



SANIDAD FORESTAL: DE LA SALUD DEL ARBOL A LA VITALIDAD DEL ECOSISTEMA. SISTEMAS DE SEGUIMIENTO DEL ESTADO SANITARIO DE LOS BOSQUES DESDE LA ESCALA LOCAL A LA GLOBAL

Sánchez Peña, G.

Jefe del Servicio de Protección de los Montes Contra los Agentes Nocivos.
Dirección General del Medio Natural y Política Forestal, Ministerio del Medio Ambiente, y Medio Rural y Marino

El seguimiento del estado de salud de los bosques parte de un principio claramente diferenciador: no se trata de erradicar al agente nocivo sino de recuperar el equilibrio dinámico en el que patógeno y hospedante conviven. En este sentido las labores de seguimiento y cuantificación de daños, así como los escenarios predictivos cobran una especial significación.

A lo largo de la presente ponencia se expondrá la evolución histórica que ha tenido el universo de la sanidad forestal, y los cambios radicales que le han acaecido durante los últimos veinte años. Contaminación atmosférica, Cambio Climático y Pérdida de la Biodiversidad son conceptos claves en este proceso reciente donde los patógenos clásicos quizás estén siendo minusvalorados.

De forma paralela se han desarrollado sistemas de vigilancia homogéneos a escala internacional, cuyo más claro pero no único exponente son las Redes Europeas de Seguimiento de Daños en los Montes. Se describirán estos sistemas de inventario y seguimiento, y su adecuación desde circunstancias locales (escala monte) a internacionales (escala continental).

Por último se esbozará el desarrollo actual y el previsible futuro a corto plazo de la sanidad forestal, donde la salud del árbol ha cedido protagonismo a la vitalidad del ecosistema, y en el cual el riesgo asociado al comercio internacional unido a variaciones climáticas constituyen los principales retos para los cuales las Redes de Alerta Temprana y los Mapas de Escenarios predictivos de riesgo son elementos imprescindible a desarrollar.

**PROBLEMÁTICA ASOCIADA AL CHANCRO RESINOSO CAUSADO POR
Fusarium circinatum EN EL PAÍS VASCO.**

Iturrutxa, E.

NEIKER-Tecnalia

Fusarium circinatum es actualmente, el hongo causante de los principales problemas sanitarios asociados al género *Pinus* en la cornisa cantábrica. Esta enfermedad que fue detectada por primera vez en 1986 en California está, a su vez, presente en el Sudeste de los Estados Unidos, Méjico, Chile, Sudáfrica, Haití, Japón, Francia, España e Italia; países en los cuales ha causado serios daños tanto en plantaciones como en bosques nativos del género *Pinus*, resultando especialmente sensible a la enfermedad el pino de Monterey.

Pinus radiata ocupa el 55 % de la superficie forestal arbolada de la cornisa cantábrica. Es la especie más abundante en el País Vasco. Desde su primera introducción a nivel experimental a mediados del siglo XIX, y las primeras repoblaciones forestales a finales de este mismo siglo, hasta nuestros días, en ésta comunidad se cultiva más del 65 % del pino insignis a nivel de España

Las mismas condiciones climáticas que en su día favorecieron el desarrollo de las masas forestales de esta especie vegetal han sido condiciones propicias para el desarrollo de diversas enfermedades habituales en esta especie, causadas por organismos nativos e introducidos. Entre los organismos introducidos, *Fusarium circinatum* es el que actualmente está repercutiendo de manera más importante en las masas forestales, tanto por las características de la enfermedad que desarrolla, como por las medidas de erradicación asociadas a su detección.

En el campo de la investigación ha supuesto la oportunidad de estudiar un pato-sistema interesante.

La presencia de un organismo nuevo introducido plantea las cuestiones de su posible origen y su impacto potencial en el nuevo ecosistema colonizado, altamente condicionado por factores ambientales y la intervención humana.

Estamos ante un organismo de una sencilla naturaleza pero con una gran versatilidad y resistencia a condiciones adversas, que requiere nuestro trabajo cuidadoso de aprendizaje sobre el que poder definir formas de actuación responsables basadas en nuestro conocimiento, aún limitado, de la enfermedad.

PRINCIPAL FORESTRY DISEASES IN PORTUGAL

Moreira, A.C., Inácio, L. and Sousa, E.

INIA/INRB- Av. República, 2785-504-Oeiras- Portugal

In Portugal, 37% of the territory is forest, corresponding to 3.3 million hectares. The more representative and economically interesting species are the eucalyptus (*Eucalyptus* spp.), the maritime pine (*Pinus pinaster*) and the cork oak (*Quercus suber*), occupying a total of 73% in the forest area. Also with significant occupation, there are holm oak (*Quercus rotundifolia*) and other forest species, namely chest nut tree (*Castanea sativa*). The most important diseases of these species are caused mainly by fungi that attack the aerial part or the root system, thus leading in some cases to plants death. This approach focuses the more relevant diseases of each tree species and a special attention is paid to the pine wood nematode of the maritime pine and the cork oak and holm oak decline.

PONENCIAS INVITADAS

Participantes:

PROF. M. MAIXNER

Julius Kühn-Institute, Bernkastel-Kues, Germany

PROF. R. MARTYN

Purdue University, West Lafayette, IN, USA

CURRENT DEVELOPMENTS IN THE STUDY OF THE EPIDEMIOLOGY OF GRAPEVINE PHYTOPLASMA DISEASES

Maixner, M.

Julius Kühn-Institute (JKI), Federal Research Centre for Cultivated Plants - Institute for Plant Protection in Fruit Crops and Viticulture, Bernkastel-Kues, Germany - Email: *Michael.Maixner@jki.bund.de*

Phytoplasmas are obligate intracellular parasites that, in general, are not transmitted vertically but depend on vector transmission. Wild plants beside cultivated crops may be involved in the epidemiology as alternative hosts. The biology of the particular vector species is an additional key factor for the epidemiology of phytoplasma diseases that often show a high vector specificity. The complex interactions between pathogens, crops, wild plants and insect vectors can result in severe outbreaks of economically significant diseases and drive their notable spatial and temporal dynamics.

Two phytoplasma diseases of grapevine (grapevine yellows; GY) are of great economic importance in Europe: Flavescence dorée (FD) and Bois noir (BN). Though they are very similar in symptomatology, the epidemic cycles of the two diseases differ fundamentally. Their specific epidemiological traits will be compared in this talk.

Current research in GY shows that the epidemic systems are even more complex than thought before. The genetic diversity of both, phytoplasma strains associated to GY and vector populations, is analyzed and linked to biological traits such as host specificity. In the case of BN, distinct epidemiological cycles including different alternative host plants and phytoplasma strains could be identified.

The infection pressure of GY on grapevine needs to be minimized in order to reduce economic damage. This parameter is influenced by various factors: Type and abundance of infected plants serving as sources of inoculum; vector presence, abundance and migration activity; feeding preferences, infestation levels and inoculation efficiency of vectors; susceptibility of grapevine cultivars. The role of some of these factors will be discussed.

Management strategies for GY need to consider the specific epidemiological traits of the particular disease in order to identify the appropriate target(s) for control measures. The vector of FD, for example, living almost exclusively on grapevine, can be readily controlled by insecticide treatments. Such measures are not appropriate to control BN, since the life history of this vector is not connected to grapes. To reduce infection pressure by this disease, cultural practice needs to be adjusted with respect to the reduction of alternative host plants and the deterioration of the vector's natural habitat.

There are still many open questions regarding the epidemiology of GY and other phytoplasma diseases. The lack of a clear correlation between disease incidence and vector presence or abundance in some regions leads to the search for alternative vectors. Phytoplasma-host plant and -vector interactions are far from being well understood and the reasons for the almost synchronous outbreaks and fluctuations of GY all over Europe still need to be investigated.

