido a esto, es difícil saber con exactitud si la actividad antibiótica de los fenólicos se debe a ellos mismos o a sus productos de oxidación. Entre las enzimas principalmente implicadas en la oxidación de los compuestos fenólicos están la peroxidasa y la polifenol oxidasa, asociadas ambas con todo tipo de enfermedades vasculares. En este trabajo se ha estudiado por medio de HPLC el contenido en compuesto fenólicos durante 28 días, en plantas de pimiento de diez semanas, inoculadas con *Verticillium dahliae* Kleb. Así mismo se ha estudiado la evolución de las dos principales enzimas relacionadas con el fenómeno de oxidación de los compuestos fenólicos, peroxidasa y polifenol oxidasa, paralelo a la aparición del proceso de pardeamiento.

Este trabajo ha sido financiado por el proyecto PGIDT01AGR10301PR

RESISTENCIA DE CULTIVARES AUTÓCTONOS Y LÍNEAS DE MELÓN A LOS PATOTIPOS 'WILT' Y 'YELLOW' DE LA RAZA 1,2 DE *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis*

CHIKH-ROUHOU, H.; OUMOULOUD, A.; ÁLVAREZ, J.M.; MALLOR, C.; GONZÁLEZ-TORRES, R.
Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria (CITA). Dpto. de Ciencia, Tecnología y Universidad. Apartado 727. 50080 Zaragoza.

Se han evaluado 54 cultivares autóctonos y líneas de melón para la búsqueda de resistencia a los patotipos 'wilt' y 'yellow' de la raza fisiológica 1,2 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 transfirieron a vasos de plástico que contenían 160 ml de solución nutritiva de Hoagland Las plantas (4 plantas/vaso y 3 vasos/cultivar) se mantuvieron separadas y erectas mediante tiras de cinta adhesiva cruzadas sobre el borde del vaso. Mediante un asa de platino al rojo se hizo un agujero circular de 6 mm de diámetro en el centro de vaso y se introdujo con micropipeta 3 ml de suspensión de inóculo de los patotipos 'wilt' y 'yellow' de Fom (3×10^6 conidias/ml). Tras la inoculación, los vasos conteniendo las plántulas se colocaron al azar en una plataforma sobre un agitador orbital a 120 rpm y se mantuvieron en una cámara de crecimiento a 26°C, bajo luz ($1.300 \mu\text{Einstein/m}^2$, 18 h al día) y humedad relativa del 60%. 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). Las plantas se mantuvieron en observación durante 30 días y la anotación de los síntomas se realizó cada 5 días de acuerdo a una escala de severidad de 0 a 4 (0 = no síntomas; 4 = planta muerta).

Tanto el cultivar híbrido 'Dinero' de S&G como japonés 'Kagane Nashi Makuwa' resultaron resistentes a los patotipos 'wilt' y 'yellow' de Fom, seguido del cultivar español 'Baza' (resistente al patotipo 'wilt' y tolerante al patotipo 'yellow'). El cultivar japonés 'C 40' resultó resistente al patotipo 'yellow' y susceptible al patotipo 'wilt'. Los cultivares 'C 160' (ruso), 'Mollerusa', 'C 300' y 'BG 5384' (españoles) resultaron tolerantes al patotipo 'yellow' y susceptibles al patotipo 'wilt'. El cultivar 'BG 045' (español) resultó tolerante al patotipo 'wilt' y susceptible al patotipo 'yellow'. Los restantes cultivares resultaron susceptibles a ambos patotipos de Fom.

COMPORTAMIENTO DE UNA NUEVA VARIEDAD DE FRESA 'AGUEDILLA' FRENTE A ENFERMEDADES EN VIVEROS

DE CAL, A.¹; LÓPEZ-ARANDA, J.M.²; MARTINEZ-TRECEÑO, A.³; BARTUAL, R.⁴; MELGAREJO, P.¹

¹Departamento de Protección Vegetal. INIA. Carretera de La Coruña Km 7,5. 28040 Madrid.

²CIFA Málaga, IFAPA Junta de Andalucía, Churriana, Málaga.

³Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, Madrid.⁴IVIA Moncada, Valencia.

'Aguedilla', es una nueva variedad de fresa obtenida en el Convenio INIA CCO1-0008 (Obtención de variedades de fresa económicamente viables y para climas templados), con la participación de entidades públicas de investigación (INIA, IFAPA e IVIA) y privadas (FNM S.A. y Asociación Española de Viveristas de Plantas de Fresa). Dicha variedad posee muy buenas características agronómicas: alta producción precoz y total, alta capacidad de adaptación a diferentes ambientes de cultivo y alta conservación post-cosecha. Paralelamente se ha estudiado su comportamiento frente a las 3 principales enfermedades que las plantas de fresa presentan en su fase de vivero: *Phytophthora cactorum*, *Verticillium dahliae* y *Sphaeroteca macularis*. Para ello se realizaron 2 ensayos en cámara de cultivo (22°C, 80% humedad, 16 horas fotoperiodo) para cada patógeno, en los cuales se evaluaba la resistencia de las plantas de 'Aguedilla' y otras dos variedades comerciales como 'Camarosa' y 'Ventana'. En los ensayos de resistencia de *P. cactorum* las plantas se mantenían en solución nutritiva durante 30 días después de la inoculación con una suspensión de zoosporas del patógeno y se evaluaba la gravedad de la enfermedad y el consumo solución nutritiva al finalizar ensayo. La gravedad de la enfermedad causada por *Verticillium dahliae* se estimó en plantas en macetas con turba estéril durante 60 días después de la inoculación con el patógeno (baño de raíces durante 30 min en suspensión de conidias 10⁶coni/ml). En estas mismas plantas se evaluó también la resistencia a *Sphaeroteca macularis*, ya que las plantas venían infectadas del vivero. La variedad 'Aguedilla' resultó ser igual de resistente que la variedad 'Camarosa' a los tres patógenos ensayados, pero significativamente más resistente a *P. cactorum* y *Sphaeroteca macularis* que la variedad 'Ventana'.

EFFECTO SUPRESOR DEL EXTRACTO ACUOSO DEL COMPOST DE ORUJO DE VID FRENTE A HONGOS FITOPATÓGENOS EDÁFICOS

DIÁNEZ, F.; SANTOS, M.; BOIX, A.; MARTÍNEZ, R.E.; DE CARA, M.; TELLO, J.C.

Departamento de Producción Vegetal. Universidad de Almería. Carretera Sacramento s/n. La Cañada de San Urbano. Almería. 04120. E-mail: fdianez@ual.es

El compost, así como sus extractos acuosos, presentan un elevado potencial supresor frente a diferentes enfermedades de las plantas, pudiendo en muchos casos sustituir a los fungicidas de síntesis. Los extractos acuosos del compost contienen agentes de biocontrol así como diferentes factores químicos que juegan un papel fundamental en la supresión fúngica. El efecto supresor del crecimiento fúngico de los extractos acuosos del compost de orujo de vid frente a nueve hongos fitopatógenos se determinó *in vitro* mediante tres métodos: mezclando extracto y medio de cultivo (METODO 1), mediante un ensayo de difusión en placa de Petri y, por último (METODO 2), determinación del peso seco de la biomasa fúngica (METODO 3) (El-Masry *et al.*, 2002). Para la obtención de los extractos acuosos, se añadieron 100 gr de compost a un matraz en una proporción 1/3 (p/v). Se agitó en agitador orbital a 150 rpm a 25°C durante 1 día, 1 semana y 2 semanas. Dichos extractos fueron filtrados, microfiltrados y esterilizados en autoclave para determinar el efecto del componente biológico y/o enzimático de los mismos. Los hongos ensayados fueron los siguientes: *Rhizoctonia solani*, *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*, *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* raza 0, *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* raza 1, *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-cucumerinum*, *Verticillium dahliae*, *Pythium aphanidermatum*, *Phytophthora parasitica* y por último un micopatógeno, *Verticillium fungicola*.

Los resultados obtenidos utilizando extracto filtrado a concentraciones de 5, 10 y 15% (v/v) muestran que existe una inhibición del 100% del crecimiento fúngico para siete de los nueve hongos ensayados. En los casos en los que no hubo inhibición (*Rhizoctonia* y *Pythium*), el desarrollo miceliar sólo podía ser detectado bajo microscopía. La inhibición del crecimiento fúngico por los extractos acuosos del compost microfiltrados indica la producción de antibióticos, enzimas líticas extracelulares u otros componentes de bajo peso molecular como son los sideróforos, por parte de la microbiota del mismo, producción que desaparece en los extractos esterilizados en autoclave. Con este trabajo se confirma el potente efecto supresor del extracto acuoso del compost de orujo de vid frente a diferentes hongos patógenos.

INDUCCIÓN DE RESISTENCIA PARCIAL A PATÓGENOS POR LA CAPSICINA EN PIMIENTO

DÍAZ, J.*; VARELA, M.; SILVAR, C.; MERINO, F.

*Departamento de Biología Animal, Biología Vexetal e Ecoloxía. Universidade da Coruña. Campus da Zapateira s/n 15071 A Coruña. *Email: josefv@udc.es*

Las plantas producen una amplia gama de metabolitos secundarios, muchos de los cuales son aprovechados por el hombre de diferentes maneras. La capsicina es un compuesto secundario que se acumula fundamentalmente en los frutos de algunas especies y variedades de pimiento, confiriéndoles un gusto picante. En el presente trabajo se ha ensayado la capacidad de la capsicina para inducir resistencia a hongos patógenos en plantas de pimiento (*Capsicum annuum* L. cv Padrón). El tratamiento inductor consistió en sumergir las raíces de las plantas de pimiento durante 3 horas en una suspensión de capsicina, inoculando las plantas 48 horas más tarde. Las plantas inducidas con capsicina e inoculadas con *Verticillium dahliae* Kleb. mostraron una reducción de casi un 40 % en la incidencia de la enfermedad, así como una importante reducción en la severidad de los síntomas con respecto a un control inducido con agua. Si atendemos a los parámetros de peso fresco, peso seco y longitud de epicotilo, que suelen disminuir en las plantas enfermas de verticilosis, las plantas inducidas con capsicina sufrieron una reducción significativamente menor que el control. Así, la infección por *V. dahliae* redujo el peso fresco del grupo control en un 75,3 % con respecto a las plantas no inoculadas, en tanto que en el grupo inducido por capsicina sólo se produjo una reducción del 52,2 %. Los datos de peso seco y longitud de epicotilo mostraron tendencias semejantes. Cuando la inoculación reto se llevó a cabo con otro patógeno, *Phytophthora capsici* Leon., se obtuvieron resultados parecidos, siendo la AUDPC de las plantas inducidas con capsicina significativamente inferior que la del control. Finalmente, se ha comprobado que la inducción de las plantas con capsicina provoca un incremento en la actividad quitinasa en las diferentes partes de la planta.

***Phaeomoniella chlamydospora*: CAPACIDAD DE COLONIZACIÓN Y PERSISTENCIA DEL INÓCULO EN SUELO**

GAFORIO, L.; PASTOR, S.; REDONDO, C.; TELLO, M.L.

Instituto Madrileño de Investigación Agraria y Alimentaria (IMIA). Autovía del Nordeste A-2, Km. 38.200, 28800 Alcalá de Henares, Madrid

Las enfermedades fúngicas de degradación de madera son una de las patologías más relevantes en el cultivo de vid. En los últimos años, se ha detectado un aumento significativo de viñedos en los que se confirma la presencia de cepas que sufren la “Enfermedad de Petri”, enfermedad de degradación de las cepas jóvenes en cuyo origen interviene uno de los principales agentes fúngicos presente en las infecciones de planta adulta, el hongo *Phaeomoniella chlamydospora*, el cual crea importantes problemas en los primeros años de plantación en el terreno definitivo de asiento. Las formas de infección propuestas por diversos autores, contemplan la penetración a través de las heridas de poda, el uso de material de multiplicación infectado o la presencia del patógeno en el terreno de asiento de la plantación. Esta última forma de transmisión de la enfermedad podría producirse también en los campos de producción de los viveros, con lo que el agricultor estaría estableciendo su plantación con material portador de la enfermedad.

En nuestro estudio hemos procedido a la infección en condiciones controladas de estacas de vid sin enraizar de la variedad Tempranillo, en suelo estéril, inoculado con una suspensión de conidias. Se estudió durante tres meses la persistencia en suelo del inóculo, así como la velocidad de avance del hongo en los tejidos vasculares vegetales, mediante la observación al microscopio de cortes histológicos de distintos segmentos de la planta, cuyos resultados se confirmaron con el reaislamiento del hongo a partir de fragmentos de madera. Nuestros resultados indican que el patógeno fue capaz de penetrar en la estaca y avanzar de forma ascendente, un total de 10 cm al completar el periodo de estudio, a pesar de no presentar síntomas visibles de degradación de los tejidos vegetales. Así mismo, se consiguió reaislar el hongo desde suelo a lo largo de los tres meses, en niveles poblacionales significativos. Estos resultados apoyan la teoría de que la infección a través de suelo es factible y que el patógeno posee capacidad de permanecer en el sustrato durante un periodo de tiempo indeterminado. Para intentar definir las condiciones idóneas para su persistencia y ampliar el periodo de observación, se han iniciado nuevos ensayos, complementados con el estudio de una variedad patrón.

CONTROL BIOLÓGICO MEDIANTE EL COMPOST DE RESTOS HORTÍCOLAS FRENTE A HONGOS FITOPATÓGENOS EDÁFICOS

GÁMEZ, I.; SANTOS, M.; DIÁNEZ, F.; DE CARA, M.; MARTÍNEZ, R.E.; BLANCO, R.; TELLO, J.C.
 Departamento de Producción Vegetal. Universidad de Almería. Carretera Sacramento
 s/n. La Cañada de San Urbano. Almería. 04120. E-mail: msantos@ual.es

La producción de residuos vegetales en la horticultura almeriense esta como no podría ser de otra forma ligada a los ciclos de cultivo. El compostaje, o estabilización e higienización de los residuos orgánicos en condiciones controladas, aparece como una alternativa muy interesante en esta búsqueda de soluciones integrales al problema anteriormente planteado.

Se han analizado plantas procedentes de los invernaderos y se llevaron sin apenas descomposición a la planta de compostaje. Igualmente, se realizó un análisis de la flora fúngica total y fusárica de forma selectiva, del compost maduro de restos vegetales hortícolas. Asimismo, se ha determinado la supresividad del compost frente a 8 patógenos que afectan frecuentemente a las hortícolas, mediante la inhibición del crecimiento de estos al enfrentarlos a distintas bacterias, actinomicetos y levaduras presentes en el compost.

Los resultados de este primer análisis determinaban una masiva presencia de *F. oxysporum* en el material de partida que se utiliza para compostar. Tras el compostaje, los resultados obtenidos no pudieron ser más claros, la cantidad obtenida de colonias fue de 0 UFC·g⁻¹

Paralelamente a los trabajos expuestos anteriormente, se hizo un análisis del lixiviado desprendido por los montones de restos vegetales durante el proceso de compostaje, en los cuales no aparece ninguna colonia de *Fusarium* sp., a pesar de que el medio utilizado es selectivo. La presencia de *Gliocladium* sp., juega un papel muy importante en la disminución del número de colonias de *Fusarium* sp., en el compost de restos vegetales hortícolas. Exceptuando el caso de *Pythium aphanidermatum*, el grupo que en general tuvo mayor poder antagonista en los 8 patógenos fue el de las bacterias termófilas. Dentro de estas, el aislado que mayor importancia ha tenido por su gran capacidad antagónica para cinco tipos de fitopatógenos era el denominado BT4d. En las bacterias mesófilas, la capacidad antagónica es menor que la anterior, en cambio estos tienen una mayor variabilidad antagónica, ya que lo pueden competir con *Pythium aphanidermatum*, aunque en baja proporción microbiana. Los actinomicetos termófilos, tienen una menor variabilidad antagónica que las bacterias en general. Quizás estos microorganismo tengan un antagonismo mas específico a cierto fitopatógenos, como ocurre en este caso con *Phytophthora capsici*. Por otro lado, para *Fusarium oxysporum*, los actinomicetos termófilos, tienen una actividad antagónica escasa o nula, para las cuatro formas especializadas ensayadas. Los actinomicetos mesófilos, al igual que en los termófilos, tienen una variabilidad antagónica más puntual que las bacterias. En este caso, los actinomicetos mesófilos tienen mayor grado de antagonismo en *Fusarium oxysporum* que los actinomicetos termófilos.

PATOGENICIDAD DE *Biscogniauxia mediterranea*, AGENTE DEL CHANCRO CARBONOSO DE *Quercus*

JIMÉNEZ, J.J.; SÁNCHEZ, M.E.; TRAPERO, A.

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

El chancro carbonoso, causado por *Biscogniauxia mediterranea* (= *Hypoxyylon mediterraneum*), está asociado principalmente a masas de *Quercus* spp. implicadas en procesos de decaimiento. Se ha determinado que el vigor del huésped, independientemente de su edad, es el factor decisivo en la aparición del estroma carbonoso en condiciones de campo; formación que no está asociada a la presencia de exudados por parte de la planta huésped.

Para aclarar el papel que juega *B. mediterranea* en el decaimiento de *Quercus* spp., se realizaron ensayos de patogenicidad en rama cortada y en planta viva. Se inocularon artificialmente ramas cortadas de *Q. ilex* y *Q. suber* con micelio, con o sin herida previa, y con ascosporas de *B. mediterranea*, y se demostró que las elevadas temperaturas en condiciones de elevada HR, favorecen la aparición de necrosis corticales y la formación del estroma carbonoso. Las inoculaciones artificiales de plantones sanos de *Q. ilex*, *Q. suber* y *Q. coccifera* de 3 años de edad, con el mismo tipo de inoculación, mostraron que el hongo es capaz de infectar y colonizar endofíticamente a las tres especies, observándose una correspondencia entre la presencia de tinción de vasos en las plantas inoculadas y el reaislamiento del hongo, aunque el hongo es capaz de colonizar de forma asintomática zonas de corteza muy alejadas de estas tinciones. Las necrosis corticales no aparecen hasta que las plantas sufren periodos de estrés hídrico severo. Sin embargo, aún en estas condiciones, la mayoría de las plantas de encina y coscoja no desarrollaron lesiones corticales, siendo el alcornoque el huésped más susceptible.

Por otra parte se ha puesto a punto un método para la detección de la fase endofítica de *B. mediterranea*, mediante la incubación de segmentos de tallo o ramas asintomáticas a 30°C y elevada HR, condiciones que inducen la formación del estroma carbonoso.

EFICACIA DEL TELONE C-35 EN LA DESINFECCIÓN DE SUELOS DE TOMATE

LACASA, A.¹; GUERRERO, M.M.¹; QUINTO, V.²; LACASA, C.²; BIELZA, P.²; CONTRERAS, J.²; TORNÉ, M.³

¹ IMIDA, Mayor s/n, 30.150 La Alberca (Murcia)

² Protección Vegetal, ETSIA, Universidad Politécnica de Cartagena. Paseo Alfonso XIII, s/n, 30.203 Cartagena (Murcia)

³ Dow AgroSciences Ibérica S.A., Cerro del Castañar, 28. Madrid

En el Sureste peninsular, el tomate se cultiva repetidamente en el mismo suelo, lo que facilita la proliferación de patógenos telúricos. La utilización de variedades resistentes es la forma más estable y sostenible de controlar los patógenos del suelo, si bien, en el caso de los nematodos (*Meloidogyne spp.*) el control no es tan eficaz debido a la selección, cada vez más frecuente, de poblaciones virulentas, que llegan a comprometer la viabilidad del cultivo. Para paliar estos efectos, es habitual la desinfección del suelo con productos específicos (1,3 dicloropropeno) o generales (Metam sodio). Las mezclas de 1,3 dicloropropeno y cloropicrina (DD+Pic) se consideró un buen desinfectante en cultivos de pimiento o fresa. Con el objeto de evaluar la eficacia del Telone C-35 EC (DD+Pic) y de determinar la dosis de aplicación en tomate, se han realizado ensayos en invernadero y bajo malla en diferentes ciclos de cultivo. El Telone C-35 aplicado en agua de riego después de humedecer el suelo a dosis de 300, 400 y 500 l/ha se comparó con el bromuro de metilo (BrMe 98:2 a 60 g/m²) y con un testigo no desinfectado. El ensayo se planeó en bloques al azar con 4 repeticiones por tratamiento. Para la evaluación de la eficacia se midió: la incidencia de *Meloidogyne*, el grado de colonización del suelo por malas hierbas, la altura de las plantas, la producción y la incidencia del colapso. En el cultivo invernadero de invernadero, todas las dosis de Telone C-35 proporcionaron el mismo nivel de control de *Meloidogyne*, de malas hierbas, similar desarrollo de las plantas y producciones que el BrMe y superiores a los del testigo. En el cultivo bajo malla, tanto el índice de nodulación con la proporción de plantas colonizadas por *Meloidogyne* del BrMe fueron menores que los de los tratamientos con Telone C-35; el índice de nodulación obtenido con la dosis de 300l/ ha fue significativamente superior al de las otras dosis de la mezcla; similares resultados se obtuvieron para las malas hierbas; la altura de las plantas y las producciones obtenidas con Telone C-35 fueron similares a las del BrMe y mayores que las del testigo, no apareciendo plantas marchitas ni colapsadas en ningún tratamiento. Las dosis de Telone C-35 más apropiados para la desinfección de los suelos de tomate sería superior a 300 l/ha.

FORMACIÓN DE LA MADERA TEMPRANA EN *U. minor* Y *U. pumila* Y SU RELACIÓN CON LA GRAFIOSIS DEL OLMO

MARTIN, J.A.¹; SOLLA, A.²; CORRALES, P.²; GIL, L.¹

¹Unidad de Anatomía, Fisiología y Mejora Genética. ETSI de Montes. Universidad Politécnica de Madrid. Paseo de las Moreras s/n. 28040. Madrid. E-mail: lgil@montes.upm.es

²Departamento de Biología y Producción de los Vegetales. Centro Universitario de Plasencia. Ingeniería Técnica Forestal. Universidad de Extremadura. Avenida Virgen del Puerto 2, 10600-Plasencia. E-mail: asolla@unex.es

Durante la primavera, los olmos forman grandes vasos que facilitan una rápida expansión del hongo de la grafiosis por su sistema vascular, siendo altamente susceptibles en este periodo. La pérdida de vasos funcionales debido a la infección puede suponer un insuficiente aporte de agua a la copa y la consecuente muerte del árbol. La madera tardía, con vasos de menor tamaño, dificulta la expansión de la enfermedad. Se hipotetiza que la pronta formación de la madera tardía en olmos resistentes ocasiona una reducción del periodo de máxima susceptibilidad a la grafiosis.

Durante el año 2002 se practicaron heridas mensuales en ramas de 4 años de edad en 4 genotipos de *U. minor* (especie susceptible) y en 4 genotipos de *U. pumila* (especie resistente). Mediante estas heridas se marcaron los incrementos mensuales del último anillo de crecimiento. Sobre las ramas se practicaron cortes transversales sobre los que se midieron dichos incrementos como porcentajes respecto al total del anillo. También se midieron los diámetros de los vasos y el número de agrupaciones de vasos.

Los principales resultados del estudio fueron los siguientes: 1) En ambas especies el crecimiento radial fue aumentando desde el 15 de marzo hasta el 15 de julio. 2) El día 15 de abril *U. pumila* mostró un crecimiento radial mayor que *U. minor* ($P < 0,01$). 3) El día 15 de abril *U. minor* desarrolló vasos de mayor diámetro, mayor número de agrupaciones de vasos y mayor conductancia hidráulica teórica que *U. pumila* ($P < 0,01$). El máximo vuelo de escolítidos, vectores de la enfermedad, se produjo durante el mes de mayo. En este momento, las características de la madera de *U. minor* hacen al árbol más vulnerable a la colonización por parte del hongo que *U. pumila*, lo que puede contribuir al diferente grado de susceptibilidad entre ambas especies.

ANÁLISIS DE LAS PODREDUMBRES RADICULARES EN EL CULTIVO DEL PUERRO EN ALICANTE

MARTÍNEZ, R.E.; DIÁNEZ, F.; DE CARA, M.; SANTOS, M.; GÁMEZ, I.; SEGURA, J.M.; TELLO, J.C.

Departamento de Producción Vegetal. Universidad de Almería. Carretera Sacramento s/n. La Cañada de San Urbano. Almería. 04120. E-mail: msantos@ual.es

El puerro es un cultivo de notable importancia en la comarca de Villena (Alicante). Actualmente, está sufriendo la aparición de síntomas de podredumbre en diversas explotaciones comerciales de la zona. Los síntomas parecen venir de una situación precaria en semilleros, pues las plántulas, justo antes de ser trasplantadas a campo, ya suelen presentar síntomas severos de podredumbre radicular.

De un total de 825 plántulas analizadas, los síntomas más destacados fueron:

- Podredumbre blanca y translúcida en un 49,3 % de las plántulas analizadas.
- Meristemo terminal necrosado en un 20,0 %.
- Raíces de color rosa claro en un 21,0 %.

Para esclarecer si alguna de las enfermedades causadas por hongos puede ser la causa de las anomalías observadas se han llevado a cabo, diferentes análisis, colocando trozos de raíces en placas de Petri con medio de cultivo PDA. Los hongos aislados de estos análisis y considerados como patógenos del cultivo fueron: *Fusarium oxysporum*, *Fusarium roseum*, *Phoma*, *Pythium*, *Fusarium solani* y *Fusarium moniliforme*.

Los materiales (turba y semillas) empleados en el sistema de producción del cultivo estaban libres de hongos fitopatógenos.

La inoculación de diversas cepas de los géneros fúngicos anteriormente mencionados, mediante tres procedimientos de distinta agresividad dio como resultado, la no aparición de síntomas de podredumbre en ninguna de las plántulas inoculadas.

La observación del deficiente desarrollo del sistema radicular de las plántulas en las bandejas de siembra, debido al reducido tamaño de los alvéolos y forma troncopiramidal parece situarnos ante un problema asociado al manejo cultural.

VARIACIONES EN LA MICROBIOTA FÚNGICA DE SUELOS DE INVERNADEROS DE PIMIENTO DESINFECTADOS CON PRODUCTOS QUÍMICOS

MARTÍNEZ, M.A.¹; LACASA, A.¹; GUERRERO, M.M.¹; MARTÍNEZ, M.C.¹; ROS, C.²; BARCELÓ, N.¹; TELLO, J.C.³

¹ Protección de Cultivos, IMIDA, Mayor s/n, 30.150 La Alberca (Murcia).

² Programa de Colaboración FECOAM-CAAMA, Caballero 13, 30.002 Murcia

³ Producción Vegetal, Edificio CITE-II B. Universidad de Almería. Ctra. de San Urbano, s/n, 4.120 Almería.

Los suelos de los invernaderos de pimiento de Murcia y Sur de Alicante se desinfectan todos los años con bromuro de metilo (BrMe) para el control de los patógenos (*Phytophthora capsici* y *Meloidogyne incognita*) y para paliar los efectos de la fatiga del suelo, provocada por el continuado monocultivo que se realiza desde hace unos 20 años. En suelos no contaminados de patógenos, los descensos de producción y del desarrollo de las plantas es superior al 20% en el mismo año que se deja de desinfectar con BrMe. En invernaderos comerciales y experimentales, con y sin patógenos, donde se ensayan (diseño de bloques al azar con 3 repeticiones por tratamiento) diferentes desinfectantes químicos, se ha tratado de conocer las variaciones en la microbiota fúngica del suelo que se puedan producir desde la desinfección hasta el final del cultivo, que pudieran explicar los efectos depresivos que aparecen cuando no se desinfecta el suelo. En cada invernadero se ha comparado con suelo desinfectado con BrMe y/o suelo sin desinfectar. Los efectos depresivos se han evaluado midiendo el desarrollo de las plantas y las producciones. En los suelos desinfectados con productos de reconocida acción funguicida (BrMe, cloropicrina, mezcla de cloropicrina y dicloropropeno) se produce una acumulación progresiva de hongos de los géneros *Fusarium* (*F. solani* y en menor cuantía y frecuencia *F. oxysporum* y *F. roseum*), *Penicillium*, *Aspergillus*, *Alternaria*, con el transcurso del cultivo, mientras se reduce la de otros (varios géneros) hasta el mes de julio, a partir del cual se aprecia una tendencia al descenso generalizado. En los desinfectados con productos que han mostrado poca eficacia para el control de los patógenos (metam sodio, óxido de propileno o dimetil disulfito), también se observó una tendencia similar, aunque se parte de densidades mayores y no siendo tan pronunciado el incremento. En los testigos sin desinfectar, las variaciones cuantitativas son mucho menos pronunciadas, aunque guardan la misma tendencia evolutiva durante el cultivo. Las diferencias entre los tres niveles de desinfección del suelo son muy pronunciadas al inicio del cultivo, pero no tanto al final. La acumulación específica de hongos en la rizosfera pudiera explicar los efectos depresivos manifestados en el desarrollo de las plantas y en la producción, en los suelos no desinfectados o en los que se aplicaron productos con escasa acción funguicida (dimetil disulfito, óxido de propileno y metam sodio).

PC-22

IDENTIFICACIÓN GENOTÍPICA DE CULTIVARES DE MELÓN RESISTENTES A LAS RAZAS 0 Y 1 DE *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis*

OUMOULOUD, A.; MALLOR, C. ; ÁLVAREZ, J.M.; GONZÁLEZ-TORRES, R.

Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria (CITA). Dpto. de Ciencia, Tecnología y Universidad. Apartado 727. 50080 Zaragoza.

Recientemente, Wang *et al.* han identificado marcadores moleculares ligados al gen *Fom-2*, entre los cuales, los marcadores codominantes SCARs (AM y FM) son los más estrechamente ligados a este gen. El marcador AM amplifica una banda de 1.682 pb en los genotipos resistentes y de 1.783 pb en los susceptibles. Para probar la eficacia del marcador molecular AM, se seleccionaron siete cultivares de melón (C-211 = 4, C-41 = 5, C-40 = 6, C-334 = 7, C-87 = 8, C-241 = 9 y C355 = 10) procedentes del Banco de Germoplasma de Hortícolas del CITA (Zaragoza) previamente identificados fenotípicamente como resistentes a las razas 0 y 1 de *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* (*Fom*). Las líneas de melón Charentais T (3), y Charentais *Fom-1* (1) se utilizaron como testigos susceptibles, mientras que la línea Charentais *Fom-2* (2) se empleó como testigo resistente. El ADN genómico se extrajo a partir de hojas jóvenes de los distintos genotipos y la amplificación se realizó mediante PCR. Con el cebador AM se amplificó la banda correspondiente al alelo resistente del gen *Fom-2* en todos los cultivares de melón probados. En el caso del genotipo C-241(9), se observó la presencia de las bandas correspondientes al alelo resistente y al susceptible, lo que podría indicar que se trata de un genotipo heterocigoto. Además, presentó una banda adicional correspondiente a un fragmento de mayor peso molecular. En conclusión, se confirma que todos los cultivares analizados tienen el gen *Fom-2* que controla la resistencia a las razas 0 y 1 de *Fom* y que el cebador AM identifica de forma precisa los genotipos resistentes a dichas razas.

SELECCIÓN Y EVALUACIÓN DE PORTAINJERTOS DE AGUACATE TOLERANTES A LA PODREDUMBRE BLANCA

PÉREZ-JIMÉNEZ, R.M.¹; ZEA-BONILLA, T.¹; IMBRODA-SOLANO, I.¹; VIDOY-MERCADO, I.¹; JURADO-VALLE, I.¹; BARCELÓ-MUÑOZ, A.¹; LÓPEZ-HERRERA, C.J.²

¹ CIFA-Málaga. IFAPA. CICE. J. A. 29140, Churriana. Málaga.

² Instituto de Agricultura Sostenible., C.S.I.C. Apdo. 4084, 14080, Córdoba. E-mail: lherrera@cica.es

La podredumbre blanca del aguacate causada por *Rosellinia necatrix* es una enfermedad que ocasiona pérdidas muy importantes en las plantaciones de la costa sur de España, debido a la amplia distribución del patógeno en la zona y a la sensibilidad a la enfermedad de los patrones (plantas de semilla del cv. Topa Topa) utilizados en aquellas. En este trabajo se presentan los resultados actuales de la investigación en el programa de selección y evaluación de portainjertos tolerantes a este patógeno, iniciado en el año 1998 y subvencionado por dos proyectos INIA SC98-042 y RTA2-023. El objetivo final de este programa es la obtención de portainjertos tolerantes para ser utilizados en plantaciones comerciales afectadas por la enfermedad.

Se está evaluando distinto germoplasma de aguacate mediante inoculaciones artificiales con un aislado muy virulento de *R. necatrix*. Actualmente se ha obtenido 52 clones de material juvenil (preselecciones), procedente, de semillas de árboles locales y de otros países, que han sobrevivido a una primera inoculación. Estas preselecciones se están multiplicando, mediante la técnica de micropropagación y de estaquillando semiherbáceo, para realizar una segunda inoculación y confirmar la respuesta de tolerancia observada.

Paralelamente se ha seleccionado, en campo, 16 árboles de aguacate que vegetan bien en parcelas infestadas por *R. necatrix* y/o *Phytophthora cinnamomi*. Para clonar este material, se están también utilizando técnicas de multiplicación *in vitro* -micropropagación y microinjertos.

Hasta la fecha, los resultados de la segunda inoculación sobre algunas de las preselecciones de material juvenil, han confirmado tolerancia en tres clones: BG 41, BG 42 y BG 83. Según el protocolo establecido dentro de este programa estos clones tolerantes se han de evaluar en condiciones de campo. Para esto se dispone de una parcela infestada artificialmente con dos aislados virulentos del hongo en la que recientemente se han plantado copias de estos clones junto con plantas de semilla cv. Topa Topa utilizadas como controles. Este material permanecerá en la parcela dónde se tomarán datos de su evolución hasta que se seleccione el que tolere mejor la infección.

TOXINAS DE *Phytophthora* spp. COMO CAUSANTES DE LA DESECACIÓN DE ESTAQUILLAS DE OLIVO SIN ENRAIZAR

RAYA-ORTEGA, M.C.; BLANCO-LÓPEZ, M.A.; TRAPERO, A.

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

Junto a la Verticilosis del olivo, las podredumbres radicales (PR) son las principales causas de “seca” de los olivos jóvenes en Andalucía. Esta enfermedad se desarrolla en suelos con exceso de agua, aislándose principalmente a *Phytophthora megasperma* y *P. inundata* de las raíces necróticas. El control de las PR es difícil, estando encaminada a evitar el exceso de humedad en el suelo. Una de las medidas de control más recomendables es el uso de cultivares resistentes. Para la evaluación de la resistencia a *Phytophthora* se desarrolló un método rápido y eficaz en el que estaquillas de olivo sin enraizar se inocularon con zoosporas del patógeno. De la mayoría de las estaquillas inoculadas se pudo reaislar el hongo ensayado. No obstante, la imposibilidad de reaislamiento en un pequeño porcentaje de estaquillas, junto a la rapidez de la reacción y a la ausencia de una raíz susceptible de ser atacada por el patógeno, condujo a la realización de ensayos para determinar la existencia de alguna sustancia tóxica de origen fúngico inductora de los síntomas en estaquillas.

Aislados de *Phytophthora* se cultivaron en el medio V-8 diluido 1:4, en agitación durante 15 días. El medio de cultivo se pasó sucesivamente a través de una serie de membranas de Acetato de Celulosa con un poro final de 0.20 µm de diámetro, obteniéndose así un extracto libre de *Phytophthora*. Estaquillas de olivo sin enraizar, y previamente desinfestadas, se dispusieron en perlita estéril a la que se le añadió el extracto filtrado obtenido anteriormente. Se ensayaron las variedades 'Picual' y 'Manzanilla de Sevilla', controles de alta y baja susceptibilidad respectivamente, utilizados en las evaluaciones de resistencia de olivo a *Phytophthora* spp.

La inoculación con el filtrado libre de *Phytophthora* reprodujo los mismos síntomas en las estaquillas que la inoculación con el patógeno, apreciándose las diferencias de susceptibilidad entre los dos cultivares. Así pues, se demuestra la existencia de sustancias tóxicas producidas por *Phytophthora* como factor responsable de la reacción sintomatológica observada en las estaquillas.

EFFECTOS DEL ESTRÉS HÍDRICO EN EL PATOSISTEMA DE LA ENFERMEDAD DE PETRI EN VID (*Vitis vinifera* L.)

REDONDO, C.; GONZÁLEZ, A.; GAFORIO, L.; PASTOR, S.; TELLO, M.L.

Instituto Madrileño de Investigación Agraria y Alimentaria (I.M.I.A.). Autovía del Nordeste A-2, km 38.2, 28800 Alcalá de Henares, Madrid

La enfermedad de Petri, definida como la muerte de las vides jóvenes causada por el hongo *Phaeomoniella chlamydospora*, constituye en la actualidad uno de los mayores problemas fitosanitarios en los viñedos de nueva implantación en España. Debido a la prohibición del tratamiento con arsenito sódico y en ausencia de tratamientos alternativos, la prevención y el manejo de las técnicas culturales constituyen las únicas herramientas efectivas para el control de la enfermedad. En este sentido, la adecuación de las condiciones de cultivo que favorezcan el desarrollo de la planta puede influir en la incidencia de la enfermedad. En este trabajo, se estudia la relación existente entre el estado fisiológico de las plantas crecidas bajo diferentes regímenes hídricos y la susceptibilidad de las mismas ante la infección del patógeno, analizando la capacidad infectiva del hongo y su progresión en los tejidos del huésped en cada tratamiento de riego.

Se utilizaron dos grupos de plantas, inoculadas con *P. chlamydospora* y controles sin inocular. Se dispusieron en tres bloques de riego correspondientes al 100, 50 y 25 % de la capacidad de campo de los contenedores.

Una vez analizados los resultados se comprobó que existen diferencias significativas ($p < 0,05$) en el contenido hídrico relativo medido en las hojas de las plantas sometidas a los tres tratamientos de riego. También se constató el efecto significativo de la inoculación ($p < 0,05$) presentando lesiones de mayor tamaño las plantas inoculadas. Las plantas sometidas a estrés hídrico e inoculadas con el patógeno presentaron heridas de menor tamaño que las plantas control.

Estos datos parecen indicar que tanto el régimen hídrico como el desarrollo de la enfermedad afectaron a la actividad fotosintética de las plantas. Por tanto sería interesante conocer las condiciones de riego que permitan un adecuado desarrollo de la planta y limiten el progreso de la enfermedad, sin limitar de forma importante la producción del cultivo.

PATOGENICIDAD DE *Botryosphaeria* sp. EN OLIVO

ROMERO, M.A.; SÁNCHEZ, M.E.; TRAPERO, A.