THE PROFESSION OF PLANT PATHOLOGY - A U.S. PERSPECTIVE

Martyn, R.D.

President, The American Phytopathological Society, Department of Botany and Plant Pathology, Purdue University, West Lafayette, IN, USA. Email: Rmartyn@purdue.edu

Plant diseases can be traced back almost as far as recorded history. Numerous ancient writings describe plagues and blights destroying crops and modern civilization still faces many plant disease challenges. Plant pathology has its roots in botany and notable scientists such as Tillet, Prevost, and deBary already had concluded microscopic organisms could cause plant diseases before Pasteur and Koch proved the germ theory of disease with sheep anthrax. Plant pathologists can be credited with helping improve crop yields and food production throughout the world. However, at a time when there are increasing challenges to crop production, some that potentially may increase the severity or distribution of plant diseases, the training of future plant pathologists appears to be declining, at least in the United States. The ability of U.S. Land Grant Universities to attract and train future generations of plant pathologist may be at risk. Recent data collected by The American Phytopathological Society^{1,2} documents a decline in the numbers of students completing advanced degrees in plant pathology, fewer faculty with a diverse expertise and appreciation for whole plant and/or field-level plant pathology, fewer stand-alone, single discipline departments of plant pathology, reduced ability of many departments to offer specific curricular aspects of plant pathology, and a demographic profile that casts an ominous prediction for an unusually large number of faculty retirements over the next decade. The combination of these factors will likely result in a serious shortage of highly skilled plant pathologists in the U.S. in coming years. The affect also may be felt globally as fewer international students will receive doctoral and post-doctoral training in plant pathology in the US as faculty retire and are not replaced. On the other hand, this will likely create greater opportunities for universities around the world to take leadership in some aspects of plant pathology education.

References

¹MacDonald, J.D., et al. 2008. APS *Ad hoc* Committee on the Future Education of Plant Pathologists.

²Gadoury, D., et al. 2008. APS *Ad hoc* Committee on The Profession of Plant Pathology.

OC-1

CAMBIOS ESPECÍFICOS EN LA EXPRESIÓN GÉNICA DE *Nicotiana benthamiana* COMO RESPUESTA A LA INTERACCIÓN SINÉRGICA ENTRE EL VIRUS X DE LA PATATA Y EL VIRUS Y DE LA PATATA

García-Marcos, A., Martiáñez, J., Pacheco, R., González-Jara, P., Díaz-Ruíz, J.R. y Tenllado, F.

Departamento de Biología de Plantas, Centro de Investigaciones Biológicas, CSIC. Ramiro de Maeztu, 9. 28040 Madrid

La infección simultánea por distintos virus puede dar lugar en condiciones naturales a una sintomatología más severa que la inducida por cualquiera de las infecciones simples, un fenómeno conocido como sinergismo. Las micromatrices de cDNA han emergido como una herramienta muy útil para evaluar los cambios en la expresión génica del hospedador como resultado de la infección viral. Estos cambios producen alteraciones en diversas rutas metabólicas y en genes relacionados con crecimiento y desarrollo, así como la inducción de mecanismos de defensa de la planta. En el presente estudio se utilizó un microchip de cDNA de *Solanum tuberosum* para determinar los cambios en la expresión génica inducidos en *N. benthamiana* por la infección simultánea de PVY y PVX, que en última instancia producen necrosis y la muerte de la planta. Nos centramos en las respuestas diferenciales producidas por la infección conjunta PVX-PVY en comparación con la inducida por PVX o PVY en infecciones simples. Se identificaron un total de 2.360 ESTs (21% del total en el chip) con diferencias significativas ($P < 0,05$) para los tres tratamientos virales ensayados, con cambios de expresión de 1,5 veces o más en comparación con las plantas control inoculadas con tampón. La infección conjunta alteró la expresión de un mayor número de ESTs que cualquiera de las infecciones simples, sugiriendo que la interacción sinérgica entre PVX y PVY provoca cambios específicos en la expresión génica que podrían ser responsables de la necrosis observada. Además, los cambios en la expresión génica de las plantas infectadas con PVX-PVY fueron mayores que aquellos encontrados en las plantas infectadas con PVX o PVY. Para identificar correlaciones entre los patrones de expresión génica y los síntomas sinérgicos, se examinó la distribución de los genes alterados en categorías ontológicas (Gene Ontology) utilizando diversas plataformas bioinformáticas. Las categorías “respuesta a estrés” y a “estímulos bióticos” y, más específicamente, genes relacionados con la ruta de biosíntesis del ácido jasmónico y oxilipinas, fueron algunas de las categorías exclusivamente sobrerrepresentadas en el grupo de genes inducidos por PVX-PVY. La expresión diferencial de algunos de estos genes asociados con defensa y/o estrés, como *RBOHB*, *WIPK*, *CSD*, *SIPK* y α -*DOX*, se confirmó mediante RT-PCR cuantitativa en tiempo real. Además, mediante Northern blot se detectó una interferencia diferencial con la biogénesis y la función de miRNAs en las distintas infecciones virales, cuya amplitud fue mayor en el caso de la interacción sinérgica PVX-PVY. La identificación de genes que muestran alteraciones específicas en sus patrones de expresión podría ayudar a identificar relaciones causa-efecto entre procesos celulares específicos y el desarrollo de la enfermedad en las infecciones sinérgicas.

OC-2**DETERMINACION DEL ESTADO AGREGADO DEL SUPRESOR 2b DE CMV EN PLANTA: RELACION CON SU ACTIVIDAD BIOLOGICA**

González, I.², Lewsey, M.¹, Carr, J.¹ y Canto, T.²

¹Department of Plant Sciences, University of Cambridge, Cambridge, CB2 3EA, Reino Unido

²Centro de Investigaciones Biológicas, CIB, CSIC. Ramiro de Maeztu 9, 28040 Madrid, ESPAÑA. E-mail: tomas.canto@cib.csic.es

La actividad funcional del supresor de silenciamiento 2b del virus del mosaico del pepino (CMV, aislado Fny) se ha relacionado directamente con su localización mayoritariamente nuclear en la célula (Lucy et al., 2000. EMBO 19, 1672; Mayers et al., 2000. JGV 81, 219). Más recientemente, la manera en que el supresor 2b realiza su actividad se ha relacionado con su interacción con el factor AGO1, un componente del complejo RISC de la maquinaria del silenciamiento viral, al que inhibiría (Zhang et al., 2006. Genes & Dev. 20, 3255). Sin embargo, parece también que el supresor 2b puede unirse a RNAs pequeños directamente (Goto et al., 2007. Plant Cell Physiol. 48, 1050).

Mediante la técnica de Complementación Bimolecular Fluorescente (BiFC), hemos determinado por primera vez el estado agregado del supresor 2b en la célula vegetal, visualizando por fluorescencia una acumulación mayoritariamente nuclear del factor agregado. Análisis mediante BiFC de una batería de seis mutantes de 2b que afectan a las señales de localización nuclear (NLS), o a putativos sitios de fosforilación de la proteína mostraron que cada una de las mutaciones analizadas impedía la formación de agregados homólogos. Sin embargo, en algunos casos, combinaciones entre distintos mutantes y también con proteína 2b no mutada permitieron la formación de agregados heterólogos fluorescentes, en unos casos reteniendo su fenotipo de acumulación nuclear mayoritaria, en otros mostrando un fenotipo de acumulación citoplásmico y perinuclear.

La capacidad de estos mutantes y combinaciones de mutantes para suprimir el silenciamiento en planta de un gen marcador se analiza y discute en relación con su capacidad de formar agregados o no, sus fenotipos de localización subcelular, y de unirse o no a AGO1 en ensayos de BiFC.