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

La variedad de olivo 'Gordal de Sevilla' se utiliza casi exclusivamente para la producción de aceituna de mesa, alcanzando en la provincia de Sevilla un importante valor económico y social. En los años 2001-2003 se ha observado en diversos olivares de esta variedad una desecación de ramillas que aparecen distribuidas aleatoriamente por la copa del árbol, en las que podían permanecer prendidas un cierto tiempo las hojas secas de color atabacado. Estos síntomas recordaban a los daños del mosquito de la corteza (*Reseliella oleisuga*), pero no se pudo encontrar ningún agente asociado a los mismos. Una observación más detallada, nos permitió detectar la presencia de chancros en las ramas afectadas. Se realizaron aislamientos de los chancros observados utilizando como medio de crecimiento PDAA. La especie fúngica consistentemente asociada a estos aislamientos se identificó como *Botryosphaeria* sp., anamorfo tipo *Fusicoccum* sp. Una vez identificado el agente asociado con los síntomas, se realizó un ensayo de patogenicidad de *Botryosphaeria* sp. en 'Gordal de Sevilla'. Se utilizaron dos aislados (FO-1 y FO-12) y tres tipos de inoculación: micelio en crecimiento activo con herida, micelio en crecimiento activo sin herida, suspensión conidial con herida y sus correspondientes testigos. Se emplearon plantones de 'Gordal' injertados sobre acebuches de unos 4 años de edad y se inocularon tres plantones por aislado y por tipo de inoculación. Sólo en la inoculación con micelio en crecimiento activo con herida se observaron los síntomas descritos en campo: muerte apical del plantón hasta alcanzar el punto de inoculación y anillado de la rama en dicho punto. En los otros dos tipos de inoculación, lo único que se observó fue un chancro alrededor del punto de inoculación que no llegaba a anillar la rama. Por otro lado, los testigos no presentaron ningún síntoma. De los plantones inoculados se reaisló al género *Fusicoccum* sp. en los tres tipos de inoculación. Esta es la primera descripción de una especie de *Botryosphaeria*/*Fusicoccum* causando enfermedad en olivo. Los ensayos de patogenicidad indican que las heridas favorecen el desarrollo de infecciones, aunque no son necesarias para su establecimiento.

LA INTERACCION *Meloidogyne incognita* Y *Phytophthora capsici* EN PIMIENTO

ROS, C.¹; BELLO, A.²; LÓPEZ, J.A.²; MARTÍNEZ, M.C.³; GUERRERO, M.M.³; LACASA, A.³

¹Programa de Colaboración FECOAM-CAAMA, Caballero, 3. 30002 Murcia

²Centro de Ciencias Medioambientales, CSIC, Serrano,115apdo.28006 Madrid

³IMIDA, Mayor s/n, 30150 La Alberca (Murcia)

Phytophthora capsici y *Meloidogyne incognita* son los principales patógenos del suelo en los cultivos de pimiento en invernadero en la Región de Murcia, realizándose desinfecciones con bromuro de metilo (BrMe) todos los años para su control. El injerto sobre patrones portadores de resistencia a uno o a ambos patógenos se ha evaluado como una alternativa al BrMe. La reiteración del cultivo de patrones resistentes a *M. incognita* en el mismo suelo provoca en algunos invernaderos, la aparición de poblaciones virulentas, capaces de infestar estos patrones, sin que, por el momento, haya ocurrido algo similar con *P. capsici*. En condiciones controladas (cámara climatizada: 23±1°C; 45-60% de H.R. durante el periodo iluminado y 85-100% en el periodo oscuro de la jornada; fotoperiodo 14:8) se ha estudiado la posible interacción de *M. incognita* en la infección por *P. capsici*, que pudiera comprometer la resistencia del hongo. Se utilizaron 3 poblaciones de *M. incognita* (A, B, y C) obtenidas de pimiento y dos aislados de *P. capsici* de diferente agresividad, también obtenidos de pimiento. La interacción se evaluó inoculando cada uno de los patógenos y ambos juntos en un pimiento sensible (cv Sonar) y en tres patrones (C2, C25 y C30) que se comportan como resistente a *P. capsici* y/o *M. incognita*.

Las tres poblaciones del nematodo facilita la instalación de *P. capsici* en las raíces de patrones resistentes al hongo, provocando una reducción en el desarrollo radicular y el oscurecimiento, lo que no sucede cuando se inocula por separado el hongo o el nematodo, pero no se producen síntomas de marchitez o "seca" de las plantas. Esta respuesta fue más acentuada con los aislados más agresivos y varió con las poblaciones del nematodo. La población "B" colonizó las raíces de los patrones con abundantes nódulos, como ocurrió con las otras en la variedad sensible. Con las poblaciones A y C no se produjeron alteraciones en las raíces cuando se inoculó con cualquiera de los dos aislados.

DINÁMICA DE LAS POBLACIONES DE *Meloidogyne incognita* EN CULTIVOS DE PIMIENTO EN INVERNADERO

ROS, C.¹; GUERRERO, M.M.²; BARCELÓ, N.²; MARTÍNEZ, M.A.²; MARTÍNEZ, M.C.²; BELLO, A.³; LACASA, A.²

¹ Programa de Colaboración FECOAM-CAAMA, Caballero, 13, 30.002 Murcia

² IMIDA, Mayor s/n, 30150 La Alberca (Murcia)

³ Centro de Ciencias Medioambientales, CSIC, Serrano, 115 dpdo. 28.006 Madrid

En los cultivos de pimiento realizados en los invernaderos de Murcia y del Sur de Alicante *Meloidogyne incognita* es uno de los principales patógenos. La desinfección del suelo con bromuro de metilo (BrMe) es una práctica habitual en todos los invernaderos desde hace más de 16 años, motivada por la presencia de *Phytophthora capsici* y para paliar los efectos de la fatiga del suelo, generada por la reiteración del cultivo en el mismo suelo. Al dejar de utilizar el BrMe afloran las poblaciones del nematodo a niveles que provocan reducciones en el desarrollo de las plantas y mermas notables en la producción. Con objeto de establecer estrategias de control eficaces y sostenibles, se han iniciado estudios de dinámica poblacional que permitan elaborar modelos epidemiológicos en base a los niveles térmicos y de daños. En dos invernaderos experimentales contaminados del nematodo se ha seguido la evolución de las densidades poblacionales de juveniles en la rizosfera, el índice de nodulación en las raíces de las plantas y se ha registrado la temperatura en el ambiente y en el suelo durante dos campañas consecutivas, en ciclos de cultivo de diciembre a agosto. Se observaron variaciones en el comportamiento poblacional, tanto entre invernaderos como entre campañas, en consonancia con las temperaturas medias del suelo y del ambiente. En la campaña 2001/02 los primeros juveniles en la rizosfera se encontraron poco después de observar los primeros nódulos en las raíces. A partir de principios de abril las poblaciones se incrementaron de forma permanente, al tiempo que lo hacían los índices de nodulación. En la campaña 2002/03 los mismos hechos se dieron con un mes de retraso, dado que no fue hasta principios de mayo que la temperatura media del ambiente alcanzara valores superiores a 20°C. En otro invernadero de mayores dimensiones y más fuertemente infestado, durante febrero y marzo se detectaron juveniles en la rizosfera y un nivel estable de nódulos en las raíces, hasta llegar a mediados de abril en que ambos parámetros aumentaron de forma rápida, al tiempo que la temperatura superaba los 20°C. Los resultados vienen a indicar que sería en las fases iniciales del cultivo cuando se debería realizar las intervenciones orientadas al control, ya que a partir de principios de abril los niveles poblacionales son muy elevados.

VARIACIONES EN LA PATOGENEICIDAD DE POBLACIONES DE *Meloidogyne incognita* EN PIMIENTO

ROS, C.¹; GUERRERO, M.M.²; BELLO, A.³; BARCELÓ, N.²; MARTÍNEZ, M.A.²; MARTÍNEZ, M.C.²; LACASA, A.²

¹ Programa de Colaboración FECOAM-CAAMA, Caballero, 13, 30.002 Murcia

² IMIDA, Mayor s/n, 30.150 La Alberca (Murcia)

³ Centro de Ciencias Medioambientales, CSIC, Serrano, 115 dpdo. 28.006 Madrid

La mayor parte de los suelos de los invernaderos destinados al monocultivo de pimiento en la comarca del Campo de Cartagena están contaminados por *Phytophthora capsici* y por *Meloidogyne incognita*, por lo que, anualmente, se desinfectan con bromuro de metilo. El injerto en patrones vigorosos y portadores de resistencia a los patógenos se ha ensayado como un modo de control de las enfermedades, que permita reducir las intervenciones químicas al suelo. En algunos invernaderos donde se realizaron ensayos en campañas precedentes se produjo la colonización de los patrones a partir del segundo año de reiteración del mismo patrón en el mismo suelo. Con el objeto de contrastar, en condiciones naturales, la variabilidad patogénica de las poblaciones del nematodo se pusieron plantas injertadas (patrones C25, C29 y GuJT2) en dos invernaderos experimentales contaminados de *M. incognita*, situados en la misma finca. En ambos invernaderos las plantas injertadas se pusieron en parcelas no desinfectadas y desinfectadas (BrMe, biofumigación, biofumigación + solarización) en un diseño de bloques al azar con tres repeticiones, alternando filas de plantas injertadas y no injertadas. A lo largo del cultivo se evaluó el desarrollo de las plantas, la producción; al final del ensayo se arrancaron las plantas y se examinaron las raíces anotando la proporción de infestadas y el índice de nodulación. En uno de los invernaderos no hubo infestación en las plantas injertadas en ninguna de los tratamientos, mientras en las no injertadas la incidencia del nematodo varió según el tratamiento (2'4 de índice medio de nodulación y 50% de plantas infestadas en el testigo y el 2'7 y 67%, respectivamente en lo biofumigado). En el otro invernadero, las plantas injertadas se infestaron (1'5 y 55'6% en el testigo y 1,2 y 56% en el biofumigado) cuando en las plantas sin injertar la incidencia varió entre 7 y 100% en el testigo y en el biofumigado, 6 y 93% en el biofumigado y solarizado y 4 y 80% en el BrMe. Los resultados parecen indicar que la estabilidad del comportamiento de la resistencia de los patrones depende de la población del nematodo y que la selección de poblaciones capaces de colonizar patrones resistentes se produce en un ciclo de cultivo, por lo que será preciso establecer estrategias integradas para el uso de las resistencias.

EVALUACIÓN DE SELECCIONES DE CASTAÑO ANDALUZAS POR SU RESISTENCIA A LA TINTA

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

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

La podredumbre de raíz que causa *Phytophthora cinnamomi* en castaño (enfermedad de la Tinta) está extendida en gran parte de la zona de distribución del castaño en Andalucía: Sierra de Aracena (Huelva), Sierra de Córdoba y Valle del Genal (Málaga). La enfermedad aparece en rodales de extensión variable según las zonas, así como en árboles individuales muertos o puntisecos.

A partir del tejido necrótico de las raicillas y suelo de la rizosfera de los árboles sintomáticos muestreados, se aisló e identificó al oomiceto *P. cinnamomi*. Para estudiar la patogenicidad de los distintos aislados obtenidos se realizaron inoculaciones de plantones sanos de castaño con 17 aislados procedentes de Huelva y Málaga. En todos los casos se han reproducido los síntomas de la enfermedad en las plantas inoculadas, con elevados porcentajes de reaislamiento del hongo. Se observaron diferencias significativas entre aislados en cuanto a la severidad de síntomas aéreos y radicales obtenidos, aunque no se han podido establecer grupos homogéneos en función de su origen.

Para la evaluación de selecciones de castaño resistentes a la podredumbre radical causada por *P. cinnamomi*, se obtuvieron plantones sanos a partir de semillas de árboles asintomáticos que se encontraban en el interior o en los bordes de rodales afectados de la enfermedad. La evaluación de 36 selecciones procedentes de Almería, Córdoba, Granada, Huelva y Málaga se realizó inoculando los plantones con un aislado altamente virulento procedente del foco más activo en la actualidad, situado en el término municipal de Benalauría (Málaga). Aunque en la mayoría de los casos (26 selecciones de las 36 evaluadas) el resultado final fue la totalidad de las plantas muertas o muy afectadas, se observó que el momento de aparición de los primeros síntomas y la severidad en la parte aérea varió notablemente entre individuos de la misma selección, así como entre las selecciones. Tan sólo en 10 de las selecciones evaluadas se obtuvieron plantas asintomáticas al concluir el ensayo, aunque en muy bajos porcentajes. Estos resultados demuestran que en las plántulas de semilla existe una amplia variabilidad respecto a la resistencia a la Tinta y, aunque dominan los individuos susceptibles, también se pueden obtener individuos resistentes.

ANÁLISIS MOLECULAR DE LA RESPUESTA DE LOS FRUTOS CÍTRICOS FRENTE A LA INFECCIÓN POR *Penicillium digitatum*

SÁNCHEZ-TORRES, P.; MARCOS, J.F.; GONZÁLEZ-CANDELAS, L.

Laboratorio de Postcosecha. Departamento de Ciencia de los Alimentos. Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos (IATA-CSIC). Apartado de correos 73, Burjassot. 46100-Valencia. E-mail: lgonzalez@iata.csic.es

El principal agente patógeno de los frutos cítricos durante la postcosecha es el hongo *Penicillium digitatum*, un patógeno de herida responsable de la podredumbre verde. Las principales líneas de investigación en este patosistema están dirigidas a desarrollar sistemas alternativos al tratamiento con fungicidas químicos de síntesis, pero es muy escasa la información relativa a los mecanismos de defensa naturales del fruto. Con el fin de profundizar en el conocimiento de los mismos, hemos abordado el aislamiento e identificación de genes del fruto que se expresan diferencialmente en respuesta a la infección por *P. digitatum*. Utilizando la técnica de hibridación substractiva mediada por PCR supresivo (SSH, Supresión Subtractive Hybridization), hemos construido una genoteca de fragmentos de cDNA enriquecida en genes que se expresan más abundantemente en la corteza de naranja a las 24 h después de la inoculación del patógeno con respecto a un control inoculado con agua (respuesta a herida mecánica). Los insertos de los clones individuales fueron amplificados mediante PCR e impresos en una macromatriz de nailon que contiene representantes de 1536 clones individuales, incluyendo diversos controles tanto negativos como clones previamente caracterizados en nuestro grupo en relación a la interacción naranja-*P. digitatum*. Réplicas de estas macromatrices fueron hibridadas con sondas obtenidas a partir de las mismas poblaciones de mRNA empleadas en la construcción de la genoteca. De esta forma, hemos categorizado los distintos cDNAs en función del nivel de inducción que presentan en el tejido infectado respecto al tejido herido. A partir de esta información seleccionamos para secuenciar 240 clones representantes de las distintas categorías. El análisis de las secuencias nucleotídicas nos proporciona una primera idea de qué rutas metabólicas o procesos celulares se encuentran más representados en esta colección de clones. Finalmente, llevamos a cabo un análisis de la expresión temporal de un grupo representativo de estos genes mediante hibridación Northern con el fin de validar los resultados obtenidos con las macromatrices.

PARASITISMO FACULTATIVO MUY DÉBIL DEL HONGO *Truncatella hartigii* EN PINO PIÑONERO

TUSET, J.; HINAREJOS, C.; MIRA, J.L.; HINAREJOS, R.

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

En una importante masa forestal compuesta de *Pinus pinea* y situada en el área mediterránea, un gran número de árboles mostraban síntomas de decoloración progresiva de la parte foliar con las acículas amarillentas que, en algunos casos, éstas aparecían secas. Este secado avanzaba progresivamente desde el ápice de la acícula hacia la base, observándose con frecuencia pequeñas manchas oscuras, tanto en las acículas verdes como en las amarillentas. De ambas, en el laboratorio, se aisló el hongo *Truncatella hartigii*, especie polífaga, aunque actualmente confinada, casi exclusivamente, a las coníferas. La capacidad patógena de este hongo, a través de la literatura, no está del todo clarificada. La importancia de los daños observados y la dudosa capacidad patógena de este hongo, nos indujo a profundizar en el estudio de la relación hospedante-patógeno con el objeto de precisar las condiciones, tanto del sustrato como ambientales, que son necesarias para que *T. hartigii* pueda infectar y colonizar los tejidos del pino piñonero. Para ello, se realizó una experiencia en plantas jóvenes de pino piñonero (7-8 meses de edad), consistente en la inoculación del hongo empleando conidios suspendidos en agua de lluvia a una concentración de $2.5-3 \times 10^5$ conidios/ml. y pulverizados sobre el follaje. Los pinitos se sometieron a tres regímenes de riego con anterioridad y posterioridad a la inoculación para conseguir distintos valores de humedad en los tejidos foliares. A los 40 días se iniciaron los controles, observando detenidamente acículas y tallos para comprobar posibles daños y presencia de fructificaciones esporógenas y, en el laboratorio, sembrando en medio de cultivo axénico con el fin de poder aislar el hongo. Los resultados han sido totalmente negativos, no logrando contaminar las plantas en ninguno de los tres regímenes de riego ensayados. Esto demuestra que la capacidad patógena de *T. hartigii* se ha manifestado muy débil, necesitando tejido vegetal muy poco irrigado y con claros síntomas de marchitamiento, para poder completar su ciclo biológico.

EVOLUCIÓN DE LA SENSIBILIDAD AL OÍDIO CON LA FOLIACIÓN EN CLONES DE *Quercus robur*

VÁZQUEZ-RUIZ DE OCENDA, R.A.; IGLESIAS, I.

Escola Politécnica Superior. Universidad de Santiago de Compostela. Campus de Lugo. 27002, Lugo. E-mail: bvocenda@lugo.usc.es

El oídio, enfermedad endémica causada por el hongo *Microsphaera alphitoides*, afecta a los brotes y hojas de la especie *Quercus robur*, de amplia distribución en Galicia. Su importancia en masas antiguas es pequeña dada la aclimatación llevada a cabo por estos árboles a lo largo de los años. El problema se manifiesta en los viveros con plantas jóvenes y, especialmente, en aquellas que están siendo seleccionadas para planta ornamental. Durante el año 2003, y tras dos años de estudios previos; se ha hecho un seguimiento de la respuesta de una plantación experimental a la presión del inóculo ambiental a lo largo del período de foliación (Mayo-Noviembre). La plantación tenía 20 ejemplares de *Quercus robur* "Fastigiata-koster" (QrF-K) obtenidos por injerto y 78 clones procedentes de semilla de *Quercus robur* var. *fastigiata* (Qr var. *fastigiata*). Se establecieron 4 niveles de ataque en función del nº de colonias del hongo y superficie foliar afectada. Asimismo, en 12 de los 78 clones se analizó la evolución de varios factores anatómicos que pueden estar relacionados con la resistencia al oídio (ej.: densidad estomática y densidad de tricomas) y también la evolución de la flora fúngica acompañante. Los datos obtenidos muestran, como cabía esperar, que los individuos de QrF-K son muy homogéneos en su respuesta a la presión del inóculo ambiental con una sensibilidad al oídio entre baja y media. Por su parte, los clones de Qr var. *fastigiata* muestran una gran heterogeneidad aunque su sensibilidad es, en general, entre media y alta durante el período de mayor ataque del hongo que se sitúa entre finales de Junio y Septiembre. Coincide con este período un descenso general en la densidad de tricomas ($<100/\text{mm}^2$), especialmente marcado en QrF-K ($<40/\text{mm}^2$), mientras que la densidad estomática ofrece un comportamiento más variable ($150\text{-}450/\text{mm}^2$). De la flora fúngica aislada destaca la presencia de *Botrytis cinerea* (Mayo-Junio) y la progresiva aparición de Dematiaceos (Julio-Noviembre).

EVALUACIÓN DE LA VARIABILIDAD GENÉTICA MEDIANTE EL EMPLEO DE MARCADORES RAPD DE AISLADOS DE *Fusarium oxysporum* Y *F. moniliforme* DEL COMPLEJO FÚNGICO CAUSANTE DEL DAMPING-OFF EN VIVEROS FORESTALES

ALVES-SANTOS, F.M.; SANTAMARÍA, O.; PAJARES, J.A.; DIEZ-CASERO, J.J.

Dpto. de Producción Vegetal y Recursos Forestales. U. de Valladolid. E. T. S. de Ingenierías Agrarias. Av./ Madrid 57. 34004. Palencia. E-mail: fmalvess@pvs.uva.es

Fusarium es un hongo de importancia económica tanto en cultivos herbáceos como forestales. Dentro del complejo causante del dumping off en viveros forestales destacan por su presencia las especies *Fusarium oxysporum* y *F. moniliforme*.

Un total de 23 aislados recuperados de plantas sintomáticas fueron analizados. Diez de ellos fueron identificados como *F. oxysporum* y trece como *F. moniliforme*. Tras la obtención de ADN a partir de micelio liofilizado se ensayaron veinte decámeros diferentes con un contenido G+C mayor del 60% (OPC primer kit de Operon). Basándose en la intensidad, claridad y reproducibilidad de los fragmentos amplificados se seleccionaron 22 marcadores polimórficos. Dos marcadores (OPC2.1 y OPC6.1) fueron exclusivos del aislado Fo2 (*F. oxysporum*). Otros marcadores como OPC6.3 y OPC18.5 estuvieron presentes en la mayoría de aislados de *F. oxysporum* y ausentes en *F. moniliforme*. Cabe destacar que ningún marcador apareció asociado a *F. moniliforme* y ausente en *F. oxysporum*. Los datos fueron analizados mediante el cálculo de la matriz de distancia genética con las formulas de Nei y Li o Sokal y Sneath con el programa RAPDistance. En ambos casos los resultados fueron similares. Los filogramas fueron creados con el paquete informático PHYLIP. Del análisis de los mismos podemos diferenciar un grupo de *F. oxysporum* y otro de mayor tamaño englobando aislados de ambas especies. Dentro de este grupo mayor también se puede diferenciar un grupo de *F. moniliforme*.

Nuestros datos sugieren que el análisis de marcadores RAPD es, por su eficiencia; una herramienta útil en el establecimiento de diferencias genéticas a nivel intraespecífico.

El presente trabajo ha sido financiado por el Ministerio de Ciencia y Tecnología, y Fondos FEDER, dentro del Plan Nacional de I+D+I 2000-2003 (Proyecto AGL2001-1771).

INTERACCIONES *Meloidogyne artiellia*-*Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* RAZA 1 EN GENOTIPOS DE GARBANZO

CASTILLO, P.¹; RODRÍGUEZ-LÓPEZ, J.¹; LANDA, B.B.^{1,2}; NAVAS-CORTÉS, J.A.¹; JIMÉNEZ-DÍAZ, R.M.^{1,2}

¹Instituto de Agricultura Sostenible, CSIC, Apdo. 4084, 14080 Córdoba.
ag1cascp@uco.es

²Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos y Montes, Universidad de Córdoba, Apdo. 3048, 14080 Córdoba.

La utilización de cultivares resistentes al patógeno es la estrategia de control de la Fusariosis Vascular del garbanzo (*Fusarium oxysporum* f.sp. *ciceris*) más práctica y económicamente eficiente en la Agricultura Sostenible. Sin embargo, dicha eficiencia y su aplicabilidad pueden verse comprometidas por la existencia de razas del patógeno (resistencia raza-específica) y por interacciones múltiples del genotipo resistente con otros agentes en combinaciones compatibles o incompatibles. Investigaciones anteriores sobre este último escenario indicaron que la resistencia a *F. oxysporum* f.sp. *ciceris* raza 5 puede ser anulada por la coinfección de la planta resistente al hongo por el nematodo nodulador *Meloidogyne artiellia*; y que dicha supresión puede ser influida por la naturaleza del genotipo resistente y la densidad de inóculo de la raza 5. En este trabajo se ha investigado si la naturaleza de la raza de *F. oxysporum* f.sp. *ciceris* determina el resultado de la interacción del genotipo resistente al hongo con el nematodo, y utilizando en el estudio genotipos representativos de la diversidad de germoplasma de garbanzo que contiene fuentes de dicha resistencia. A tal efecto, se ha estudiado la interacción de la raza 1A de *F. oxysporum* f.sp. *ciceris* con *M. artiellia* en genotipos de garbanzo del tipo 'kabuli' ('ICC1416K', 'CA334-20-4-2-3' y 'CA 336-14-3-3') y 'desi' ('BG 212' y 'WR 315') que muestran resistencia múltiple a varias razas patogénicas del hongo. Las plantas se inocularon simultáneamente con 6.000 clamidosporas/g suelo de *F. oxysporum* f.sp. *ciceris* raza 1A y 20 huevos + juveniles/cm³ de suelo de *M. artiellia*, y se incubaron en condiciones óptimas para la Fusariosis Vascular. Los resultados indican que, en estas condiciones, la resistencia de los genotipos de garbanzo referidos a la raza 1A es estable, no siendo modificada por la coinfección de la planta por *M. artiellia*. No obstante, la colonización del sistema radical de aquéllos, determinada por el número de propágulos/g de raíz, fue influida por el genotipo de garbanzo y fue significativamente mayor en las plantas coinfectadas por ambos patógenos que en aquéllas que fueron infectadas sólo por *F. oxysporum* f.sp. *ciceris* raza 1A. Investigación subvencionada por el Proyecto AGL2003-00640

VARIACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE GENES QUE CODIFICAN PARA PEROXIDASA EN UNA LÍNEA DE TRIGO RESISTENTE A *Heterodera avenae* EN RESPUESTA AL ATAQUE DEL NEMATODO

LÓPEZ-BRAÑA, I.¹; GONZÁLEZ-BELINCHÓN, C.M.¹; MORENO, S.¹; DELIBES, A.¹; ROMERO, M.D.²; ANDRÉS, M.F.²; MARTÍN-SÁNCHEZ, J.A.³

¹Dtos. Biotecnología y Biología, ETSI Agrónomos, U. Politécnica de Madrid

²Dto. Protección Vegetal, Centro de Ciencias Medioambientales, CSIC, Madrid

³Dto. Producción Vegetal y Ciencia Forestal, Centre R+D, UdL-IRTA, Lleida

El gen *Cre2* que confiere resistencia al nematodo de quiste de los cereales "*Heterodera avenae*" se ha transferido desde *Aegilops ventricosa* a la línea de introgresión con trigo, H-93-8, mediante el cruzamiento [(*T. turgidum* x *Ae. ventricosa*) x *T. aestivum*]. Se ha analizado por Northern la variación de la concentración de mRNAs que codifican para peroxidasas, en distintos tejidos de esta línea de introgresión, infectadas y sin infectar por el nematodo, utilizando su parental trigo como control susceptible. Se observó una mayor inducción de dichos mRNAs en respuesta al ataque por el nematodo en la raíz de la línea resistente, alcanzando la cota máxima a los siete días post-infección y en la zona adyacente al nematodo. Un resultado similar se obtuvo al valorar en este mismo material la actividad peroxidasa por espectrofotometría, alcanzándose la mayor actividad enzimática en la raíz de la línea resistente a los 11 días post-infección. El análisis de peroxidasas por isoelectroenfoque, utilizando diferentes rangos de anfolinas, confirmó este resultado y se determinaron las isoformas que variaban en intensidad en respuesta al ataque del nematodo. Se han clonado y secuenciado los productos de la reacción de RT-PCR utilizando como primer en la segunda reacción una secuencia común para las peroxidasas de trigo. Se deduce que alguno de ellos se corresponde con el gen *pox2* que según la bibliografía, se expresa predominantemente en la raíz a unos niveles que varían en función de distintos tipos de estrés. Alguno de estos productos parecen ser específicos de la zona de la raíz donde el nematodo establece su lugar de alimentación.

DESCRIPCIÓN DE UN MARCADOR MOLECULAR PARA EL GEN *Cre2* QUE CONFIERE RESISTENCIA A *Heterodera avenae*. CARACTERIZACIÓN AGRONÓMICA DE UNA LÍNEA AVANZADA CON *Cre2*

MORENO, S.¹; GONZÁLEZ-BELINCHÓN, C.M.¹; MAURO, M.¹; LÓPEZ-BRAÑA, I.¹; DELIBES, A.¹; ROMERO, M.D.²; ANDRÉS, M.F.²; MARTÍN-SÁNCHEZ, J.A.³; SIN, E.³; MARTÍNEZ, C.³

¹Dtos. Biotecnología y Biología, ETSI Agrónomos, Universidad Politécnica de Madrid. * Dirección actual CIMMYT, México

²Dto. Protección Vegetal, Centro de Ciencias Medioambientales, CSIC, Madrid

³Dto. Producción Vegetal y Ciencia Forestal, Centre R+D, UdL-IRTA, Lleida

Heterodera avenae Woll., es un nematodo endoparásito sedentario formador de quistes que puede provocar pérdidas considerables en cultivos de cereal. El gen *Cre2*, que confiere resistencia a *H. avenae*, fue descrito en una línea de introgresión trigo/*Aegilops ventricosa* (H-93-8) que ha servido como base para la introducción de la resistencia en líneas avanzadas de mejora. Entre éstas destaca la línea ID2150 cuya evaluación preliminar se presenta aquí. Se estudia su comportamiento agronómico en 14 ambientes distintos; así como los cambios producidos en respuesta al ataque del nematodo en la expresión de enzimas detoxificantes, previamente relacionadas con la resistencia en trigo conferida por los genes *Cre*. La búsqueda de marcadores moleculares ligados a *Cre2* que faciliten la introgresión de la resistencia en trigos de interés comercial ha sido prioritaria en nuestro grupo. Se han analizado marcadores isoenzimáticos y de ADN tipo RAPDs, RFLPs, etc. Hasta ahora solo se ha encontrado un marcador RAPD, pero la detección de líneas avanzadas recombinantes aconseja la búsqueda de nuevos marcadores más estrechamente ligados a la resistencia. La mayoría de los genes de resistencia conocidos dan lugar a proteínas intracelulares constituidas por una región central con un sitio de unión a nucleótidos (NBS) y una región C-terminal con repeticiones imperfectas de un motivo rico en leucina (LRR). En este trabajo se describe la obtención de un nuevo marcador para *Cre2* mediante una estrategia original que requiere la amplificación de ADN mediante la combinación de cebadores con la secuencia de un motivo hidrofóbico conservado situado en la región 3' terminal del dominio NBS y de cebadores con las secuencias de motivos conservados de elementos móviles. De estos últimos, se seleccionaron aquellos con un elevado número de copias y una inserción preferente en aquellas zonas del genoma con mayor concentración de genes.

PUESTA A PUNTO DE LA TÉCNICA RAPD-PCR PARA EL ANÁLISIS DE LA DIVERSIDAD GENÉTICA DE POBLACIONES DE LA RAZA F DE JOPO DE GIRASOL (*O. cumana*)

MOLINERO-RUIZ, M.L.; MELERO, J.M.

Instituto de Agricultura Sostenible, C.S.I.C., Alameda del Obispo s/n, Apdo. 4084, 14080 Córdoba. E-mail: ag2morum@uco.es

El jopo de girasol (*O. cumana*) es la principal enfermedad del cultivo en España, pudiendo causar pérdidas de cosecha de hasta un 50%. El método de control más eficaz es la incorporación de resistencia en los híbridos de girasol cultivados. No obstante, el patógeno evoluciona hacia razas de mayor virulencia. A mediados de los 90 se identificó la raza más virulenta hasta el momento (raza F) y en los últimos años su frecuencia ha aumentado en todas las zonas de cultivo de girasol. Existen indicios de que poblaciones de la raza F de Castilla La Mancha no presentan el mismo patrón de virulencia que otras poblaciones de Andalucía de la misma raza. La comparación entre poblaciones de *O. cumana* de la raza F puede llevarse a cabo mediante la caracterización de sus virulencias sobre genotipos del huésped portadores de resistencia de diferente origen, pero también mediante el uso de marcadores RAPD, los cuales pueden generar patrones de bandas con polimorfismos de interés que permitan agrupar las poblaciones en función de su procedencia geográfica o de su virulencia sobre material resistente. En el presente trabajo se planteó el análisis de la diversidad genética de poblaciones de la raza F de jopo mediante marcadores RAPD. Se incluyeron seis poblaciones de *O. cumana* de Andalucía y dos de Castilla - La Mancha, todas ellas recogidas sobre la línea de girasol NR5, portadora del gen *Or5* de resistencia a la raza E. Se eligió un método adecuado para la extracción del ADN genómico total de seis plantas de cada una de las poblaciones. Para efectuar las reacciones RAPD-PCR se ensayaron los factores: temperatura de hibridación, concentración de $MgCl_2$, unidades de polimerasa y cantidad de ADN molde en el volumen de reacción. Las reacciones que aportaron resultados de mayor consistencia se llevaron a cabo con 20 ng de ADN genómico, 2 mM de $MgCl_2$ y 0.5 unidades de polimerasa. La temperatura de hibridación más adecuada se estableció en 36°C. Tres de los 44 iniciadores ensayados amplificaron el ADN de las ocho poblaciones y generaron polimorfismos de bandas de tamaños entre 240 y 1400 pb. Una vez ensayado un número mayor de iniciadores y comprobada la consistencia de los resultados para los que resulten de interés, se elaborará un dendograma que agrupe las poblaciones en función de su similitud. La agrupación de las poblaciones establecida se relacionará con su virulencia y/o procedencia geográfica.

CARACTERIZACIÓN DE GENES ASOCIADOS CON LA MANIFESTACIÓN DE SÍNTOMAS INDUCIDOS POR EL VIRUS DE LA TRISTEZA DE LOS CÍTRICOS (CTV) USANDO MICROMATRICES DE cDNA

GANDÍA, M.¹; CONESA, A.¹; ANCILLO, G.¹; GÓMEZ, G.²; PALLÁS, V.²; HERNÁNDEZ, C.²; FLORES, R.²; DURÁN-VILA, N.¹; MORENO, P.¹; GUERRI, J.¹

¹ Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (I.V.I.A.). Ctra/ Moncada-Náquera Km 5. 46113 Moncada (Valencia).

² Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas (I.B.M.C.P.). UPV-CSIC. Avda de los Naranjos s/n. 46022 Valencia.

La inducción de síntomas debe ser un fenómeno complejo que precise de la interacción de elementos del patógeno y del huésped. En este trabajo se pretende estudiar los cambios que se producen en el transcriptoma de cítricos inducidos por la infección de CTV mediante el uso de micromatrices de cDNA. Las micromatrices han sido desarrolladas dentro del proyecto “Genómica funcional de cítricos (CFGP)” (<http://citrusgenomics.ibmcp-ivia.upv.es>) y contienen mas de 6.500 unigenes diferentes, obtenidos a partir de 23 genotecas de cDNA de distintos tejidos y estadios de desarrollo, así como de árboles sometidos a distintas condiciones de estreses bióticos y abióticos, incluyendo una genoteca obtenida a partir de plantas infectadas con CTV. Las micromatrices se hibridaron con sondas marcadas con fluoróforos Cy3 y Cy5 (marcaje reverso o “dye swap”) obtenidas a partir de RNA total extraído de plantas de lima mexicana sanas o infectadas con el aislado severo de CTV T305. Se realizaron 5 réplicas biológicas. Los resultados obtenidos fueron analizados mediante el paquete “Lineal Models for Microarray Data” (limma) del proyecto R-Bioconductor. Se observó expresión diferencial en 192 genes, de los cuales 186 están sobreexpresados y 6 reprimidos. La mayoría estos están relacionados con procesos de estrés.

LOCALIZACIÓN SUBCELULAR EN *Nicotiana benthamiana* DEL SUPRESOR DEL SILENCIAMIENTO GÉNICO CODIFICADO POR *Beet yellows virus*

MEDINA, V.¹; REED, J.²; DOLJA, V.V.²

¹Dept. Producció Vegetal i Ciència Forestal. ETSEA. Universitat de Lleida. Avda. Alcalde Rovira Roure 191, 25198 Lleida.

²Dept. of Botany and Plant Pathology, Oregon State Univesity, USA
medinap@pvcf.udl.es

Beet yellows virus (BYV) es el miembro prototipo de la familia *Closteroviridae* cuyo genoma determina al menos 10 proteínas. La replicación y transcripción de BYV requiere dos replicasas y dos amplificadores de la acumulación de ARN, llamados proteinasa líder y la proteína de 21 kDa (p21). Las restantes proteínas no son necesarias en la replicación pero si son esenciales en el ensamblaje y transporte del closterovirus en la planta. P21 ha sido identificada como un supresor del silenciamiento génico ("RNA silencing suppressor", RSS) mostrando actividades similares a las exhibidas por dos proteínas de otros closterovirus aunque no presenta homologías con ningún RSS reconocido hasta el momento. Con el fin de conocer la distribución de la p21 a escala celular se han realizado análisis serológicos al microscopio láser confocal (MLSC) y al microscopio electrónico (ME) de hojas de *Nicotiana benthamiana* infectadas con BYV de forma natural o infiltradas con *Agrobacterium* para que expresaran p21 conjuntamente con la proteína verde fluorescente (GFP). El examen de la distribución del producto de fusión p21-GFP en células epidérmicas vivas se realizó a los dos días de la post-infiltración usando un MLSC. El estudio al SE ME realizó con secciones ultrafinas de material incluido en frío inmunomarcado con oro coloidal (IGL) usando antisueros específicos contra la p21 y las proteínas implicadas en la replicación: metiltransferasa (MET) y helicasa (HEL), realizándose IGLs simples y dobles. Los resultados muestran que p21 co-localiza con MET y HEL en los cuerpos vesiculares membranosos de inclusión donde se produce la replicación (complejos de replicación), se encuentra también en el citoplasma, a veces formado minúsculos agregados y forma acumulaciones en la periferia de la célula. P21 no parece acompañar a los virus aunque se puede detectar a su alrededor

IMMUNOLOCALIZACIÓN DE LOS PRODUCTOS GÉNICOS DEL ARN2 DE *Lettuce infectious yellows virus* (LIYV) EN PLANTA Y EN PROTOPLASTOS

MEDINA, V.¹; SUDARSHANA, M.R.²; TIAN, T.²; RALSTON, K.²; YEH, H.H.²; FALK, B.W.²

¹ Dept. Producció Vegetal i Ciència Forestal. ETSEA. Universitat de Lleida. Avda. Alcalde Rovira Roure 191, 25198 Lleida.

² Dept. of Plant Pathology, 1 Shields Ave. University of California, Davis, CA 95616, USA. medinap@pvcf.udl.es

Se han realizado estudios citológicos, de fraccionamiento celular, inmunológicos y de mutagénesis para analizar las infecciones producidas por el tipo salvaje y mutantes de *Lettuce infectious yellows virus* (LIYV), tanto en plantas como en protoplastos de *Nicotiana tabacum*. La observación al Microscopio Electrónico e inmunomarcaje con oro coloidal usando anticuerpos policlonales contra cuatro de los cinco productos génicos del ARN2 de LIYV (CP, CPm, HSP70h, y P59) reveló el marcaje específico de los viriones y de las típicas inclusiones membranosas tanto en plantas infectadas por LIYV como en protoplastos transfectados. En cambio, los anticuerpos contra otro producto génico del ARN2, el P26, mostró un marcaje específico de los llamados depósitos cónicos del plasmalema (PDs) en todas las muestras infectadas. Los PDs no se marcaron con antisueros contra otras proteínas virales y presentan viriones asociados a ellos. Al inocular protoplastos con transcritos del tipo salvaje y construcciones mutantes para el ARN2 de LIYV, el 2 - 5% mostraron las típicas inclusiones membranosas indicativas de la infección, al menos por LIYV-ARN1. La cantidad de protoplastos con viriones fue muy inferior a la de protoplastos con inclusiones. Los viriones se observaron en todos los mutantes, excepto en los carentes del gen de la CP (mutante CP-). Los PDs se observaron con dificultad en los mutantes CP- y CPm- y no se detectaron en los mutantes P26-, HSP70h- ó P59-. Las partículas semejantes a virus (VLPs) no están asociadas con los PDs en el caso del mutante CPm-. El análisis por inmunoblot indicó que P26 no está asociado a los viriones purificados. P26 se detectó únicamente en la fracción de la pared celular en extractos fraccionados de plantas infectadas por LIYV pero no en plantas sanas. Estos resultados sugieren que P26 no es una proteína que forme parte del virión

SECUENCIACIÓN Y CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE UN AISLADO AGRESIVO DE CTV DE ORIGEN ESPAÑOL

RUIZ-RUIZ, S.; MORENO, P.; GUERRI, J.; AMBRÓS, S.

Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias. Ctra Moncada a Náquera, Km.5 CP 46113. Valencia. E-mail: srui@ivia.es

Citrus tristeza virus (CTV) tiene un RNA genómico (gRNA) monocatenario de polaridad positiva de casi 20 Kb con 12 marcos de lectura. Se dispone de las secuencias completas de los aislados T36 y T30 de Florida, VT de Israel, T385 de España, SY568 de California, NUagA de Japón y Qaha de Egipto. Las de T36 y Qaha, por un lado, y las de T30 y T385 por otro, son casi idénticas, y la de SY568 parece el resultado de una recombinación entre T385/T30 y otra secuencia divergente. Los determinantes de patogenicidad de CTV son aún desconocidos, si bien hay estudios en curso con clones quiméricos de cDNA de los aislados T36 (inductor de decaimiento en plantas injertadas sobre naranjo amargo) y T30 (asintomático) de Florida. En el marco de un proyecto para estudiar otros determinantes de patogenicidad, hemos abordado la secuenciación del gRNA del aislado T318A de origen español, que induce acanaladuras en la madera de naranjo dulce y pomelo, como paso previo a la obtención de un clon infeccioso de este genotipo y quimeras con el genotipo asintomático T385. A partir de dsRNA se han sintetizado cDNAs que comprenden regiones extensas del gRNA mediante retrotranscripción y amplificación largas con alta fidelidad de copia. Se han obtenido clones de cuatro regiones solapantes que cubren la totalidad del gRNA, una de las cuales abarca prácticamente los 10 genes 3'-terminales (8 Kb), mientras que las otras tres abarcan en conjunto la mitad 5'. De cada región se han comparado numerosos clones mediante análisis del polimorfismo de conformación de DNA monocatenario (SSCP), secuenciándose dos clones representativos de la variante predominante en este aislado. En contraste con otros aislados virulentos de CTV, los datos obtenidos indican que T318A, obtenido previa transmisión por pulgones, tiene una variante de secuencia mayoritaria en todas las regiones analizadas. Además tiene una identidad nucleotídica muy elevada con la secuencia de los dos aislados más agresivos: con SY568 en su extremo 5'-terminal, y con éste y NuagA en los 5 genes 3'-terminales. Se presentan y discuten los resultados de los análisis comparativos de la secuencia de T318A con otras secuencias disponibles.

TIPOS DE COMPATIBILIDAD SEXUAL, RAZAS Y CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE AISLADOS DE *Podosphaera fusca*

MINGORANCE, E.¹; RIVERA, M.E.¹; ROMERO, D.¹; TORÉS, J.A.²; DE VICENTE, A.¹; PÉREZ-GARCÍA, A.¹

¹Departamento de Microbiología, Facultad de Ciencias, Universidad de Málaga. Campus Universitario de Teatinos s/n 29071. Málaga, España. E-mail: aperez@uma.es

²Estación Experimental "La Mayora" (CSIC) Algarrobo Costa, E-290750 Málaga, España.

Una de las principales enfermedades de origen fúngico que afecta al cultivo de las cucurbitáceas es el oídio, cuyos síntomas se caracterizan por la presencia de pequeñas manchas blanquecinas y de aspecto pulverulento sobre las partes aéreas de la planta. El agente causal del oídio de las cucurbitáceas en España es *Podosphaera fusca*, un hongo biotrofo estricto que genera graves problemas fitosanitarios fundamentalmente en melón y calabacín. *P. fusca* es un hongo heterotálico y requiere, por tanto, de la presencia de aislados de ambos tipos de compatibilidad (MAT1-1 y MAT 1-2) para iniciar el ciclo de reproducción sexual. Dicho proceso permite incrementar la variabilidad genética de las poblaciones, favoreciendo así la aparición de cepas resistentes a nuevos fungicidas antioídio o capaces de desarrollarse sobre cultivares resistentes, por lo que el replanteamiento de las estrategias de control de la enfermedad se convierte en un proceso dinámico.

Con el objetivo de determinar el grado de importancia de la reproducción sexual sobre la epidemiología de la enfermedad, se están analizando algunas características biológicas y genéticas de aislados de *P. fusca* obtenidos en prospecciones realizadas en varias provincias de la mitad Sur de España productoras de cucurbitáceas. De entre los caracteres biológicos, se están analizando tanto el tipo de compatibilidad sexual como la raza fisiológica de los diferentes aislados. En los últimos años, se ha detectado la presencia de ambos tipos de compatibilidad sexual, con predominancia del tipo MAT1-1 sobre el MAT1-2, así como de cuatro de las cinco razas descritas en todas las áreas de muestreo analizadas. Al tratarse de un hongo biotrofo, la determinación del tipo de compatibilidad sexual mediante ensayos biológicos resulta tediosa. Para agilizar este proceso, estamos intentando desarrollar técnicas de análisis de carácter molecular que permitan determinar mediante PCR el tipo de compatibilidad de los aislados. Desde el punto de vista genético, el abordaje del análisis se está llevando a cabo en esta misma línea, empleando ensayos RAPD y rDNA-RFLP para obtener información sobre el grado de variación genética existente dentro y entre las poblaciones de oídio de las cucurbitáceas en España.

CYSDV Y CVYV TRANSMITIDOS POR *Bemisia tabaci* EN MELÓN: COMPORTAMIENTO EN VARIEDADES COMERCIALES, EFICIENCIA DE LAS MEDIDAS DE CONTROL FÍSICO Y BÚSQUEDA DE RESISTENCIAS A CVYV EN UN BANCO DE GERMOPLASMA

CANO, M.; JANSSEN, D.; LÓPEZ, M.C.; BELMONTE, A.; ORTEGA, A.; SEGUNDO, E.; MARTÍN, G.; GIL-SALAS, F.M.; CUADRADO, I.M.

CIFA de Almería. IFAPA. Autovía del Mediterráneo, Km 420, La Mojonera 04745 (Almería). Email: virucifa@arrakis.es.

Los cultivos de melón bajo plástico en el sudeste de España suelen estar infectados por *Bemisia tabaci* que transmite *Cucurbit yellow stunting disorder virus* (CYSDV) y *Cucumber vein yellowing virus* (CVYV). Hemos evaluado el comportamiento del melón frente a estos virus en 14 variedades comerciales, representando a 6 tipos diferentes ("Rochet" (1), "Piel de sapo" (3), "Amarillo" (3), "Tendral" (1), "Galia" (3) y "Cantaloup" (3)), en invernaderos con una infección espontánea de *B. tabaci* durante la primavera de 2002. Todas las variedades presentaron síntomas de virus, pero los melones tipo "Galia" mostraban menor incidencia de CYSDV (3-24% según variedad) y mayor de CVYV (44-82%) cuando se compararon con melones tipo "Cantaloup" (25-41% y 16-40%, respectivamente). La producción de frutos osciló entre 6,3 ("Rochet") y 8,1 kg/m² (en una variedad tipo "Galia") y se correlacionó con el porcentaje de plantas mostrando síntomas de CVYV en el caso de "Piel de sapo", "Galia" y "Amarillo". Además, se evaluó la incidencia de los dos virus en una variedad de melón, tipo "Galia", cultivada simultáneamente en dos invernaderos bajo condiciones de infección natural de mosca blanca. Un invernadero fue similar a los comúnmente usados en la zona (convencional) y el segundo invernadero se adaptó disponiendo internamente una malla continua antitrips (adaptado). En el invernadero convencional, el 60 y 100% de las plantas desarrollaron síntomas de CYSDV y CVYV respectivamente, y se contaron semanalmente un número superior a 50 moscas blancas por planta de promedio. En el invernadero adaptado, los porcentajes de plantas con síntomas fueron de 8% (CYSDV) y 2% (CVYV), mientras que el número promedio de moscas blancas por planta osciló entre 0 y 5. El peso total de la producción de frutos en el invernadero adaptado fue un 39% mayor que en el invernadero convencional. Finalmente, se han buscado fuentes de resistencia a CVYV en 160 entradas de banco de germoplasma de melón, originarios de India y obtenidos del National Plant Germplasm System (USDA-ARS). Las accesiones se sometieron a dos rondas de ensayo (durante primavera y otoño de 2003) una mediante inoculación mecánica y otra con mosca blanca virulífera. La resistencia se evaluó tanto por observación de síntomas como por hibridación con sondas marcadas con digoxigenina. Ninguno de las accesiones ensayadas manifestaron completa resistencia a CVYV.

PD-2

EFFECTO DE ACEITES DE DISTINTO ORIGEN SOBRE LA SUPERVIVENCIA DE *M. persicae* Y SOBRE LA TRANSMISIÓN DEL VIRUS DEL MOSAICO DEL PEPINO POR ESTE VECTOR

MARTÍN-LÓPEZ, B.; VARELA- BARRENECHEA, I.; CABAILEIRO-SOBRINO, C.

Departamento de Producción Vegetal. Escuela Politécnica Superior. Universidad de Santiago de Compostela. Campus Universitario.27002 Lugo.

Los aceites minerales han sido con frecuencia empleados para el control de virus transmitidos de forma no persistente por pulgones, aunque bajo ciertas condiciones de aplicación y en determinados cultivos, estos aceites pueden dar lugar a problemas de fitotoxicidad.

En la Escuela Politécnica de Lugo se han llevado a cabo ensayos para investigar el efecto insecticida de aceites de distinto origen sobre *Myzus persicae* (Sulzer), y el efecto sobre la inoculación y la adquisición del virus CMV por este vector. Los aceites evaluados fueron: aceites de colza y soja, brutos y refinados, un aceite crudo de pescado y un aceite mineral parafínico.

En relación con el poder insecticida de los aceites sobre *M. persicae*, el aceite de soja bruto es el que causó una mayor mortalidad (próxima al 50%, a las 72 h) en los pulgones que accedieron a hojas tratadas. Estadísticamente comparables a él fueron los aceites de soja y colza refinados, así como el de pescado, que dieron lugar a mortalidades comprendidas entre el 30% y el 40% (a 72 h). En un ensayo de inoculación de CMV sobre plantas de pimiento tratadas con los distintos aceites se observó que el aceite de colza refinado y el mineral, suprimieron totalmente la infección por CMV. Para los restantes tratamientos los porcentajes de infección fueron variables, aunque inferiores al testigo. En ensayos de adquisición de CMV, la tasa de infección fue nula para todos aceites excepto en el caso de la soja bruta y de la colza bruta.

Palabras clave: transmisión no persistente de virus, CMV, eficacia insecticida, aceite de soja, aceite de colza, aceite mineral parafínico, aceite de pescado

MANEJO DE VEGETACIÓN EN CEPAS DE VID INFECTADAS CON EL VIRUS DEL ENROLLADO (GLRaV-3)

PEREIRA-CRESPO, S.; CABALEIRO-SOBRINO, C.

Departamento de Producción Vexetal. EPS. Universidade de Santiago de Compostela.
Campus Universitario s/n 27002 LUGO. E-mail: pvcabsob@lugo.usc.es

Los principales daños causados por los virus del enrollado de la vid están relacionados con alteraciones en la maduración de las uvas, de forma que los mostos tienen mayor acidez y menor grado alcohólico que los procedentes de cepas libres de enrollado. En la D.O. Rías Baixas son frecuentes los años con condiciones meteorológicas poco favorables para la maduración de la uva a final del verano y el virus del enrollado de la vid (*Grapevine leafroll associated virus -3*, sobre todo) está ampliamente extendido por lo que se agravan esos problemas. El manejo de vegetación, especialmente las podas en verde y los sistemas de conducción que faciliten la penetración de la luz, son prácticas recomendadas en viticultura para acelerar la maduración de los racimos y podría compensar recomendarlo especialmente cuando el virus está ya presente en viñedos en plena producción. En 2003 se realizó un ensayo de deshojado en dos viñedos, uno de unos 20 años con el 100% de incidencia de GLRaV-3 y otro de 15 años, parcialmente infectado. Se realizaron deshojados de distinta intensidad en una o dos fechas, a 10 ó 15 plantas por tratamiento (previamente analizadas por ELISA) y se evaluó el efecto de dicha medida en el contenido en azúcar, pH y acidez total del mosto en vendimia. En el viñedo de 15 años se constató la maduración deficiente de la uva en las cepas con enrollado, con un contenido medio en azúcar de hasta 2 °Brix inferior en las cepas enfermas, diferencia mayor a la medida entre 1992 y 1994 cuando esas mismas plantas estaban entrando en producción; la acidez del mosto fue también significativamente mayor. En las cepas con GLRaV-3 el deshojado en envero permitió a los racimos una mayor acumulación de azúcar aunque sin igualar la de las cepas sanas y la acidez total disminuyó significativamente dando lugar a mostos menos ácidos incluso que los de las cepas sanas sin deshojar. La producción por m², que no había sido significativamente diferente entre cepas sanas y enfermas durante la entrada en producción, fue en 2003 inferior en las cepas con enrollado. En el viñedo con 100% de infección el tratamiento de deshojado ligero, en envero, fue el que potenció una mayor acumulación de azúcar y el deshojado en dos veces fue el que consiguió una disminución de la acidez mas clara. Los resultados son prometedores por lo que evaluarán, en años sucesivos, otro tipo de medidas complementarias que ayuden a contrarrestar los daños.

EL EMPLEO DE MALLAS DE ALTA DENSIDAD FOTOSELECTIVAS REDUCE LA INFECCIÓN POR TYLCD EN CULTIVOS DE TOMATE: INFLUENCIA VARIETAL

VELASCO, L.

Departamento de Biotecnología y Protección Vegetal. Instituto Murciano de Investigación y Desarrollo Agrario y alimentario (IMIDA). c/ Mayor s/n. E-30150. La Alberca – Murcia. E-mail: leonardo.velasco@carm.es

El uso de estructuras bajo mallas de alta densidad se extiende paulatinamente en los cultivos del sureste español por su buena adaptación a las condiciones climáticas y agronómicas de estas regiones. El efecto aislante de las plagas y virus transmitidos por las mismas se ha visto confirmado ampliamente. La combinación de mallas de alta densidad y fotoselectividad es una alternativa para la que los estudios realizados hasta la fecha en condiciones de campo, salvo excepciones, son muy heterogéneos, tratando de comparar mallas de distinta densidad con otras referidas como fotoselectivas. En este trabajo se abordan los resultados de una primera campaña (2003-2004) para la que se han construido dos invernaderos bajo malla producida por Meteor (Israel) de igual densidad de hilos (50 mesh); siendo el primero fotoselectivo (BionetTM) y el segundo no fotoselectivo (AntivirusTM), situados ambos en la localidad de Mazarrón (Murcia). Uno de los objetivos de este estudio, que se adelanta aquí, es la evolución e incidencia de la enfermedad de la cuchara del tomate (TYLCD) en estos invernaderos. Este parámetro ha sido analizado mediante hibridación molecular con sondas no radiactivas para TYLCV y TYLCSV, puesto que el registro de síntomas se consideró subjetivo, aunque sí se valoró. Por otra parte, el estudio se ha complementado con el empleo de cuatro variedades de tomate, dos tolerantes y otras dos no tolerantes a TYLCD.

Los resultados mostraron que el efecto de la protección fue efectiva bajo las mallas fotoselectivas en esta primera campaña. Los niveles de TYLCD fueron significativamente mayores en el invernadero no fotoselectivo frente al fotoselectivo: 37.5% de plantas positivas frente al 25% a los 85 dpt. Además, en el invernadero fotoselectivo no se encontraron diferencias significativas en la tasa de infección por TYLCV/TYLCSV independientemente de la variedad de la que se trate, tolerante o no tolerante, diferencias que si existían en el invernadero no fotoselectivo: a los 85 dpt, en el invernadero no fotoselectivo, 30% y 45%, tolerantes y no tolerantes, respectivamente; en el invernadero fotoselectivo, 24% (tolerantes), 26% (no tolerantes).

Cabe señalar, por otro lado, que la carga viral en planta medida en una escala semicuantitativa (0-3) de señal de hibridación molecular fue significativamente mayor en el invernadero no fotoselectivo (0,83) frente al fotoselectivo (0,32). Igualmente, los niveles (a los 85 dpt) fueron más extremos en el invernadero no fotoselectivo: 1,26 (no tolerantes) y 0,48 (tolerantes), mientras que eran más parecidos en el fotoselectivo: 0,41 (no tolerantes) y 0,23 (tolerantes). La incidencia del vector *Bemisia tabaci* mostró valores correlativos con los síntomas. Estos estudios continuarán en campañas sucesivas y se extenderán además a dos nuevos invernaderos de similares características en la localidad de Águilas. Se analizará asimismo la incidencia de Tomato chlorosis virus mediante sonda RNA. Simultáneamente, se tomarán exhaustivos datos fisiológicos que permitan explicar las diferencias en los niveles de carga viral.

TRANSMISIÓN POR SEMILLA DEL VIRUS DEL MANCHADO FOLIAR DE LOS CÍTRICOS: IMPLICACIÓN EN LOS PROGRAMAS DE CUARENTENA Y CERTIFICACIÓN

VIVES, M.C.; PINA, J.A.; NAVARRO, L.; MORENO, P.; GUERRI, J.

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

El virus del manchado foliar de los cítricos (CLBV) se purificó y caracterizó a partir de un kumquat Nagami que inducía, entre otros, síntomas de mala unión de algunas variedades de cítricos con el patrón citrange. Recientemente CLBV se ha detectado en árboles de distintos cultivares procedentes de Australia, Estados Unidos, Japón y España, con síntomas de decaimiento asociado a la mala unión patrón-injerto sobre citrange o citrumelo. La importancia económica de CLBV en la industria citrícola se desconoce ya que no se ha evaluado la incidencia del virus en las regiones donde se ha detectado. Para determinar si el virus se transmite por semilla, se sembraron de 120 a 210 semillas de árboles de citrange Troyer, kumquat Nagami y naranjo amargo infectados con CLBV. Las plantas obtenidas se cultivaron en invernadero, se analizaron a los cuatro meses mediante RT-PCR y en aquellas que resultaron positivas se confirmó la presencia del virus mediante ensayos de infectividad en plantas indicadoras. Alrededor del 2.5% de las plantas de citrange, kumquat y naranjo amargo estaban infectados con el virus. Actualmente, la propagación de los cítricos en la mayor parte del mundo se realiza injertando yemas de la variedad seleccionada sobre patrones cultivados a partir de semilla. Para evitar la dispersión de CLBV es necesario controlar el estado sanitario tanto de los árboles productores de yemas de las distintas variedades, como el de los árboles productores de semilla. A la vista de estos resultados ha sido necesario cambiar la legislación sobre importación de semillas exigiéndose un certificado de que los árboles productores de éstas están exentos de CLBV.

CARACTERIZACIÓN DE METABOLITOS PRODUCIDOS POR CEPAS BACTERIANAS EFICACES EN EL BIOCONTROL DE HONGOS FITOPATÓGENOS

ALEMANY, J.; BONATERRA, A.; CAMPS, J.; MONTESINOS, E.

Institut de Tecnologia Agroalimentària (INTEA). Universitat de Girona. Av. de Montilivi s/n. 17071. Girona.

El control biológico de las enfermedades de las plantas goza de una amplia aceptación entre los consumidores. No obstante, hay que resolver importantes aspectos teóricos y prácticos para que el biocontrol sea una alternativa/complemento de uso generalizado, al conocido control químico mediante el uso de plaguicidas.

Para un mejor conocimiento del mecanismo de la interacción entre el agente de biocontrol, el microorganismo fitopatógeno y la planta, es necesario aislar, caracterizar, y cuantificar los compuestos químicos con actividad biológica implicados en el proceso.

En el trabajo que se expone se han aislado e identificado una serie de compuestos producidos por diversas cepas de *Pseudomonas fluorescens* de la colección (EPS) de nuestro laboratorio. Estos metabolitos secundarios han resultado activos contra diversos hongos fitopatógenos, y se han identificado mayoritariamente como: ácido cianhídrico; 2,4-diacetilfloroglucinol; ácido fenazina-1-carboxílico; y pirrolnitrina.

Para la detección de la producción de sustancias antifúngicas se realizaron cuatro tipos de ensayo:

- a) Antagonismo en cultivo dual en placa (metabolitos difusibles).
- b) Detección de actividad antifúngica en los caldos libres de células, por determinación de su efecto inhibitorio sobre la germinación de conidias.
- c) Extracción de los compuestos activos con disolventes orgánicos.
- d) Bioautografía, antibiograma realizado recubriendo la placa cromatográfica (TLC) de los compuestos anteriores, con un gel nutritivo a base de agarosa conteniendo el hongo indicador.

La identificación se ha realizado mediante las técnicas cromatográficas (HPLC) y espectroscópicas (RMN e IR) convencionales.

DETERMINACIÓN *in vitro* DE LA SENSIBILIDAD DE *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* A COMPUESTOS QUÍMICOS

DE LEÓN, L.¹; SIVERIO, F.²; RODRÍGUEZ, A.^{1,3}

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

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

³Dpto. Microbiología y Biología Celular. Facultad de Farmacia. Universidad de La Laguna. 38207 La Laguna, Tenerife.

El “chancro bacteriano” producido por *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Cmm) es una enfermedad ampliamente distribuida a nivel mundial. En la campaña 2002-2003 se detectó su presencia por primera vez en las Islas Canarias, provocando grandes pérdidas económicas en el sector tomatero. Los escasos trabajos publicados referidos al control químico de la enfermedad, consideran estos tratamientos como poco eficaces una vez que la bacteria se ha establecido en la planta.

En este trabajo se ha estudiado la sensibilidad *in vitro* de cuatro cepas de Cmm a la acción de los antibióticos y antimicrobianos kasugamicina, estreptomina, oxitetraciclina, ácido oxolínico, quinolón, bronopol, sulfato de cobre, y los productos comerciales Oleato Potásico (PBCF S.L.) y Antibak-RZ (Stoller Ibérica S.L.), así como el bioestimulante Param (Inpla S.A.). Para ello se determinó la concentración mínima inhibitoria (CMI) y bactericida (CMB) para cada uno de ellos, mediante el método de dilución en tubo, utilizando caldo de levadura-peptona suplementado con glucosa (LPGB) y tripticasa-soja (TSB). Del mismo modo, se ensayaron combinaciones de los químicos a concentraciones subinhibitorias (1/2 y 1/4 de la CMI), para detectar posibles efectos sinérgicos.

Los resultados obtenidos indican que, a excepción de la kasugamicina (>400 µg/ml) y del sulfato de cobre (100-150 µg cobre/ml), los valores de CMIs de los antibióticos y antimicrobianos ensayados oscilaron entre 2-6 µg/ml. Los valores de CMIs de los productos comerciales se situaron entre 1-6 µl de producto comercial/ml. Además, la relación entre los valores de CMI y CMB de la estreptomina, quinolón, Antibak-RZ y Oleato Potásico, ponen de manifiesto su claro efecto bactericida. Por otro lado, combinaciones de quinolón-sulfato de cobre, quinolón-Antibak, estreptomina-Antibak y estreptomina-Oleato Potásico a concentraciones subinhibitorias, redujeron considerablemente el número de unidades formadoras de colonias de Cmm. En función de estos resultados, se han iniciado ensayos en condiciones controladas, a fin de evaluar los efectos de estos productos *in vivo*.

SÍNTESIS Y EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE PÉPTIDOS PARA EL CONTROL DE BACTERIAS Y HONGOS FITOPATÓGENOS

FERRE, R.²; MONROC, S.²; BADOSA, E.¹; HOSTENCH, J.¹; MORAGREGA, C.¹; FELIU, L.²; PLANAS, M.²; BARDAJÍ, E.²; MONTESINOS, E.¹

¹Instituto de Tecnología Agroalimentaria-CerTA-CIDSAV. Universitat de Girona. Campus Montilivi 17071. Girona. E-mail:.

²LIPPSO. Departamento de Química. Universitat de Girona. Campus Montilivi 17071. Girona. E-mail: eduard.bardaji@udg.es

En los últimos años, se ha realizado un enorme esfuerzo en el estudio de la actividad de péptidos catiónicos frente a distintos microorganismos patógenos con el objetivo de desarrollar nuevas moléculas para su control. En el presente trabajo se han sintetizado y evaluado la actividad de péptidos catiónicos lineales, derivados de la cecropina A y de péptidos catiónicos cíclicos. La actividad antibacteriana y antifúngica *in vitro* se determinó utilizando como indicadores distintos hongos (*Fusarium oxysporum*, *Penicillium expansum*, *Verticillium dahliae*, *Aspergillus niger*, *Rhizopus stolonifer*) y bacterias fitopatógenas de gran interés agronómico (*Pseudomonas syringae*, *Xanthomonas vesicatoria*, *Clavibacter michiganensis*, *Erwinia amylovora*) utilizando un sistema automatizado tipo Bioscreen.

En el caso de los péptidos derivados de la cecropina-A, se sintetizó un péptido de 11 aminoácidos (RFMP01), correspondiente al extremo N-terminal de la cecropina-A (descrito en estudios previos como inhibidor de hongos fitopatógenos) y se realizaron distintas modificaciones (substituciones de aminoácidos y cambios en el extremo N-terminal). Cinco de las modificaciones del péptido mostraron mayor actividad frente a algunos de los microorganismos indicadores que el péptido de referencia. Mediante el análisis de las curvas dosis-efecto, se observó que la substitución de un residuo de triptófano por una lisina aumentaba la actividad del péptido frente a *E. amylovora*, *P. syringae*, *F. oxysporum*, *P. expansum* y *R. stolonifer*.

En cuanto a los péptidos catiónicos cíclicos, se sintetizaron péptidos cíclicos de diez aminoácidos, alternando aminoácidos hidrofóbicos e hidrofílicos, y se comparó la actividad de la secuencia cíclica respecto a su precursora lineal. Se observó un aumento de la actividad en algunos péptidos con estructura cíclica respecto al mismo péptido de estructura lineal frente a varios microorganismos fitopatógenos indicadores, mostrándose un factor de especificidad en su actividad.

Actualmente se están realizando ensayos de eficacia *ex-vivo* que indican que se mantienen niveles aceptables de actividad en el control de infecciones sobre material vegetal.

IMPACTO DE PLANTAS DE PATATA TRANSGÉNICAS EN LA MICROBIOTA DEL SUELO Y LA RIZOSFERA

MARCO-NOALES, E.; LÓPEZ, M.M.

Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA). Carretera Moncada-Náquera, km 5. 46113 Moncada (Valencia)

La marchitez bacteriana o podredumbre parda de la patata es una enfermedad causada por la bacteria de cuarentena *Ralstonia solanacearum* que afecta a especies vegetales de más de 50 familias. Actualmente se está ensayando la eficacia de diversas líneas transgénicas de patata de la variedad Désirée como estrategia biotecnológica de control frente a esta enfermedad, siendo la línea DL12 la más resistente. Las plantas modificadas expresan el gen de la lisozima del fago T4, la cual interfiere con la pared celular de las bacterias gram-positivas y la membrana externa de las gram-negativas. En este estudio se analizó el impacto cuantitativo de la línea DL12 en la microbiota cultivable de la planta y del suelo. Concedido el correspondiente permiso para la liberación de organismos modificados genéticamente, se plantaron minitubérculos de la línea DL12 y de la línea control (no modificada), en una parcela dividida en subparcelas, siguiendo una distribución al azar. Se hicieron muestreos en tres estadios de crecimiento: emergencia, floración y senescencia, analizándose la rizosfera y el tallo de las plantas y el suelo de las subparcelas. Respecto al recuento de bacterias, en la rizosfera el número de ufc/g recuperadas fue aumentando ligeramente con el crecimiento, pasando de 5×10^7 ufc/g en la emergencia a 10^8 en la senescencia, pero el aumento fue mucho más acusado en el tallo, donde el valor se incrementó desde 10^3 ufc/g hasta casi 10^6 . En el suelo se recuperaron en todos los muestreos alrededor de 10^6 ufc/g. El recuento de hongos, sin embargo, fue mayor en el primer estadio (10^6 en la rizosfera y 10^4 en el suelo) y menor en los siguientes (10^5 y 5×10^3 , respectivamente, en la senescencia). Lo más relevante fue que no se observaron diferencias en los recuentos, ni de rizosfera ni de tallo, entre las plantas transgénicas y no transgénicas, y tampoco en el suelo de unas subparcelas y otras, por lo que no parece haber un impacto cuantitativo de las plantas transgénicas de patata en la microbiota. En cada muestreo, una parte del extracto obtenido de rizosfera y suelo se procesó para el análisis molecular de la comunidad microbiana total y de la fracción de microbiota activa. Estos posibles cambios cualitativos están siendo evaluados.

DESARROLLO DE MARCADORES MOLECULARES SCAR PARA LA DETECCIÓN DE *Pseudomonas fluorescens* EPS62E, AGENTE DE CONTROL BIOLÓGICO DEL FUEGO BACTERIANO

PUJOL, M.; BADOSA, E.; TRIAS, R.; MONTESINOS, E.

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

El fuego bacteriano es una de las enfermedades más graves que afecta a plantas de las familia de las rosáceas, de gran interés económico como el peral, manzano, níspero y algunas plantas ornamentales. La cepa *Pseudomonas fluorescens* EPS62e se seleccionó en trabajos previos por su alta eficacia en el control biológico del fuego bacteriano. Con la finalidad de desarrollar un método de trazabilidad mediante PCR que permita su seguimiento después de la aplicación en campo, se han diseñado tres parejas de cebadores SCAR (Sequence Characterized Amplified Regions).

Se obtuvieron tres fragmentos de amplificación específicos de la cepa EPS62e mediante la amplificación múltiple arbitraria (RAPD) y una amplificación utilizando cebadores no específicos en un conjunto de cepas de la especie *P. fluorescens*. Los tres fragmentos se clonaron y secuenciaron en su totalidad. Las secuencias obtenidas mostraron una baja homología con las secuencias presentes en la base de datos del GenBank. Para cada fragmento específico se diseñó una pareja de cebadores SCAR, que permiten la amplificación simple y definida de fragmentos de 177 pb, 392 pb y 378 pb. La especificidad de las tres parejas de cebadores se evaluó frente a 162 cepas de *P. fluorescens* y 71 cepas de otras especies relacionadas. Dos de las parejas de cebadores son específicos para la detección de la cepa EPS62e, mientras que la tercera pareja es semiespecífica puesto que se obtuvo el mismo fragmento de amplificación de 378 pb en 9 de las 162 cepas de *P. fluorescens*, aunque no se obtuvo en ningún caso amplificación de cepas pertenecientes a otras especies.

La sensibilidad de las tres parejas de cebadores fue evaluada en cultivos puros y en extractos vegetales inoculados artificialmente con la cepa EPS62e, observándose una mayor sensibilidad en dos de las tres parejas de cebadores diseñados. También se está utilizando la técnica del NMP asociada a PCR con los cebadores SCAR para la cuantificación de la población de la cepa EPS62e presente en muestras vegetales, comparándola con la técnica del recuento en placa. Actualmente se está poniendo a punto un sistema de cuantificación basado en PCR cuantitativa.

IDENTIFICACIÓN DE SUSTANCIAS ANTIFÚNGICAS PRODUCIDAS POR CEPAS DE *Bacillus* spp. ANTAGONISTAS DE *Podosphaera fusca*

ROMERO, D.¹; **RAKOTOALY, R.**³; **CAZORLA, F.M.**¹; **ZERIOUH, H.**¹; **TORÉS, J.A.**²; **PAQUOT, M.**³; **DE VICENTE, A.**¹; **PÉREZ-GARCÍA, A.**¹

¹Departamento de Microbiología. Facultad de Ciencias. Universidad de Málaga. Campus Universitario de Teatinos s/n 29071. Málaga. E-mail: fitomicro@uma.es;

²Estación Experimental "La Mayora" (CSIC). Algarrobo Costa. 29750 Málaga España;

³Chemie Biologie Industrielle. FSAGX. Pasaje des Deportes, 5030 Gembloux, Bélgica.

El oídio es una enfermedad común en cultivos de cucurbitáceas que genera como síntomas más visibles la formación de manchas blancas pulverulentas en superficie. La enfermedad es causada en España por *Podosphaera fusca*. La aplicación de fungicidas es la práctica más extendida para el control de la enfermedad, no obstante el control biológico es una estrategia alternativa o complementaria de control. En nuestro laboratorio se han aislado cuatro cepas bacterianas identificadas como *Bacillus* spp. que en trabajos previos mostraron capacidad para frenar el desarrollo de la enfermedad. El objetivo del presente trabajo fue evaluar la capacidad inhibitoria de los filtrados bacterianos libres de células así como identificar las putativas sustancias antifúngicas producidas. La evaluación de la actividad antifúngica de los filtrados libres de células se realizó *in vitro* usando hojas de melón en el sistema de doble placa. Los índices de reducción de la enfermedad oscilaron entre el 90 % y 50 %, siendo similares a los resultados obtenidos en ensayos tanto *in vitro* como en plántula en los que se usaron células obtenidas de la fase estacionaria de crecimiento bacteriano, lo que apoya la tesis de la antibiosis como el principal mecanismo de acción implicado en la actividad de biocontrol de estas bacterias. Para el análisis de las sustancias antifúngicas producidas se realizó una extracción con n-butanol y fraccionamiento de los compuestos mediante "FLASH chromatography" seguido del empleo de otras técnicas cromatográficas como TLC y HPLC que mostraron factores y tiempos de retención similares a los observados para lipopéptidos conocidos y ya descritos en diferentes especies de *Bacillus*. Análisis de masas (Maldi-Toff), análisis de aminoácidos y de ácidos grasos así como análisis de infrarrojos permitieron confirmar que las cuatro cepas producen surfactinas, fengicinas y bacilomicinas o iturina A dependiendo de la cepa, compuestos de reconocida actividad antifúngica contra diferentes hongos fitopatógenos. Paralelamente se observaron diferencias en los niveles de producción de lipopéptidos obtenidos para cada cepa que se correlacionaron con los diferentes valores de control de la enfermedad obtenidos con cada bacteria. Actualmente se están realizando ensayos *in vitro* para evaluar la capacidad de control de estas cepas frente a otros patógenos de cucurbitáceas.

MÉTODOS DE CONTROL ALTERNATIVOS EN EL TRATAMIENTO DE LA NECROSIS APICAL DEL MANGO

ROSALES, J.¹; ARREBOLA, E. ¹; OLEA, F. ¹; BOBO, S. ²; TORÉS, J.A.³; DE VICENTE, A.¹; CAZORLA, F.M.¹

¹Departamento de Microbiología, Facultad de Ciencias, Universidad de Málaga. Campus Universitario de Teatinos s/n 29071. Málaga. E-mail: fitomicro@uma.es

² S.A.T. 2803 "TROPS", 29700-Vélez-Málaga, Málaga.

³ Estación Experimental "La Mayora" (CSIC), 29750-Algarrobo Costa, Málaga.

La necrosis apical del mango es una enfermedad causada por *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* (*P.s.s.*), que provoca lesiones necróticas en yemas y hojas reduciendo el cuajado del fruto y causando importantes pérdidas económicas en el sur de la Península Ibérica. Los daños más severos ocurren durante el otoño e invierno, siempre asociados a la presencia de elevadas poblaciones de la bacteria. Los métodos de control utilizados de forma convencional para el tratamiento de esta enfermedad se basan en la aplicación de compuestos derivados de sales de cobre, como el caldo bordelés. Trabajos anteriores han mostrado una elevada frecuencia de resistencia a cobre en cepas de *P.s.s.* aisladas de árboles de mango. Además ensayos de campo utilizando distintos métodos de control muestran que cuando la gravedad de los síntomas de la enfermedad se reduce, esto no coincide con un descenso en los niveles poblacionales de *P.s.s.*; sugiriendo que probablemente el efecto protector de los tratamientos no se basa en una actividad bactericida, sino en otros efectos como puede ser la formación de películas protectoras sobre el tejido vegetal.

La extensión del cultivo de mango en agricultura biológica hace plantearse el empleo de productos alternativos al cobre compatibles con la agricultura ecológica; además de tener en cuenta los fallos en el control con productos cúpricos que se han venido observando en agricultura convencional. En el presente trabajo se presenta un ensayo de control químico realizado sobre árboles de mango en fincas comerciales de la cooperativa SAT 2803 TROPS (Vélez-Málaga) durante las campañas 2002-03 y 2003-04. Se han usado árboles de distintas variedades: Manzanillo, Keitt, Tommy Atkins y Lippens. Los tratamientos ensayados son en general productos formadores de película compatibles con agricultura ecológica y que se comparan con el tratamiento con caldo bordelés. La aplicación de estos tratamientos se realizó por vía foliar, desde octubre hasta marzo con aplicaciones mensuales y quincenales en los meses más críticos. La población de bacterias heterótrofas totales, *P.s.s.* y la incidencia de la enfermedad (porcentaje de yemas con necrosis) se evaluó bimensualmente sobre yemas de los árboles estudiados, empleando como control un grupo de árboles no tratados. Además en junio se realizan análisis del nivel de síntomas en hoja.

BASES MOLECULARES DE LA PRODUCCIÓN DE UN NUEVO ANTIBIÓTICO POR *Pseudomonas fluorescens* PCL1606 CON ACTIVIDAD EN BIOCONTROL

RUIZ-ROMERO, D.J.¹; PÉREZ-GARCÍA, A.¹; ARREBOLA, E.¹; BLOEMBERG, G.V.²; LUGTENBERG, B.J.J.²; DE VICENTE, A.¹; CAZORLA, F.M.¹

¹Departamento de Microbiología, Facultad de Ciencias, Universidad de Málaga. Campus Universitario de Teatinos s/n 29071. Málaga. E-mail: cazorla@uma.es

²Leiden University, Institute of Biology of Leiden, Clusius Laboratory, Wassenaarseweg 64, 2333 La Leiden, The Netherlands.

Las enfermedades fúngicas causadas por los hongos de suelo provocan el principal problema fitosanitario del aguacate (*Persea americana*) en el Sur de la Península Ibérica. Entre ellos destacan el hongo fitopatógeno *Rosellinia necatrix* (que causa la “podredumbre blanca del aguacate”) y el oomycete *Phytophthora cinnamomi*. El uso de cepas bacterianas como potenciales agentes de biocontrol es una alternativa que en la actualidad se está valorando dentro del control integrado de este cultivo. La cepa *Pseudomonas fluorescens* PCL1606 ha sido seleccionada previamente por su alta actividad antagonista frente a un amplio espectro de hongos fitopatógenos mediante ensayos *in vitro*, así como una elevada capacidad de biocontrol frente a *R. necatrix* en ensayos cámara. Los análisis de los compuestos antifúngicos producidos por *P. fluorescens* PCL1606 han mostrado la presencia de una sustancia nueva antifúngica implicada en la capacidad de biocontrol.