OC-3

UN CONJUNTO DE NUEVOS RNAs CLOROPLÁSTICOS SE ACUMULAN EN PALMERA DATILERA AFECTADA POR LA ENFERMEDAD DE LAS HOJAS QUEBRADIZAS

Marqués, J.^{1,2}, Fadda, Z.^{1,2}, Duran-Vila, N.², Flores, R.¹, Bové, J.M.³ y Daròs, J.A.¹

¹Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas (CSIC-UPV) Valencia.

²Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias, Moncada, Valencia.

³INRA y University Victor Segalen Bordeaux 2, Villenave d'Ornon, Francia.

La enfermedad de las hojas quebradizas o *maladie des feuilles cassantes* (MFC) es una afección letal de la palmera datilera (*Phoenix dactylifera* L.) que ha adquirido proporciones epidémicas en los oasis del sur de Túnez. El síntoma más característico de la enfermedad consiste en que los folíolos de las palmas afectadas se vuelven frágiles y quebradizos, extendiéndose posteriormente esta alteración a toda la palmera que para de crecer y, eventualmente, muere. La epidemiología de la MFC sugiere una causa biótica porque las palmeras afectadas se presentan agrupadas en focos. Sin embargo, hasta la fecha ningún agente patógeno del tipo hongo, bacteria, fitoplasma, virus o viroide ha podido asociarse con la enfermedad, mientras que se ha comprobado que los folíolos de las palmas afectadas presentan concentraciones de manganeso inferiores a los controles sanos.

La búsqueda del posible agente causal de la MFC llevó al análisis de preparaciones de RNA de folíolos de palmeras afectadas, con el objetivo de rastrear la existencia de pequeños RNAs con las propiedades características de los viroides. Estos análisis mostraron la presencia en los tejidos afectados de una serie de pequeños RNAs (MFC-RNAs) estrictamente asociados con la enfermedad. Algunos de estos RNAs aparecen en forma bicatenaria (MFC-dsRNAs) según se infiere de análisis cromatográficos, marcaje terminal, digestión con RNasas e hibridación northern. Sin embargo, la clonación y secuenciación de los MFC-RNAs demostró que no provienen del agente causal de la enfermedad sino que derivan de diferentes regiones del genoma del cloroplasto de la palmera, tanto de la polaridad sentido como antisentido. Particularmente abundantes son los correspondientes a las regiones que contienen los genes *rrn5S-trnR(ACG)* y *trnM(CAU)-atpE*. El origen de los MFC-RNAs podría estar relacionado con la deficiencia en manganeso que es un elemento esencial para las plantas con funciones muy relevantes en el cloroplasto.

En cualquier caso, los MFC-RNAs son marcadores moleculares de la MFC y su detección ha permitido desarrollar un método de diagnóstico que permite detectar la enfermedad precozmente, incluso antes de la aparición de síntomas, y que debe ayudar a establecer medidas para su control.

OC-4

ANÁLISIS DE LOS MECANISMOS DE TOLERANCIA DE LAS PLANTAS A LOS VIRUS

Pagán, I.¹, Alonso-Blanco, C.² y García-Arenal, F.¹

¹Centro de Biotecnología y Genómica de Plantas & Departamento de Biotecnología, Universidad Politécnica de Madrid, ETSI Agrónomos, 28040 Madrid.

²Departamento de Genética Molecular de Plantas, Centro Nacional de Biotecnología, Campus Universidad Autónoma, Cantoblanco, 28049 Madrid.

Los parásitos son una importante fuerza de selección para sus huéspedes, y éstos han desarrollado diversas estrategias para evitar la infección o disminuir su coste. Los mecanismos de resistencia, que impiden la entrada del parásito o limitan la colonización del huésped, han sido ampliamente estudiados. Sin embargo los mecanismos de tolerancia, definida como la capacidad del huésped para reducir el efecto negativo del parásito en su eficacia biológica, han recibido una menor atención. La tolerancia puede estar asociada a cambios en la historia vital del huésped. Según la teoría de la historia vital la infección induce cambios en el patrón de distribución de los recursos y en la duración de los periodos dedicados a crecimiento y reproducción: el huésped infectado aumenta la proporción de recursos empleados en reproducirse, y reduce el tiempo invertido en crecimiento y reproducción para minimizar el efecto del parasitismo. El apoyo experimental a esta teoría es escaso, y en plantas sólo se ha analizado en respuesta a la herbivoría.

Hemos analizado los mecanismos de tolerancia de las plantas a los virus usando el sistema formado por CMV y la planta *Arabidopsis thaliana*. Para ello, se analizó la respuesta de 21 accesiones de *Arabidopsis* frente a la infección por tres aislados de CMV. En este conjunto no se encontró correlación entre la resistencia a CMV y el efecto de la infección en la planta, debido a fenómenos de tolerancia específicos de determinados genotipos. La tolerancia parecía asociada a cambios en la historia vital del huésped, por lo que se analizaron, en plantas infectadas y sanas, distintos caracteres de la historia vital: distribución de recursos entre parte vegetativa y reproductora, y duración del periodo vegetativo y del periodo reproductor. La capacidad de *Arabidopsis* para modificar el patrón de distribución de recursos dependió de la arquitectura de la planta, y los genotipos tolerantes fueron los que aumentaron la proporción de recursos dedicados a reproducción y a producción de progenie tras la infección. Para identificar los determinantes genéticos de tolerancia se usaron líneas recombinantes autofecundadas (RILs), lo que permitió identificar 3 QTLs de efecto mayor, que cartografiaban con genes implicados en los procesos de floración y producción de semillas, candidatos a explicar la tolerancia.

Por tanto en el sistema *Arabidopsis*-CMV se cumplen las predicciones de la teoría de la historia vital en los genotipos tolerantes, en los que cambios en el patrón de distribución de recursos se asocian a mecanismos de tolerancia.

OC-5

ANÁLISIS GENÓMICO FUNCIONAL DE LA INTERACCIÓN *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* - OLIVO

Matas, I.M. y Ramos, C.

Área de Genética, Universidad de Málaga, 29071-Málaga, E-mail: crr@uma.es

Los procesos moleculares responsables de la interacción entre el agente causante de la tuberculosis del olivo, *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* (Psv), y su planta huésped, *Olea europaea* L., son prácticamente desconocidos. Tras la penetración de Psv en los tejidos vegetales a través de heridas en ramas y brotes, la multiplicación del patógeno desencadena una hipertrofia e hiperplasia de los mismos y, en consecuencia, la formación de tumores (ver comunicación presentada por L. Rodríguez-Moreno). En este trabajo planteamos utilizar una estrategia de genómica funcional, *Signature Tagged Mutagenesis* (STM), para la identificación de genes de Psv necesarios para su multiplicación e invasión del hospedador. Se construyó una colección de 4724 mutantes de la cepa Psv NCPPB 3335, cada uno de los cuales contienen un transposón *mini-Tn5*-STM portador de una etiqueta diferente (región variable de 40 pb). El análisis en masa de los mutantes se lleva a cabo en plantas de olivo cultivadas *in vitro*. Treinta días después de la infección, las etiquetas correspondientes a los mutantes cuya multiplicación *in planta* se encuentra reducida no se detectan mediante hibridación *southern*. Hasta la fecha, se han analizado 3183 mutantes, de entre los cuales, 152 etiquetas no fueron detectadas. La identificación del punto de inserción del transposón y el análisis de las secuencias flanqueantes al mismo han revelado, hasta el momento, la identidad del gen interrumpido en 18 de los mutantes identificados. Los genes identificados pertenecen a las siguientes categorías funcionales: 1) metabolismo central o de los ácidos nucleicos, 2) relacionados con virulencia y secreción, 3) biosíntesis de envueltas celulares, 4) respuesta a estrés y adaptación ambiental y 5) quimiotaxis. Para analizar el proceso de infección de cada uno de estos mutantes, en comparación a la cepa parental, se están llevando a cabo inoculaciones individuales de los mismos tanto en olivo *in vitro*, como en plantas de un año. Adicionalmente, estamos analizando la estructura tumoral y la localización de células bacterianas, marcadas con GFP, en tumores de olivo inducidos por al menos un mutante perteneciente a cada una de las categorías anteriores.

OC-6

LA PERCEPCIÓN DE ÁCIDO JASMÓNICO POR LA BACTERIA *Dickeya dadantii* (ex-*Erwinia chrysanthemi*) CONTRIBUYE A SU ENTRADA EN LA PLANTA A TRAVÉS DE HERIDAS

Antúñez-Lamas, M.¹, Ordoñez-Cabrera, E.¹, López-Solanilla, E.¹, Solano R.² y Rodríguez-Palenzuela, P.¹

¹Centro de Biotecnología y Genómica de Plantas. E.T.S.Ingenieros Agrónomos. Universidad Politécnica de Madrid. Av. Complutense s/n 28040 Madrid.

²Departamento de Genética Molecular de Plantas, Centro Nacional de Biotecnología-CSIC, Campus Universidad Autónoma, 28049 Madrid.

Dickeya dadantii es agente causal de la podredumbre blanda de los vegetales, una enfermedad que causa importantes pérdidas económicas en todo el mundo. Los principales factores de virulencia que se han identificado hasta la fecha en esta bacteria incluyen enzimas hidrolíticas, sideróforos y sistemas de detoxificación. El objetivo fundamental de este trabajo ha sido evaluar la importancia de la quimiotaxis hacia el ácido jasmónico en el proceso de patogénesis de esta bacteria.

Se ha analizado la quimiotaxis hacia diversas moléculas de diferente naturaleza entre las que se encuentran azúcares, aminoácidos, ácidos orgánicos y compuestos de origen vegetal. *Dickeya dadantii* mostró quimiotaxis positiva a todos ellos excepto a la cisteína. Entre estos últimos se ha estudiado la quimiotaxis hacia moléculas implicadas en la defensa vegetal como son el ácido jasmónico y el ácido salicílico. Los resultados muestran que *D. dadantii* responde positivamente hacia el ácido jasmónico, mientras que muestra repulsión hacia el ácido salicílico. Dada la atracción por el ácido jasmónico se realizaron ensayos de virulencia en diferentes genotipos de *Arabidopsis thaliana* alterados en la ruta y biosíntesis de esta hormona, corroborándose que esta hormona está implicada en el defensa frente a *D. dadantii*. Además se ha analizado la cantidad de bacteria que entra al interior de una hoja de *A. thaliana* tras 1 hora de incubación obteniéndose una menor entrada en aquellos genotipos que no producen ácido jasmónico.

Debido a que el ácido jasmónico se produce como consecuencia de una herida en un tejido vegetal se ha analizado el movimiento a lo largo de hojas de endibia que habían sido dañadas previamente. Los resultados obtenidos muestran que la población bacteriana avanza más rápida y direccionalmente en presencia de una herida que cuando la hoja está intacta.

Posteriormente se han realizado ensayos de virulencia en diferentes huéspedes con células de *D. dadantii* que habían sido tratadas previamente con ácido jasmónico. Los resultados muestran una mayor virulencia en hojas de endibia y en hojas de violeta africana cuando las células habían sido pretratadas con este compuesto. Para analizar con más detalle el efecto de este pretratamiento se han llevado a cabo análisis de la expresión tras el tratamiento empleando hibridación de microordenamientos de ADN que contienen el genoma completo de la bacteria. El análisis bioinformático de los genes inducidos los ha agrupado en distintas categorías como genes reguladores implicados en patogénesis, de respuesta a estrés y virulencia, genes de metabolismo y genes con función desconocida.

Todo esto sugiere que la quimiotaxis hacia el jasmonato juega un papel importante en la entrada de *D. dadantii* a través de heridas del tejido vegetal.

OS-7

PAPEL DE LOS LIPOPEPTIDOS DE *Bacillus subtilis* EN LA CAPACIDAD DE BIOCONTROL DE ENFERMEDADES BACTERIANAS DE CUCURBITÁCEAS

Zeriuoh, H., Romero, D., García-Gutiérrez, L., Codina, J.C., de Vicente, A. y Pérez-García, A.

Grupo de Microbiología y Patología Vegetal. Dpto. Microbiología, Facultad de Ciencias, Universidad de Málaga. 29071 Málaga. E-mail: aperez@uma.es

Diversas especies del género *Bacillus* se encuentran entre los biopesticidas de mayor éxito en el control de diferentes insectos y patógenos, debido, entre otras propiedades, a su capacidad de producir diferentes compuestos biocidas. Entre estos compuestos destacan los antibióticos lipopéptidicos, que están recibiendo una especial atención ya que están relacionados con el biocontrol de diversos hongos fitopatógenos y pueden contribuir al control de las enfermedades mediante diferentes mecanismos de acción. En nuestro laboratorio se han seleccionado dos cepas de *Bacillus subtilis* por su capacidad antagonista frente a un amplio rango de patógenos fúngicos, demostrándose su capacidad de biocontrol frente al oídio de las cucurbitáceas. Dado que la actividad antifúngica de estas cepas estaba principalmente asociada a la producción de lipopéptidos, se planteó como principal objetivo de este trabajo evaluar el espectro de acción de estas cepas de *B. subtilis* frente a patógenos aéreos de origen bacteriano y analizar el papel de estos lipopéptidos en la posible actividad supresora. Los ensayos de biocontrol realizados sobre hojas de melón cortadas revelaron que dos de estas enfermedades, la mancha bacteriana y la podredumbre blanda causadas por *Xanthomonas campestris* pv. *cucurbitae* y por *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* respectivamente, eran también controladas por estas cepas de *B. subtilis*.

La capacidad inhibitoria observada en filtrados libres de células señalaba a la antibiosis como el principal mecanismo de acción empleado por estas cepas de *B. subtilis*. Con el fin de corroborar esta hipótesis y la posible implicación de los lipopéptidos en la capacidad de biocontrol, se empleó una colección de mutantes simples incapaces de producir iturina, bacilomicina o fengicina. En los ensayos de biocontrol los mutantes en iturina/bacilomicina perdieron completamente la actividad supresora, mientras que los mutantes en fengicina retenían cierta capacidad de control. El estudio microscópico de las interacciones antagonistas permitió visualizar el efecto deletéreo de estos lipopéptidos sobre las membranas de las células bacterianas. Estos resultados han permitido confirmar el papel esencial de los lipopéptidos de la familia de las iturinas en la actividad de biocontrol de estas cepas de *B. subtilis* frente a estos patógenos bacterianos.

OS-8

MEJORA DE LA APTITUD ECOLÓGICA Y EFICACIA DE AGENTES DE BIOCONTROL MEDIANTE ESTRÉS SALINO

Cabrefiga, J., Francés, J., Camps, J., Montesinos, E. y Bonaterra, A.

Instituto de Tecnología Agroalimentaria-CeRTA-CIDSAV, Universidad de Girona, Campus Montilivi, 17071 Girona. E-mail: anna.bonaterra@udg.es

Una de las principales limitaciones del control biológico de las enfermedades de las plantas reside en la elevada variabilidad en la eficacia de un ensayo a otro, que suele ser debido a dificultades del agente de biocontrol para colonizar y sobrevivir en el medio en el que se aplica, así como a factores ligados al ambiente o al hospedante.

La mejora de la supervivencia y de la capacidad de adaptación de los agentes de biocontrol a situaciones desfavorables, durante las distintas fases de producción, formulación, conservación y almacenamiento, y tras su aplicación en las plantas o en los productos de la postcosecha, constituye uno de los puntos críticos a superar en el desarrollo de aplicaciones prácticas de los agentes de control biológico.