Con el fin de profundizar en las bases genéticas y moleculares de la producción de dicha sustancia antifúngica, se ha construido una colección de mutantes Tn5 empleando el plásmido pRL1063a. De los aproximadamente 5000 mutantes ensayados, 7 mostraron una reducción importante en la capacidad de inhibición de *R. necatrix* en placa. El análisis de las secuencias flanqueantes del gen interrumpido en los distintos mutantes parecen indicar que algunas de ellas presentan homología con genes de aciltransferasas o con sistemas T de rotura de glicina.

De forma paralela, se está construyendo una genoteca de la cepa silvestre *P. fluorescens* PCL1606 para localizar los genes homólogos a los interrumpidos en los mutantes defectivos mediante ensayos de complementación y comprobación de la restauración de la actividad antifúngica.

Por otro lado, el efecto las mutaciones defectivas sobre la capacidad de biocontrol se está analizando mediante ensayos en cámara, empleando los sistemas experimentales tomate/*Fusarium* y aguacate/*Rosellinia*, que muestran una reducción de la capacidad de biocontrol frente a *R. necatrix*, así como frente a *Fusarium oxysporum*.

IMPLICACIÓN DE LAS POLIAMINAS EN LA TOLERANCIA DE LA VID A LA PUDRICIÓN GRIS

AGUIRREOLEA, J.¹; SANTA-MARÍA, E.^{1,2}; GENY, L.²

¹ Departamento de Fisiología Vegetal. Facultades de Ciencias y Farmacia, Universidad de Navarra. Irunlarrea s/n. 31008. Pamplona (Navarra).

² Laboratoire de Pédologie et Physiologie de la Vigne. Faculté d'Oenologie, Université Victor Segalén. Bordeaux 2.351. Cours de la Liberation 33405. Talence (Francia)

En vid, las poliaminas están implicadas en procesos relacionados con el control del crecimiento y desarrollo, así como en la respuesta a un amplio espectro de estreses bióticos y abióticos. Su acumulación se ha relacionado con una mayor tolerancia a las condiciones adversas. En el caso de la infección con *Botrytis cinerea*, se ha visto que el metabolismo de las poliaminas depende de si la interacción planta-patógeno es compatible o incompatible.

Por ello, con el fin de estudiar la posible implicación de las poliaminas en la resistencia de la vid a la pudrición gris, el objetivo del presente trabajo ha sido estudiar, en dos variedades de vid, la evolución de diferentes formas de poliaminas en respuesta a la infección con *B. cinerea*.

Para evitar la variabilidad ambiental en campo, la enfermedad se reprodujo en condiciones ambientales controladas, mediante inoculación de racimos maduros en esquejes fructíferos de dos cultivares de vid: Tempranillo y Cabernet Sauvignon. Las poliaminas se determinaron en las bayas a diferentes tiempos después de la inoculación. La separación y cuantificación de las diferentes formas de poliaminas libres, conjugadas y ligadas a macromoléculas se realizó mediante HPLC en combinación con espectrofotometría de fluorescencia. La sensibilidad al patógeno se determinó mediante inoculación *in vitro* de bayas maduras individuales con diferentes concentraciones de esporas de *B. cinerea*. Las bayas se incubaron a 20°C, alta humedad relativa y oscuridad durante un periodo de 12 días.

El test de sensibilidad puso en evidencia la mayor tolerancia de Tempranillo al desarrollo de la enfermedad, principalmente a dosis bajas de inóculo. El proceso de infección provocó importantes cambios en los niveles y distribución de las diferentes clases de poliaminas. La mayor tolerancia pudo estar relacionada con una mayor inducción de formas ligadas a macromoléculas, mientras que en el cultivar mas sensible se estimularon las conjugadas a ácidos hidroxicinámicos. Los resultados se discuten en relación al posible papel de las diferentes formas de poliaminas en la tolerancia a *B. cinerea*

Trabajo financiado por Fundación Universitaria de Navarra (2002) y Gobierno de La Rioja (FPI-2000).

MÉTODOS DE DESINFECCIÓN DE SUSTRATO PERLITA PARA EL CONTROL DE LA FUSARIOSIS DEL PEPINO (*Cucumis sativus* L.) EN CULTIVO SIN SUELO

AÑÑOS, M.; BLANCO, R.; TELLO, J.C.

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

Una enfermedad que ha aparecido en diferentes países incluyendo España, concretamente en los cultivos protegidos de Almería, y que hasta la fecha carece de control efectivo es la fusariosis del pepino (*Cucumis sativus* L.) cuyo agente incitante es *Fusarium oxysporum*. Con el fin de controlar dicha enfermedad se ensayaron en las condiciones de cultivo métodos de desinfección del sustrato de perlita donde había habido enfermedad y existía *F. oxysporum*: químicos, físicos y la combinación de ambos. Los tratamientos fueron 10 (x 3 repeticiones): Metam potasio, Metam sodio, Cloropicrina, 1-3 dicloropropeno y éstos combinados con la solarización (cubriendo con plástico transparente de 150 galgas); solarización y parcelas testigo sin tratar. Se evaluó la evolución de la enfermedad durante la campaña (2002-03) y se midió la población de especies de *Fusarium*, en el sustrato de perlita, antes y después de los tratamientos, así como al final del cultivo. Los resultados de la evaluación de la enfermedad para una población de 544 plantas por tratamiento con 3 repeticiones fueron para la Cloropicrina, Metam potasio, Metam sodio, 1-3 dicloropropeno de 8.54%, 19.35%, 9.92% y 4.67% de plantas muertas (media de 3 repeticiones) respectivamente; los mismos tratamientos con solarización dieron lugar a 1.65%, 4.33%, 4.28%, 4.11% de plantas muertas respectivamente. Un resultado destacable es el porcentaje de plantas muertas con la solarización (3.43%) comparado con el del testigo sin tratar (8.50%), a pesar de haber usado un plástico transparente simple de 150 galgas. Se discute la relación de la enfermedad con la población detectada de *Fusarium* en el sustrato de cultivo de pepino.

COMPARACIÓN DE LOS EFECTOS DE INÓCULOS COMERCIALES Y AISLADOS LOCALES DE HONGOS MICORRÍZICOS SOBRE LA VID EN PRESENCIA DE *Armillaria mellea* VAHL.

ARMAS, I.E.¹; GARCÍA-FIGUERES, F.²; CALVET, C.³; JAIZME-VEGA, M.C.¹

¹Dpto. de Protección Vegetal. Instituto Canario de Investigaciones Agrarias (ICIA). Apdo. 60. 38200. La Laguna, Tenerife. E-mail: iarmas@icia.es

²Servei de Sanitat Vegetal, D.A.R.T. Vía Circulació Nord, Tram 6, 08040 Barcelona.

³Departament de Protecció Vegetal. Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentàries (IRTA). Crta. de Cabrils s/n, 08348 Cabrils, Barcelona.

La vid es el cultivo de mayor extensión de las Islas Canarias (19.000 has). Entre los problemas fitosanitarios de esta especie, tiene cada día más importancia los daños ocasionados por el hongo causante de la podredumbre blanca de la raíz, *Armillaria mellea* Vahl. Este patógeno no sólo produce la muerte de las plantas, sino que imposibilita el cultivo de los terrenos afectados en un periodo largo de tiempo. La lucha química es prácticamente inaccesible y la desinfección del suelo resulta demasiado costosa. Los beneficios de los hongos formadores de micorizas arbusculares (MA) son conocidos sobre esta especie leñosa y el efecto protector que confiere la micorrización a determinados estreses de tipo biótico o abiótico. En este trabajo se propone utilizar la micorrización de la vid como estrategia de control de *Armillaria mellea* Vahl. en las primeras fases de desarrollo. Se inocularon varetas del cultivar local Malvasía, con diferentes inóculos de origen comercial (Endorize-mix, Terra Vital, Terra Vital Plus y Tri-Ton) o con un aislado local (*Glomus mosseae*). Después de 7 meses en condiciones de vivero y una vez comprobado la colonización micorrízica, las plantas fueron inoculadas con *A. mellea*, multiplicada previamente sobre bellotas, a razón de 2 unidades/planta. El levante se realizó 18 meses después de introducir el hongo patógeno. Algunos de los inóculos estudiados protegieron a la planta frente al ataque de *A. mellea*, llegando a reducir los índices de severidad de la enfermedad hasta un 90% con respecto al control, en el caso del inóculo comercial Terra Vital y un 40% para el aislado local, *G. mosseae*. Estos datos deben ser tomados como preliminares, siendo necesarios nuevos estudios en los que se incremente el periodo de interacción de los microorganismos con el hospedador.

EFFECTO DE LA BIOFUMIGACIÓN CON PASTO DEL SUDÁN Y COLZA SOBRE EL CONTROL DE *Verticillium dahliae* EN VIVEROS DE OLIVO

BEJARANO-ALCÁZAR, J.

CIFA "Alameda del Obispo". Instituto de Investigación y Formación Agroalimentaria y Pesquera. Apdo. 3092. 14080 Córdoba. E-mail: jose.bejarano@juntadeandalucia.es

La utilización de enmiendas orgánicas para la desinfestación de suelos y sustratos y el control de enfermedades de las plantas ha sido ampliamente estudiada en diversos patosistemas. Uno de los mecanismos de actuación consiste en la liberación de compuestos químicos volátiles de actividad biocida (biofumigación) que ocurre durante la descomposición de los residuos aplicados. Este trabajo se ha planteado con el objetivo de investigar el efecto de la adición de restos de pasto del Sudán (*Sorghum sudanense* (Piper) Stapf cv. Piper) y de colza (*Brassica napus* L. var. *oleifera*) sobre la erradicación de *Verticillium dahliae* de sustratos de uso frecuente en viveros de olivo en la fase de crianza de los plantones.

En un primer experimento, bolsas de nylon conteniendo un sustrato (arena:limo:turba, 1:1:2, v/v/v) estéril mezclado con diferentes dosis (0%, 2% y 4%, p/p) de restos frescos picados de plantas de pasto del Sudán e infestado artificialmente con inóculo esclerocial de un aislado defoliante de *V. dahliae* de elevada virulencia sobre olivo, se enterraron a 10 cm de profundidad en bandejas de plástico conteniendo el mismo tipo de mezcla sin infestar. Las bandejas se sellaron con plástico transparente de 50 µm de grosor o se dejaron sin sellar, y se mantuvieron a 25°C durante 60 días. Las bolsas fueron extraídas de las bandejas a los 5, 15, 30 y 60 días, y se determinó la densidad de inóculo viable (DI) del patógeno. Un segundo experimento fue realizado de forma similar utilizando como enmienda restos frescos picados de plantas de colza (0%, 2,5% y 5%, p/p).

En ambos experimentos, los valores finales de DI de *V. dahliae* en los tratamientos testigo (0% de enmienda con y sin cobertura plástica) fueron similares o significativamente superiores a los niveles iniciales. En los sustratos con pasto del Sudán al 2% o al 4%, las DI disminuyeron de forma significativa a los 5 días de la incorporación de la enmienda, y en los tratamientos sellados con plástico se mantuvieron en niveles relativamente bajos (18-35% de las DI iniciales) hasta el final del experimento, mientras que en los tratamientos sin recubrimiento plástico aumentaron hasta alcanzar valores finales variando entre el 61-89% de las DI iniciales. Sin embargo, en todos los muestreos realizados la DI fue significativamente inferior en los sustratos enmendados que en los testigos sin enmienda, con independencia de la dosis añadida y del sellado o no con plástico. La adición de colza al 2,5% o al 5% redujo la DI de forma drástica a partir de los 15 días de biofumigación a valores que estuvieron comprendidos entre el 0,6-5,8% de los niveles iniciales en los tratamientos cubiertos con plástico y entre el 0-0,2% de los valores iniciales en los tratamientos sin plástico. Asimismo, en los muestreos realizados a los 15, 30 y 60 días, la DI fue siempre significativamente menor en los sustratos enmendados que en los testigos, independientemente de la dosis empleada y del recubrimiento o no con plástico.

Subvencionado por los Proyectos CAO99-010-C3-02 y CAO00-019-C5-5

EFICACIA DE LA SOLARIZACIÓN DEL SUELO PARA LA ERRADICACIÓN DE *Verticillium dahliae* EN VIVEROS DE OLIVO

BEJARANO-ALCÁZAR, J.

CIFA "Alameda del Obispo". Instituto de Investigación y Formación Agroalimentaria y Pesquera. Apdo. 3092. 14080 Córdoba. E-mail: jose.bejarano@juntadeandalucia.es

La utilización de material de propagación sano es una medida fundamental para el control de enfermedades que afectan a plantas que se propagan vegetativamente en viveros especializados, como es el caso de la Verticilosis del olivo. La obtención de plantones de olivo sanos en los viveros requiere el uso de material vegetal y sustratos de crecimiento libres de inóculo de *Verticillium dahliae*. En esta investigación se ha evaluado el potencial de la solarización en las condiciones ambientales prevalentes en Andalucía, para la erradicación de *V. dahliae* de sustratos utilizados frecuentemente en viveros de olivo en la fase de crianza de los plantones.

Dos experimentos se realizaron en Córdoba en la segunda quincena de julio de 1999 y 2000. Bolsas de nylon conteniendo sustrato (arena:limo, 1:1, v/v, en 1999; arena:limo:turba, 1:1:2, v/v/v, en 2000) no estéril infestado artificialmente con inóculo esclerocial de un aislado defoliante de *V. dahliae* de elevada virulencia sobre olivo, se enterraron en montículos del mismo sustrato de forma cónica (1 m de base y 0,8 m de alto). Las bolsas se dispusieron a una profundidad de 20 cm en la cara lateral del montículo y a 20 y 40 cm de profundidad en la cima del montículo. Los montículos se regaron a capacidad de campo y se cubrieron (solarizados) o no (testigos) con polietileno transparente de 50 µm de grosor durante 15 días en 1999 y 17 días en 2000. Las bolsas fueron extraídas periódicamente de los montículos y se evaluó la eficacia del tratamiento mediante el análisis de la densidad de inóculo viable (DI) del patógeno.

La temperatura máxima de las medias estimadas para cada fracción horaria durante el periodo de solarización a 20 cm de profundidad fue de 47,4°C en 1999 y 48,2°C en 2000 en los montículos solarizados, y de 35,6°C y 32,7°C, respectivamente, en los montículos no solarizados. En ambos años, la DI de *V. dahliae* en los tratamientos testigo sin solarizar se mantuvo en general durante los experimentos en niveles similares o significativamente superiores a los iniciales. Por el contrario, en todos los tratamientos de solarización se observó una reducción muy drástica en la DI, siendo significativas las diferencias respecto a los valores iniciales en los diferentes muestreos realizados transcurrido tres (1999) o cuatro (2000) días de exposición a la solarización, y la DI permaneció en valores comprendidos entre el 0 y el 1% de los niveles iniciales a partir de los ocho días de solarización. Asimismo, en cada muestreo efectuado entre los cuatro (2000) o seis (1999) días y la conclusión de los experimentos, la solarización redujo de forma significativa la DI del hongo en comparación con los testigos no solarizados, independientemente de la posición y profundidad a la que se encontraba situado el inóculo en el montículo.

Subvencionado por los Proyectos CAO99-010-C3-02 y CAO00-019-C5-5

EVALUACIÓN DE ACEITES VEGETALES Y DE PESCADO PARA EL CONTROL DE OIDIO (*Sphaerotheca mors-uvae*) EN GROSELLERO NEGRO (*Ribes nigrum*)

CABANO-SEARA, B.; CABAILEIRO-SOBRINO, C.

Departamento de Producción Vexetal. EPS. Universidade de Santiago de Compostela. Campus Universitario s/n 27002 LUGO. E-mail: pvcabsob@lugo.usc.es

El oidio (*Sphaerotheca mors-uvae* (Schwein.) Berk. & M.A. Curtis) es uno de los principales problemas fitopatológicos del grosellero negro (*Ribes nigrum*). Aunque existen variedades con un buen nivel de tolerancia, la gravedad de los ataques depende mucho de las condiciones ambientales de cada año, de las podas realizadas y de la fecha de inicio de recolección. Como ocurre en otros pequeños frutos, la recolección es escalonada y ello complica la elección de productos fitosanitarios para el control de plagas y patógenos. Los aceites naturales pueden ser una buena alternativa de control en programas de protección integrada y en agricultura ecológica, pues tienen calidad alimentaria. En los veranos de 2002 y 2003 se compararon aceites vegetales y de pescado con aceites minerales de verano y fungicidas antioidio. Se utilizaron plantas de *Ribes nigrum* variedad "Troll" (de sensibilidad media al oidio), en macetas con una media de 3-4 brotes. Cada tratamiento se aplicó a 20-25 brotes. Se comenzaron los tratamientos una vez detectada la primera mancha de oidio tras inoculación artificial en condiciones controladas de humedad y temperatura. En 2002 se hicieron 8 tratamientos con periodicidad semanal a lo largo de Julio y Agosto y en 2003 los 8 tratamientos fueron inicialmente semanales y después se comparó el tratamiento semanal con la aplicación cada 15 días.

Las condiciones ambientales parecen ser determinantes a la hora de conseguir controlar el oidio en los brotes jóvenes de grosellero negro. En 2002, todos los aceites lograron mantener la superficie atacada de los brotes apicales por debajo del 6-12%, mientras que el control con agua superó el 50%. Sin embargo, en 2003, con un verano con temperaturas muy superiores a lo habitual en la zona, ningún producto, incluido un fungicida con quinoxifén, consiguió reducir los ataques por debajo del control sin tratar, aunque los daños no superaron el 20% en ningún caso. El uso de aceites parece prometedor y es especialmente interesante en cultivos en los que el número de sustancias activas registradas es muy limitado y donde el consumidor exige una alta calidad – considerando como tal la ausencia de residuos de productos fitosanitarios –. Para su utilización resulta necesario optimizar la frecuencia de aplicación para reducirla al máximo, especialmente en el periodo anterior a la recolección (Junio/Julio) y para evitar problemas graves de fitotoxicidad que aparecieron sobre todo en 2003 debido a las elevadas temperaturas.

EFICACIA DE FUNGICIDAS EN EL CONTROL DE LA PODREDUMBRE RADICAL CAUSADA POR *Phytophthora cinnamomi* SOBRE *Quercus ilex* Y *Q. suber*

CAETANO, P.¹; SÁNCHEZ, M.E.²; TRAPERO, A.²

¹Faculdade de Engenharia de Recursos Naturais, Universidade do Algarve, PORTUGAL, ²Dep. de Agronomía, ETSIAM, Universidad de Córdoba.

La “Seca” es la principal enfermedad que en las últimas décadas afecta las masas de *Quercus ilex* y *Q. suber* del sudoeste de España y sureste de Portugal y se caracteriza por el decaimiento y muerte de los árboles afectados. Entre los factores bióticos implicados destaca la podredumbre radical causada por el oomiceto *Phytophthora cinnamomi*.

En este trabajo se ha estudiado *in vitro* el efecto del Metalaxil, Fosetil-Al y Fosfito potásico en la tasa de crecimiento de dos aislados de *P. cinnamomi* (PE₁₃, procedente de encina y PA₂₀, de alcornoque). El Fosfito potásico fue la materia activa que más redujo la tasa de crecimiento de los dos aislados, mientras el Metalaxil produjo la menor reducción. No obstante, la inhibición relativa del crecimiento para los dos aislados fue siempre superior al 50 %.

En los experimentos *in vivo* se aplicaron, en condiciones semicontroladas, las mismas materias activas en tres dosis diferentes (baja, mediana y alta) en plántones de *Q. ilex* y *Q. suber* inoculados con *P. cinnamomi*. Los plántones fueron sometidos a saturación hídrica del suelo 2 días por semana. Al cabo de 3 meses se procedió a la evaluación de la severidad de síntomas aéreos y radicales de todas las plantas: testigos sin inocular, testigos inoculados y tratadas con productos químicos, según una escala 0-4 (0= parte aérea o raíz sin síntomas, 4= parte aérea o raíz muerta).

El análisis de la varianza no mostró diferencias significativas entre los valores de severidad de síntomas aéreos entre los diferentes tratamientos para las dos especies de *Quercus*. Sin embargo, para los síntomas radicales, el Metalaxil en las dosis alta y mediana redujo significativamente la severidad respecto de los testigos inoculados, tanto para *Q. ilex* como para *Q. suber*. Sin embargo, esta reducción no fue significativa para las plantas tratadas con Fosetil-Al o Fosfito potásico. Al final del experimento, *P. cinnamomi* fue re-aislado de las raíces de las plantas en todos los tratamientos, excepto en las plantas testigo no inoculadas.

EVALUACIÓN DE LA INOCULACIÓN CONTROLADA DE *Armillaria mellea* EN EL PORTAINJERTO DE VID RICHTER110 MICORRIZADO Y RESPUESTA EN UN SUELO DE REPLANTE

CALVET, C.¹; GARCÍA-FIGUERES, F.²; ESTAÚN, V.¹; CAMPRUBÍ, A.¹; NOGALES, A.¹; MARTÍN, R.¹; LUQUE, J.¹

¹Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentàries (IRTA), Departament de Protecció Vegetal, Ctra. de Cabriels s/n, 08348 Cabriels, Barcelona.

²Servei de Sanitat Vegetal, D.A.R.P., Via Circulació Nord, Tram 6, 08040 Barcelona.

La influencia de la micorrización del sistema radicular frente a la podredumbre blanca de raíz causada por *Armillaria mellea*, se evaluó en un experimento de inoculación controlada de dos años de duración con estacas leñosas enraizadas del portainjerto de vid Richter 110 (*Vitis berlandieri* x *Vitis rupestris*) como material vegetal. Las estacas, con raíz incipiente, se inocularon con el hongo *Glomus intraradices* (Schenck & Smith) al ser trasplantadas a contenedores de 5l de capacidad con mezcla de suelo pasteurizada. Tres meses más tarde, se realizó la inoculación controlada de *Armillaria mellea* utilizando un aislado procedente de suelo de viñedo infestado en Vimbodí (Tarragona), caracterizado mediante PCR-RFLP y reproducido en condiciones axénicas utilizando bellotas de *Quercus suber* como soporte vegetal para facilitar la dosificación y asegurar la presencia de una fuente continua de inóculo patogénico en el experimento.

Al final de la primera temporada de crecimiento en condiciones de microparcela, las plantas infectadas con *A. mellea*, micorrizadas o no, tuvieron un desarrollo vegetativo significativamente menor. Al iniciarse la segunda temporada de crecimiento, la mortalidad causada por el hongo patógeno era del 42 % en las plantas no micorrizadas y del 17% en las micorrizadas con *G. intraradices*, pero no se detectaron diferencias de crecimiento entre las plantas supervivientes de los distintos tratamientos.

En el segundo año de experimentación, se trasplantaron dos lotes de plantas idénticas a las del experimento anterior al suelo de replante infestado y adecuado para las características agronómicas del 110R, resistente a caliza y de alto vigor en suelos calcáreos. A los seis meses, la supervivencia en campo era del 100 % para las plantas micorrizadas, y del 70 % para las plantas no inoculadas artificialmente. En el mismo suelo se ha conseguido aislar un hongo nativo formador de micorizas arbusculares, identificado como *Glomus aggregatum*.

SUPRESIVIDAD DEL COMPOST DE CORCHO A LA CAÍDA DE PLÁNTULAS DE PEPINO POR *Pythium aphanidermatum*

CASTILLO, S.; BENÍTEZ, E.; BORRERO, C.; AVILÉS, M.

Dpto. Ciencias Agroforestales, Universidad de Sevilla. E.U.I.T.A. Ctra. Utrera km 1, s/n, 41013, Sevilla

En los semilleros profesionales es muy frecuente aplicar preventivamente productos anti-oomicetes al sustrato dado el riesgo de caída de plántulas por *Pythium aphanidermatum*. Por otro lado, es conocida la supresividad que frente a la caída de plántulas por *Pythium* spp. presentan los sustratos hortícolas formulados con composts de residuos orgánicos. La supresividad de los compost a este patosistema está asociada al establecimiento de microbiostasis. El objetivo de este trabajo es evaluar la supresividad natural a esta enfermedad de un compost de residuo industrial de corcho respecto a un sustrato comercial de turba a distintas dosis de inóculo del fitopatógeno. Ambos sustratos se evaluaron naturales y sometidos a un vaciado biológico por calor seco en estufa (6 días a 60°C) para conocer el efecto de una reducción transitoria de su actividad microbiana en su comportamiento. El diseño del ensayo fue de bloque al azar con cinco repeticiones, en condiciones controladas (27°C, día largo). Cada repetición consistió en una maceta de 300 cm³ en la que se sembraron 10 semillas de pepino variedad 'Hyclos Mix'. Se utilizó un inóculo suelo-patata (ISP) realizado a partir de un aislado de *P. aphanidermatum* obtenido de planta de pepino enferma. Aplicándose las dosis de inóculo de 0, 1, 2 y 3 g ISP / l de sustrato. La intensidad de la afección se evaluó a los 14 días de la siembra con la siguiente escala de severidad: 0 = planta sin síntomas, 1 = plántula con síntomas, 2 = muerte de postemergencia y 3 = muerte de preemergencia. Tanto en las semillas no emergidas como en las plántulas afectadas fue confirmada la afección por el hongo. La severidad media de cada maceta fue expresada en proporción respecto a la máxima severidad posible y posteriormente corregida por el porcentaje de nascencia obtenido para cada tratamiento en los testigos (no inoculado). De las semillas no germinadas en los testigos no se aisló el hongo. El compost de corcho natural presentó una menor severidad que el sustrato de turba a las tres dosis de inóculo ensayadas y solo mejoró al compost de corcho calentado a la dosis de inóculo mayor. En cambio, el sustrato de turba natural solo presentó una menor severidad que su correspondiente calentado a la menor dosis de inóculo. De los resultados se deduce que el compost de corcho es capaz de suprimir eficazmente la enfermedad incluso a dosis de inóculo elevadas y que el efecto negativo del vaciado por calor solo se aprecia a dosis de inóculo elevadas. Por otro lado, se confirma la elevada conductividad de la turba a este patosistema.

EFFECTO A LARGO PLAZO DE LA SOLARIZACIÓN SOBRE LA PRODUCCIÓN, INCIDENCIA DE RAÍCES CORCHOSAS Y ACTIVIDAD BIOLÓGICA DEL SUELO EN EL CULTIVO DEL TOMATE

DÍAZ-HERNÁNDEZ, S.¹; GALLO, L.¹; DOMÍNGUEZ-CORREA, P.¹; RODRÍGUEZ-PÉREZ, A.^{1,2}

¹ Dpto. Protección Vegetal. Instituto Canario de Investigaciones Agrarias (I.C.I.A.). Apdo. 60. 38200 La Laguna. Tenerife.

² Dpto. Microbiología y Biología Celular. Facultad de Farmacia. Universidad de La Laguna. 38207 La Laguna. Tenerife.

El efecto a largo plazo de la solarización, sola y combinada con biofumigación, fue estudiado en un cultivo de tomate afectado por *Pyrenochaeta lycopersici*, agente causal del síndrome de las raíces corchosas. Ambos tratamientos, junto con un tratamiento químico (metam sodio) y un control sin tratar, fueron ensayados durante 3 años consecutivos en un invernadero de malla siguiendo un diseño experimental de cuadrado latino.

Las temperaturas máximas alcanzadas a 10 y 30 cm de profundidad en el suelo solarizado oscilaron entre 42-45°C y 35-37°C; y en el tratamiento solarización+biofumigación entre 43-48°C y 36-38°C. Las temperaturas registradas en el suelo control fueron 9-7°C inferiores.

Después de tres años de ensayo la producción de tomate en las parcelas solarizadas (3,9 kg/planta) y solarizadas-biofumigadas (4,0 kg/planta) fue significativamente superior al control (3,4 kg/planta), no así la producción en las parcelas fumigadas con metam sodio (3,8 kg/planta). Paralelamente, el índice de intensidad de la enfermedad (IIE, evaluado siguiendo una escala visual de 0 a 4. 0=raíz sana. 4=afección superior al 75%), más alto se detectó en el control (IIE 3,3), seguido del metam sodio (IIE 3,0), solarización (IIE 2,0) y solarización+biofumigación (IIE 1,5).

La actividad biológica del suelo fue evaluada mediante hidrólisis de diacetato de fluoresceína (DAF), poniéndose de manifiesto un incremento significativo de la actividad biológica en el suelo solarizado (52,63 µg DAF hidrolizado/g suelo seco y hora) y solarizado-biofumigado (69,77 µg DAF hidrolizado/g suelo seco y hora) con respecto a los tratamientos control y metam sodio (38,91 y 34,92 µg DAF hidrolizado/g suelo seco y hora, respectivamente).

EVALUACIÓN DE FUNGICIDAS RACIONALES PARA EL CONTROL DE *Phytophthora*: *P. infestans* Y *P. capsici*

FERNÁNDEZ-ACERO, F.J.; CARBÚ, M.; GARRIDO, C.; CANTORAL, J.M.; VALLEJO, I.
Facultad de CC. del Mar y Ambientales. Lab. Microbiología. Universidad de Cádiz.
Campus Puerto Real 11510 Cádiz (España). carlos.garrido@uca.es

Phytophthora constituye uno de los géneros responsables de enfermedades fitopatógenas más devastadoras. Entre las especies de este género destacan, *P. infestans* (falso mildiu de la patata) y *P. capsici* (tristeza o seca del pimiento). *P. infestans* es el más estudiado debido a la importancia económica de los daños que causa y a su significación histórica. Se encuentra en todas aquellas áreas donde se cultiva la patata (*Solanum tuberosum*) y el tomate (*Lycopersicon esculentum*). Poseen ciclos de reproducción asexual y sexual, siendo éste último muy poco frecuente. El único lugar del mundo donde convivían cepas con los dos grupos de compatibilidad sexual A1 y A2 era Méjico hasta que en 1984 aparecen ambos en Europa. La posibilidad de cruces sexuales entre las cepas aumenta la variabilidad y favorece la adaptabilidad, lo que está produciendo la reaparición de la enfermedad con cepas más agresivas y resistentes a los tratamientos convencionales. Estos cambios hacen necesario el desarrollo de nuevos fungicidas que mejoren los ya existentes, y minimicen el daño medioambiental debido al uso abusivo de compuestos químicos. La estrategia seguida para el diseño de estos fungicidas se basa en el uso de análogos biosintéticos de las fitotoxinas excretadas por los hongos fitopatógenos, (diseño biosintético de fungicidas). El mecanismo de actuación de estos análogos consiste en confundir al sistema enzimático del hongo, que al detectarlos como propios los metaboliza, transformándolos y liberando radicales tóxicos al medio que acaban por matarlo. Con este propósito se han diseñado moléculas que puedan confundir y bloquear al sistema o sistemas enzimáticos implicados en las diferentes etapas de la patogénesis. Se han venido diseñando moléculas que han demostrado su actividad fungicida frente a distintos fitopatógenos (*Botrytis cinerea*, *Sphaeroteca fulginea*). Por su posición taxonómica es importante conocer como afectarían estos productos a un Oomicete como *Phytophthora*. Se ensayaron siete productos frente a *P. Infestans* y *P. capsici*, consiguiendo todos un efecto fungistático, con porcentajes de inhibición superior al 40%. Se ha puesto de manifiesto una diferenciación importante entre las respuestas de *P. capsici* y *P. infestans*, con las implicaciones metabólicas y bioquímicas que esto conlleva.

RESISTENCIA A ESTROBILURINAS Y FUNGICIDAS IBE EN OÍDIO DE CUCURBITÁCEAS

FERNÁNDEZ-ORTUÑO, D.¹; LÓPEZ-RUIZ, F.J.¹; CÁNOVAS, I.¹; ROMERO, D.²; CAZORLA, F.M.²; PÉREZ-GARCÍA, A.²; TORÉS, J.A.¹

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

²Dpto. Microbiología. Facultad de Ciencias. Universidad de Málaga. Campus de Teatinos. 29071 Málaga.

Una de las principales enfermedades de origen fúngico que afecta al cultivo de las cucurbitáceas es el oídio, cuyos síntomas se caracterizan por la presencia de manchas de color blanquecino y aspecto pulverulento sobre la superficie de las hojas. En España, se ha descrito como agente causal del oídio de las cucurbitáceas al hongo *Podosphaera fusca*. Actualmente el principal método de control del oídio consiste en el empleo de fungicidas con distintos mecanismos de acción, durante todo el periodo del cultivo. Sin embargo este método conlleva el inconveniente de la aparición de cepas resistentes del hongo a estos productos químicos con relativa frecuencia. El objetivo principal del presente trabajo consiste en evaluar la resistencia/sensibilidad en aislados de oídio de cucurbitáceas, obtenidos de prospecciones realizadas en diversas provincias de la mitad sur de España, a dos grandes grupos de fungicidas antioídio: las estrobilurinas (kresoxim metil, azoxistrobin y trifloxistrobin) y los inhibidores de la biosíntesis de ergosterol (IBE) como son miclobutanil, triadimenol y fenarimol, a través de un método *in vitro* en disco de hoja. Calculando, posteriormente, la concentración mínima inhibitoria (CMI) y la concentración efectiva 50 (CE₅₀).

Después de llevar a cabo el análisis de 50 aislados del hongo, se ha detectado resistencia cualitativa a estrobilurinas, es decir, se obtienen dos grandes poblaciones de cepas: sensibles (CMI < 25 µg/ml) y resistentes con un valor de CMI > 500 µg/ml. Además esta resistencia es, en todos los casos, cruzada, por lo que cepas resistentes a kresoxim metil también lo son a azoxistrobin y trifloxistrobin. Sin embargo, el tipo de resistencia detectada en los IBE es de tipo cuantitativo, encontrando diferentes niveles de resistencia/sensibilidad a estos fungicidas.

Se están elaborando mapas de distribución geográfica y temporal de la resistencia a estos fungicidas, en provincias españolas donde el cultivo de cucurbitáceas es importante como: Almería, Córdoba, Murcia, Valencia, Badajoz y Ciudad Real, entre otras.

Por otra parte, para poder realizar una caracterización más rápida y fiable de los aislados, se está procediendo al aislamiento y clonación de los genes que codifican las dianas de los fungicidas mencionados anteriormente, el gen citocromo b para estrobilurinas, y el gen CYP51 (C14 demetilasa) para los inhibidores de la síntesis de ergosterol, con el objetivo de analizar si las resistencias a estos fungicidas en las cepas de *P.fusca* están asociadas a mutaciones en estos genes diana; y así establecer estrategias moleculares para la detección rápida y sencilla de la sensibilidad/resistencia a fungicidas y permitir un análisis más exhaustivo.

EFFECTO DE TRATAMIENTOS QUÍMICOS Y BIOLÓGICOS APLICADOS EN CAMPO EN EL CONTROL DE PODREDUMBRES CAUSADAS POR *Monilinia laxa* EN MELOCOTONERO

FRANCÉS, J.¹; PUIGNAU, A.¹; VILAJELIU, M.²; MONTESINOS, E.¹

¹Institut de Tecnologia Agroalimentària CeRTA-CIDSAV, Universitat de Girona.

² Estació Experimental Mas Badia. Girona

La podredumbre provocada por *Monilinia* es una de las más frecuentes en los frutos de hueso. El objetivo de este trabajo fue determinar el efecto de tratamientos químicos y biológicos aplicados en campo en el control de infecciones causadas por *Monilinia laxa* en la variedad de melocotonero "O'Henry". Las estrategias de control fueron la aplicación de dos fungicidas experimentales (A y B), el biofungicida a base de *Pantoea agglomerans* EPS125 y un fungicida convencional, tradicionalmente utilizado en la zona, además de un testigo no tratado. Todos los productos se aplicaron mediante pulverización en campo hasta punto de goteo. El diseño experimental consistió en 4 repeticiones de 5 árboles por repetición para cada tratamiento. De cada tratamiento y repetición se recolectaron 5 cajas de 20 frutos por caja. Las evaluaciones de los frutos afectados por *Monilinia laxa* se realizaron en el momento de la entrada en cámara, y a los 1, 2, 5, 7 y 9 días de la salida de la cámara de frigoconservación.

Al final del período de conservación la incidencia de podredumbres en el testigo no tratado fue del 56.1%. Esta incidencia se redujo al 26% en el tratamiento realizado con el fungicida experimental A, el cual presentó el mejor control sobre la podredumbre causada por *Monillia laxa*. El biofungicida EPS125 redujo significativamente los niveles de podredubre hasta un 44.4%. Los niveles de control del biofungicida no difirieron significativamente respecto de los obtenidos con el fungicida utilizado tradicionalmente en la zona. Tampoco se observaron diferencias significativas con el fungicida experimental B, pero si con el A, que fue el que proporcionó mejor control de la podredumbre.

La limitada eficacia del biofungicida EPS125 en los tratamientos en campo, en comparación con los tratamientos en poscosecha se atribuye a una menor supervivencia bajo las condiciones ambientales que tuvieron lugar durante el ensayo. En la actualidad se están efectuando estudios con nuevas formulaciones que permitan un incremento de la supervivencia y efectividad en los tratamientos en campo.

EFFECTO DE LA APLICACIÓN DE ÁCIDO PERACÉTICO Y AGENTES DE BIOCONTROL EN EL CONTROL DE *Rhizopus stolonifer* Y *Monilinia laxa* EN CEREZAS, CIRUELAS Y ALBARICOQUES

FRANCÉS, J.¹; MARI, M.²; CASALINI, L.²; MONTESINOS, E.¹

¹Institut de Tecnologia Agroalimentària CeRTA-CIDSAV, Universitat de Girona, Girona, España.

²CRIOF, Università di Bologna, Bologna, Italia.

Monilinia laxa y *Rhizopus stolonifer* son dos de los principales hongos causantes de podredumbres en cerezas, ciruelas y albaricoques. Las infecciones pueden ocurrir en campo, durante la precosecha y especialmente en la recolección, sin embargo el desarrollo de la podredumbre generalmente ocurre en post-cosecha. El principal sistema de control de estas podredumbres es la aplicación de fungicidas en campo, con resultados en algunos casos insatisfactorios, especialmente cuando se dan periodos de humedad elevada y lluvias abundantes cercanas a la recolección. En España, Francia e Italia no se realizan tratamientos con fungicidas en post-cosecha en fruta de hueso. Una alternativa al uso de fungicidas es la aplicación de agentes de control biológico junto con medidas de limpieza y desinfección. En este trabajo se estudió el efecto combinado de la aplicación de ácido peracético y de dos agentes de biocontrol (ABC) en fase experimentl en el control de *R. stolonifer* y *M. laxa* en cerezas, ciruelas y albaricoques. Las dos bacterias antagonistas utilizadas como ABC, *Pseudomonas fluorescens* EPS288 y *Pantoea agglomerans* EPS125 fueron efectivas en el control de ambos hongos en cerezas, ciruelas y albaricoques a 15°C y 1°C. *P. agglomerans* EPS125 fue más efectiva en el control de las dos podredumbres a 15°C que *P. fluorescens* EPS288. La eficacia de biocontrol de estas dos cepas de ABC en combinación con la aplicación de ácido peracético fue significativamente mayor que la de las dos cepas por separado y que la del ácido peracético sólo, en los dos patógenos y temperaturas estudiadas. Los resultados mostraron también que la aplicación de las dos cepas juntas en combinación con el ácido peracético fue más efectivo en el control de *R. stolonifer* y *M. laxa* que la aplicación de una sólo cepa en combinación con el ácido peracético. Los frutos tratados con los ABCs y almacenados a 1 °C tuvieron una menor incidencia de podredumbres por ambos patógenos, que los almacenados a 15°C. Sin embargo ambos ABCs colonizaron y se multiplicaron más rápidamente en las heridas realizadas sobre los frutos a 15°C que a 1°C. Los niveles poblacionales de *P. fluorescens* EPS288 y *P. agglomerans* EPS125 en la superficie de los frutos fueron significativamente menores que en las heridas. La supervivencia fue menor en la superficie de las cerezas y ciruelas que en la superficie de los albaricoques.