Con el objetivo de mejorar la aptitud ecológica en *Pantoea agglomerans* EPS125 contra enfermedades de poscosecha y en *Pseudomonas fluorescens* EPS 62e para el control del fuego bacteriano de las rosáceas, se ha utilizado una estrategia de mejora fisiológica mediante un sistema de estrés salino durante el cultivo para la preparación de la formulación. En dicho estudio se observó que cada una de las bacterias acumula diferentes sustancias osmoprotectoras (glicina-betaína, trehalosa, y otros productos) que le permiten adaptarse a las condiciones de estrés y crecer. El sistema de osmoadaptación combina estrés osmótico salino mediante NaCl (0.5 a 0.7 M) con la adición de glicina betaína u otro tipo de osmolitos en el medio de cultivo. El proceso tiene efectos pleiotrópicos y además de acumular glicina betaína, las cepas sintetizan *de novo* otros osmolitos que mejoran significativamente su tolerancia a la desecación, al estrés térmico (temperaturas moderadas) o a otras situaciones desfavorables y aumentan la supervivencia en la superficie de frutos en postcosecha y en la filosfera del peral y manzano. Esta mayor aptitud ecológica comporta una mejor eficacia del control biológico tal y como se ha demostrado en ensayos de control de podredumbres de frutos en postcosecha en diversas condiciones y del fuego bacteriano en ensayos de campo. Se concluye que esta técnica puede hacerse extensiva a otros agentes de control biológico con el fin de aumentar su eficacia.

OS-9**DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE AGENTES DE BIOCONTROL**

Larena, I. y Melgarejo, P.

Dpto. Protección Vegetal; CIT-INIA; Carretera de La Coruña 7,500; 28040 Madrid. E-mail: melgar@inia.es

El registro de un agente de control biológico requiere el desarrollo métodos de monitorización que permitan su detección y cuantificación en el ambiente. Este trabajo se ha centrado en la detección molecular y cuantificación de dos hongos antagonistas aplicados en dos patosistemas: rizosfera y suelo frente a diferentes patógenos de suelo de cultivos hortícolas y filosfera frente a *Monilinia* spp. en frutales de hueso. Se ha empleado un método mixto que incluye aislamiento en medio semiselectivo del ACB e identificación del mismo mediante tecnología basada en PCR.

La cepa 212 de *P. oxalicum* (PO212) ha demostrado ser un prometedor agente de control biológico frente a algunas enfermedades de plantas hortícolas . Se desarrolló una pareja de cebadores (POITS1F /POITS2R1) para la detección específica de PO212 basándose en las secuencias de las regiones ITS del rADN. Esta pareja de cebadores fue capaz de detectar al hongo en varios tipos de suelo en los cuales el agente de biocontrol había sido inoculado. El desarrollo de un medio semiselectivo (PoIM) permitió el aislamiento y cuantificación del mismo. Cuando la PCR usando la pareja de cebadores específica para PO212 se combinó con diluciones seriadas de muestras de suelo sobre PoIM, las colonias fueron identificadas rápidamente.

Por otro lado el aislado 282 *Epicoccum nigrum* Link. (EN282) es un agente de biocontrol de la podredumbre parda causada por *Monilinia* spp. en frutales de hueso. Se partió de una pareja de cebadores denominados OPN18-1F /OPN18-1R que amplificaba específicamente el ADN desde cultivo puro del aislado 282. En este trabajo se demostró que esta pareja de cebadores detectaba al agente de biocontrol en varios tipos de frutos de hueso. El desarrollo de un medio semiselectivo (EnSM), permitió el aislamiento y cuantificación del mismo. Cuando la PCR usando la pareja de cebadores específica para EN282 se combinó con diluciones seriadas de muestras de frutos de hueso sobre EnSM, las colonias fueron rápidamente identificadas

OS-10

MONITORIZACIÓN A NIVEL CELULAR DE LA INTERACCIÓN *Verticillium dahliae* - *Pseudomonas fluorescens* PICF7 EN TEJIDOS DE OLIVO

Prieto, P.¹, Navarro-Raya, M.C.², Valverde-Corredor, A.² y Mercado-Blanco, J.²

¹Departamentos de Mejora Genética Vegetal y ²Protección de Cultivos. Instituto de Agricultura Sostenible (CSIC). Alameda del Obispo s/n, Apdo. 4084, 14080 Córdoba. E-mail: jesus.mercado@ias.csic.es

La Verticilosis del olivo (VO), causada por *Verticillium dahliae* Kleb., afecta severamente al olivar y, por el momento, no existe una estrategia de control eficiente. Una medida de lucha, concebida como complementaria de otras en un contexto de control integrado y sostenible de la enfermedad, consiste en el tratamiento de la planta con agentes microbianos con buena capacidad colonizadora de la rizosfera, efectivos antagonistas del agente patógeno y/o estimuladores de mecanismos defensivos innatos en la planta. Trabajos anteriores han permitido constatar que la cepa PICF7 de *Pseudomonas fluorescens*, nativa de raíces de olivo, es capaz de controlar eficientemente infecciones causadas por el patotipo defoliante (D) de *V. dahliae* en plantones de la variedad Picual, muy susceptible a la enfermedad. Asimismo, mediante el uso combinando de microscopía confocal (CLSM), disección tridimensional de tejidos y marcaje autofluorescente (*egfp* y *rfp*) de PICF7, hemos demostrado que dicho agente de biocontrol es capaz de colonizar endofíticamente las raíces de olivos 'Arbequina'. Las bacterias se localizan siempre en los espacios intercelulares de la región del córtex y nunca se observa colonización de tejidos vasculares. Sin embargo, no se ha verificado si la colonización endofítica por PICF7 es un factor determinante para el control efectivo de la VO. Con objeto de estudiar la influencia que la ecto/endo-colonización de la raíz de olivo por PICF7 tiene en la infección por parte de *V. dahliae* y en el desarrollo de la enfermedad, se han efectuado bioensayos en los que además de constatar la capacidad de PICF7 de controlar la VO en plantones 'Arbequina', se ha seguido el proceso de colonización de un aislado D de *V. dahliae* transformado con la proteína autofluorescente YFP, así como de éste y PICF7 conjuntamente. Para ello, las raíces desnudas de plantas de olivo se inocularon mediante inmersión en una suspensión de bacterias etiquetadas con *egfp*, e inmediatamente se transplantaron a suelo artificial infestado con conidias del patógeno (etiquetado con *yfp*). El proceso de colonización de ambos se siguió mediante CLSM durante 80 días. En las condiciones ensayadas, y a pesar de reducir los efectos de la enfermedad, la presencia de PICF7 no impidió la colonización por el aislado D de *V. dahliae* de los tejidos vasculares de las raíces, ni su posterior progreso hacia tejidos vasculares aéreos. Por último, no se detectaron fenómenos de antibiosis entre ambos microorganismos.

OS-11

ACUMULACIÓN DE FENOL EN *Ulmus minor* TRAS SU APLICACIÓN POR RIEGO, E INFLUENCIA DEL TIPO DE SUELO Y DOSIS DE FENOL ANTE INOCULACIONES CON *Ophiostoma novo-ulmi*

Martín, J.A.¹, Solla, A.², Gil, L.¹ y García-Vallejo, M. C.³

¹ETSI de Montes. Universidad Politécnica de Madrid, Paseo de las Moreras s/n, 28040 Madrid ²Ingeniería Técnica Forestal. Universidad de Extremadura. Av. Virgen del Puerto 2, 10600 Plasencia. ³CIFOR. INIA. Carretera de la Coruña Km 7,5, 28040 Madrid. E-mail: asolla@unex.es

La grafiosis, enfermedad causada por el hongo vascular *Ophiostoma novo-ulmi* y transmitida por coleópteros del género *Scolytus*, ha ocasionado la desaparición de la mayoría de los olmos en Europa y Norte América. Se han sugerido diferentes funciones de los compuestos fenólicos en la defensa de las plantas ante patógenos, entre las que destacan su actividad como fitoalexinas, barreras estructurales, y activadores de genes de resistencia. Se plantea la hipótesis de que la aplicación de fenol en olmos susceptibles incrementa su resistencia ante *O. novo-ulmi*. Para testar esta hipótesis se plantearon como objetivos comprobar si el fenol aplicado mediante riego en *Ulmus minor* se acumula en los tejidos del xilema y estudiar si existe una relación entre la dosis aplicada y dicha acumulación observando la influencia del tipo de sustrato en el que está plantado el árbol (arena o arcilla).