ESTADO ACTUAL DE LA SELECCIÓN Y EVALUACIÓN EN CAMPO DE PATRONES DE AGUACATE DE RAZA ANTILLANA TOLERANTE-RESISTENTES A *Phytophthora cinnamomi* Rands

GALLO, L.¹; DÍAZ-HERNÁNDEZ, S.¹; SIVERIO, F.²; DOMÍNGUEZ-CORREA, P.¹; RODRÍGUEZ-PÉREZ, A.^{1,3}

¹ Dpto. Protección Vegetal. Instituto Canario de Investigaciones Agrarias. Apdo. 60. 38200 La Laguna. Tenerife. lgallo@icia.es

² Sección de Laboratorio de Sanidad Vegetal. Dirección General de Desarrollo Agrícola. Apdo. 60. 38200 La Laguna. Tenerife.

³ Dpto. Microbiología y Biología Celular. Facultad de Farmacia. Universidad de La Laguna. 38207 La Laguna. Tenerife.

Una de las prioridades en la investigación del aguacate es encontrar patrones tolerante-resistentes a la enfermedad conocida como podredumbre de raíz cuyo agente causal es *Phytophthora cinnamomi* Rands.

Se han evaluado patrones procedentes de semillas recolectadas en árboles de aguacate de raza Antillana, pertenecientes a ecotipos locales de las Islas Canarias y material vegetal recolectado en Cuba. Mediante distintos procesos de selección se obtuvieron 342 patrones (plantas madre) para su transplante a una parcela altamente infestada. En un primer ensayo de campo, 222 plantas madre han permanecido durante 6 años en evaluación; 58 durante 4 años; 32 durante 3 años y 30 durante 2 años, siendo el porcentaje de supervivencia de 59%; 48%; 62%; y 63%, respectivamente.

En un segundo ensayo se eligieron para ser clonadas once plantas madre de entre las que habían presentado un mejor comportamiento en el proceso de selección y evaluación. Éstas fueron comparadas con los patrones comerciales de raza Mexicana reconocidos por su tolerancia a *P. cinnamomi* Duke 7 y Thomas. El material vegetal se propagó vegetativamente mediante la técnica de Frölich y Platt modificada. La tolerancia-resistencia se evaluó anualmente mediante un índice de intensidad de la enfermedad (IIE) en una escala visual en la que 0=sano y 5=muerto. Se realizaron mediciones del perímetro de la copa y del tronco, así como de la longitud del tallo. El diseño experimental fue de bloques al azar con 12 repeticiones.

Después de 4 años los patrones estudiados en este segundo ensayo quedan ordenados de mayor a menor tolerancia-resistencia al patógeno de la siguiente forma: SS3-1; Maoz H-5 6B; Gema; BH-2; La Planta 2-4; La Planta 2-8; H-15A (9,2); H-15A(6,13); H-15G(4,28); H-15A(2,1); Duke 7; Thomas; La Planta 1A. Estos resultados confirman el alto interés agronómico de la raza Antillana como fuente de resistencia a la podredumbre de raíz del aguacate.

RESPUESTA DEL PORTAINJERTO DE FRUTAL GXN 22 MICORRIZADO CON *Glomus intraradices* A *Rosellinia necatrix*

GARCÍA-FIGUERES, F.¹; CALVET, C.²; CAMPRUBÍ, A.²; ESTAÚN, V.²; PRAT, M.²

¹Servei de Sanitat Vegetal, D.A.R.P., Via Circulació Nord, Tram 6, 08040 Barcelona

²Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentàries (IRTA), Departament de Protecció Vegetal, Ctra. de Cabrils s/n, 08348 Cabrils, Barcelona. E-mail: cinta.calvet@irta.es

Plantas del portainjerto GxN 22, híbrido de melocotonero x almendro (*Prunus persica* x *Prunus dulcis*), caracterizado por su tolerancia a la sequía, buena adaptación a suelos calcáreos, y resistencia moderada a nematodos agalladores, se sometieron a dos experimentos de microparcelsa en años sucesivos para evaluar su respuesta a la micorrización artificial con el hongo formador de micorrizas arbusculares *Glomus intraradices* (Schenck & Smith), combinada con la inoculación controlada de un aislado de alta patogenicidad de *Rosellinia necatrix* Prill, procedente de un suelo de replante de melocotonero en Piera (Barcelona). Plantas procedentes de micropropagación se inocularon con *G. intraradices* y a los seis meses se transplantaron a microparcelsas con mezcla de suelo arenoso-arena de sílice- turba de sphagnum (3-2-1,v/v) pasteurizada. En la temporada de crecimiento 2002-2003, la inoculación con el hongo patógeno causante de podredumbre blanca de raíz se realizó de forma localizada y equidistante a 5 cm del cuello y de la superficie del suelo. Al año siguiente, temporada 2003-2004, el inóculo patogénico se aplicó en distribución homogénea en el fondo de la microparcelsa, antes del transplante de los plantones de GXN 22 previamente micorrizados. Cuando la inoculación con *R. necatrix* se localizó cerca del cuello, la mortalidad fue muy elevada en los dos grupos de plantas, a pesar de que el desarrollo vegetativo de las plantas micorrizadas e inoculadas con *R. necatrix* era significativamente superior al de las plantas no micorrizadas e infectadas por el hongo patógeno. En el segundo experimento, cuando el inóculo patogénico se aplicó de forma dispersa y no en contacto con la raíz, la micorrización con *G. intraradices* incrementó significativamente el valor de todos los parámetros de crecimiento, equiparándose los tratamientos de plantas micorrizadas e inoculadas por *R. necatrix* y de plantas no micorrizadas libres de patógeno.

VALORACIÓN DE LA EFICACIA *in vitro* DE FUNGICIDAS FRENTE A *Pythium* sp. AISLADO DE LECHUGA

GONZÁLEZ, A.J.¹; MENÉNDEZ, F.²; FERREIRA, J.J.¹

¹SERIDA, carretera de Oviedo s/n, 33300 Villaviciosa. Asturias. e-mail: anagf@serida.org.

² Sección de Sanidad Vegetal, Consejería de Medio Rural y Pesca, c/ Coronel Aranda 2. Oviedo.

Se ha descrito que *Pythium* puede ser responsable de una enfermedad vascular en lechuga (*Lactuca sativa* L.). En cultivos de invernadero en Asturias se viene detectando desde 2002 daños (necrosis en la zona del cuello y tallo que se extiende a las hojas interiores) que se han asociado a la presencia de *Pythium*, cuya especie aún no ha podido ser determinada. Los tratamientos antifúngicos utilizados (propamocarb y fosetil-Al) no fueron eficaces en el control de la enfermedad. Para poder establecer una pauta terapéutica se realizó un ensayo de eficacia *in vitro* de cinco productos fitosanitarios cuyas materias activas eran: metalaxil (8%) + mancozeb (64%), himexazol (36%), fosetil-Al (80%), dimetomorf (7,5%) + mancozeb (66,7%) y propamocarb (72,2%).

Las dosis ensayadas siguieron una progresión geométrica de 1 a 1.024 ppm referidas siempre a la materia activa de referencia, es decir, metalaxil, himexazol, fosetil-Al, dimetomorf y propamocarb. También se incluyó un testigo sin producto. Los ensayos se realizaron por duplicado. El medio de cultivo empleado fue el agar de patata y dextrosa. Como inóculo se utilizaron trozos de medio de igual tamaño conteniendo el hongo en estudio que se colocaron boca abajo sobre las placas de cultivo para poner en contacto directo el micelio del hongo con el producto. Las placas se incubaron dos días a 25°C y el crecimiento se estimó por la media de dos diámetros perpendiculares de las colonias medidos con un pie de rey. Se evaluó únicamente el efecto de los productos respecto al desarrollo del micelio. La disminución del diámetro de la colonia respecto al control se utilizó como indicador de inhibición (total o parcial) del crecimiento. Para determinar el efecto fungistático o fungicida se procedió a resembrar el inóculo del que se inhibió el crecimiento, en medio sin producto para comprobar su viabilidad, considerándose la acción del producto fungicida si no crecía en este medio y fungistática si lo hacía.

El producto más eficaz fue la mezcla de metalaxil + mancozeb que impidió el crecimiento fúngico a 64 ppm y se comprobó su efecto fungicida, seguido de la mezcla de dimetomorf + mancozeb que inhibió el crecimiento del hongo a 256 ppm y, en este caso, a esa concentración, fue fungistático, mientras que a las superiores, 512 y 1024 ppm, fue fungicida.

DESARROLLO DE TUSAL[®]: UN BIOFUNGICIDA A BASE DE CEPAS DE *Trichoderma harzianum* Y *T. viride* PARA EL CONTROL DE HONGOS FITOPATÓGENOS

GRONDONA, I.¹; RODRÍGUEZ, A.¹; GÓMEZ, M.I.¹; AZPILICUETA, A.¹; LLOBELL, A.²; MONTE, E.³

¹NBT Newbiotechnic. Parque Científico –Tecnológico “Isla de la Cartuja”. Avda. Américo Vespucio, 69, Sevilla.

En los últimos años, NBT ha encaminado sus investigaciones al desarrollo de un biofungicida a base del hongo *Trichoderma* como una alternativa para el control biológico de hongos fitopatógenos. El desarrollo de este producto ha supuesto la caracterización bioquímica y molecular de los microorganismos, evaluación de su actividad biológica, comportamiento frente a condiciones medioambientales adversas, determinación de los mecanismos de biocontrol, producción masiva, estudios de formulación, determinación de dosis y formas de aplicación, ensayos de campo, estudios de toxicidad y estudios de impacto ambiental, entre otros. Se ha estudiado el comportamiento de las cepas a pH extremos, crecimiento a altas y bajas temperaturas, resistencia a fungicidas y tolerancia al secado. Se determinó su efecto antagonista sobre patógenos de los géneros *Rhizoctonia*, *Fusarium*, *Botrytis*, *Colletotrichum*, *Penicillium*, *Acremonium*, *Monosporascus*, *Pythium*, *Phytophthora*, *Verticillium*, etc., en condiciones de laboratorio.

Las cepas de *Trichoderma* se fermentaron en medio sólido. La materia técnica (conidios) se cosechó y formuló como granulo dispersable en agua. TUSAL[®] ha sido sometido a todos los controles de calidad fisicoquímicos y microbiológicos y a un estudio de almacenamiento con el fin de determinar la vida útil del mismo.

TUSAL[®] se ha probado en cultivos de remolacha, fresa, algodón, hortalizas (pepino, pimiento, tomate, lechuga), melón y espárrago. Las aplicaciones se han realizado en semillero, vivero, invernadero y campo. Estas aplicaciones han mostrado un efecto de disminución de la incidencia de enfermedades y aumento del rendimiento en las cosechas. Además se ha observado un efecto de inducción de crecimiento sobre semillas de girasol, tomate y pepino.

Actualmente TUSAL[®] se encuentra en proceso de registro en España y la UE y se están realizando estudios de toxicología para determinar su efecto sobre especies no-diana.

Proyecto cofinanciado por el Ministerio de Ciencia y Tecnología a través del Programa PROFIT (Biocontrol de enfermedades en cultivos mediante aplicaciones biotecnológicas respetuosas con el medio ambiente Ref: FIT-010000-2001-38) y el CDTI (Biocontrol de enfermedades en cultivos mediante aplicaciones biotecnológicas respetuosas con el medio ambiente. N° Expediente: 010189).

CONTROL BIOLÓGICO DE *Senecio inaequidens* CON *Puccinia lagenophorae*: TÉCNICAS DE GERMINACIÓN

HORTAL, S.; GIRBAL, J.

IRTA, Departament de Protecció Vegetal, Ctra. Cabrils s/n, 08348 Cabrils (Barcelona)

Senecio inaequidens es una asterácea originaria de Sudáfrica en rápida expansión por Europa. Se trata de una planta invasora que crece en ambientes alterados y que supone graves problemas para la flora local. En ocasiones, se encuentra atacada por *Puccinia lagenophorae*, basidiomiceto del orden de las Uredinales. Las posibilidades de uso de este hongo como agente de control biológico se han estudiado en *S. vulgaris* y de forma preliminar en *S. inaequidens* obteniendo, en este último caso, resultados poco claros (sobre planta viva). Por este motivo, exponemos el uso de técnicas *in vitro* para evaluar la capacidad infectiva de *P. lagenophorae* sobre *S. inaequidens* en condiciones controladas y profundizar en el conocimiento de este sistema hongo-planta.

La metodología propuesta consiste básicamente en la preparación de placas de agar con extracto de planta, la aspiración de eciósporas de una planta infectada, la inoculación de éstas sobre el medio de cultivo mediante pulverización (de modo que queden dispuestas de una en una) y posterior evaluación del porcentaje de germinación (tras 24 horas y al microscopio óptico). Una vez comprobada la aplicabilidad de la técnica, se establecieron las mejores condiciones de germinación (a 10°C y con luz) y se comprobó que la respuesta del hongo no se ve afectada por el hecho de autoclavar el medio con extracto (lo cual indica que la sustancia de la planta que puede inhibir la germinación de las esporas no es termolábil).

Siguiendo este protocolo, se comparó la germinación de las esporas en función de su procedencia (*S. vulgaris* o *S. inaequidens*) y del medio utilizado, agar-agua o agar con extracto de *S. vulgaris* o de *S. inaequidens* (de diferentes partes de la planta). Los resultados mostraron diferencias para ambos factores pero al repetir la prueba hubo problemas tanto en la germinación de las esporas como en el mantenimiento de los resultados, probablemente debido a cambios en el ciclo biológico del hongo que habría que estudiar. Se hallaron también ejemplares de *S. inaequidens* fuertemente atacados por otra roya, *Coleosporium senecionis*, lo cual abre nuevas perspectivas en el control biológico de esta especie.

EFFECTO DE DIFERENTES DOSIS DE *Trichoderma harzianum* SOBRE LAS PLÁNTULAS DE PEPINO AFECTADAS POR LA PODREDUMBRE DEL PIE (*Pythium aphanidermatum*)

LABELLA, Y.E.; SÁNCHEZ, J.; AGUILERA, C.; GALLEGU, E.

Departamento de Biología Vegetal y Ecología. Universidad de Almería. E-04120 Almería. E-mail: josanche@ual.es

El hongo edáfico *Pythium aphanidermatum* es responsable de la podredumbre de las semillas, raíces y cuello de plántulas, en lo que se conoce como enfermedad de los semilleros, ahogamiento de plántulas, podredumbre del pie o “damping-off”. Los tratamientos del suelo con el hongo antagonista *Trichoderma harzianum* pueden ser una alternativa para luchar contra *P. aphanidermatum* usado como fungicida biológico. Se diseñó un ensayo en el que se aplicó el antagonista al suelo cada semana desde la anterior a la siembra del pepino, momento en que se inoculó con el patógeno. Las plantas se mantuvieron 28 días, en que se arrancaron para medir diversas características fisiológicas. Se utilizaron diferentes dosis (6 kg/ha, 12 kg/ha y 15 kg/ha) de Trisan®, un producto biológico que contiene esporas de *T. harzianum*. Se trata de un polvo gris que contiene 2×10^8 ufc/g. Se utilizó el aislado I8C de *P. aphanidermatum* procedente de la micoteca del Área de Botánica de la Universidad de Almería. Se utilizó una variedad no híbrida de pepino (cv. “Ashley”). La nascencia y supervivencia de las plántulas de pepino en presencia de *Pythium* mejoró con la aplicación de *T. harzianum* (Trisan®) a cualquiera de las dosis ensayadas, sin presentar diferencias significativas. La dosis de *T. harzianum* (Trisan®) a 6kg/ha dio los mejores resultados para gran parte de los parámetros fisiológicos (peso húmedo de la parte aérea, peso húmedo de la raíz, peso seco de la parte aérea, peso seco de la raíz, contenido en agua de la planta, contenido en agua de la raíz, diámetro del tallo, altura de la plántula hasta los cotiledones, altura de la plántula hasta el ápice). La eficiencia fotosintética (Fv/Fm) fue mayor para los tratamientos de 12 kg/ha y 15 kg/ha. La aplicación del antagonista en solitario también mejoró la eficiencia fotosintética.

IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DEL AGENTE DE BIOCONTROL *Epicoccum nigrum* AISLADO 282

LARENA, I.; DE CAL, A.; MELGAREJO, P.

Departamento de Protección Vegetal, INIA; carretera de La Coruña Km 7,500. 28040 Madrid. E-mail: ilarena@inia.es

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

Epicoccum nigrum Link. aislado 282 es un agente de biocontrol de la podredumbre parda causada por *Monilinia* spp. en frutales de hueso. Con objeto de diferenciar a este aislado de otros aislados de la misma especie y de otros hongos presentes en la superficie vegetal, se ha procedido a su identificación molecular mediante RAPD-PCR. Para ello se han obtenido hasta 100 aislados de *E. nigrum* de distintas regiones de España y de distintos orígenes (frutos, brotes...). En una selección inicial se han usado 10 aislados de *E. nigrum*, incluyendo el 282, y 40 cebadores RAPD pertenecientes a las series N y R de OPERON. Entre ellos el cebador OPN18, rindió un fragmento específico de 615 pb de longitud para el aislado 282. Este fragmento fue clonado en plásmido pGEM y secuenciado a partir de una minipreps del plásmido. Se han diseñado 3 pares de parejas de cebadores. La especificidad de cada una de estas parejas de cebadores ha sido evaluada con todos los aislados de *E. nigrum* así como con otras especies y géneros de hongos. De entre ellas se ha seleccionado una pareja que parece ser específica del aislado 282 de *E. nigrum*. Esta pareja de cebadores nos permitirá la identificación rápida y específica de este aislado de *E. nigrum* responsable del biocontrol en cualquier parte del ecosistema donde sea aplicado.

EVALUACIÓN DEL ANTAGONISMO *in vitro* DE HONGOS ECTOMICORRÍDICOS COMESTIBLES SOBRE LA GERMINACIÓN ESPORAL Y EL CRECIMIENTO MICELIAR DE *Fusarium moniliforme*, E *in vivo* SOBRE LA GERMINACIÓN DE *Quercus ilex*, *Q. pyrenaica*, *Pinus pinea* Y *P. sylvestris*

LEÓN, D.; PASTOR, M.; MARTÍN, P.; PANDO, V.; PAJARES, J.A.; DIEZ-CASERO, J.J.

Universidad de Valladolid. Unidad de Entomología y Patología Forestales. Departamento de Producción Vegetal y Recursos Forestales. Escuela Técnica Superior de Ingenierías Agrarias (E.T.S.II.AA.). Campus Yutera Edificio E, Av. de Madrid 44. 34071. Palencia. E-mail: jdcasero@pvs.uva.es.

Fusarium moniliforme es uno de los hongos patógenos causantes, de la enfermedad de viveros conocida como damping off que causa graves daños sobre semillas y plántulas forestales. Con el fin de evaluar las posibilidades del control biológico de esta enfermedad mediante hongos ectomicorrícicos comestibles (HEC) y saprófitos se analizó la capacidad inhibidora de *Amanita rubescens*, *Leccinum lepidus*, *Lactarius sanguifluus*, *Lepista inversa*, *Suillus luteus*, *Tricholoma portentosum*, *Xerocomus ferrugineus* y *Agaricus silvaticus* frente al crecimiento miceliar y la germinación esporal de *Fusarium moniliforme*. Por otra parte, se estudió el efecto de los HEC *L. sanguifluus* y *L. lepidus* sobre la germinación de semillas de *Quercus ilex*, *Q. pyrenaica*, *Pinus pinea* y *P. sylvestris* inoculadas con *F. moniliforme*.

El crecimiento miceliar de *F. moniliforme* fue inhibido en presencia del micelio de *Amanita rubescens*, *L. lepidus* y *Suillus luteus*. Los filtrados de cultivos de todos los HEC lograron inhibir la germinación esporal de *F. moniliforme* en alguno de los intervalos estudiados (6, 12 y 24 h), de forma diferente entre los aislamientos del patógeno. Los porcentajes germinativos de las semillas de *Quercus ilex* y *Quercus pyrenaica* no variaron de forma significativa por la presencia individual o combinada de *Boletus lepidus* y *Fusarium moniliforme* en el sustrato. El HEC *Lactarius sanglifluus* tampoco mejoró la germinación de las semillas de *P. pinea* y *P. sylvestris*, ni en presencia ni en ausencia de *F. moniliforme*.

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

ALTERNATIVAS AL USO DEL BENOMILO PARA EL CONTROL DEL CHANCRO DE DIPLODIA EN EL ALCORNOQUE

LUQUE, J.; PERA, J.; PARLADÉ, X.

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

Hasta el año 2003, el benomilo se venía utilizando en Catalunya para el control del chancro de *Diplodia* en el alcornoque, una enfermedad causada por el hongo *Diplodia mutila*. Teniendo en cuenta la eliminación de este fungicida del registro de productos fitosanitarios, ha sido necesario encontrar otros productos alternativos para el control de la enfermedad.

Los ensayos de nuevos productos se plantearon en dos fases. En una primera fase realizada en el laboratorio, se estudió la capacidad de diferentes productos para inhibir el crecimiento del hongo en placa y así establecer una primera clasificación de los productos según su eficacia. En la segunda fase, los fungicidas que resultaron más eficaces en la primera fase se probaron en campo, bajo condiciones reales de descorche. En estas pruebas se utilizaron seis fungicidas: benomilo (usado como referencia), ciprodinilo, metiltiofanato, tiabendazol y dos productos con un principio activo cúprico (sulfato e hidróxido). Los productos se aplicaron en cuatro parcelas de alcornocal, con un diseño experimental de bloques al azar y con un mínimo de 150 árboles tratados por producto y parcela, de los que el 25% fueron árboles no tratados (control). Para examinar la eficacia protectora de los fungicidas se analizaron el número y la superficie de los chancros causados por el patógeno en el tronco de árboles descorchados, y se compararon los índices de eficacia de Abbott entre los distintos tratamientos.

Los resultados obtenidos indican que el benomilo demostró una mayor eficacia protectora frente a la enfermedad. En el otro extremo, los fungicidas basados en cobre presentaron una eficacia nula o muy baja. Los fungicidas restantes presentaron valores intermedios o próximos a los del benomilo, como en el caso del metiltiofanato. Sin embargo, la gran variabilidad observada en las parcelas experimentales no permitió establecer una clasificación homogénea y definitiva en cuanto a los productos de efectividad intermedia.

DETERMINACIÓN DEL MECANISMO DE ACCIÓN DE *Pantoea agglomerans* EPS125 EN EL BIOCONTROL DE *Erwinia amylovora* y *Penicillium expansum* MEDIANTE LA TÉCNICA DE MUTAGÉNESIS CON TRANSPOSONES

MORENO, M.C.¹; BADOSA, E.¹; AGUSTÍ, L.¹; PENYALVER, R.²; MONTESINOS, E.¹

¹Instituto de Tecnología Agroalimentaria-CerTA-CIDSAV. Universitat de Girona. Campus Montilivi 17071. Girona. E-mail: carme.moreno@udg.es.

²Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA). Apartado oficial, 46113 Moncada, Valencia.

Como resultado de una exhaustiva prospección de aislados bacterianos activos como agentes de control biológico de bacterias y hongos fitopatógenos, nuestro laboratorio seleccionó la cepa *Pantoea agglomerans* EPS125. Esta cepa se ha mostrado como un agente de biocontrol muy eficiente contra diferentes enfermedades fúngicas en poscosecha de fruta, causadas por *Penicillium expansum*, *Monilinia laxa* y *Rhizopus stolonifer* en una amplia variedad de frutos como manzanas, peras, melocotones, nectarinas, fresas y cerezas. Además, la cepa ha mostrado actividad antagonista *in vitro* contra *E. amylovora*, agente causal del fuego bacteriano.

En estudios preliminares se observó que para el biocontrol de hongos fitopatógenos era necesaria la interacción directa célula-a-célula sin contribuir significativamente la producción de metabolitos secundarios o la competencia por nutrientes.

Un objetivo que nos planteamos en el presente trabajo fue la determinación de los posibles mecanismos de acción de este agente de biocontrol. Para ello, se ha utilizado la técnica de mutagénesis con transposones mediante la conjugación con la cepa donadora *Escherichia coli* S17-1 λ pir portadora del plásmido pCAM140 (minitransposón GUS), obteniéndose inicialmente una colección de 4032 mutantes no auxotróficos.

Para seleccionar los posibles mutantes defectivos en biocontrol se ha verificado la pérdida de la producción de halos de inhibición *in vitro* frente a *E. amylovora*, así como de la inhibición de la infección causada por *P. expansum* en manzanas de la variedad Golden.

Después de una primera selección entre los 4032 mutantes, se procedió a la repetición de los ensayos para comprobar su estabilidad. Al final de los dos cribados, se han seleccionado 58 mutantes, de los que, 8 son defectivos en el control de la infección causada por *P. expansum* en manzana, 7 no producen halos de inhibición *in vitro* frente a *E. amylovora* y los 43 restantes, son defectivos en ambos ensayos. Actualmente, se están analizando estos mutantes defectivos para identificar los genes que pueden estar relacionados con la capacidad de biocontrol de la cepa EPS125.

CONTROL BIOLÓGICO DE *Cryphonectria parasitica* CON *Trichothecium roseum*

MORET, A.; NADAL, M.; MUÑOZ, Z.

Dpto. de Biología Vegetal, Fac. de Biología, Av. Diagonal, 645, 08028 Barcelona. E-mail: mmoret@ub.edu; E-mail: mnadal@ub.edu

Cryphonectria parasitica (Murrill) Barr. (= *Endothia parasitica* [Murrill] Anderson & Anderson) es un hongo ascomicete responsable de la enfermedad conocida como "cáncer del castaño (*Castanea sativa* Mill.)", no obstante también infecta la encina (*Quercus ilex* L.) y otras especies forestales. Esta enfermedad es originaria de Asia donde es poco agresiva para sus huéspedes, en cambio en Europa, África y América del Norte ha ocasionado la muerte de miles de árboles.

El control de esta enfermedad es difícil de conseguir dado que la mayoría de los fungicidas convencionales resultan poco efectivos. Por este motivo, el objetivo de este estudio es ensayar el control biológico de *C. parasitica* con el hongo *Trichothecium roseum* (Bull.) Lk. el cual no resulta perjudicial para la especie objeto de estudio.

El cultivo puro de *C. parasitica* se obtuvo a partir de castaños afectados por una cepa agresiva del hongo mientras que *T. roseum* se aisló a partir de manzanas infectadas.

Los estudios se realizaron con encinas de 1 año de edad que crecían en condiciones de invernadero. Se realizaron cuatro tratamientos distintos: un lote de plantas no inoculadas se utilizó como control negativo, un segundo lote de plantas que se inoculó con *C. parasitica* se consideró como control positivo, un tercer lote fue inoculado con *T. roseum* y el cuarto lote recibió inóculo de *T. roseum* y posteriormente, a los 15 días de la primera inoculación, se inoculó con *C. parasitica*.

Antes de la inoculación se procedió a la desinfección superficial de la corteza con etanol del 95% durante 10 segundos; a continuación se practicó una herida de unos 15 mm de longitud para separar un fragmento superficial de la corteza debajo del cual se colocó un disco de 5 mm de diámetro, procedente de un cultivo puro de 7 días de crecimiento, de las especies correspondientes. Finalmente se envolvieron las heridas practicadas con parafilm para evitar la deshidratación de los hongos y las infecciones secundarias.

A los 90 días de la inoculación tanto el control negativo como las plantas tratadas con *T. roseum* permanecieron sanas. Un 60% de árboles del control positivo presentaron distintos grados de afectación (10% muertos, 40% con hojas cloróticas con inicios de necrosis y hojas totalmente necrosadas y un 10% con el tallo principal necrosado pero con rebrotes laterales vivos). Un 70% de las plantas con la doble inoculación permanecían sanas y el 30 % restante presentaban hojas cloróticas.

EL PÉPTIDO PAF26 COMO ANTIFÚNGICO FRENTE A HONGOS FITOPATÓGENOS DE POSTCOSECHA: ESTUDIOS COMPARADOS SOBRE SU ESPECIFICIDAD, MODO DE ACCIÓN Y SECUENCIA DE AMINOÁCIDOS

MUÑOZ, A.; LÓPEZ-GARCÍA, B.; MARCOS, J.F.

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

La búsqueda de compuestos antimicrobianos líderes adquiere especial relevancia en la lucha por encontrar nuevas estrategias de protección contra fitopatógenos y alternativas al control de las podredumbres postcosecha. Nuestro laboratorio ha identificado mediante química combinatorial una serie de hexapéptidos antifúngicos, llamados PAF. Tres de ellos (PAF26, PAF32 y PAF34) presentaron actividad antimicrobiana *in vitro* frente a *Penicillium digitatum*, *P. italicum* y *P. expansum*, los tres hongos patógenos de postcosecha, de cítricos ó frutos de pepita. Son péptidos que difieren en uno o dos residuos de aminoácidos y que presentan distintos grados y patrones de actividad frente a estos hongos y frente a microorganismos no diana también testados como las bacterias *Escherichia coli* y *Bacillus subtilis*, y la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. Se seleccionó PAF26 para un estudio más profundo debido a su mayor potencia antimicrobiana y especificidad de microorganismo.

Se estudió el modo de acción de PAF26 por medio de ensayos sobre las posibles alteraciones de la membrana y pared celular de *P. digitatum*, en lo que se refiere a permeabilización y cambios en su morfología, y en comparación con péptidos de secuencia relacionada pero con actividad antifúngica muy disminuida.

También se ha estudiado la optimización de la secuencia primaria de aminoácidos de PAF26. Por medio de una serie de seis análogos de sustitución por alanina de PAF26 en cada una de sus posiciones, evaluamos la importancia de cada residuo en cuanto a su actividad, especificidad, y capacidad de permeabilización y producción de alteraciones morfológicas sobre *P. digitatum*. Se demostró que PAF26 es un compuesto líder idóneo con el que abordar su posible mejora por extensión de secuencia de aminoácidos, y producción biotecnológica de un péptido antifúngico de aplicación práctica altamente competitivo.

EFICACIA DE DESTILADOS DE SUBPRODUCTOS DEL OLIVO EN EL CONTROL DE *Colletotrichum acutatum* Y *Botrytis cinerea*

ORTEGA, J.; DE LOS SANTOS, B.; BARRAU, C.; GARRIDO, J.M.; ROMERO, F.
I.F.A.P.A., C.I.F.A. "Las Torres-Tomejil", C.I.C.E. Junta de Andalucía,
Cta. Sevilla-Cazalla, Km 12,2. 41200-Alcalá del Río, Sevilla

Colletotrichum acutatum y *Botrytis cinerea*, aislados de planta de fresa originan dos de las enfermedades más importantes que afectan a este cultivo: antracnosis y podredumbre gris. Su control se basa en el uso de plantas libres de patógenos, aplicación de fungicidas químicos, utilización de cultivares resistentes. Existiendo pocos trabajos sobre biocontrol, la utilización de extractos vegetales con capacidad fungicida aparece como una alternativa de bajo impacto ambiental que permite reducir el uso de productos químicos.

En este estudio se ha ensayado la efectividad de la fracción líquida de un destilado (DSO) de subproductos de la industria olivarera (restos de poda) en el control de *C. acutatum* y *B. cinerea*.

Se han llevado a cabo ensayos "in vitro", sobre medio de patata dextrosa agar enriquecido con esta formulación a distintas concentraciones, para determinar su capacidad inhibitoria sobre el crecimiento micelial de los patógenos. Los ensayos se llevaron a cabo en condiciones de luz continua y oscuridad.

A concentración de 0,1% DSO o inferiores no se aprecia efecto sobre el crecimiento de los patógenos estudiados. Concentraciones de 1% DSO reducen el desarrollo de *C. acutatum* respecto al control en un 42% en oscuridad y en un 38% bajo luz, en el caso de *B. cinerea* los porcentajes varían entre un 25% en oscuridad y 27% en luz. La concentración mínima inhibitoria para *C. acutatum* se encuentra entre 1,5% y 2%, mientras que en el caso de *B. cinerea* se halla entre 2 y 3%.

Mediante la aplicación por riego o pulverización a plantas de fresa se ha comprobado que este destilado no es fitotóxico a las concentraciones estudiadas.

ACTIVIDAD *in vitro* DE PRODUCTOS DE ORIGEN VEGETAL FRENTE A ESPECIES FÚNGICAS DEL COMPLEJO DE LA PODREDUMBRE DE CORONA (CROWN ROT) DEL PLÁTANO EN CANARIAS

PERERA, S.¹; HERNÁNDEZ-HERNÁNDEZ, J.M.²; MARRERO, A.³

¹Dpto. Técnico de COPLACA. ²Dpto. Protección Vegetal, ICIA. ³CSCA.. Universidad de La Laguna.

La podredumbre de corona *crown rot* es el principal problema post-cosecha del plátano. Surgió en la década de los 60, cuando el cv. 'Gross Michel', susceptible al Mal de Panamá, fue substituido por cvs. del subgrupo 'Cavendish', resistentes a dicha enfermedad. Por la mayor fragilidad de los cvs. 'Cavendish,' se pasó a exportar racimos troceados en manos en vez de los tradicionales racimos enteros. Las amplias zonas de corte, propiciaron la aparición del *crown rot*, producido por especies fúngicas de la serie de patógenos de herida. El rechazo generalizado de los consumidores al uso de productos químicos en postcosecha, hace que se están investigando métodos alternativos de control. El objetivo de este trabajo ha sido estudiar la actividad *in vitro* de productos de origen vegetal, frente a las especies fúngicas más comunes del complejo de la podredumbre de corona (*crown rot*) del plátano en Canarias.

Se probó la eficacia *in vitro* de los productos de origen vegetal : a) Esencia de tomillo rojo (*Thymus zizis*) al 8% (38,2 % en Timol); b) solución hidroglicólica de propóleo(0,2 g/ml) y extracto líquido de aceite de soja. Como referentes químicos se utilizaron Imazilil,(7,5 % SL); Tiabendazol (60% SC) y Metil tiofanato (45% SC). Se probaron tres dosis. Para los productos de origen vegetal, la dosis recomendada (dosis media) fue aumentada y disminuida en un 25 % (dosis máxima y mínima). En los productos químicos se utilizaron las dosis recomendadas.

Para cada una de las especies fúngicas se obtuvieron diferencias significativas entre los productos ensayados. Dentro de los productos de origen vegetal, la esencia de tomillo rojo produjo reducciones del crecimiento lineal superiores al 50 % en *Acremonium* sp. ; *Colletotrichum musae*; *Geotrichum* sp., *Fusarium oxysporum* y *Verticillium theobromae*. Se han observado diferencias significativas entre dosis para todas las especies fúngicas excepto para *Penicillium* sp. y *Gliocladium* sp. Para la esencia de tomillo rojo , no se apreciaron diferencias significativas entre dosis media y máxima excepto en *Colletotrichum musae*, *F. oxysporum* y *F. proliferatum*. En general, con los productos químicos se obtuvieron las mayores reducciones. Teniendo en cuenta las características del proceso de comercialización y transporte del plátano canario, estos resultados indican que la esencia de tomillo rojo, podría ser una alternativa al uso de productos químicos.

ALTERNATIVAS NO QUÍMICAS PARA EL CONTROL DE *Phytophthora* spp. EN CAMPOS DE FRESA

PORRAS, M.; BARRAU, C.; ARROYO, F.T.; DE LOS SANTOS, B.; BLANCO, C.; ROMERO, F.
IFAPA. CIFA "Las Torres-Tomejil". Consejería de Innovación, Ciencia y Empresa de la Junta de Andalucía. Apto. Correos Oficial 41200. Alcalá del Río (Sevilla). E-mail: maria.porras.ext@juntadeandalucia.es

Los patógenos de suelo ocasionan considerables pérdidas económicas en el cultivo de la fresa. Las enfermedades que originan clásicamente han sido controladas mediante desinfestación con bromuro de metilo y fungicidas sistémicos. La legislación europea, cada vez más restrictiva a la utilización de pesticidas en productos dedicados al consumo directo, y la prohibición a partir de 2005 del uso del bromuro de metilo, por contribuir a la destrucción de la capa de ozono, hacen necesario el desarrollo de alternativas adecuadas.

Phytophthora spp. provocan severas podredumbres de coronas, raíces y frutos, marchitez y muerte de la planta. Sus oosporas persisten en el suelo y en plantas infectadas, constituyendo la fuente de inóculo.

En este estudio evaluamos el efecto de la solarización y de la aplicación de cepas de *Trichoderma* como alternativas no químicas frente a *Phytophthora* spp. patógenas de fresa.

Los ensayos de campo se realizaron en Moguer (Huelva), en parcelas (12'5m x 3'3 m) que nunca habían sido tratadas con bromuro de metilo, con diseño estadístico factorial en bloques completos al azar, con cuatro repeticiones.

Se cuantificaron las poblaciones edáficas de *Phytophthora* spp. y de *Trichoderma* spp. mediante aislamientos en medios de cultivo selectivos.

Los datos se sometieron a análisis de varianza para estudiar el efecto de la solarización, de la aplicación de *Trichoderma* y de la interacción entre ambas.

La solarización disminuyó el inóculo de *Phytophthora* spp. y de *Trichoderma* spp., aunque no significativamente.

Las parcelas tratadas con *Trichoderma* spp. (Tusal®), mediante aplicaciones de fondo+inmersión y fondo+inmersión+recuerdo, presentaron un número significativamente superior de unidades formadoras de colonias (ufc) de *Trichoderma* spp./g de suelo seco, y un número significativamente inferior de ufc de *Phytophthora* spp./g de suelo seco, respecto a las parcelas control.

DESINFECCIÓN DE SUELOS MEDIANTE BIOFUMIGACIÓN, SOLARIZACIÓN Y BIOSOLARIZACIÓN EN EL OLIVAR

REYES, J.M.¹; DE CARA, M.¹; DIÁNEZ, F.¹; SANTOS, M.¹; BLANCO, R.¹; SEGURA, J.M.¹; SÁNCHEZ, J.A.²; TELLO, J.C.¹

¹Departamento de Producción Vegetal. Universidad de Almería. Cañada de San Urbano s/n. 04120, Almería. jtello@ual.es, (+34) 950 015527.

²Departamento de Edafología y Química Agrícola. Universidad de Almería. Cañada de San Urbano s/n. 04120, Almería.

Con el fin de buscar un método de control para la Verticiliosis del olivar, se han venido ensayando una serie de tratamientos desinfectantes de tipo biológico, físico y una combinación de éstos, para poder evaluar en campo la respuesta de los árboles enfermos frente a los mismos. Los tratamientos se ensayaron en una finca con olivos de ocho años gravemente afectados por problemas de seca de ramas y árboles completos. Para medir la evolución de los árboles tratados con los distintos métodos se eligieron parcelas testigo como referencia. El trabajo se divide en dos partes, una dedicada al patosistema *Verticillium dahliae* y olivo, en el que se han analizado los síntomas observados en los árboles para detectar la presencia de *V. dahliae*, así como el análisis microbiológico de los suelos tratados con los distintos métodos para comprobar como evolucionan las poblaciones de microorganismos en el suelo tras los tratamientos. La otra parte del trabajo esta dedicada a la influencia agronómica que tienen estos tratamientos sobre la finca. Se ha realizado un estudio de la influencia de los tratamientos sobre las propiedades fisico-químicas de los suelos, así como del crecimiento de los árboles, cantidad de cosecha, tamaño de frutos, etc.

Palabras clave: Biofumigación, Biosolarización, Solarización, Verticiliosis.

INFLUENCIA DE LA BIOSOLARIZACIÓN SOBRE UNA FRACCIÓN DE LA MICROBIOTA FÚNGICA DE LOS SUELOS DE OLIVAR

REYES, J.M.¹; DE CARA, M.¹; DIÁNEZ, F.¹; SANTOS, M.¹; SEGURA, J.M.¹; BLANCO, R.¹; SÁNCHEZ, J.A.²; TELLO, J.C.¹

¹Departamento de Producción Vegetal. Universidad de Almería. Cañada de San Urbano s/n. 04120, Almería. jtello@ual.es, (+34) 950 015527.

²Departamento de Edafología y Química Agrícola. Universidad de Almería. Cañada de San Urbano s/n. 04120, Almería.

La biosolarización, se ha aplicado durante el año 2003 para el control de la verticiliosis (agente causal *Verticillium dahliae*) en el olivar. Los trabajos se han realizado en un olivar joven de ocho años de edad, seriamente afectado por problemas de seca de ramas y árboles completos. Como material biofumigante se utilizó hoja de olivo procedente de las líneas de limpieza de las almazaras de la zona, a razón de 50 litros/m², que se enterró y se regó a saturación, posteriormente se cubrió con una lámina de polietileno transparente, una superficie de 20 m² alrededor de cada árbol en los meses estivales y se mantuvo durante seis semanas. Se analizó en el laboratorio como evolucionaban las poblaciones de microorganismos como *Fusarium*, *Pythium* y *Phytophthora* antes y después del tratamiento y se compararon con un testigo y con otros tratamientos de Solarización y de Biofumigación. Se observó como la biosolarización redujo notablemente las poblaciones de estos géneros de hongos con respecto al testigo. El estudio de las poblaciones de los géneros aquí citados ha sido útil para demostrar el efecto desinfectante de la biosolarización sobre los microorganismos del suelo, en un primer momento, ya que tras la retirada de los plásticos, el elevado contenido en materia orgánica de estos suelos, permitió que se desarrollaran rápidamente aquellos microorganismos especializados en descomponer la materia orgánica de modo que se activa la defensa natural de los suelos frente a los patógenos de las plantas.

Palabras clave: Biosolarización, *Verticillium*, *Fusarium*, *Phytophthora*.

EFFECTO DE LOS FUNGICIDAS CÚPRICOS SOBRE LA FLORACIÓN DEL OLIVO

ROCA, L.F.; TRAPERO, A.

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

El control del Repilo del olivo, causado por *Spilocaea oleagina*, se lleva a cabo principalmente mediante la aplicación de fungicidas cúpricos de efecto protector. Tradicionalmente los tratamientos fungicidas se aplican a principios del otoño y de la primavera. Recientemente se ha comprobado que las hojas jóvenes desarrolladas en primavera, son más susceptibles a la infección, por lo que los tratamientos de primavera son de gran importancia para el manejo de esta enfermedad. Estos tratamientos pueden coincidir con la floración del olivo, desconociéndose hasta el momento el efecto del cobre sobre la floración y posterior cuajado del fruto.

En el presente trabajo, cuatro fungicidas cúpricos comerciales, sulfato de cobre puro y caldo bordelés preparado en laboratorio, se aplicaron en floración a plántones de olivo de la variedad 'Arbequina', así como a olivos de la variedad 'Picual' en campo. En este último caso solo se trataron ramas aisladas, empleándose dos productos por árbol y señalándose además una rama testigo en cada uno de ellos. Todos los productos cúpricos se prepararon a una concentración de 2000 mg de Cu/l, empleándose además concentraciones de 630 y 200 mg de Cu/l en el caso del sulfato de cobre.

En los plántones se evaluó el número de flores viables por inflorescencia inmediatamente tras la floración, mientras que en los olivos se marcaron veinte ramillas, con al menos cinco inflorescencias cada una, en las ramas tratadas, a fin de contabilizar el número final de frutos cuajados por inflorescencia y la caída de hojas por efecto del tratamiento. Se observó cierta fitotoxicidad del cobre, que indujo una mayor necrosis de flores e inflorescencias, especialmente cuando se aplicó en forma de sulfato puro, efecto que no se produjo de forma significativa con los productos comerciales. Se comprobó además la incidencia negativa del sulfato de cobre sobre la germinación *in vitro* de los granos de polen. Estos resultados aún preliminares, habrán de ser contrastados en nuevos ensayos ampliando el número de fungicidas analizados.

CONTROL QUÍMICO DE LA PODREDUMBRE RADICAL DE LOS *Quercus*

ROMERO, M.A.; SÁNCHEZ, M.E.; FERNÁNDEZ, R.; TRAPERO, A.

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

En las primaveras de los años 2001 y 2002 se prospectaron un total de 25 fincas afectadas de Seca de *Quercus* en la provincia de Huelva. La evaluación del grado de defoliación del arbolado en estas fincas nos llevó a concluir que la Seca de encinas y alcornoques es un problema ampliamente distribuido en dehesas y montes de la provincia de Huelva, con índices de severidad preocupantes. Del análisis de muestras de tejidos afectados (raíces) así como de los análisis fitopatológicos de muestras de suelo, se pudo determinar que la podredumbre radical causada por *Phytophthora cinnamomi* es la principal enfermedad presente en las fincas. El hongo se detectó en 22 de las 25 fincas evaluadas. Las prospecciones realizadas sirvieron también para seleccionar las 7 fincas en las que hemos establecido una serie de parcelas experimentales para evaluar la eficacia de tratamientos químicos contra *P. cinnamomi*. Las parcelas experimentales se eligieron en función de la presencia de focos de enfermedad en los cuales los árboles afectados presentaran niveles similares de severidad de síntomas (defoliación). En cada una de las fincas seleccionadas se marcaron y evaluaron individualmente 24–36 árboles afectados, asignando a cada uno de ellos un índice de defoliación, definido según las clases de defoliación establecidas por la Consejería de Medio Ambiente de la Junta de Andalucía para la Red de Seguimiento de Daños en Ecosistemas Forestales. Este índice valora, en una escala de 0 a 5, el grado de defoliación que muestran las copas de los árboles afectados, asignando el valor 0 al árbol sano y el valor 5 al árbol muerto. Sobre estos árboles se realizaron los tratamientos de inyección al tronco de fosfito potásico. Se realizaron dos evaluaciones anuales de la evolución de los árboles una vez tratados. Los resultados obtenidos muestran un empeoramiento de los árboles testigos, algunos de los cuales murieron en el transcurso de los experimentos. Los árboles inyectados, mostraron un estado estacionario en la evolución de la enfermedad, con remisión de síntomas en algunas de las parcelas tratadas, aunque no en todas.

BIOFUMIGACIÓN Y CONTROL MICROBIOLÓGICO CONTRA EL "DAMPING-OFF" EN REMOLACHA AZUCARERA CAUSADO POR *Rhizoctonia solani*

SACRISTÁN PÉREZ-MINAYO, G.¹; LÓPEZ-ROBLES, D.J.²; REGUERA-USERO, J.I.¹; GONZÁLEZ-CARCEDO, S.²

¹Área de Microbiología. ² Área de Edafología y Química Agrícola.

Facultad de Ciencias. Universidad de Burgos. Plaza Misael Bañuelos s/n. 09001 Burgos.

El "damping-off" (o pie negro) constituye una de las enfermedades de la remolacha azucarera producida por hongos edáficos entre los que destaca *Rhizoctonia solani* en los cultivos de la provincia de Burgos. El control de la enfermedad se ha centrado tradicionalmente en el uso indiscriminado de productos químicos que contribuyen a perjudicar el medio ambiente y la salud de los consumidores. En el presente trabajo se evalúan dos posibles alternativas de control, la biofumigación y el empleo de microorganismos antagonistas.

Se emplearon diferentes dosis de biofumigante (10, 20 y 40 g/Kg de suelo agrícola) con restos vegetales procedentes de subproductos del cultivo de fresa y se determinó "in vitro" la eficacia de *Pseudomonas* sp. (colección propia) frente a *R. solani*. Se inocularon semillas de remolacha con un cultivo de *Pseudomonas* sp. (6×10^9 ufc/ml). Todos los ensayos fueron realizados en suelos infectados con *R. solani* y se sembraron semillas de remolacha no pildoradas para detectar el efecto patógeno de dicho hongo.

El número de nascencias de plantas de remolacha fue mayor en el ensayo con una dosis de biofumigante de 40 g/Kg de suelo agrícola. Al disminuir esta dosis, el número de nascencias disminuyó progresivamente. Con *Pseudomonas* sp. se observó un crecimiento similar al del ensayo con una dosis de biofumigante de 10 g/Kg de suelo agrícola.

El desarrollo y crecimiento de las plántulas se favoreció notablemente en suelos que sufrieron un proceso de biofumigación y/o donde las semillas se inocularon con *Pseudomonas* sp. De estos datos se desprende la posibilidad de aplicar alternativas de control del "damping-off" contra *R. solani* compatibles con el medio ambiente y de un coste económico menor que el del control químico tradicional. Los resultados obtenidos ponen de manifiesto la eficacia de las técnicas de manejo del suelo basadas en la acción biocida de las sustancias volátiles, que resultan de la incorporación de materia orgánica al suelo, así como la contribución de la microbiota antagonista.

PAPEL BIOFUMIGANTE DE LOS RESTOS DE COSECHA DE PLANTAS HORTÍCOLAS SOBRE *Phytophthora capsici*

SANTOS, M.; BOIX, A.; DIÁNEZ, F.; MARTÍNEZ, R.E.; GÁMEZ, I.; DE CARA, M.; BLANCO, R.; TELLO, J.C.

Departamento de Producción Vegetal. Universidad de Almería. Carretera Sacramento s/n. La Cañada de San Urbano. Almería. 04120. E-mail: msantos@ual.es

Los investigadores y técnicos en agricultura se están enfrentados a uno de los mayores retos de los últimos años, el de encontrar alternativas al bromuro de metilo (BM) y en general a los pesticidas para controlar plagas y enfermedades de las plantas por sus efectos negativos para el ambiente y la salud de los ciudadanos. Concretamente, en España, el consumo de BM afecta a unas 8000 ha de cultivo, principalmente hortalizas (49%) y frutales (39%). La alternativa que se proponga debe ser eficaz, no impactar sobre el medio ambiente, ser económica y socialmente viable, características que no han sido hasta ahora exigidas a ningún pesticida.

El objetivo principal de este trabajo, es determinar, mediante un ensayo de laboratorio, la eficacia biofumigante de distintos restos de cultivos hortícolas locales en el control del hongo fitopatógeno *Phytophthora capsici*.

Se ha utilizado como material vegetal biofumigante hojas sanas de pimiento, tomate, calabacín y pepino, en dosis de 75 g y 100 g. Estudiando la eficacia biofumigante de dicho material vegetal sobre el patógeno inoculado, usando macetas de cierre hermético, para evitar los escapes de los gases producidos en la biofumigación, con vermiculita esterilizada como sustrato. Se realizaron 4 tratamientos: en el tratamiento 1, se añadió a la vermiculita hojas del material vegetal más el patógeno, en el segundo tratamiento solo se añadieron las hojas, en el tercero solo patógeno y en el cuarto solo se le añadió agua al sustrato. Para comprobar los efectos biocidas y/o bioestáticos del material biofumigante frente al patógeno, una vez finalizada la biofumigación, cuya duración fue ensayada a tres tiempos distintos de permanencia 20, 30 y 40 días, se sembraron plantas susceptibles, pimiento para el caso de *P. capsici*. La relación patógeno / hospedador susceptible fue comprobada mediante un ensayo de poder patógeno previo a la biofumigación. El éxito biocida y/o bioestático del material biofumigante se ha evaluado atendiendo a la presencia en el sustrato después del proceso de biofumigación de *P. capsici* y los síntomas que este hongo produce en las plantas utilizadas, así como sus valores de peso y altura, después de la finalización del ensayo, de las plantas utilizadas como indicadoras, para comprobar el efecto del material vegetal en el proceso de biofumigación. En los ensayos realizados se han establecido las repeticiones necesarias para obtener significación en el tratamiento estadístico de los datos obtenidos. Los resultados obtenidos han mostrado que existe una elevada presencia de PC después del proceso de biofumigación, además este patógeno ha sido capaz de enfermar a un gran número de plantas de pimiento, siendo independiente del material vegetal utilizado, la dosis y el tiempo de permanencia.

EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD SUPRESORA DE LA VERTICILOSIS DEL OLIVO DE ANTAGONISTAS MICROBIANOS Y COMPUESTOS DE ORIGEN BIOLÓGICO

TEJEDOR, E.¹; MERCADO-BLANCO, J.¹; JIMÉNEZ-DÍAZ, R.M.^{1,2}

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

² ETSIAM, Universidad de Córdoba, Apdo. 3048, 14080 Córdoba. ag1jdir@uco.es

La Verticilosis del olivo causada por *Verticillium dahliae* afecta severamente al olivar en prácticamente todos los países de relevancia oleícola, pero su control eficiente en plantaciones establecidas continúa siendo un reto significativo para los fitopatólogos. Una posible medida de lucha, complementaria de otras y concebida en un contexto de control integrado de la enfermedad, consiste en el tratamiento de la planta infectada con antagonistas microbianos y/o extractos derivados de los mismos con capacidad de inducir o estimular los mecanismos defensivos innatos en la planta. En este trabajo hemos evaluado el potencial de biocontrol de infecciones causadas por el patotipo más virulento y defoliante de *V. dahliae*, mediante la aplicación de los aislados bacterianos *Pseudomonas fluorescens* PICF4 y PICF7 a plantones de 1 a 2 años de edad de diversos cultivares de olivo, utilizando diferentes técnicas de aplicación y protocolos de tratamiento. Por otra parte, hemos tratado con extractos proteínicos de *Trichoderma* sp. plantones de olivo 'Picual' susceptible de 2 años de edad. La reacción de las plantas se evaluó por el desarrollo de síntomas y la detección del patógeno en raíz y tallo mediante análisis "nested" PCR. Los resultados corroboraron la tolerancia de los cvs. Empeltre y Frantoio a *V. dahliae*. En el resto de los cultivares de estudio, considerados como susceptibles, el tratamiento de las plantas mediante inmersión del sistema radical desnudo en una suspensión de bacterias no determinó un nivel significativo de supresión de Verticilosis en nuestras condiciones experimentales. Adicionalmente, hemos estudiado si diferentes metodologías para el tratamiento con los aislados bacterianos facilitan el establecimiento de una población estable de ellos en la rizosfera de olivo y si esta población llega a colonizar endofíticamente la raíz y tallo de los plantones. Los resultados muestran que la población nativa de *Pseudomonas* sp. resulta desplazada por el agente de biocontrol incorporado en la raíz, aunque la estabilidad de la población de este último en el tiempo varía según la metodología de aplicación y el tipo de planta. La aplicación de extractos de proteínas de *Trichoderma* sp. no confirió niveles significativos de supresión de la Verticilosis, tanto en tratamientos mediante pulverización de los extractos a la parte aérea, como de inyección de los mismos en el tallo de plantas de olivo 'Picual'. Mediante estudios de expresión génica, en progreso, estamos tratando de determinar si la falta de eficacia de dichos tratamientos obedece a incapacidad de ellos de inducir la expresión de mecanismos defensivos en olivo.

Subvencionado por el Proyecto CAO00-017 del Programa de Mejora de la Calidad de la Producción del Aceite de Oliva de la Junta de Andalucía.

ESTUDIO DE FUNGICIDAS DE BAJA TOXICIDAD Y DE ORIGEN BIOLÓGICO CONTRA HONGOS CAUSANTES DE PUDRICIÓN Y AZULADO DE LA MADERA

TROYA, M.T.; RUBIO, F.; RAPOSO, R.

Laboratorio de Protección de Maderas, CIFOR-INIA, Apdo. 8111, 28080-Madrid. E-mail: troya@inia.es.

Dpto. de Biología Celular y Molecular y Bioquímica, Fac. CC. Experimentales y de la Salud, Universidad San Pablo, Boadilla del Monte-Madrid. E-mail: frubcre@ceu.es.

Unos de los principales problemas que existen en la industrialización y uso de la madera, tanto para fines decorativos como estructurales, es el ataque de hongos xilófagos y cromógenos. Este hecho es evitable mediante la aplicación de productos fungicidas que eviten el daño.

La transposición de la Directiva de Biocidas a España en octubre de 2002, ha obligado a enfocar las investigaciones del sector de la protección de la madera, en la búsqueda de métodos alternativos a los tradicionalmente utilizados, que minimicen el impacto ambiental.

El objetivo de este trabajo ha sido evaluar la eficacia de productos de baja toxicidad y de algunos bioprotectores utilizados en los sistemas agrícolas, para estudiar su aplicación y uso en la madera recién apeada y seca.

Para ello, se han seleccionado 13 productos, de los cuales siete son de baja toxicidad, tres de origen biológico y dos de referencia. Se han utilizado probetas de madera de *Pinus sylvestris* L., impregnadas con los productos anteriormente mencionados, que se pusieron en contacto en placas Petri de agar-malta, con las cepas de los hongos xilófagos y cromógenos de obligado cumplimiento en la normativa europea destinada a evaluar la eficacia de los protectores. Las especies ensayadas fueron: *Coniophora puteana*, *Gloeophyllum trabeum*, *Postia placenta*, y *Trametes versicolor* (hongos xilófagos causantes de pudriciones cúbica y fibrosa); y *Pullularia pullulans* y *Sclerophoma pityophila*, como hongos causantes de azulado. Igualmente se ha evaluado la eficacia de los mencionados productos en aislados españoles pertenecientes al género *Ophiostoma* spp., productores de un azulado especialmente intenso en las serrerías de nuestro país.

Los resultados han mostrado que los formulados de baja toxicidad suelen ser más eficaces que los de origen biológico a las concentraciones estudiadas.

Estos resultados abren un esperanzador camino en el uso de este tipo de productos, que podría cubrir el vacío existente en el mercado, ya que por ser de baja toxicidad para el hombre y el medio ambiente cumplen con las exigencias de la citada Directiva de Biocidas.

ACTIVIDAD ANTAGONISTA EN MADERA DE VID DE DOS ESPECIES DE *Chaetomium* CONTRA HONGOS ENDOFITOS CAUSANTES DE LA “YESCA”

TUSET, J.¹; HINAREJOS, R.¹; MIRA, J.L.¹; HINAREJOS, C.¹; NAVARRO, A.²; BENAVENT, E.²

¹Departamento de Protección Vegetal y Biotecnología. Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA). Moncada, Valencia. E-mail: jjtuset@ivia.es

²Servicio de Viticultura y Enología. Conselleria d'Agricultura i Pesca. Requena, Valencia.

La “yesca” es la enfermedad más importante y antigua del viñedo. Un complejo de hongos endofitos están asociados a la misma. En nuestro país dos hongos basidiomicetos: *Stereum hirsutum*, muy extendido, especialmente, en el área mediterránea y *Phellinus igniarius*, éste menos habitual y localizado, generalmente, en las zonas vitícolas más húmedas y frías del centro y norte de la península, Son los principales responsables de la descomposición del leño. La prohibición del arsenito sódico, único producto que reducía o ralentizaba la actividad de ambos hongos en el viñedo, nos está obligando a cambiar la estrategia de lucha. La utilización del control biológico puede significar un avance importante en el control de la “yesca” en un futuro próximo y, con ello, la posibilidad de ser ésta una alternativa nada desdeñable en la defensa de este cultivo. Para ello, este trabajo ha puesto en marcha una metodología de evaluación de eficacia, teniendo como soporte u hospedante el propio leño de la vid y en condiciones controladas de humedad y temperatura, del antagonismo expresado por los agentes micóticos. Los hongos del género *Chaetomium* son degradadores de la celulosa y hemicelulosa y productores de diferentes endo y exometabolitos, confiriéndoles posibilidades antagonistas interesantes. Las especies *Ch. globosum* y *Ch. elatum*, ambos aislados de sarmientos, han sido confrontados con los dos hongos basidiomicetos en las condiciones indicadas. A los 10-12 días de iniciada la experimentación, *Ch. globosum* había conseguido detener completamente el crecimiento de *S. hirsutum* y *P. igniarius*, por el contrario *Ch. elatum*, si bien había ralentizado el desarrollo de ambos hongos, no consiguió detener completamente el crecimiento de ambos en la madera de vid.

SENSIBILIDAD A LAS MICOSIS DEL SUELO EN ALUBIAS (*Phaseolus vulgaris* L.) AFECTADAS POR LAS MOSCA DE LOS SEMBRADOS (*Delia platura* (Meigen))

VALENCIANO, J.B.; REINOSO, B.; CASQUERO, P.A.

Departamento de Ingeniería Agraria. Universidad de León. Avda. Portugal, nº 41. 24.071 León. Correo electrónico: diajva@unileon.es

El cultivo de la alubia se encuentra afectado durante la fase de establecimiento por el ataque de la mosca de los sembrados (*Delia platura*) y por la incidencia de hongos parásitos del suelo (*Rhizoctonia solani*, *Pythium* spp., *Fusarium* spp., etc), ambos representan un grave problema en la provincia de León; existiendo entre ellos interacción, ya que las plantas atacadas por mosca son más sensibles a las enfermedades producidas por hongos del suelo.

El objetivo del presente trabajo consiste en evaluar la influencia que los ataques de la mosca de los sembrados tiene sobre el incremento de los daños causados por las micosis del suelo, durante la fase de establecimiento.

Los ensayos se realizaron durante los años 1998, 1999 y 2000 en dos ambientes distintos cada año, en comarcas de cultivo tradicional de alubia en la provincia de León. Se siguió un diseño estadístico de split-plot con 3 repeticiones, en el que el factor principal fue la variedad (Canela y Riñón de León) y el factor secundario fue la aplicación de productos fitosanitarios, utilizando cuatro tratamientos distintos, sin aplicar ningún fitosanitario, aplicando sólo insecticida, aplicando sólo fungicida y aplicando conjuntamente insecticida y fungicida. El insecticida utilizado fue Diazinón y el fungicida utilizado fue Himexazol. El sistema de siembra adoptado fue siembra en llano.

Aunque existieron diferencias entre ambientes, en aquellos tratamientos en los que se aplicó protección contra la mosca el porcentaje medio de plantas afectadas por micosis del suelo fue sólo del 0,36 %, mientras que en los tratamientos en los que no se aplicó insecticida el porcentaje medio de plantas afectadas por pudriciones radiculares se incrementó casi 3 veces, siendo del 1,07 %. La protección contra mosca mediante insecticidas representó una protección indirecta contra las micosis del suelo. Los daños por pudriciones radiculares fueron ligeramente superiores en la variedad Riñón de León que en la variedad Canela. Además, el incremento de plantas afectadas por micosis del suelo cuando no se realiza tratamiento con insecticida frente a cuando se realiza tratamiento insecticida fue superior en Riñón de León, que pudiera ser debido a la influencia que el color tiene sobre el ataque de la mosca de los sembrados, que es superior en semillas de color blanco. El hongo principalmente detectado en la fase de establecimiento fue *Rhizoctonia solani*.

BIOCONTROL DE LA PODREDUMBRE VERDE DE CÍTRICOS MEDIANTE NUEVOS AISLADOS DE LEVADURAS, SOLOS O EN COMBINACIÓN CON PEQUEÑOS PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS

VEYRAT, A.; LÓPEZ-GARCÍA, B.; MARCOS, J.F.; GONZÁLEZ-CANDELAS, L.

Laboratorio de Postcosecha. Departamento de Ciencia de los Alimentos. Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos (IATA) – CSIC. Apartado de Correos 73. Burjassot. 46100 Valencia. E-mail: lgonzalez@iata.csic.es

Las podredumbres verde y azul, causadas por los hongos *Penicillium digitatum* y *P. italicum* respectivamente, son las principales enfermedades postcosecha de cítricos. Su control se consigue fundamentalmente con la aplicación postcosecha de fungicidas. El control biológico es una alternativa prometedora que estamos evaluando en nuestro grupo. Hemos utilizado una colección de unos 1000 aislados de levaduras en la búsqueda de antagonistas de *P. digitatum* mediante ensayos de actividad sobre frutos cítricos. La mayor parte de los aislados se obtuvieron de la superficie de frutos cítricos ó de instalaciones hortofrutícolas, y también de uvas ó hojas y flores de cítricos. En una primera fase, se realizaron bioensayos coinoculando el patógeno con mezclas de tres cepas distintas de levaduras y en condiciones de alta incidencia de infección. Se analizaron 332 grupos, encontrándose una reducción significativa de la incidencia en 29 de ellos. En una segunda fase, se volvieron a ensayar estos grupos, junto con cada una de las tres cepas integrantes por separado, con el objetivo de seleccionar aquella que fuera responsable de la actividad antagonista. Finalmente, se realizó un ensayo con los aislados de mayor actividad, tras el cual se seleccionaron 12 para un estudio más detallado. La identificación de cepas se realizó mediante amplificación por PCR y posterior secuenciación de la región ITS ó el dominio D1-D2 del 26S rDNA. La búsqueda de homólogos en las bases de datos públicas, permitió identificar cepas de los géneros *Rhodotorula*, *Pichia* ó *Metchsniakowia*.

Previamente, habíamos identificado dos péptidos sintéticos (PAF19 y PAF26) que inhiben específicamente el crecimiento de determinados fitopatógenos de postcosecha, entre ellos *P. digitatum* y *P. italicum*. Hemos analizado la sensibilidad de las cepas de biocontrol a estos dos péptidos y a imazalil y tiabendazol, dos fungicidas usados en postcosecha de cítricos. Algunas cepas son insensibles a los PAF, abriendo la posibilidad de su utilización conjunta. La cepa L370 presentó la más alta resistencia a péptidos y fungicidas en ensayos *in vitro*. Esta cepa mostró además buenos resultados de control de podredumbres causadas por *P. digitatum* y *P. italicum*, en bioensayos realizados a 20°C, incluso en el caso de aislados de hongos resistentes a fungicidas. La coinoculación de *P. digitatum* ó *P. italicum* junto con L370 combinada con PAF26 proporcionó una actividad de biocontrol incrementada en comparación con la utilización individual de levadura ó péptidos.

EVALUACIÓN DEL ANTAGONISMO *in vitro* DE HONGOS ECTOMICORRÍDICOS COMESTIBLES FRENTE A CEPAS PATÓGENAS DE *Fusarium oxysporum* Y *Fusarium moniliforme*

OLAIZOLA, J.; PAJARES, J.A.; DIEZ-CASERO, J.J.

Entomología y Patología Forestales. Dpto. de Producción Vegetal y Silvopascicultura. U. de Valladolid. E. T. S. de Ingenierías Agrarias. Av./ Madrid 44. 34004. Palencia. E-mail: jaimeos@pvs.uva.es

Fusarium spp. es un hongo de raíz que provoca daños en todo tipo de vegetación a escala mundial. En el ámbito forestal es uno de los hongos integrantes del Damping-off, causante de graves pérdidas en plántulas de vivero especialmente del género *Pinus* spp. El control químico no se recomienda dada la resistencia que este hongo genera. De esta manera, el control integrado en el que el control biológico con hongos ectomicorrícicos sea una parte importante, parece dar buenos resultados. La selección de hongos ectomicorrícicos debe tener en cuenta en primer lugar su utilidad (comestible, medicinal, etc.), en previsión de una micorrización de las plántulas tratadas y en segundo lugar, su capacidad de control frente a cepas patógenas de *Fusarium* spp. Superada la primera selección, se ha evaluado el antagonismo *in vitro* de 19 cepas de HEC (*Lactarius deliciosus* (3 cepas), *Lactarius sanguifluus*, *Lactarius semisanguifluus*, *Suillus luteus* (2 cepas), *Amanita rubescens*, *Amanita ovoidea*, *Boletus aereus*, *Boletus aestivalis* (2 cepas), *Boletus pinicola*, *Boletus fragans*, *Leccinum lepidus*, *Tricholoma portentosum* (2 cepas), *Laccaria laccata* y *Rhizopogon roseolus*), frente a dos aislamientos de patogenicidad contrastada de *Fusarium oxysporum* y dos de *Fusarium moniliforme*. Los HEC se cultivaron en placas Petri con 20 ml de MMN sólido colocando en un extremo de la placa un disco de 5 mm de diámetro procedentes del borde de colonias de 30 días. Después de 15 días se colocó en el extremo contrario de cada placa y a 4 cm, un disco de 5 mm de *Fusarium*. Al mismo tiempo, se prepararon placas control y se realizaron 5 repeticiones por tratamiento. Los radios de ambas colonias fueron medidas diariamente durante dos semanas. Muchos de los hongos evaluados tuvieron un efecto antagonista frente a *Fusarium* aunque *Rhizopogon roseolus*, *Suillus luteus*, *Lactarius semisanguifluus* y *Boletus fragans* mostraron una mayor inhibición. No disminuyeron el crecimiento de ninguna de las cepas de *Fusarium*, las especies *Lactarius sanguifluus* y *Boletus aereus*.

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

EFICACIA DE NUEVOS DESINFECTANTES QUÍMICOS EN PIMIENTO DE INVERNADERO

GUERRERO, M.M.¹; ROS, C.²; MARTÍNEZ, M.A.¹; BARCELÓ, N.¹; MARTÍNEZ, M.C.¹; LACASA, A.¹

¹IMIDA. C/ Mayor s/n, 30.150. La Alberca (Murcia). Alfredo.Lacasa@carm.es

² Programa de Colaboración FECOAM-CAAMA, Caballero 13, 30.002 Murcia

Se han ensayado nuevos desinfectantes químicos para el control de los patógenos del suelo (*Phytophthora capsici* y *Meloidogyne incognita*) y para paliar la fatiga del suelo de los invernaderos de pimiento, motivada por el reiterado cultivo en el mismo suelo de forma ininterrumpida. La cloropicrina (Pic) en formulación emulsionable y el óxido de propileno (Op.), aplicados en el agua de riego, se han comparado con el bromuro de metilo (BrMe) y con la mezcla de 1,3 dicloropropeno y cloropicrina (DD+Pic) esta última en forma emulsionable. Los ensayos se han realizado en un invernadero comercial, con más de 20 años de cultivo ininterrumpido de pimiento y con el suelo contaminado de *P. capsici* y *M. incognita*, y en otro de 7 años de antigüedad, no contaminado de patógenos. El diseño experimental fue de bloques al azar, con 3 repeticiones por tratamiento. Para evaluar la eficacia desinfectante se midió: la incidencia de *P. Capsici* y *M. incognita*, el desarrollo de las plantas, las producciones y el grado de colonización del suelo por malas hierbas. La Pic proporcionó similares niveles de control de *P. capsici* y de malas hierbas que el BrMe e inferior eficacia frente a *M. incognita*, lo que no repercutió en el desarrollo de las plantas ni en la producción; presentó mayor eficacia fungicida que DD+Pic similares niveles de control de nematodo, de malas hierbas, de altura de plantas y de producción. El Op. no proporcionó niveles aceptables de control de los patógenos y de malas hierbas, lo que se tradujo en menor desarrollo de las plantas y menos producción que los tratamientos de referencia en el invernadero comercial; en el invernadero experimental con menor antigüedad de cultivo y son patógenos, la producción y el desarrollo de las plantas fueron similares a los de BrMe y DD+Pic, siendo inferior el control de malas hierbas.

CONTROL DE LAS ENFERMEDADES DEL ARROZ EN EL DELTA DEL EBRO

ALMACELLAS, J.¹; MARÍN, J.P.²; GALIMANY, G.³; BOADA, J.⁴; CATALÁ, M.M.⁵; MATAMOROS, E.³; TOMÁS, A.³; PORTA, J.³; MONTES, F.⁶

¹Sanitat Vegetal. DARP-Generalitat de Catalunya. Serveis territorials a Lleida. Av. Alcalde Rovira Roure, 191, 25198 Lleida. E-mail: jalmacellas@gencat.net ²Universitat de Lleida. Avda. Alcalde Rovira Roure, 191, 25198 Lleida. ³Sanitat Vegetal. DARP-Generalitat de Catalunya. Serveis territorials a les Terres de l'Ebre. Pl. d'Alfons XII, 7, 4 2a, 43500 Tortosa. ⁴Sanitat Vegetal. DARP-Generalitat de Catalunya. Serveis territorials a Tarragona. Avda. Catalunya, 50, 43002 Tarragona. ⁵Estació Experimental de l'Ebre. IRTA. Ctra. Balada s/n, 43870 Amposta (Tarragona). ⁶Federación de Arroceros de Sevilla. Dpto. de Investigación. Avda. S. Francisco Javier 9, Sevilla II. 3ª M-8, 41018 Sevilla.

La Pyriculariosis y las Helminthosporiosis del arroz son las enfermedades más importantes en el Delta del Ebro. Recientes estudios cuantifican las pérdidas medias en 72.72 euros por hectárea y año para Pyriculariosis y de 60.70 euros por hectárea y año para las Helminthosporiosis. Las estrategias utilizadas durante estos años para el estudio de su control se han basado en: 1) el control químico, mediante el ensayo de productos, umbrales de riesgo, momentos y número de tratamientos, así como de la maquinaria de aplicación, y 2) el uso de la resistencia de las variedades comerciales o con un potencial económico para la zona de cultivo, así como el estudio de los genes de virulencia de la población de *Pyricularia grisea* en el área.

Los resultados más importantes, desde el año 2000 hasta la actualidad, de los experimentos llevados a cabo con estos objetivos han sido los siguientes:

Los niveles epidémicos registrados en el cultivo como intensidad de enfermedad en diferentes órganos de la planta han sido medios o bajos durante estos años.

De los productos ensayados, los más eficaces han sido Folicur®, Punch®, Octagon®, Impact® y Bumper P® utilizados para un control amplio de ambas enfermedades y Bim® y Fuji-One® cuando han sido utilizados como "específicos" para *P. grisea*.

Los momentos críticos que han resultado más efectivos para realizar los tratamientos se han conseguido tomando como base un criterio fenológico del cultivo, siendo: a) EF 4-5 (pseudotallo), b) EF 10.1 (inicio de paniculación) y c) EF 11 (grano lechoso).

El número máximo de tratamientos con las situaciones de enfermedad soportadas ha sido de tres, aunque la situación más habitual sería de dos tratamientos por campaña.

Comparando aplicaciones fungicidas mediante tractor, helicóptero y avioneta, el sistema de aplicación que ha resultado más eficiente en cuanto a distribución de producto y más efectivo en cuanto a eficacia fungicida sobre las enfermedades ha sido claramente el del tractor frente a los otros sistemas.

Estudiando los costes económicos del control mediante el beneficio obtenido por el tratamiento menos los costos debidos a fungicida+aplicación+rodadas+pérdidas no controladas, se estimó que las diferencias de costo entre la estrategia más económica (criterio fenológico/Folicur®) y el no tratamiento oscilaron entre los 433 euros/ha y los 475 euros/ha. En este sentido, aún con bajos niveles de intensidad de enfermedad resultó más rentable tratar que no tratar.

Los estudios del respuesta varietal respecto a *P. grisea* han mostrado un comportamiento diferencial según año, localidad o zona del Delta, variedad y órgano de la planta (hoja, cuello de la panícula y panícula).

Los genes de virulencia presentes en la población de *P. grisea* de la zona, estudiados mediante colecciones de variedades diferenciales (colección Internacional y Japonesa), han sido Pi-k y Pi-ta.

EFFECTO INHIBITORIO DE SUSTANCIAS FUNGICIDAS SOBRE EL CRECIMIENTO MICELIAR DE *Phaeomoniella chlamydospora*

PASTOR, S.; GAFORIO, L.; TELLO, M.L.

Instituto Madrileño de Investigación Agraria y Alimentaria (IMIA). Autovía del Nordeste A-2, Km. 38.200, 28800 Alcalá de Henares, Madrid

La “enfermedad de Petri” que afecta a vides jóvenes, y cuyo principal responsable es el hongo *Phaeomoniella chlamydospora* (Pch), constituye un grave problema sanitario en vivero y en los primeros años de plantación en campo. La prohibición del arsenito sódico y la carencia de otros medios de control efectivos impulsa la necesidad de encontrar métodos alternativos. Por otro lado, el aislamiento en pureza de este hongo a partir de muestras provenientes de campo se encuentra muy dificultado por numerosos microorganismos contaminantes. En este trabajo se realizaron experimentos “in vitro” para evaluar el efecto de folpet, captán, benomilo, cloranfenicol, rosa de bengala (RB) y dos medios de cultivo semiselectivos suministrados por la Dra. Mugnai de Florencia, sobre el crecimiento miceliar de Pch. El aislado de Pch procedía de madera de vid sintomática recogida en la subzona de Arganda de la Denominación de Origen “Vinos de Madrid”. El parámetro de crecimiento evaluado fue el diámetro de colonia tomado, cada 2 días, sobre dos ejes perpendiculares y el análisis estadístico se realizó a través de la comparación de las tasas de incremento de las correspondientes curvas. Los resultados indicaron que el micelio de Pch fue completamente inhibido en los medios suplementados con benomilo y captán; en cambio con folpet y cloranfenicol no fue afectado significativamente. Por su parte RB causó la disminución del crecimiento de la colonia, diferenciándose significativamente del control en los tres niveles de concentración evaluados. Los dos medios semiselectivos causaron disminución del crecimiento de la colonia, siendo significativamente mayor el efecto correspondiente al medio 2. Por tanto, captán y benomilo podrían ser eficientes controladores químicos de la enfermedad de Petri. Folpet, cloranfenicol y el medio semiselectivo 1 podrían ser utilizados “in vitro” para aislar el hongo de un sustrato muy contaminado, como podría ser suelo o madera de la zona basal, con el objetivo de detener los contaminantes sin afectar el desarrollo de Pch. El efecto observado en los medios con RB desaconseja su utilización para aislar Pch si éste se encontrara en baja concentración o si fuera necesario realizar conteo de colonias totales en suspensión.

EVALUACIÓN DE LA PERSISTENCIA DE FUNGICIDAS CÚPRICOS EN HOJAS DE OLIVO

ROCA, L.F.; MARCHAL, F.; ALCÁNTARA, E.; TRAPERO, A.

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

El uso de fungicidas cúpricos para el control de las principales enfermedades del olivar es una práctica habitual en España. Estos productos, en forma de diversas sales y numerosas formulaciones comerciales, actúan como protectores, inhibiendo la germinación de las esporas fúngicas o la multiplicación de las bacterias. Esta característica, unida al largo periodo de infección que presenta alguna de las principales enfermedades del olivo, como es el Repilo causado por *Spilocaea oleagina*, hacen que la persistencia sobre la hoja sea de gran importancia en el control de dicha enfermedad. Uno de los métodos desarrollados para el estudio de dicho parámetro, es el denominado "método de las improntas", basado en la reacción del cobre con el ácido rubeánico, que da lugar a la formación de un precipitado de color oscuro, indicador de la presencia y distribución del cobre sobre la hoja.