El ensayo consistió en cuatro tratamientos: 1) planta control, regada con agua, 2) planta regada con una disolución de fenol (C₆H₆O) al 0,02%, 3) planta regada con una disolución de fenol al 0,2% y 4) planta regada con una disolución de fenol al 1%. Para comprobar y cuantificar la acumulación de fenol en los tejidos del xilema se realizó un análisis mediante cromatografía de gases/espectrometría de masas. Los olmos fueron inoculados a finales de abril de 2007 con *O. novo-ulmi*. El marchitamiento foliar causado por la inoculación se evaluó a los 30, 60 y 120 días tras la inoculación.

Los olmos absorbieron y acumularon fenol en tejidos del xilema. Se observó una relación directa entre las dosis utilizadas en los riegos y dicha acumulación, salvo en el caso de la dosis al 1%, la cual causó la muerte de los árboles por toxicidad. La máxima absorción fue a la dosis de 0,2%, lo cual podría estar relacionado con el hecho de que para dicho tratamiento los árboles presentaron un menor porcentaje de marchitamiento tras la inoculación ($P < 0,05$), traduciéndose en una mayor resistencia ante el patógeno. El sustrato arcilloso favoreció la absorción de fenol frente al sustrato arenoso. Los resultados obtenidos indican la posibilidad de que el fenol se pudiera utilizar como tratamiento de control frente a *O. novo-ulmi*.

OS-12

**TRATAMIENTOS CON METIL JASMONATO PARA EL CONTROL DE
Fusarium oxysporum EN PLÁNTULAS DE *Pinus pinaster***

Vivas, M.¹, Company, M.¹, Sampedro, L.², Zas, R.² y Solla, A.¹

¹ Ingeniería Técnica Forestal. Universidad de Extremadura. Av. Virgen del Puerto 2, 10600 Plasencia. E-mail: asolla@unex.es ² Centro de Investigaciones Ambientales CINAM-Lourizán. Apdo. 127. Pontevedra 36080

Fusarium oxysporum es un hongo patógeno incluido en el complejo 'Damping off', presente en una gran mayoría de viveros de ámbito forestal, que afecta a las plántulas en fases muy tempranas de desarrollo. En este trabajo testamos la hipótesis que el Metil Jasmonato (MeJa) actúa como un elicitor de los mecanismos defensivos de *Pinus pinaster* ante el patógeno citado, durante la emergencia y post-emergencia de las plántulas.

Se realizaron 3 ensayos (E) con semillas de *P. pinaster* de procedencia Galicia costa. Las semillas se sumergieron en H₂O₂ al 30%, y se sembraron en arena estéril contenida en macetas de 250 ml. Se siguió un diseño completo de bloques al azar (n=10). E1 permitió obtener la curva de susceptibilidad de *P. pinaster* a *F. oxysporum*, para lo cual se inocularon semanalmente las macetas (5 ml de inóculo; 10⁵ esporas/ml) hasta la semana 6 tras la siembra. En E2, las semillas recibieron los siguientes tratamientos antes de la siembra: (i) pulverización con MeJa 5 mM, (ii) inmersión de 10 minutos en MeJa 5 mM, y (iii) pulverización e inmersión en agua esterilizada (control). Las macetas se inocularon como en E1 en la semana 1 tras la siembra. En E3 los tratamientos de pulverización de MeJa se realizaron en dos momentos (semanas 4 y 5 tras la siembra), y a dos dosis (5 y 10 mM); las inoculaciones se realizaron en la base del tallo de las plántulas a dos concentraciones (10⁵ y 10⁷ esporas/ml) y después de dos intervalos de tiempo distintos tras las pulverizaciones con MeJa (1 y 7 días).

El pico de susceptibilidad de *P. pinaster* a *F. oxysporum* se observó en las semanas 1 y 2 tras la siembra, con una incidencia del 80-100% de las plántulas. Los tratamientos de MeJa a las semillas no afectaron significativamente a la germinación de las plántulas. No obstante, las semillas pulverizadas o sumergidas en MeJa mostraron una mayor incidencia que las semillas no tratadas (80 vs 40%), luego se descarta la posible aplicación de este producto en semilla para combatir *F. oxysporum*. Las plántulas tratadas con MeJa durante la postemergencia y no inoculadas mostraron clorosis y marchitamiento de las acículas cootiledonares, y su tallo fue menor en diámetro al de las plantas control ($P < 0,10$). Las plantas tratadas e inoculadas mostraron siempre una incidencia y una intensidad mayor que las plantas no tratadas e inoculadas, con independencia del momento de los tratamientos, la dosis del tratamiento, la concentración del inóculo, y el momento de inoculación. Se descarta la posible aplicación de MeJa en plántula de *P. pinaster* para el control de *F. oxysporum*.

OS-13

CONTROL BIOLÓGICO DE *Botrytis cinerea* EN VIÑA CON TRATAMIENTOS DEL AGENTE DE BIOCONTROL *Candida sake*

Teixidó, N.¹, Usall, J.¹, Cañamás, T.P.¹, Torres, R.¹, Solsona, C.¹, Cases, E.¹ y Viñas, I.²

¹IRTA. Àrea de Postcollita, XaRTA, Centre UdL-IRTA, Rovira Roure, 191, Lleida-Catalunya

²Universitat de Lleida. Àrea de Postcollita, XaRTA, Centre UdL-IRTA, Rovira Roure, 191, Lleida-Catalunya Email: josep.usall@irta.cat

Botrytis cinerea puede llegar a causar importantes pérdidas en uva de mesa si las condiciones meteorológicas le son favorables. Actualmente hay un interés creciente en utilizar sistemas de control alternativo a los productos químicos de síntesis tradicionales, entre estos sistemas potenciales destaca la utilización de microorganismos antagonistas, algunos de ellos ya en el mercado. Pero las aplicaciones de agentes de control biológico muchas veces son variables y poco consistentes en el tiempo, dependiendo de las condiciones meteorológicas. En esta línea se están realizando muchos esfuerzos en desarrollar formulaciones que permitan mejorar su eficacia e incrementar su consistencia. En este trabajo se van a evaluar diferentes métodos de formulación, entre los que destaca la adaptación de *C. sake* a condiciones de stress y la utilización de aditivos. De los resultados obtenidos hay que destacar que se consiguió incrementar la termo tolerancia de *C. sake* a través de su crecimiento en diferentes condiciones de temperatura. En el estudio se realizaron tratamientos en campo durante tres campañas, con diferentes estrategias y tipos de formulaciones de *C. sake*. Los resultados indican que es posible mejorar la adherencia y supervivencia de *C. sake* en campo modificando su formulación. Los mejores resultados se obtuvieron añadiendo el aditivo Fungicover (film alimentario). Este mismo tratamiento (*C. sake*+Fungicover) fue el que presentó mejores niveles de eficacia, con una reducción del nivel de infección del orden del 90%. Estos resultados demuestran el potencial de *C. sake* en el control de *B. cinerea* en uva de vinificación.

OS-14

SENSIBILIDAD DE *Phaeomoniella chlamydospora* Y *Phaeoacremonium aleophilum* A DIVERSOS FUNGICIDAS EN ENSAYOS *IN VITRO* E *IN VIVO*

Gramaje, D.¹, Aroca, A.², Raposo, R.², García-Jiménez, J.¹ y Armengol, J.¹

¹Instituto Agroforestal Mediterráneo, Universidad Politécnica de Valencia, Camino de Vera s/n, 46022 Valencia. ²Instituto de Investigaciones Agrarias (INIA). CIFOR. Ctra. Coruña Km 7,5, 28040 Madrid

Se estudiaron 14 fungicidas (azoxystrobin, captan, carbendazima, oxiclóruo de cobre, cubiet, flusilazol, imazalil, iprodiona, quinosol, tiram, procloraz, tebuconazol, metiltiofanato y didecildimetil cloruro amónico) evaluando su efecto a diferentes concentraciones (0,1, 1, 10 y 100 mg de materia activa L⁻¹) sobre el crecimiento micelial y la germinación de conidios de *Pa. chlamydospora* y *Pm. aleophilum*. Para comparar la efectividad de los fungicidas se calculó la concentración efectiva 50 (CE 50). Los fungicidas que mostraron un mejor efecto en la reducción del crecimiento micelial de ambos hongos fueron carbendazima, flusilazol y tebuconazol. Respecto a la germinación de conidios, azoxystrobin, captan, carbendazima, oxiclóruo de cobre, cubiet, tiram y didecildimetil cloruro amónico fueron los que se mostraron más efectivos. Complementariamente, se realizó un ensayo de fungicidas simulando las condiciones de la fase de amerado de varetas del patrón en el proceso de producción de plantas de vid injertadas en viveros. En este caso, se estudiaron tres materias activas, quinosol y cubiet con una concentración de 0,5 g de materia activa L⁻¹, y didecildimetil cloruro amónico con una concentración de 0,18 g de materia activa L⁻¹. Varetas del portainjerto de vid 110 R sin enraizar, de 15 cm de longitud, previamente tratadas por termoterapia con agua caliente a 54°C durante 30 minutos, se inocularon con una suspensión de 10⁴ ó 10⁸ conidios/mL de *Pm. aleophilum* o *Pa. chlamydospora* mediante una bomba de vacío. A continuación se prepararon recipientes con agua estéril y las diferentes soluciones de fungicida en los que se introdujo una vareta inoculada junto a tres varetas no inoculadas. Las varetas se mantuvieron sumergidas durante 4 días a 25 °C y, a continuación, se procesaron para la detección de la infección causada por estos hongos mediante aislamiento en medio de cultivo MEAS. Para cada combinación de concentración de inóculo-tratamiento y patógeno se realizaron 3 repeticiones y el experimento se repitió dos veces independientemente en las mismas condiciones. Los resultados mostraron que, en los controles sin fungicidas, las varetas no inoculadas fueron infectadas por *Pa. chlamydospora* y *Pm. aleophilum*, aumentando el porcentaje de aislamiento a mayores dosis de inóculo. En cuanto a los tratamientos fungicidas, didecildimetil cloruro amónico fue el más efectivo, sobre todo a dosis bajas de inóculo, inhibiendo completamente en este caso la infección de las varetas no inoculadas.

OS-15

VARIABILIDAD INTRAESPECÍFICA Y ESTRATEGIAS DE DIAGNÓSTICO DE UN PATÓGENO EMERGENTE, EL *Iris yellow spot tospovirus*

Lunello, P.¹, Muñoz, R.M.², Lerma, M.L.² y Williams, L.¹

¹Agrenvec, Boadilla del Monte 22, Madrid. E-Mail: pablo.lunello@agrenvec.es

²SEDAF, Instituto Técnico Agronómico Provincial de Albacete.

El *Iris yellow spot virus* (IYSV), miembro del género Tospovirus, tiene un genoma de RNA tripartito, envuelto en una estructura lipídica y glicoproteica. Sus viriones son isodiamétricos. Infecta el cultivo de la cebolla (*Allium cepa*) entre otras especies y sus citas han sido crecientes en los últimos años a nivel mundial.

En observaciones de muestras de campo, la detección de este patógeno fue variable en el tiempo y en diferentes tejidos de la planta. Además su transmisión se produce en la naturaleza por trips, hecho que hace a este patógeno epidemiológicamente más interesante. En una primera etapa de este trabajo, ajustamos una IC-RT-PCR con los cebadores citados por Coutts y colaboradores en 2003, con los cuales los resultados por ELISA y por RT-PCR no eran coincidentes, existiendo mayor cantidad de muestras positivas siempre por DAS-ELISA. Por este motivo los objetivos de este trabajo fueron: 1-El diseño de nuevos cebadores en base a las nuevas secuencias, el clonado y secuenciación de fragmentos amplificados correspondientes a la secuencia codificante de la nucleocápsida viral. 2- Alineamiento y ubicación taxonómica a partir de las secuencias obtenidas en el banco de datos del NCBI. 3- Desarrollo de una herramienta de diagnóstico ultra-sensible por IC-RT-PCR en tiempo real, con tecnología TaqMan®. 4-Aplicación de este último diseño en estudios de distribución del virus en la planta, detección precoz y análisis de insectos vectores. 5-Observación por microscopía electrónica (EM) de preparados de extractos de plantas infectadas.

Se obtuvieron 11 nuevas secuencias que alineadas con las preexistentes permiten observar la variabilidad intraespecífica de este virus y la homogeneidad de los aislados castellano-manchegos. Sobre estas secuencias se determinaron falencias en el diseño de los cebadores utilizados en primera instancia. La detección por IC-RT-PCR en tiempo real permitió, en resultados preliminares el diagnóstico con gran especificidad y sensibilidad, en diferentes tejidos y hasta en dos trips. Las sondas diseñadas no presentaron amplificaciones cruzadas con otros miembros del género tospovirus. En los preparados de ME por la técnica de ISEM-D se observaron partículas isodiamétricas con un diámetro de 80-90 nm aproximadamente.

OS-16

**NUEVAS ESPECIES DE BEGOMOVIRUS AISLADOS DE BATATA:
IMPLICACIONES TAXONÓMICAS**

Trenado, H.P.¹, Lozano, G.¹, Valverde, R.² y Navas-Castillo, J.¹

¹Estación Experimental “La Mayora”, CSIC, 29760, Algarrobo-Costa, Málaga.

²Department of Plant Pathology and Crop Physiology, Louisiana State University Agricultural Center, Baton Rouge, LA 70803, USA.

La batata (*Ipomoea batatas*) es el tercer cultivo de raíz más importante en el mundo. Debido a su propagación vegetativa es propenso a acumular virus que reducen enormemente su producción. Hasta el momento, sólo se han descrito dos especies de begomovirus (familia *Geminiviridae*) en batata [*Sweet potato leaf curl virus* (SPLCV) y *Sweet potato leaf curl Georgia virus* (SPLCGV)] y una especie en *I. indica*, una planta ornamental del mismo género [*Ipomoea yellow vein virus* (IYVV)].

En este trabajo presentamos datos sobre la variabilidad genética que presentan las poblaciones naturales de begomovirus presentes en cultivos de batata en dos de las principales zonas de cultivo de España (Málaga e Islas Canarias) así como en *I. indica*. La secuenciación de los genomas completos de 15 aislados virales puso de manifiesto que tres de ellos pertenecían a la especie SPLCV y tres a IYVV. Los nueve genomas restantes no podían ser incluidos en ninguna de las especies descritas hasta el momento siguiendo los criterios de demarcación oficialmente establecidos para el género *Begomovirus*. Estos aislados pertenecerían a tres nuevas especies virales para las que se proponen los nombres *Sweet potato leaf curl Spain virus* (SPLCEsV) (2 aislados), *Sweet potato leaf curl Canary Islands virus* (SPLCCIV) (3 aislados) y *Sweet potato leaf curl Lanzarote virus* (SPLCLanV) (4 aislados).