En el presente trabajo se ha comprobado el método de las improntas "in vitro", haciendo reaccionar gotas de distintos compuestos de cobre, a distintas concentraciones, con el ácido rubeánico sobre papel de filtro. Se ha evaluado además la persistencia de varios fungicidas cúpricos, midiendo el cobre externo de la hoja mediante extracción del mismo con ácido clorhídrico y posterior análisis de la solución por Espectrofotometría de Absorción Atómica. Para los experimentos se han utilizado plantones y árboles en campo, tratados y expuestos a lluvia natural, así como hojas aisladas, tratadas y sometidas a lavado por agitación en matraces. La medición de cobre se realiza en varios momentos, tras el tratamiento, a fin de conocer el nivel de cobre inicial y después del lavado para determinar el porcentaje de cobre remanente.

Se comprueba que la intensidad de la reacción frente al ácido rubeánico depende del producto cúprico, quizás relacionado con la solubilidad del cobre, por lo que no es un método válido para la comparación de fungicidas. Sin embargo la extracción con CIH sí se mostró eficaz, correlacionándose los resultados obtenidos en olivos y plantones con los de hojas separadas lavadas en matraces, metodo que se realiza en condiciones más controladas y permitiendo ahorro de tiempo y esfuerzo.

EVALUACIÓN DEL ANTAGONISMO *in vitro* DE HONGOS ECTOMICORRÍDICOS COMESTIBLES SOBRE LA GERMINACIÓN ESPORAL Y EL CRECIMIENTO MICELIAR DE *Fusarium oxysporum*, E *in vivo* SOBRE LA GERMINACIÓN DE *Quercus ilex*, *Q. pyrenaica*, *Pinus pinea* Y *P. sylvestris*

ZAMORA, P.; MARTÍN, J.; SANTAMARÍA, O.; OLAIZOLA, J.; ALVES-SANTOS, F.M.; DIEZ-CASERO, J.J.

Universidad de Valladolid. Unidad de Entomología y Patología Forestales. Departamento de Producción Vegetal y Recursos Forestales. Escuela Técnica Superior de Ingenierías Agrarias (E.T.S.II.AA.). Campus Yutera Edificio E, Av. de Madrid 44. 34071. Palencia. E-mail: jdcasero@pvs.uva.es.

El hongo *Fusarium oxysporum* es uno de los principales causantes de la enfermedad conocida como damping off, que origina numerosas pérdidas en viveros de planta forestal en todo el mundo. El uso de productos químicos no es apropiado para el control de esta enfermedad, ya que produce efectos perjudiciales para la planta y el bosque. Por ello, la lucha contra el damping off debe abordarse mediante el uso de técnicas inócuas como el control biológico, bien de forma aislada o conjuntamente con otras técnicas (manejo integrado).

El objetivo de este estudio fue conocer el posible efecto antagonista que ejercen los hongos ectomicorrícicos comestibles (HEC) *Amanita rubescens*, *Leccinum lepidus*, *Lactarius sanguifluus*, *Lepista inversa*, *Suillus luteus*, *Tricholoma portentosum* y *Xerocomus ferrugineus*, y el hongo saprófito *Agaricus silvaticus*, sobre *F. oxysporum*. Para ello, se estudió en condiciones *in vitro* el efecto de los HEC sobre el crecimiento y germinación de esporas del patógeno, y en el invernadero con plántulas de *Quercus ilex*, *Q. pyrenaica*, *Pinus sylvestris* y *P. pinea*.

Los HEC *S. luteus*, *L. sanguifluus*, y *L. lepidus* ejercieron antagonismo *in vitro* por antibiosis sobre los aislamientos de *F. oxysporum* ensayados. Sin embargo, este efecto fue diferente entre genotipos del patógeno e intervalos ensayados (6, 12 y 24 h). La presencia de los HEC *L. sanguifluus* y *L. lepidus* en el sustrato de los tratamientos inoculados con *F. oxysporum* incrementó la germinación de las semillas de *P. sylvestris* y *Q. ilex*, respectivamente.

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

LA SOLARIZACIÓN COMO MÉTODO DE CONTROL ALTERNATIVO DEL NEMATODO FORMADOR DE QUISTES DE LA PATATA (*Globodera* sp.) EN MALLORCA

ALONSO, R.¹; ALEMANY, A.¹; ANDRÉS, M.F.²

¹Dpto. Protección Vegetal. Centro de Ciencias Medioambientales, CSIC. C/ Serrano 115, 28006 Madrid.

² Dpto. de Biología. Universidad de las Islas Baleares. Ctra. Valldemossa km. 7,5. 07122 Palma de Mallorca. Baleares.

Los nematodos formadores de quistes del género *Globodera* son los patógenos más importantes que afectan al cultivo de la patata donde pueden ocasionar graves pérdidas de la cosecha. En Mallorca tradicionalmente el control de estos nematodos se ha basado en la aplicación sistemática de nematicidas químicos altamente tóxicos y con un elevado coste económico y medioambiental. La solarización del suelo es un método de control físico ambientalmente seguro y efectivo para el control de nematodos fitopatógenos y su uso está especialmente indicado en el área mediterránea donde los meses de verano son secos y se alcanzan temperaturas elevadas. El objetivo de este trabajo es evaluar la eficacia de este método para el control de *Globodera* sp, así como ajustar las dosis de aplicación de los nematicidas químicos en el cultivo de la patata de Mallorca, con objeto de contribuir a la planificación de estrategias de control integrado que optimicen la producción y rentabilidad del cultivo en esta isla.

El ensayo experimental se ha realizado en un finca situada en el término Sa Pobla, con una infestación natural previa de *Globodera pallida*. Se aplicaron cuatro tratamientos: a) DD (1,3-Dicloropropeno) a dosis normal (200 l/Ha). b) DD a dosis reducida (100 l/Ha). c) Solarización del suelo. d) Solarización + DD (dosis reducida). El diseño fue en bloques al azar con cuatro repeticiones para cada tratamiento. Para estimar la eficacia de los tratamientos se ha estudiado su efecto sobre la evolución de las poblaciones del nematodo patógeno en suelo desde el inicio de los tratamientos hasta el final del cultivo y su impacto sobre el rendimiento mediante la determinación de parámetros cuantitativos y cualitativos relativos a la producción de cosecha. Los resultados obtenidos demuestran que todos los tratamientos disminuyen significativamente la densidad de población de *Globodera pallida*, tanto inmediatamente después de su aplicación, como al final del cultivo. Esta disminución resulta más acusada en los tratamientos de solarización, no apreciándose diferencias significativas en cuanto a la aplicación conjunta de solarización y nematicida. Respecto a la eficacia de los tratamientos en el rendimiento del cultivo se obtiene una producción total significativamente mayor en las microparcelas solarizadas y, cualitativamente, se observan diferencias significativas con el testigo en los calibres de mayor tamaño. A partir de estos resultados se constata la eficacia del método de solarización del suelo para el control de *Globodera* sp en Mallorca que se manifiesta no sólo por la reducción del inóculo y por tanto de la incidencia de la enfermedad sino también por el incremento de la cantidad y calidad de la cosecha.

EVALUACION DE CULTIVOS TRAMPA PARA EL CONTROL DE *Globodera* spp. EN SUELOS DE LA COMARCA DE A LIMIA (OURENSE)

COUCEIRO, C.; BARRIGA, C.; LASTRA, B.; CABALEIRO-SOBRINO C.

Departamento de Producción Vexetal. EPS. Universidade de Santiago de Compostela.

Campus Universitario s/n 27002 LUGO. E-mail: pvcabsob@lugo.usc.es

La amplia presencia de nematodo dorado (*Globodera rostochiensis*) es un factor limitante del cultivo de la patata en la comarca de A Limia (Ourense) y ha forzado la introducción de variedades resistentes, la rotación con trigo y el uso de nematicidas aplicados en siembra. Los precios de la patata son muy irregulares por lo que resulta imprescindible controlar los costes de producción. El uso de nematicidas consigue mantener las producciones en las variedades sensibles pero supone un incremento considerable de costes y aumenta el riesgo de contaminación de suelos y aguas y de residuos en las cosechas. Los cultivos trampa podrían contribuir, apoyados por otras medidas, a reducir el inóculo en el suelo, haciendo más eficientes las rotaciones. En 2002, en un campo con alto nivel de infestación se compararon varios cultivos para evaluar su capacidad de disminuir el nivel de quistes viables en el suelo: patata "Cunera", resistente a *G. rostochiensis*, patata sensible "Desireé" y *Solanum nigrum* frente a trigo "Sideral" habitual en las rotaciones. En todos los casos se produjo un descenso en la viabilidad de los quistes, con valores de 0,6 a 0,8 Juveniles de segundo estadio (J2) final/inicial en 100 cm³ de suelo tras el arranque de las patatas trampa. En el momento de la cosecha de la variedad resistente (primeros de septiembre), ésta fue la de mejor comportamiento, con un valor de 0,4 J2 final/inicial en 100 cm³. A final del ciclo no hubo diferencias significativas entre los cultivos ensayados y el trigo, pero la variabilidad era muy alta debido probablemente a patatas voluntarias o a patatas mal eliminadas en alguna de las parcelas. Los datos muestran lo problemática que es la puesta en práctica de este tipo de medidas de control en parcelas de agricultores. En 2002 y 2003 se hicieron ensayos en maceta en invernadero con suelo de la misma parcela. Se evaluaron patata sensible "Kennebec" y *Solanum nigrum* como trampas a eliminar antes de que maduren los quistes (patata) y antes de que maduren los frutos (*S. nigrum*), comparando con patata "Agria" resistente a *G. rostochiensis*, patata "Kennebec" hasta fin de ciclo y suelo desnudo. Todos los cultivos trampa consiguieron reducciones de viabilidad de quistes mayores o iguales a las del suelo desnudo. La variedad resistente "Agria", fue la que tuvo un mayor efecto al permanecer todo el ciclo de cultivo, pero sin diferencias significativas frente a patata sensible eliminada a 30 días lo que abre una posibilidad de utilización de ésta inmediatamente antes del cultivo de patata evitando el uso repetido de variedades resistentes a *G. rostochiensis* que puede potenciar la selección de patotipos resistentes o de *G. pallida* en la zona.

INTERACCIÓN DE *Glomus intraradices* Y *Meloidogyne incognita*. EFECTOS SOBRE EL DESARROLLO Y LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA EN PLANTAS DE TOMATE

JAIZME-VEGA, M.C.¹; ANDRÉS, M.F.²; RODRÍGUEZ-ROMERO, A.S.¹; GONZÁLEZ, C.³; DELIBES, A.³

¹Dpto. Protección Vegetal. ICIA. Ctra. del Boquerón, s/n. 38270. LA LAGUNA, TENERIFE. E-mail: mcjaizme@icia.es

²Dpto. Protección Vegetal. CCMA.CSIC. Serrano 115 28006 MADRID

³Dpto. Biotecnología. E.T.S. Agrónomos. UPM. 28040. MADRID

Los hongos formadores de micorrizas arbusculares (MA), son simbioses obligados que colonizan la mayoría de las plantas cultivadas. Esta asociación además de mejorar la absorción de nutrientes y elevar los niveles de actividad hormonal de la planta, incrementa su tolerancia frente a situaciones de estrés, tales como la sequía, la salinidad o el ataque de patógenos de suelo, entre los que destacan los nematodos formadores de nódulos (*Meloidogyne* spp.). Así se ha demostrado que la colonización por MA puede modificar e interferir en la relación hospedadora-*Meloidogyne* disminuyendo la reproducción del nematodo y/o aumentando la tolerancia de la planta, sin embargo no se han determinado todavía los mecanismos fisiológicos y bioquímicos que intervienen en esta interacción. El objetivo del presente trabajo es el estudio de los efectos de la simbiosis micorrízica sobre el desarrollo vegetal y la variación de las actividades enzimáticas relacionadas con el estrés oxidativo generada en las raíces de la planta hospedadora como respuesta a la interacción de los hongos MA y del nematodo. Se ha realizado un ensayo experimental en condiciones controladas de invernadero. En dicho experimento, plántulas de tomate (var. Dorothy) micorrizadas con *Glomus intraradices* de 4 semanas, se han inoculado con 2.000 juveniles de *Meloidogyne incognita* por planta. La evaluación de los efectos de ambos organismos sobre la planta hospedadora se han realizado 15 y 30 días después de la aplicación del patógeno, a través del estudio de variables experimentales relativas al crecimiento vegetal (altura, peso fresco y seco, superficie foliar...) y al desarrollo el patógeno (% agallamiento, tasa de reproducción...). El análisis de las actividades enzimáticas peroxidasa, esterasa y superóxido dismutasa se ha realizado mediante electroforesis por IEF de las raíces de las plántulas 7 y 15 días después de la inoculación del nematodo. A partir de los resultados obtenidos se analiza la influencia de las MA en la tolerancia y resistencia de las plantas y su relación con los cambios bioquímicos inducidos en respuesta a la infección del nematodo patógeno.

USO COMBINADO DE *Glomus mosseae* Y *Pseudomonas fluorescens* CEPA EPS817 SOBRE EL DESARROLLO DE PLATANERA MICROPROPAGADA INFECTADA CON *Meloidogyne javanica*

RODRÍGUEZ-ROMERO, A.S.¹; MONTESINOS, E.²; BADOSA, E.²; JAIZME-VEGA, M.C.¹

¹Dpto. Protección Vegetal. Instituto Canario de Investigaciones Agrarias. Apdo. 60 3200 La Laguna, Tenerife. E-mail: arguezr@icia.es

²Instituto de Tecnología Agroalimentaria-CeRTA-CIDSAV, Universitat de Girona. Campus Montilivi. 17071 Girona.

Son numerosas las citas que hacen referencia al uso individual de hongos formadores de micorrizas arbusculares (hongos MA) y bacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPB) para el control de patógenos de raíz. Estos dos tipos de microorganismos han demostrado su capacidad para favorecer el desarrollo, nutrición y salud de las plantas, mejorando la tolerancia frente a los patógenos. Sin embargo, el alto grado de especificidad que caracteriza las relaciones microbianas del suelo, hace que el resultado de este tipo de interacciones sea en general, muy poco predecible. Es por ello, que resulta imprescindible un conocimiento previo de las cepas microbianas, así como su repuesta concreta en nuestro sistema de trabajo. El presente experimento, se propuso con el objetivo de determinar el efecto de la interacción del hongo MA *Glomus mosseae* y la cepa PGPB *Pseudomonas fluorescens* EPS 817 sobre el desarrollo y nutrición de platanera micropropagada infectada con el nematodo *Meloidogyne javanica* cultivada en condiciones de vivero. Asimismo, se estudió también el efecto de la citada interacción sobre la reproducción del patógeno. Para llevar a cabo el estudio, se utilizaron plántulas micropropagadas de platanera (cultivar 'Gran Enana') que fueron inoculadas con *G. mosseae* y *P. fluorescens* EPS 817, tanto de forma individual como con la combinación de ambos microorganismos. Una vez establecida la micorrización y 15 días después de la aplicación de la bacteria, se añadió el inóculo del nematodo constituido por una suspensión acuosa que contenía unos 10.000 nematodos por mililitro. Los análisis, realizados 135 días de la inoculación con *M. javanica*, detectaron ligeros incrementos (en algún caso significativo) en el desarrollo de la infectadas con el nematodo y tratadas individualmente o con la combinación de los microorganismos benéficos. Los contenidos foliares en nitrógeno fueron significativamente superiores en las plantas micorrizadas, tratadas con *P. fluorescens* o con la combinación de ambos organismos. Los niveles poblacionales del nematodo se redujeron significativamente en presencia del hongo MA, la bacteria o la presencia conjunta de ambos. Destacar por último que no se observaron efectos negativos en la colonización micorrícica atribuibles a la cepa bacteriana y/o al nematodo. Igualmente, la presencia del nematodo y/o *G. mosseae* no pareció afectar a la colonización rizosférica de la bacteria.

EVOLUCIÓN DE LA MICROBIOTA DURANTE EL PROCESO DE BIOFUMIGACIÓN EN SUELOS AGRÍCOLAS

SACRISTÁN PÉREZ-MINAYO, G.¹; REGUERA-USEROS, J.I.¹; LÓPEZ-ROBLES, D.J.²

¹Área de Microbiología.

²Área de Edafología y Química Agrícola.Facultad de Ciencias. Universidad de Burgos. Plaza Misael Bañuelos s/n. 09001 Burgos.

La biofumigación se basa en la incorporación de enmiendas orgánicas al suelo con la posterior biodegradación de las mismas. Los microorganismos presentes en el suelo son los responsables directos de esta descomposición, por lo que la biofumigación estimula la actividad microbiana edáfica. El incremento de estas poblaciones microbianas también produce un aumento de los niveles de exoenzimas en el suelo. Durante la biodegradación se producen sustancias y gases volátiles que muestran una relativa capacidad biocida sobre diferentes patógenos vegetales.

Se emplearon distintas dosis de biofumigante (10, 20 y 40 g/Kg de suelo agrícola) con restos vegetales procedentes de subproductos del cultivo de fresa. Se realizaron recuentos de aerobios (medio TSA), anaerobios (medio PCA en anaerobiosis) y *Pseudomonas* sp. (medio KING) a las 0, 24, 48 y 72 h de los 0, 7 y 20 d de la biofumigación.

La población de anaerobios aumentó considerablemente (7×10^6 ufc/g de suelo agrícola) en el ensayo con una dosis de biofumigante de 40 g/Kg. Al disminuir esta dosis los recuentos fueron disminuyendo progresivamente, pero siempre con valores superiores a los del ensayo testigo. Las poblaciones de aerobios y *Pseudomonas* sp. no sufrieron cambios notables por la incorporación de materia orgánica.

De estos datos se desprende que la actividad y crecimiento microbianos de los anaerobios se estimulan mediante la biofumigación poniéndose de manifiesto la oportunidad de identificar y caracterizar en futuras investigaciones las sustancias producidas por este incremento de anaerobios. La biofumigación supone, por tanto, una alternativa viable y compatible con otras técnicas de manejo integrado de cultivos, así como para el control microbiológico de plagas y enfermedades vegetales en la producción primaria.

FORMULACIÓN DE *Epicoccum nigrum* PARA EL CONTROL BIOLÓGICO DEL MOMIFICADO DE LOS FRUTALES DE HUESO

LARENA, I.; MELGAREJO, P.; DE CAL, A.

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

Epicoccum nigrum (282) es un hongo epifito de la micoflora residente de flores y brotes de melocotonero y que ha sido identificado como un agente de biocontrol frente al marchitamiento de brotes y la podredumbre de frutos en frutales de hueso causados por *Monilinia laxa* (1). Se ha desarrollado un método de producción en masa de conidias del agente de biocontrol mediante fermentación sólida que produce más de 108 conidias/g seco de sustrato, y con una viabilidad superior al 90% (2). Las conidias así obtenidas se pueden secar mediante lecho fluido (40 min a 40°C) manteniendo su viabilidad durante 90 días (3). La obtención de un producto comercialmente competitivo necesita una formulación que mantenga o mejore su efectividad, asegurando su estabilidad, y facilitando su manejo y aplicación, todo ello unido a un bajo coste de producción. Por ello, se ha estudiado el efecto de diferentes dosis de aditivos (estabilizantes, adherentes y desecantes: Tween 80, Tween 20, KCl, glicerol, PEG 8000, PEG 300, metilcelulosa, glutamato sódico, alginato sódico, talco y gel de sílice), aplicados en distintos momentos del proceso de producción-secado, sobre la rehidratación, estabilidad y adherencia de conidias secas de *E. nigrum*. Los coadyuvantes se aplicaron bien durante la fermentación o bien antes del secado del producto (con o sin desecantes). La capacidad de rehidratación y estabilidad de los productos almacenados a tª ambiente durante un año se evaluó mediante bioensayo. La adherencia de las conidias formuladas se ensayó *in vitro* e *in vivo*. La adición de 1% KCl ó 50% PEG 8000 en las bolsas de fermentación, de 2.5% metilcelulosa ó 1% KCl (con o sin talco) ó 10% glutamato sódico+gel de sílice en la pasta de conidias antes de secar incrementó la viabilidad de las conidias de *E. nigrum* después de 1 año de almacenamiento. Estos formulados redujeron la incidencia y el diámetro de lesión causado por *M. laxa* sobre melocotones *in vivo*. Se observó un aumento significativo de la adherencia de las conidias de *E. nigrum* sobre melocotones con formulaciones que contenían 2.5% metilcelulosa ó 1.25% alginato sódico (con o sin gel de sílice). Formulados con distintas mezclas de los aditivos seleccionados se han aplicado en 7 huertos de melocotoneros y nectarinos en Francia, Italia y España durante la campaña de 2003 para ver su eficacia sobre la podredumbre de frutos en postcosecha.

(1) Melgarejo P, Carrillo R, M.-Sagasta E.1986.Crop Prot. 5:422-426.

(2) Larena, I., De Cal, A., Melgarejo, P. 2004. Int. Food Microbiol. (en prensa)

(3) Larena I, De Cal A, Liñán M, Melgarejo P.2003.J. Appl. Microbiol.94:508-514.

INFLUENCIA DE LAS PRÁCTICAS AGRONÓMICAS EN LA MICORRIZACIÓN POR VAM EN TRIGO (*Triticum* spp.)

SÁNCHEZ, C.¹; PROVENZA, S.²; PERDIGUER, A.²; MARTÍN, J.²; PALAZÓN, C.F.³; BARRIUSO, J.¹

¹Escuela Politécnica Superior de Huesca, Universidad de Zaragoza

²Centro de Protección Vegetal, Gobierno de Aragón

³Centro de Investigación en Tecnología Agroalimentaria

Muchas prácticas de la agricultura convencional, caracterizadas por el elevado aporte de insumos, además de resultar en altos rendimientos, han conllevado la inestabilidad para los sistemas agrícolas de producción. Algunas manifestaciones es esto son la contaminación ambiental, la reducción o pérdida total de enemigos naturales, la disminución de fertilidad del suelo, la aparición de nuevos problemas fitopatológicos, el descenso de rendimientos de cosechas, la mayor dependencia de los agroquímicos para mantener las actuales producciones, etc.

Las micorrizas pueden considerarse como agentes estabilizadores de los agroecosistemas y las prácticas culturales les pueden afectar de tal forma que lleguen a influir en los rendimientos de los cultivos.

El uso incorrecto de los agroquímicos como los herbicidas, funguicidas y el fósforo, afecta a la microbiota edáfica y puede incidir en el desarrollo de la simbiosis micorrízica con hongos VAM. En estos resultados preliminares hemos intentado desvelar de qué forma se presenta esta interacción realizando unos ensayos de campo en tres localidades de Aragón, dos en la provincia de Huesca y otras en la de Zaragoza, con cultivos de trigo en regadío, secano y secano húmedo.

Se muestrearon los campos en cuatro épocas del cultivo en los meses de febrero, marzo, abril y mayo, observándose el desarrollo de las micorrizas VAM y sus estructuras (vesículas, arbuscúlos y esporas) al microscopio con dos diferentes tinciones, Azul Trypan y Negro Clorazol. En pocos casos se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los diferentes tratamientos, aunque en todos los casos se pudo ver una mayor cantidad de estructuras fúngicas entre los testigos no tratados y el aporte de fósforo y los tratamientos funguicidas y herbicidas a los que habían sido sometidos los campos de cultivo.

EFFECTO DE LAS MICORRIZAS ARBUSCULARES EN PLANTAS AUTÓCTONAS USADAS EN PROCESOS DE RESTAURACIÓN

BUSQUETS, M.¹; MARTÍN, R.¹; ESTAÚN, V.¹; CALVET, C.¹; CAMPRUBÍ, A.¹; BIEL, C.²

¹Dep. Protecció Vegetal, ²Dep. Tecnologia Hortícola, Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentàries (IRTA), Centre de Cabrils, Ctra de Cabrils s/n, 08348 Cabrils

La utilización de plantas autóctonas en procesos de revegetación/ restauración es clave para garantizar la sostenibilidad del proceso. La flora mediterránea está dominada por especies de matorrales leñosos, la mayoría formadores de la simbiosis micorriza arbuscular. En este trabajo se estudia la respuesta de tres especies de arbustos mediterráneos a la inoculación con el hongo *Glomus intraradices* (BEG 72) en condiciones controladas y en una actuación de restauración de una zona peri-urbana muy degradada. Las plantas seleccionadas fueron: *Rosmarinus officinalis*, *Anthyllis cytisoides*, *Santolina chamaecyparissus* y *Lavandula spica*.

En condiciones controladas se midieron los siguientes parámetros fenológicos y fisiológicos: altura, diámetro del tallo, cobertura, crecimiento relativo, peso específico foliar y pesos fresco y seco de las diferentes partes de la planta al final del ensayo. Se observó, en la mayoría de los parámetros medidos, una mejor respuesta de las plantas micorrizadas de *Rosmarinus officinalis*, *Anthyllis cytisoides* y *Santolina chamaecyparissus*. Sin embargo en el caso de *Lavandula spica* la inoculación con el hongo formador de MA no tuvo efectos significativos en los parámetros estudiados.

En condiciones de campo se determinó la supervivencia a los 6 i 18 meses de plantas no inoculadas e inoculadas con *Glomus intraradices* en el momento del transplante. En todos los casos la supervivencia de las plantas inoculadas fue superior a la de las no inoculadas aún cuando las plantas no inoculadas desarrollaron la simbiosis con un endófito nativo.

La inoculación con hongos formadores de micorizas arbusculares seleccionados mejora el crecimiento y también la supervivencia de plantas autóctonas en condiciones extremas que son frecuentes en actuaciones de restauración.

PROSPECCIÓN, AISLAMIENTO Y EVALUACIÓN DE HONGOS FORMADORES DE MICORRIZAS ARBUSCULARES NATIVOS EN SUELOS DE REPLANTE DE VID Y FRUTAL

CAMPRUBÍ, A.; CALVET, C.; ESTAÚN, V.

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

Con el objetivo de conocer y proteger la diversidad de géneros y especies de hongos formadores de micorrizas arbusculares en zonas productoras de vid y frutal, se realizó una amplia prospección en distintas localidades de Cataluña, incluyendo suelos de replantación y de vivero. En cada una de las parcelas implicadas, se determinó inicialmente el potencial micorrícico natural mediante bioensayos con plantas de puerro valorados con la técnica del número más probable (NMP), y paralelamente, se llevaron a cabo el aislamiento y la caracterización taxonómica de los hongos formadores de micorrizas arbusculares presentes.

Cinco aislados fueron identificados a nivel de especie o género y se inició su reproducción en simbiosis con planta hospedadora y condiciones de invernadero, a partir de esporas de resistencia. De entre ellos, cuatro: *Glomus aggregatum* 1 (aislado en suelo de vivero de vid), *Glomus aggregatum* 2 (aislado en suelo de replante de viñedo), *Glomus intraradices* 2 (aislado en suelo de replante de manzano) y *Glomus* sp. (suelo de replante de melocotonero) se incluyeron en un experimento de valoración de efectividad en el que se utilizó el portainjerto de frutal híbrido de melocotonero por almendro GF677 (*Prunus persica* x *Prunus dulcis*), como planta hospedadora, y el hongo de colección *Glomus intraradices* (BEG 72) como inóculo de referencia.

El objetivo final de esta prueba es la detección de hongos arbusculares de alto poder infectivo, que tras ser reproducidos de forma masiva puedan ser reintroducidos en suelos de características agronómicas similares a las del suelo originario. De entre los hongos evaluados, el aislado *G. intraradices* 2 superó en efectividad al hongo de colección.

DESARROLLO EN SUELO DE REPLANTE DE PERAL CONFERENCE INOCULADO EN PLANTACIÓN CON EL HONGO FORMADOR DE MICORRIZAS ARBUSCULARES *Glomus intraradices*

PRAT, M.¹; CARBÓ, J.²; CASALS, M.²; NOGALES, A.¹; CAMPRUBÍ, A.¹; ESTAÚN, V.¹; CALVET, C.¹

¹Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentàries (IRTA), Departament de Protecció Vegetal. Ctra. de Cabrils s/n, 08348 Cabrils, Barcelona. E-mail: cinta.calvet@irta.es

²IRTA-Fundació Mas Badia, 17134 La Tallada d'Empordà, Girona.

Se estableció una plantación de peral Conference en un suelo de replante de la provincia de Gerona, en la que se combinaron tratamientos de micorrización, desinfección química y aplicación de enmienda orgánica, en un diseño de bloques al azar, realizándose el seguimiento de los árboles durante 3 años. La principal causa del problema de replante identificada era el nematodo lesionador *Pratylenchus vulnus*. Paralelamente, se determinó el potencial micorrícico natural en el suelo, que resultó ser moderadamente alto.

La inoculación micorrícica se realizó en el momento de establecer la plantación de material vegetal obtenido mediante propagación vegetativa, con inóculo homogéneo de *Glomus intraradices*. El tratamiento biocida, aplicación de Metam-sodio (Vapam), y una enmienda orgánica húmica se aplicaron a los bloques afectados.

Los mejores valores de crecimiento vegetativo los alcanzaron las plantas del tratamiento combinando desinfección química y micorrización artificial con *G. intraradices*, mientras que la aplicación de enmienda orgánica o de micorrización como tratamientos aislados no produjo ningún efecto.

Teniendo en cuenta que el tratamiento del suelo con Metam-Na no eliminó la micorrización natural, y que la aplicación de enmienda orgánica fue efectiva únicamente cuando las plantas habían sido inoculadas previamente, se puede concluir que el hongo introducido fue más efectivo para favorecer el crecimiento de los árboles que el inóculo micorrícico nativo siempre que se aplique en combinación con un tratamiento alternativo.

CONTROL QUÍMICO DE LA PODREDUMBRE BLANCA DEL AGUACATE MEDIANTE FUNGICIDAS SISTÉMICOS Y DE CONTACTO

ZEABONILLA, T.¹; PÉREZ-JIMÉNEZ, R.M.¹; LÓPEZ-HERRERA, C.J.²

¹CIFA-Málaga. IFAPA. CICE. J.A. 29140, Churriana. Málaga.

²Instituto de Agricultura Sostenible., C.S.I.C. Apdo. 4084, 14080, Córdoba. E-mail: lherrera@cica.es

Se ha estudiado el efecto de los fungicidas sistémicos: Benomilo, Carbendazima, Metil tiofanato y de contacto: Fluazinam, sobre la podredumbre blanca del aguacate causada por *Rosellinia necatrix*.

Se realizaron cuatro experimentos sobre plantas de aguacate de semilla cv Topa-Topa, dos con una sola inoculación con semillas de trigo (4 g de trigo/l sustrato) colonizadas por el patógeno y aplicaciones fungicidas (0.1% y 1%) a los 10, 20, 30, 45, 60, 75, 90 y 105 días desde la inoculación. En los otros dos experimentos las plantas recibieron una dosis de inóculo adicional transcurridos 30 días desde la última aplicación de los fungicidas. Se utilizaron 10 repeticiones por tratamiento.

Durante el desarrollo de los cuatro experimentos se realizaron lecturas semanales de síntomas aéreos de las plantas inoculadas según la escala (con 6 grados); 0: planta sana, 1: planta muerta. Se calculó el área bajo la curva de progreso de la enfermedad estandarizada (ABCPES)

A la finalización de los experimentos, (220 días) se determinó, el incremento de altura de las plantas, el % de aislamiento del patógeno en raíces secundarias, el peso seco de raíces secundarias, y se cuantificó *R. necatrix* en suelo (ufc/l). Todos los tratamientos se compararon entre sí, mediante un análisis de varianza de los parámetros medidos.

A la concentración del 0.1 % y con una sola inoculación de *R. necatrix*, todos los tratamientos fungicidas se diferenciaron del testigo inoculado, presentando una menor cantidad de plantas enfermas (ABCPES). En los dos experimentos Fluazinam destacó como el fungicida más efectivo, con un % de aislamiento de *R. necatrix* en raíces secundarias muy bajo. No se detectó ninguna colonia de *R. necatrix* en suelo tratado con Benomilo o Fluazinam. En las plantas inoculadas dos veces, de nuevo Fluazinam fue el tratamiento más efectivo, las plantas tratadas con este fungicida, no presentaron síntomas de la enfermedad; el % de aislamiento de *R. necatrix* en raíz y suelo, fue nulo y presentaron un mayor peso seco de raíz.

Cuando se ensayó la concentración del 1%, con una o dos inoculaciones del patógeno, los valores de ABCPES y de peso seco de raíz, de las plantas tratadas con Metil tiofanato y Benomilo fueron similares a las tratadas con Fluazinam a una concentración 10 veces menor.

Todo esto indica que entre los fungicidas ensayados, Fluazinam es el más efectivo en el control de la enfermedad.

GENERACIÓN DE UN CLON INFECCIOSO DEL VIRUS DE LA ROTURA DEL COLOR DE LA FLOR DEL PELARGONIUM

RICO, P.; HERNÁNDEZ, C.

Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas (UPV-CSIC), Universidad Politécnica de Valencia. Avenida de los Naranjos s/n 46022. Valencia. E-mail: cahernan@ibmcp.upv.es

El virus de la rotura del color de la flor del Pelargonium (*Pelargonium flower break virus*, PFBV) es uno de los patógenos virales más frecuentes en geranio llegando a alcanzar porcentajes de incidencia del 80-90% en algunas regiones de Europa occidental incluyendo algunas áreas de nuestro país. A pesar de las infecciones causadas por el PFBV repercuten negativamente tanto en la producción como en la calidad de las plantas afectadas, los datos moleculares sobre este agente son aún escasos. El PFBV ha sido adscrito al género *Carmovirus* (familia *Tombusviridae*) y, como los otros miembros de este grupo, presenta partículas isométricas y un genoma monopartido de RNA de simple cadena y polaridad positiva. Recientemente hemos determinado la secuencia completa del RNA genómico de un aislado del PFBV (Rico & Hernández, *Arch. Virol.* 149: 641-651, 2004) poniendo de manifiesto que está constituido por 3923 nucleótidos (nt) y que presenta cinco marcos abiertos de lectura ("open reading frames", ORFs). Dichos ORFs codifican dos proteínas presuntamente implicadas en replicación, dos pequeñas proteínas de movimiento y la proteína de cubierta. Con el fin de facilitar el análisis de las relaciones estructura-función en el PFBV, hemos fusionado un cDNA viral de longitud completa al promotor de la RNA polimerasa del fago T7 y lo hemos ligado a un vector de clonación de alto número de copias. Esta construcción se ha mantenido estable en *Escherichia coli* y los transcritos generados *in vitro* a partir de la misma han sido bioensayados tanto en plantas de geranio como del huésped experimental *Chenopodium quinoa*. En el caso de este último, seis días después de la inoculación se observó la aparición de lesiones cloróticas locales y la infección por el virus fue corroborada mediante análisis Northern. En lo que respecta a las plantas de geranio, aunque no desarrollaron síntomas obvios en las condiciones de crecimiento utilizadas, se pudo constatar la presencia del virus tanto en hojas locales como sistémicas un mes después de la inoculación. Esta es la primera descripción de la síntesis de un clon biológicamente activo del PFBV y su empleo para la disección de elementos del genoma implicados en distintas etapas del ciclo infeccioso será comentado.

PE-2

EFFECTO EN TRANSMISIÓN DE LOS COMPONENTES DEL TAMPÓN DE ELUCIÓN USADO EN LA PURIFICACIÓN DE LA PROTEÍNA HC-PRO DE TEV

RUIZ-FERRER, V.; FERNÁNDEZ-CALVINO, L.; MARTÍNEZ-GARCÍA, B.; GOYTIA, E.; LÓPEZ-ABELLA, D.; LÓPEZ-MOYA, J.J.

Departamento de Biología de Plantas, Centro de Investigaciones Biológicas, CSIC. Ramiro de Maeztu, 9. Madrid 28040, Spain.

La transmisión de potyvirus por pulgones requiere la intervención conjunta del virus y de una proteína viral denominada HC-Pro. Esta proteína se piensa que sirve de puente de unión entre las partículas virales y estructuras desconocidas del estilete del pulgón vector, donde se produciría la retención y posterior liberación del virus durante las diferentes fases del proceso.

Utilizando un clon infeccioso del virus del grabado del tabaco (TEV) que incorpora una cola de histidinas en el extremo amino-terminal de HC-Pro, se puede purificar esta proteína a partir de plantas infectadas mediante cromatografía de afinidad con resina de níquel-NTA. Al eluir la proteína de la resina con un tampón que contenía EGTA, el producto obtenido presentó una alta actividad en transmisión. En cambio, al emplear un tampón con imidazol, la proteína obtenida resultó no ser activa en transmisión. El análisis de las propiedades de la proteína, tras cada forma de elución, mostró claras diferencias en su patrón de oligomerización, estabilidad y comportamiento durante la conservación a diferentes temperaturas. Una diferencia importante entre las preparaciones de proteína obtenidas con cada tampón de elución se encuentra en el contenido de níquel, que era mayor cuando la elución se realizaba con EGTA. Además, la adición de níquel exógeno a las preparaciones de proteína eluida con imidazol permitió recuperar parcialmente la actividad de la misma en transmisión. En su conjunto, nuestros datos sugieren que la actividad de la proteína HC-Pro en transmisión se ve muy influida por alteraciones estructurales que podrían tener lugar durante el proceso de purificación, siendo especialmente sensible a la presencia del catión níquel.

IMPACTO SOBRE LA DIVERSIDAD BACTERIANA DE LA FILOSFERA DE DISTINTOS TRATAMIENTOS QUÍMICOS Y BIOLÓGICOS FRENTE *Erwinia amylovora*, AGENTE CAUSAL DEL FUEGO BACTERIANO EN ROSÁCEAS

MARTÍNEZ-ALONSO, M.¹; SALAZAR, I.¹; BADOSA, E.²; MONTESINOS, E.²; GAJU, N.¹

¹Departamento de Genética y Microbiología. Universidad Autónoma de Barcelona. 08193 Bellaterra (Barcelona). E-mail: maira.martinez@uab.es

²Instituto de Tecnología Agroalimentaria-CeRTA-CIDSAV. Universidad de Girona. Campus Montilivi. 17071 Girona.

El conocimiento actual de la naturaleza y los beneficios de la microbiota autóctona de las superficies vegetales, a diferencia de la microbiota propia de la rizosfera, es escaso. El ecosistema foliar es un sistema muy dinámico que puede ser colonizado por microorganismos patógenos y no patógenos. Teniendo en cuenta la importancia económica que pueden representar los primeros, ya que pueden afectar a grandes extensiones cultivadas, y dado que en la propia filosfera se pueden encontrar microorganismos antagonistas que confieren a la planta una protección frente a los posibles agentes infecciosos, el estudio de la diversidad microbiana de las superficies vegetales, así como las posibles alteraciones de ésta derivadas del tratamiento de las diferentes patologías que puede presentar la planta huésped, cobra una especial importancia. El propósito de este proyecto ha sido el estudio de las poblaciones microbianas que colonizan la filosfera del peral; así como la evaluación de las posibles alteraciones de las mismas, como consecuencia de la utilización de distintos tratamientos frente al fuego bacteriano, una enfermedad para la cual, hasta este momento, sólo es posible su prevención. El trabajo se realizó con dos variedades de peral: Williams y Blanquilla. Se seleccionaron cinco productos fitosanitarios (benzothiadiazol, prohexadiona del calcio, Caldo Bordes, kasugamycina, harpinas) y un agente de biocontrol (*Pseudomonas fluorescens*); los cuales se aplicaron mediante pulverización. Al finalizar dichos tratamientos, tres meses después de su inicio, se realizó el análisis de la diversidad de las poblaciones bacterianas de la filosfera mediante la técnica de electroforesis en geles de poliacrilamida de gradiente desnaturante (DGGE), utilizando dos aproximaciones distintas, una de ellas consistente en la recuperación de la microbiota total de las hojas (método cultivo independiente) y la otra a partir de la recuperación de la microbiota capaz de crecer en medios de cultivo sintéticos (método cultivo dependiente). Los patrones de bandas obtenidos fueron analizados en términos de similitud o disimilitud utilizando el coeficiente de Jaccard y representados en forma de dendrogramas. Finalmente, las bandas predominantes fueron recuperadas de los geles y secuenciadas. A pesar de que los patrones obtenidos presentaban diferencias en función del método de extracción de la microbiota utilizado, en ambos casos se pudieron detectar diferencias entre los distintos tratamientos utilizados; no obstante, los resultados deben interpretarse con precaución dada la elevada variabilidad existente entre las réplicas. Respecto a las bandas secuenciadas, se detectó la presencia de *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Pantoea*, *Actinobacter*, *Arthrobacter*, *Klebsiella* y *Microbacteria*, géneros bacterianos asociados previamente a la filosfera.

PE-4

DETERMINACIÓN CUANTITATIVA DE MICELIO DEL HONGO ECTOMICORRÍFICO *Lactarius deliciosus* MEDIANTE PCR EN TIEMPO REAL

HORTAL, S.; GALIPIENSO, L.; PERA, J.; PARLADÉ, X.

IRTA, Departament de Protecció Vegetal, Ctra. Cabrils s/n, 08348 Cabrils (Barcelona)

La identificación y cuantificación de hongos ectomicorrícicos se ha basado principalmente en los esporocarpos y, en menor medida, en las micorrizas. Sin embargo, el micelio fúngico extramatricial es la parte fisiológicamente activa de la micorriza que explora la rizosfera y determina la capacidad de transporte de agua y nutrientes a la planta. Recientemente, se han utilizado métodos moleculares para identificar micelio de hongos ectomicorrícicos en el suelo mediante la utilización de determinados genes como marcadores. Estas técnicas, sin embargo, no permiten la cuantificación específica del micelio, necesaria para abordar, entre otros, estudios de colonización edáfica y competencia interespecífica. En el presente estudio hemos aplicado la técnica de PCR en tiempo real (real-time PCR) para cuantificar micelio del hongo ectomicorrífico comestible *L. deliciosus*. La cepa utilizada ha sido previamente preseleccionada por su capacidad colonizadora de raíces de *Pinus* spp. en condiciones controladas. Para poner a punto la técnica se diseñaron dos cebadores específicos de *L. deliciosus* a partir de un alineamiento de secuencias de la región ITS del rDNA de distintas especies y cepas de *Lactarius* spp. Estos cebadores permitieron amplificar específicamente un fragmento de 440 pb de *L. deliciosus* sin que se produjera amplificación de la especie próxima *L. sanguifluus*. Posteriormente, se estableció un banco de experimentos para determinar las condiciones óptimas para la reacción de PCR en tiempo real utilizando el marcaje con SYBR Green y sondas TaqMan. La formación del producto de PCR y posibles amplificaciones inespecíficas se verificó mediante el análisis de las curvas de melting. Paralelamente, se procedió a construir una curva patrón a partir de diluciones del producto de PCR, de concentración conocida, clonado en un vector plasmídico. En este trabajo se exponen los resultados obtenidos hasta el momento en la optimización de las condiciones de la PCR en tiempo real y la puesta a punto de este método. Esta técnica amplía las perspectivas de estudios de competitividad de hongos ectomicorrícicos a partir de extracciones de DNA del suelo.

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LOS HONGOS ECTOMICORRÍDICOS COMESTIBLES *Lactarius deliciosus* Y *L. sanguifluus* MEDIANTE MICROSATELLITE-PRIMED PCR Y ANÁLISIS ITS-SSCP

HORTAL, S.; GALIPIENSO, L.; PERA, J.; PARLADÉ, X.

IRTA, Departament de Protecció Vegetal, Ctra. Cabrils s/n, 08348 Cabrils (Barcelona)

Lactarius es un género de hongos ectomicorrícicos que incluye especies comestibles muy apreciadas, especialmente *L. deliciosus* y *L. sanguifluus* (nizcalos) cuya recolección proporciona significativos ingresos en áreas poco favorecidas para la agricultura. La micorrización controlada de distintas especies de *Pinus* con *Lactarius* comestibles es una alternativa factible para el desarrollo de producciones sostenibles alternativas. El desarrollo científico-técnico de la micorrización controlada requiere la caracterización específica e intraespecífica de las cepas inoculadas para su posterior seguimiento en plantaciones experimentales. Dentro de esta línea de investigación, en este trabajo se presentan los resultados obtenidos tras la aplicación de dos técnicas moleculares para la caracterización de 12 cepas preseleccionadas de *Lactarius deliciosus* y *L. sanguifluus*: 'microsatellite-primed PCR' (MPP) y 'single strand conformation polymorphism' (SSCP) de la región ITS del DNA ribosómico. Para la técnica MPP se utilizó el oligonucleótido (GTC)₅ como cebador, obteniendo entre dos y 10 productos de PCR con tamaños comprendidos entre 300 y 1200 pb. Los productos de amplificación mostraron un remarcable polimorfismo inter e intraespecífico en las regiones entre microsatélites. La técnica SSCP proporcionó una gran resolución de bandas y claros polimorfismos de dos o más bandas entre las diferentes cepas estudiadas. Esta técnica ha resultado ser extremadamente precisa para diferenciar entre cepas de *L. deliciosus* que diferían en un sólo nucleótido.

Los resultados obtenidos indican que las técnicas probadas pueden ser de gran utilidad en la caracterización y seguimiento en campo de cepas de *Lactarius* comestibles en el proceso de micorrización controlada. En concreto, la técnica MPP permitiría la identificación de los esporocarpos obtenidos a partir de planta inoculada mediante una sola reacción de PCR. Mediante la técnica SSCP podríamos identificar las micorrizas formadas por la cepa inoculada a partir de la amplificación de la región ITS del hongo. Los resultados se discuten en función de su aplicabilidad práctica y de las posibilidades de utilizar cebadores específicos en la región ITS para mejorar la precisión de la técnica SSCP en condiciones de campo.

CUANTIFICACIÓN DE LAS ENDOMICORRIZAS (VAM) EN TRIGO DURO (*Triticum durum*) COMO INDICADOR BIOLÓGICO DEL SUELO

RODRÍGUEZ, M.S.¹; PROVENZA, S.²; PERDIGUER, A.²; MARTÍN, J.²; PALAZÓN, C.F.³; BARRIUSO, J.¹

¹Escuela Politécnica Superior de Huesca, Universidad de Zaragoza

²Centro de Protección Vegetal, Gobierno de Aragón

³Centro de Investigación en Tecnología Agroalimentaria

El Centro de Protección Vegetal de Aragón, desde hace algunos años recibe gran número de consultas debidas a anomalías aparecidas en el cultivo del trigo, manifestándose con un escaso desarrollo de las plantas, un gran número de espigas decoloradas "espiga blanca", acompañado con un descenso de la producción, estos síntomas no han podido ser relacionados con otros problemas fitosanitarios habitualmente descritos.

Con objeto de determinar algún otro factor no patogénico concomitante en este fenómeno se analizaron y cuantificaron las micorrizas vesículo-arbusculares (VAM) presentes en las raíces de las plantas de trigo duro (*Triticum durum* L.) cultivadas en suelos en los que ya había aparecido este problema y en otros diferentes en los que el cultivo se desarrollaba con normalidad. Además se tuvo en cuenta a la hora de realizar los análisis la presencia previa de funguicidas en la semilla.

Para la determinación de dichas estructuras fúngicas se utilizaron dos tinciones diferenciales, una con Azul Trypan y otra con Negro Clorazol, eligiéndose ésta última por que mostraba un mejor contraste de las estructuras presentes en las muestras tiñendo solamente aquellas que pertenecían a los hongos VAM.

Se observó que el porcentaje de colonización de las raíces por hongos VAM depende de los funguicidas presentes en las semillas y del origen del suelo, si éste provenía de terrenos con problemas de "espiga blanca" o de zonas en los que no se detectaban estos problemas aunque no parecen influir en el desarrollo final de las plantas.

La realización de un tratamiento funguicida a las semillas hace que se reduzca el porcentaje de colonización por hongos VAM, a la vez que se incrementa la formación de vesículas.

La competencia entre las micorrizas puede hacer que disminuya la cantidad de arbusculos formados por éstas, siendo más evidente en los suelos perturbados que en los aparentemente sanos. A la vez el tipo de suelo puede influir en la germinación de las esporas de los hongos VAM.



ÍNDICE ALFABÉTICO DE AUTORES

A

ABAD-CAMPOS, P.	144, 149, 170, 171
ABADÍA, A.	54
ABELLEIRA, A.	174
ACCOTTO, G.P.	77
ACHÓN, M.A.	28, 107, 121, 179, 180, 216
ADILLÓN, J.	153
AGUILAR, J.M.	85
AGUILERA, C.	299
AGUÍN, O.	65, 161, 174, 229
AGUIRREOLEA, J.	72, 280
AGUSTÍ, L.	303
AL RWAHNIH, M.	30
ALBIACH-MARTI, M.R.	35
ALCÁNTARA, E.	324
ALDEA, M.	28
ALEMANY, A.	326
ALEMANY, J.	272
ALFARO-LASSALA, F.	170, 171
ALIQUE, R.	69
ALMACELLAS, J.	27, 322
ALONSO, J.	69
ALONSO, R.	326
ALONSO-DUEÑAS, N.	179, 180
ALTABELLA, J.	134
ÁLVAREZ, A.	167
ÁLVAREZ, B.	191
ÁLVAREZ, J.M.	231, 242
ÁLVAREZ, L.A.	135, 170
ÁLVAREZ-MORALES, A.	227
ALVES-SANTOS, F.M.	47, 254, 325
AMARI, K.	84
AMBRÓS, S.	215, 262
AMENDUNI, T.	22
ANCILLO, G.	259
ANDRÉS, M.F.	256, 257, 326, 328
ANDRÉS, R.M.	216
ANDÚJAR, E.	103, 104, 105, 126, 136
ANTÚNEZ, O.	12
ANTÚNEZ-LAMAS, M.	20
AÑAÑOS, M.	281
ARAHAL, D.R.	12
ARAMBURU, J.	25, 106, 109, 112, 224
ARANDA, M.A.	19, 85, 185
ARJONA, L.	123
ARMAS, I.E.	282

ARMENGOL, J.	44, 81, 135, 140, 144, 149, 152, 170, 171, 199, 201, 202, 213
AROCA, A.	137
ARONA, M.	135
ARQUERO, O.	192, 198
ARREBOLA, E.	34, 278, 279
ARREGUI, J.M.	116
ARROYO, F.T.	90, 308
ASEGINOLAZA, J.	205, 218
ASENSI, M.J.	171
ASENSIO, C.	129
ASENSIO-S-MANZANERA, M.C.	129
ATENCIO, F.A.	86
ÁVILA, A.	42, 138
AVILÉS, M.	56, 288
AYRES, J.	117
AZPILICUETA, A.	69, 297

B

BADAL, J.	171, 199
BADENES, M.L.	59
BADOSA, E.	274, 276, 303, 329, 341
BALADO, M.	174
BALLESTER, A.R.	38
BARAJAS, D.	86
BARBOSA, C.	68
BARCELÓ, F.	53
BARCELÓ, N.	54, 87, 89, 223, 241, 248, 249, 321
BARCELÓ-MUÑOZ A.	243
BARDAJÍ, E.	274
BARÓN, M.	40
BARRAU, C.	90, 306, 308
BARRIGA, C.	327
BARRIUSO, J.	332, 344
BARTUAL, R.	232
BASALLOTE, M.J.	74, 141, 162, 163, 164, 173
BATLLE, A.	28, 124, 193, 197
BATLLORI, LL.	97
BEJARANO, E.R.	57
BEJARANO-ALCÁZAR, J.	81, 83, 200, 283, 284
BELLINI, A.	18
BELLO, A.	247, 248, 249
BELMONTE, A.	48, 120, 182, 267
BELTRÁN, C.	135
BELTRÁN, R.	44, 149, 201
BENAVENT, E.	317
BENDAHMANE, A.	19
BENEDIKTY, Z.	40
BENÍTEZ, E.	288

BENITO, A.	107
BERBEGAL, M.	149, 202
BERNAD, L.	93
BERTOLINI, E.	26, 66, 79, 133
BEUZÓN, C.	225
BIANCHI, L.	118
BIEL, C.	333
BIELZA, P.	238
BILLS, G.F.	166
BIOSCA, E.G.	63, 191
BLANCO, C.	90, 230, 308
BLANCO, I.	143
BLANCO, R.	142, 165, 169, 236, 281, 309, 310, 314
BLANCO-LÓPEZ, M.A.	21, 58, 244
BLOEMBERG, G.V.	279
BOADA, J.	27, 322
BOBO, S.	278
BOITEUX, L.S.	184
BOIX, A.	233, 314
BONATERRA, A.	16, 272
BORRERO, C.	56, 288
BOTELLA, F.	114
BOVÉ, J.M.	117
BRACAMONTE, L.	139
BRAÑA, M.	152
BUÑOL, J.	53
BURGOS, L.	84
BUSQUETS, M.	333

C

CABALEIRO-SOBRINO, C.	43, 268, 269, 285, 327
CABANO-SEARA, B.	285
CABEZA-FERNÁNDEZ, E.	83
CABREFIGA, J.	16, 132
CAETANO, P.	286
CALVET, C.	51, 282, 287, 295, 333, 334, 335
CALZADO, C.	151
CAMBRA, M.	12, 39, 66, 79, 116, 117, 133, 221
CAMBRA, M.A.	41, 130
CAMPELO, M.P.	125
CAMPOS, M.	209
CAMPRUBÍ, A.	51, 287, 295, 333, 334, 335
CAMPS, J.	272
CANO, M.	48, 182, 267
CÁNOVAS, I.	291
CANTORAL, J.M.	290
CAPOTE, N.	221
CARAZO, G.	181

CARBÓ, J.	335
CARBÚ, M.	290
CASALINI, L.	293
CASALS, M.	335
CASQUERO, P.A.	318
CASTILLO, A.G.	57
CASTILLO, P.	175, 255
CASTILLO, S.	56, 288
CASTRO, S.	52, 119, 181, 188
CATALÁ, M.M.	27, 322
CAZORLA, F.M.	34, 75, 277, 278, 279, 291
CELADA, B.	134
CENIS, J.L.	190
CHIKH-ROUHO, H.	231
CID, M.	43
COBOS, R.	50
CODINA, J.C.	34
COLLADO, M.	140
COLLADO-ROMERO, M.	17, 81
CONCI, V.	32
CONESA, A.	259
CONTRERAS, J.	238
CÓRDOBA, M.C.	46, 186, 189
CORPAS, C.	74, 141
CORRALES, P.	239
COUCEIRO, C.	327
CRESPO, A.	213
CUADRADO, I.M.	48, 120, 182, 187, 267
CUBERO, J.	11, 49

D

DAWSON, W.O.	35
DE BLAS, B.	205, 218
DE CAL, A.	11, 18, 73, 91, 232, 300, 331
DE CARA, M.	67, 142, 165, 233, 236, 240, 309, 310, 314
DE LA ROSA, E.	170
DE LA VIÑA, G.	69
DE LEÓN, L.	273
DE LOS SANTOS, B.	90, 306, 308
DE VICENTE, A.	34, 263, 277, 278, 279
DELGADO, S.	22
DELIBES, A.	256, 257, 328
DI SERIO, F.	22
DI VITO, M.	175
DIÁNEZ, F.	142, 165, 233, 236, 240, 309, 310, 314
DÍAZ, J.	168, 234
DÍAZ-HERNÁNDEZ, S.	289, 294
DÍAZ-RUÍZ, J.R.	86

DIEZ-CASERO, J.J.	47, 154, 155, 254, 301, 320, 325
DOLJA, V.V.	260
DOMENICHINI, P.	18
DOMÍNGUEZ-CORREA, P.	289, 294
DONAT, V.	132
DUQUE, C.	183
DUQUE, M.	79
DURÁN-VILA, N.	68, 93, 107, 117, 259

E

ERDOZÁIN, M.	131
ERENA, M.	190
ESCRIU, F.	113
ESPADAS, M.	172
ESPÁRRAGO, G.	143
ESTAÚN, V.	51, 287, 295, 333, 334, 335
ESTEBAN, O.	39
ESTRADA, F.J.	142
ETXEANDIA, A.	203

F

FALK, B.W.	55, 261
FELIU, L.	274
FERERES, A.	79
FERNÁNDEZ, E.J.	142
FERNÁNDEZ, L.	214
FERNÁNDEZ, R.	312
FERNÁNDEZ, S.	129
FERNÁNDEZ, Y.	152
FERNÁNDEZ-ACERO, F.J.	290
FERNÁNDEZ-CALVINO, L.	340
FERNANDEZ-ESPINOSA, S.	187
FERNÁNDEZ-ORTUÑO, D.	291
FERRANDO, V.	144
FERRE, R.	274
FERREIRA, J.J.	296
FERRER, R.M.	108, 113
FLORES, R.	22, 92, 104, 126, 136, 259
FORTANETE, J.	41
FRAILE, A.	15, 45, 115
FRANCÉS, J.	292, 293
FRANCO, M.	85
FRESNO, J.	183
FUERTES, J.R.	125

G

GAFORIO, L.	82, 235, 245, 323
------------------	-------------------

GAJU, N.	341
GALIMANY, G.	27, 322
GALIPIENSO, L.	25, 106, 109, 112, 224, 342, 343
GALLEGO, B.	183
GALLEGO, E.	299
GALLEGO, J.	207
GALLO, L.	289, 294
GÁMEZ, I.	236, 240, 314
GANDÍA, M.	259
GARCÍA, A.	189
GARCÍA, B.	122, 123, 183
GARCÍA, F.	134, 146
GARCÍA, J.A.	39
GARCÍA, M.L.	92
GARCÍA, P.	152
GARCÍA-ANDRÉS, S.	77, 222
GARCÍA-ARENAL, F.	8, 15, 45, 115
GARCÍA-BENAVIDES, P.	145, 196
GARCÍA-CANO, E.	37, 184, 222
GARCÍA-CIUDAD, A.	172
GARCÍA-CRIADO, B.	61, 166, 172
GARCÍA-FIGUERES, F.	51, 282, 287, 295
GARCÍA-GARRIDO, J.M.	209
GARCÍA-JIMÉNEZ, J.	44, 81, 135, 140, 144, 149, 170, 171, 199, 201, 202, 213
GARCÍA-LUQUE, I.	40
GARCIA-MAS, J.	19
GARCÍA-PAREJO, E.	44
GARCÍA-RELLÁN, D.	170
GARMENDIA, I.	72
GARNSEY, S.M.	35
GARRIDO, C.	290
GARRIDO, J.M.	306
GAYOSO, C.M.	147
GELL, I.	11
GENÉ, J.	70
GENOVÉS, A.	13
GENY, L.	280
GIL, L.	33, 239
GIL, M.	39, 66
GIL-SALAS, F.M.	48, 182, 187, 267
GIMENEZ, E.	120
GIMÉNEZ-JAIME, A.	81, 140, 213
GIMÉNEZ-PECCI, M.P.	110
GIORDANO, L.B.	184
GIRBAL, J.	298
GOICOECHEA, N.	72
GÓMEZ, G.	259
GÓMEZ, J.	94, 111, 148, 167, 169, 204

GÓMEZ, M.I.	69, 297
GÓMEZ-BERNARDO, E.M.	125
GONZALEZ DE MURILLO, M.	205, 218
GONZÁLEZ, A.	245
GONZÁLEZ, A.J.	67, 127, 128, 296
GONZÁLEZ, C.	328
GONZÁLEZ, L.	162
GONZALEZ, M.A.	75
GONZÁLEZ, M.L.	41
GONZÁLEZ, X.	28
GONZÁLEZ-BELINCHÓN, C.M.	256, 257
GONZÁLEZ-CANDELAS, L.	38, 251, 319
GONZÁLEZ-CARCEDO, S.	313
GONZÁLEZ-TORRES, R.	231, 242
GORRIS, M.T.	39, 221
GOWDA, S.	35
GOYTIA, E.	86, 214, 340
GRAHAM, J.H.	49
GRAU, O.	92
GRONDONA, I.	297
GUERRERO, M.M.	54, 87, 89, 111, 223, 238, 241, 247, 248, 249, 321
GUERRI, J.	35, 92, 108, 215, 259, 262, 271
GUIJARRO, B.	73
GUIRADO, M.L.	94, 111, 148, 167, 204

H

HEPPE, E.	205, 218
HERNÁNDEZ, C.	22, 259, 339
HERNÁNDEZ, M.D.	190
HERNÁNDEZ-HERNÁNDEZ, J.M.	31, 307
HERRANZ, M.C.	30, 109, 224
HERRERO DE HARO, R.	187
HINAREJOS, C.	252, 317
HINAREJOS, R.	252, 317
HITA, I.	54, 122, 123, 183, 223
HORTAL, S.	298, 342, 343
HOSTENCH, J.	274

I

IBEAS, A.	129
IBRAHEN, Y.	200
IGLESIAS, I.	253
IMBRODA-SOLANO, I.	243
IPPOLITO, A.	14
ITURRITXA, E.	205, 218

J

JAAFAR, L.....	135, 149
JAIZME-VEGA, M.C.	282, 328, 329
JANSSEN, D.	48, 120, 182, 187, 267
JIMÉNEZ, J.J.	150, 151, 237
JIMÉNEZ-DÍAZ, R.M.....	1, 7, 29, 62, 64, 81, 88, 140, 157, 175, 206, 208, 217, 255, 315
JIMÉNEZ-MARTÍNEZ, R.	208
JORDÁ, C.	46, 186, 189
JORDÁN-RAMÍREZ, R.	62, 206
JUÁREZ, J.	116, 117
JUÁREZ, M.A.	185
JURADO-VALLE, I.	243

K

KASSEM, M.A.	185
-------------------	-----

L

LABELLA, Y.E.	299
LACASA, A.	46, 54, 87, 89, 111, 186, 189, 223, 238, 241, 247, 248, 249, 321
LACASA, C.	238
LAFUENTE, M.T.	38
LAMARCA, N.	95
LAMBERTSEN, L.	225
LANDA, B.B.	29, 64, 88, 157, 217, 255
LANDERAS, E.	127, 149, 152
LARENA, I.	18, 188, 300, 331
LASTRA, B.	327
LAVIÑA, A.	124, 193, 197
LEGORBURU, F.J.	203
LEÓN, D.	301
LEUCHTMANN, A.	61
LICHOU, J.	18
LINDE, C.C.	8
LIÑÁN, M.	18
LLÁCER, G.	59
LLAMA-PALACIOS, A.	20
LLOBELL, A.	69, 297
LLOP, P.	12, 132
LLORENTE, I.	96, 97
LOPES, J.R.S.	217
LÓPEZ, C.	25, 92, 112
LÓPEZ, J.A.	247
LÓPEZ, M.	162
LÓPEZ, M.C.	48, 182, 267
LÓPEZ, M.M.	12, 26, 63, 71, 130, 132, 191, 275
LÓPEZ, R.	129

LÓPEZ-ABELLA, D.	214, 340
LÓPEZ-ARANDA, J.M.	232
LÓPEZ-BRAÑA, I.	256, 257
LÓPEZ-ESCUDERO, F.J.	58
LÓPEZ-GARCÍA, B.	305, 319
LÓPEZ-HERRERA, C.J.	14, 162, 163, 243, 336
LÓPEZ-LÓPEZ, K.	227
LÓPEZ-MOYA, J.J.	214, 340
LÓPEZ-ROBLES, D.J.	313, 330
LÓPEZ-RUIZ, F.J.	291
LÓPEZ-SOLANILLA, E.	20
LORENZANA, A.	125
LOVERA, M.	192, 198
LOZANO, G.	78
LUGTENBERG, B.J.J.	7, 279
LUIS, M.S.	108
LUIS-ARTEAGA, M.	113
LUNA, A.P.	57
LUNELLO, P.	32, 110
LUQUE, J.	51, 146, 153, 156, 287, 302

M

MAGGIORANI, A.	20, 139
MALLOR, C.	231, 242
MALPICA, J.M.	45
MANDRIN, J.F.	18
MANSILLA, C.	32
MANSILLA, J.P.	65, 161, 174, 229
MARCHAL, F.	324
MARCO, C.F.	85
MARCO-NOALES, E.	26, 63, 275
MARCOS, J.F.	251, 305, 319
MARI, M.	293
MARÍN, J.P.	27, 322
MARRERO, A.	307
MARSIÑACH, M.	121
MARTÍN, C.M.	160
MARTÍN, G.	48, 120, 182, 267
MARTÍN, J.	325, 332, 344
MARTÍN, J.A.	33, 239
MARTÍN, M.C.	50
MARTÍN, M.P.	133, 134
MARTÍN, M.T.	50
MARTÍN, P.	154, 155, 301
MARTÍN, R.	287, 333
MARTÍN, S.	92
MARTÍN, T.	160
MARTÍN-LÓPEZ, B.	268

MARTÍN-SÁNCHEZ, J.A.	256, 257
MARTÍNEZ DE ILÁRDUYA, O.	147
MARTÍNEZ, B.	214
MARTÍNEZ, C.	257
MARTÍNEZ, I.	204
MARTÍNEZ, M.A.	54, 87, 89, 223, 241, 248, 249, 321
MARTÍNEZ, M.C.	54, 87, 89, 221, 223, 241, 247, 248, 249, 321
MARTÍNEZ, R.E.	233, 236, 240, 314
MARTÍNEZ-ALONSO, M.	341
MARTÍNEZ-CULEBRAS, P.	170, 171
MARTÍNEZ-GARCÍA, B.	340
MARTÍNEZ-PRIEGO, L.	46, 186
MARTÍNEZ-TRECEÑO, A.	232
MARTOS, S.	146, 156
MARUHENDA, A.	114
MASA, A.	230
MASCANZONI, E.	216
MATAMOROS, E.	27, 322
MATAS, I.	80
MATAS, I.M.	194
MATEO, N.	227
MATEO-SAGASTA, E.	82
MAURO, M.	257
MCDONALD, B.A.	8
MEDINA, V.	28, 55, 107, 260, 261
MELERO, J.M.	36, 74, 94, 141, 162, 163, 164, 167, 173, 258
MELGAREJO, P.	11, 18, 73, 91, 232, 300, 331
MÉNDEZ-RODRÍGUEZ, M.A.	64
MENDOZA, M.C.	128
MENÉNDEZ, F.	296
MERCADO-BLANCO, J.	17, 81, 140, 208, 315
MERINO, F.	147, 168, 230, 234
MINAFRA, A.	30
MINGORANCE, E.	263
MIRA, J.L.	252, 317
MOLINERO-RUIZ, M.L.	36, 258
MONROC, S.	274
MONTE, E.	69, 145, 297
MONTES, F.	27, 103, 104, 105, 126, 159, 322
MONTES, M.	29, 157
MONTESINOS, E.	16, 76, 96, 132, 195, 272, 274, 276, 292, 293, 303, 329, 341
MONTÓN, C.	133, 134
MONTOYA, S.	142
MORAGREGA, C.	76, 195, 274
MORAL, J.	158
MORALES, F.	187
MORALES, M.	19
MORENO, A.	79

MORENO, C.M.	50, 160
MORENO, I.M.	185
MORENO, M.C.	303
MORENO, P.	35, 92, 108, 117, 215, 259, 262, 271
MORENO, S.	256, 257
MORENTE, C.	26
MORERA, B.	103, 104, 105, 159
MORET, A.	304
MORETTI, A.	144
MORILLA, G.	57
MORIONES, E.	37, 77, 184, 222
MOYA, P.	215
MUÑOZ, A.	305
MUÑOZ, C.	105
MUÑOZ, Z.	304
MUÑOZ-LEDESMA, F.J.	29, 157
MURILLO, J.	131, 132, 225, 226, 227, 228
MURUAMENDIARAZ, A.	205, 218
MYRTA, A.	30

N

NADAL, M.	304
NAUM-ONGANÍA, G.	92
NAVARRO, A.	317
NAVARRO, E.	52, 119
NAVARRO, J.A.	13, 114
NAVARRO, L.	116, 271
NAVARRO, R.	151
NAVAS-CASTILLO, J.	77, 78
NAVAS-CORTÉS, J.A.	62, 64, 88, 206, 255
NEDBAL, L.	40
NG, J.	55
NIETO, C.	19
NOGALES, A.	287, 335
NOVO, M.	230
NUEZ, F.	112
NÚÑEZ, A.	78
NÚÑEZ, Y.	207

O

OCAMPO, J.A.	209
OCHOA DE ERIBE, X.	18, 73
OLAIZOLA, J.	320, 325
OLEA, F.	278
OLIVARES-GARCÍA, C.	17, 81, 140
OLMOS, A.	12, 66, 79
ORDAX, M.	63

ORDOVÁS, J.	56
ORJEDA, G.	19
ORNAT, C.	53
ORTEGA, A.	48, 120, 182, 202, 267
ORTEGA, C.	116
ORTEGA, J.	90, 306
ORTEGA, M.G.	103, 104, 105, 126
ORTIZ-BARREDO, A.	131, 132, 205, 218
OUMOULOU, A.	231, 242

P

PADILLA, C.V.	123
PADILLA, V.	122, 123, 183
PÁEZ, J.I.	103, 136, 159
PAGÁN, I.	45, 115
PAJARES, J.A.	154, 155, 254, 301, 320
PALACIO-BIELSA, A.	41, 130
PALAUDELMÀS, M.	118
PALAZÓN, C.F.	332, 344
PALLÁS, V.	13, 30, 84, 109, 114, 224, 259
PALO, E.J.	143
PALOMO, J.L.	125, 145, 196
PALUKAITIS, P.	6
PANDO, V.	301
PAQUOT, M.	277
PARLADÉ, X.	302, 342, 343
PASTOR, J.	53
PASTOR, M.	212, 301
PASTOR, S.	235, 245, 323
PELÁEZ, H.	50, 160
PELLICER, C.	54
PENYALVER, R.	71, 303
PEÑA, L.	39
PEÑALVER, J.	132
PERA, J.	302, 342, 343
PERDIGUER, A.	332, 344
PEREIRA-CRESPO, S.	43, 269
PERERA, S.	307
PÉREZ-ARTÉS, E.	81
PÉREZ-BUENO, M.L.	40
PÉREZ-GARCÍA, A.	34, 263, 277, 279, 291
PÉREZ-JIMÉNEZ, R.M.	75, 243, 336
PÉREZ-MARTÍNEZ, I.	60, 80, 225
PÉREZ-ORTÍN, J.E.	12
PÉREZ-SIERRA, A.	135
PERIS, A.	199
PERIS, P.	44
PICO, P.	195

PINA, J.A.....	271
PINEDA-DORADO, M.	40
PINTOS, C.	65, 161
PLANAS, M.	274
PLAZA, P.	95
PLIEGO, C.	75
POMAR, F.....	147, 230
PONS, J.	53
PONZ, F.	32, 110, 207
PORRAS, M.	90, 308
PORTA, J.....	27, 322
PRADOS, A.M.	162, 163, 164, 173
PRAT, M.	295, 335
PROVENZA, S.	332, 344
PUIGNAU, A.	292
PUJOL, M.	276

Q

QUESADA, J.M.	71
QUINTO, V.....	238

R

RAKOTOALY, R.	277
RALSTON, K.	261
RAMOS, C.	60, 75, 80, 194, 225
RAPOSO, R.	137, 207, 316
RATTI, C.	118, 216
RAYA-ORTEGA, M.C.	21, 244
REDONDO, C.	82, 235, 245
REED, J.....	260
REGUERA-USEROS, J.I.	313, 330
REINOSO, B.....	318
REQUENA, A.....	115
RESCA, R.....	118
RESENDE, R.O.	184
REYES, J.M.....	165, 309, 310
RICO, A.....	131, 132, 226
RICO, P.....	339
RIVAS, L.....	131, 226, 228
RIVERA, M.E.	263
ROBERTS, P.A.....	8
ROBERTSON, C.	35
ROCA, L.F.....	311, 324
RODICIO, M.R.	127, 128
RODIO, M.E.....	22
RODRÍGUEZ, A.....	273, 297
RODRÍGUEZ, E.....	209

RODRÍGUEZ, J.M.	111
RODRÍGUEZ, M.	210
RODRÍGUEZ, M.S.	344
RODRÍGUEZ, R.	192, 198
RODRÍGUEZ-JURADO, D.	81, 208
RODRÍGUEZ-LÓPEZ, J.	255
RODRÍGUEZ-MOLINA, M.C.	143
RODRÍGUEZ-MORCILLO, V.	83
RODRÍGUEZ-MORENO, L.	60, 194
RODRÍGUEZ-PALENZUELA, P.	20, 139
RODRÍGUEZ-PÉREZ, A.	289, 294
RODRÍGUEZ-ROMERO, A.S.	328, 329
ROMÁN, M.P.	116, 117
ROMERO, C.	59
ROMERO, D.	263, 277, 291
ROMERO, F.	90, 306, 308
ROMERO, J.	52, 119, 181, 188
ROMERO, M.A.	246, 312
ROMERO, M.D.	256, 257
ROMO-VAQUERO, M.	61, 172
ROS, C.	87, 89, 223, 241, 247, 248, 249, 321
ROSALES, J.	278
ROSENDE, R.O.	37
ROYUELA, M. A.	202
RUANO-ROSA, D.	14
RUBIES, C.	118, 216
RUBIO, F.	316
RUBIO, L.	108, 113
RUÍZ DE GALARRETA, J.I.	131
RUÍZ, J.	183
RUÍZ, L.	52, 119, 120
RUÍZ, M.L.	71
RUÍZ-FERRER, V.	214, 340
RUÍZ-GARCÍA, A.B.	12
RUÍZ-ROMERO, D.J.	279
RUÍZ-RUIZ, S.	262
RUIZ, L.	76

S

SABADELL-GONZÁLEZ, S.	31
SABATÉ, J.	124, 193, 197
SABATER, J.	28
SABUQUILLO, P.	91
SACRISTÁN PÉREZ-MINAYO, G.	313, 330
SACRISTÁN, S.	15
SÁEZ, E.	111, 148, 182, 187, 204
SAGRARIO, J.	113
SÁINZ, M.J.	229

SAJNANI, C.....	40
SALAZAR, I.....	341
SALCEDO, C.I.....	71
SALES JR., R.....	201
SÁNCHEZ, C.....	198, 332
SÁNCHEZ, J.....	299
SÁNCHEZ, J.A.....	165, 309, 310
SÁNCHEZ, J.E.....	151, 211, 250
SÁNCHEZ, M.....	192, 198
SÁNCHEZ, M.E.....	150, 151, 210, 211, 237, 246, 250, 286, 312
SÁNCHEZ, M.I.....	212
SÁNCHEZ-MÁRQUEZ, S.....	166
SANCHEZ-NAVARRO, J.A.....	30
SÁNCHEZ-PINA, M.A.....	84, 114
SÁNCHEZ-TORRES, P.....	251
SANDOVAL, C.....	188
SANTA-MARÍA, E.....	280
SANTAMARÍA, O.....	47, 254, 325
SANTIAGO, Y.....	50, 160
SANTILLI, E.....	225
SANTOS, M.....	142, 165, 233, 236, 240, 309, 310, 314
SASTRE, P.....	114
SATYANARAYANA, T.....	35
SAVAL, P.....	46
SCHENA, L.....	14
SCHNEIDER, B.....	134
SEEMÜLLER, E.....	134
SEGARRA, J.....	107
SEGUNDO, E.....	48, 120, 182, 187, 267
SEGURA, A.....	43, 186
SEGURA, J.M.....	165, 240, 309, 310
SEMINAGO, R.....	224
SEMPERE, R.N.....	185
SENMARTI, J.....	106
SERRA, P.....	68
SERRANO, L.....	107, 121, 180
SERRANO, Y.....	94, 111, 148, 167, 204
SILVAR, C.....	168, 234
SIMÓN, B.....	190
SIN, E.....	257
SIVERIO, F.....	273, 294
SOLLA, A.....	33, 239
SORIANO, J.M.....	59
SORRIBAS, F.J.....	53, 70
SOTELO, C.E.....	69
SUÁREZ-BONNET, E.....	163
SUDARSHANA, M.R.....	261
SUGAR, D.....	5

SZUREK, B. 19

T

TEGLI, S. 225
TEJEDOR, E. 315
TELLO, J.C. 67, 89, 142, 165, 169, 233, 236, 240, 241, 281, 309, 310, 314
TELLO, M.L. 82, 235, 245, 323
TENLLADO, F. 86
TIAN, T. 261
TOMÁS, A. 27, 322
TORÉS, J.A. 263, 277, 278, 291
TORNÉ, M. 238
TOROK, V.A. 114
TORRES, E. 51, 133, 134, 146
TORRES, R. 18, 73, 95
TRAPERO, A. 21, 42, 138, 150, 151, 158, 192, 198, 210, 211, 212, 237, 244,
246, 250, 286, 311, 312, 324
TRIAS, R. 276
TRILLAS, M. I. 56
TROYA, M.T. 316
TRUNIGER, V. 19
TUSET, J. 252, 317

U

URBEZ, J.R. 50, 160
USALL, J. 18, 73, 95

V

VALENCIANO, J.B. 318
VALLEJO, I. 290
VALLEJO, R. 133
VALVERDE, R. 78
VALVERDE-CORREDOR, A. 17
VARELA, M. 234
VARELA-BARRENECHEA, I. 268
VARGAS, M. 86, 214
VARGAS, Y. 187
VÁZQUEZ, M.A. 34
VÁZQUEZ DE ALDANA, B.R. 172
VÁZQUEZ-RUIZ DE OCENDA, R.A. 253
VEGA, J.M. 103, 105
VELASCO, I. 126
VELASCO, L. 120, 122, 182, 190, 270
VELASCO, V. 169
VERDEJO-ALONSO, E. 143
VERDEJO-LUCAS, S. 53, 70
VETTEN, H.J. 114

VEYRAT, A.....	319
VICENT, A.	44, 135, 170, 171, 199, 201
VIDOY-MERCADO, I.....	243
VIERA, A.	53, 70
VILAJELIU, M.	97, 292
VILANOVA, S.....	59
VILARDELL, A.	96
VILARDELL, P.	97
VILLAMAR, L.P.....	162
VIÑAS, I.	95
VIVES, M.C.	271
VOVLAS, N.	175

Y

YEH, H.H.	261
----------------	-----

Z

ZABALGOGEAZCOA, I.....	61, 166, 172
ZAMBOLIM, L.	217
ZAMORA, P.....	325
ZEABONILLA, T.....	243, 336
ZERIOUH, H.....	277
ZURERA, C.	173