Se analizan los procesos de recombinación que han tenido lugar en la generación de estas nuevas especies y se discuten sus relaciones filogenéticas. Los resultados obtenidos ponen de manifiesto la complejidad del grupo de begomovirus que infectan batata y otras especies del género *Ipomoea* y sientan las bases para una posible revisión taxonómica del género *Begomovirus*.

OS-17

MÉTODOS DIRECTOS DE PREPARACIÓN DE MUESTRAS PARA LA DETECCIÓN A GRAN ESCALA Y EN PERIODO DE DORMANCIA DEL VIRUS DE LA SHARKA. COMPARACIÓN DE PCR A TIEMPO REAL Y ELISA-DASI

Capote, N., Bertolini, E., Olmos, A., Vidal, E., Martínez, M.C. y Cambra, M.

Centro de Protección Vegetal y Biotecnología. Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA). Carretera Moncada-Náquera km 5. 46113 Moncada, Valencia. e-mail: mcambra@ivia.es

La PCR a tiempo real convencional (uso de RNA purificado) es un método que posee alta sensibilidad y especificidad para la detección molecular de virus de plantas. Sin embargo, el mayor inconveniente de esta técnica es la necesidad de extraer RNA de la muestra, lo que hace que sea tediosa, lenta, costosa y no aplicable para análisis a gran escala. Por todo ello, se han desarrollado métodos sencillos de preparación de muestras que permiten analizar un gran número de plantas sin necesidad de extraer RNA, utilizando directamente extractos crudos (dilución y "spot") o impresiones de tejido vegetal (impresión y escachado). Estos métodos se han aplicado a la detección del virus de la sharka (*Plum pox virus*-PPV), considerado el patógeno más importante de frutales del género *prunas*, pero son igualmente aplicables para la detección de otros organismos fitopatógenos. Dilución y "spot" acoplados a RT-PCR a tiempo real resultaron 100 veces más sensibles que ELISA-DASI y 10 veces más que PCR co-operativa, aunque el método más sensible para detección de PPV resultó RT-PCR a tiempo real convencional. "Spot" RT-PCR a tiempo real fue validado como método para el análisis de muestras de *Prunus* en invierno, durante el periodo de dormancia o reposo vegetativo, la época más frecuente de comercialización de plantas, mostrando una alta sensibilidad (93.6%), es decir, detectando PPV en invierno en el 93.6% de los árboles que desarrollaron la enfermedad de la sharka la siguiente primavera. La especificidad (98.0%) y probabilidad post-test (97.9%) de la técnica también fueron elevadas. ELISA-DASI, con anticuerpos monoclonales, resultó el método más específico, identificando correctamente en invierno el 99% de los árboles sanos. Por otro lado, el análisis de 2.919 muestras comparando ELISA-DASI y "spot" RT-PCR a tiempo real mostró un 90.8% de coincidencia en los resultados y un coeficiente de correlación del 0.87 entre los valores de ELISA (DO_{405nm}) y el número de ciclos para amplificación (Ct) demostrando la validez de esta técnica molecular para el análisis de muestras a gran escala.

OS-18

***Pectobacterium carotovorum*, AGENTE CAUSAL DE PODREDUMBRE BLANDA EN CULTIVOS COMERCIALES DE ADORMIDERA EN ESPAÑA**

Aranda, S.¹, Montes-Borrego, M.^{1,2}, Muñoz-Ledesma F.J.³, Jimenéz-Díaz, R.M.^{1,2} y Landa, B.B.¹

¹Instituto de Agricultura Sostenible, CSIC, 14080 Córdoba. ²ETSIAM, Universidad de Córdoba, 14071, Córdoba, ³Alcaliber S.A, Ctra. Carmona-El Viso del Alcor, Km. 1.8 Carmona (Sevilla).

La adormidera (*Papaver somniferum* L.) es un cultivo de gran importancia económica para la industria farmacéutica mundial. En España se cultivan anualmente ca. 8000 ha distribuidas en Castilla La Mancha y Andalucía. Durante el periodo 2004 a 2007 se detectaron plantas en cultivos comerciales de adormidera en regadío en Andalucía afectadas de marchitez y ennegrecimiento y podredumbre blanda y acuosa en los tallos seguido de muerte de la planta. Aislamientos de tejidos sintomáticos en B de King y Agar Nutritivo dieron lugar consistentemente a colonias bacterianas morfológicamente similares a *Pectobacterium carotovorum* (PC). Este diagnóstico constituiría la primera cita de este patógeno en cultivo de adormidera en España si se confirmaran los postulados de Koch. En este trabajo se han caracterizado aislados puros representativos de *P. carotovorum* de adormidera mediante análisis polifásico de caracteres fenotípicos y moleculares utilizando como referencia diferentes subespecies de PC, *Dickeya chrysanthemi* y *Brenneria* spp. Los aislados de adormidera son Gram-, anaeróbicos facultativos, oxidasa (-), catalasa(+), producen ácido a partir de D(+)-arabinosa, lactosa y D(+) trehalosa y no de α -D-metilglucosido, crecen a 37 °C y causan podredumbre blanda de rodajas de patata y reacción hipersensible (-) en tabaco. La patogenicidad se determinó mediante inyección de una suspensión de células, que dio lugar a podredumbre blanda severa y ennegrecimiento del tejido entre los 3 y 5 días después de la inoculación. Los aislados de PC de adormidera fueron más virulentos que los aislados de PC de otros huéspedes. Mediante el sistema OmniLog ID 1.2 y placas Biolog GN se identificaron los aislados bacterianos como PC con un 66.7% de similitud con la subsp. *carotovorum*. La caracterización molecular se realizó mediante iniciadores específicos para la diferenciación del 'grupo carotovora' (*peY1/peY2*, *G1/L1*, *indC-F1/indC-R3*) y mediante secuenciación de los genes 16S del ADNr, *mtlD* y *acnA*. El análisis de Máxima parsimonia identificó a los aislados de PC como pertenecientes al grupo '*carotovorum*', si bien su posicionamiento (con alto soporte estadístico) en clusters independientes de la subsp. *carotovorum* sugiere que puede tratarse de una subespecie nueva no descrita hasta la fecha en ningún otro cultivo a nivel mundial.

Investigación financiada por el Proyecto PET2006_0444, MEC.

OS-19

***Xanthomonas arboricola* pv. *pruni*, PATÓGENO DE CUARENTENA, IDENTIFICADO EN ESPAÑA: PRIMERAS DETECCIONES EN FRUTALES Y EN PLANTAS DE VIVERO.**

Roselló, M.¹, Santiago, R.², Cambra, M.A.³, Colino, M. I.², Arribas, C.², Rius, L.¹, Toledo, J.⁴, Peñalver, J.⁵, Morente, C.⁵, Quesada, J.M.⁵, Llop, P.⁵ y López, M. M.⁵

¹ Laboratorio de Diagnóstico, 46460, Silla, Valencia. E-mail: rosello_monper@gva.es

² Servicio de Sanidad Vegetal, 06071, Badajoz

³ Centro de Protección Vegetal, 50059, Zaragoza

⁴ Sección de Sanidad Vegetal, 03003, Alicante

⁵ Centro de Protección Vegetal y Biotecnología, 46113, Moncada, Valencia

La mancha bacteriana de los frutales de hueso, está causada por *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni* (antes *Xanthomonas campestris* pv. *pruni*). Actualmente, la enfermedad está distribuida por numerosos países que cultivan dichos frutales. En Europa, está declarada en Bulgaria, Francia, Italia, República de Moldova, Rumania, Federación Rusa, Eslovenia y Ucrania. Esta bacteriosis genera pérdidas cuantiosas, no sólo porque los frutos afectados no tienen valor comercial, sino porque provoca severas defoliaciones que debilitan el árbol, disminuyendo progresivamente su productividad. Por su gravedad, está considerada como un patógeno de cuarentena en la Unión Europea. La enfermedad se detectó por primera vez en España en 2002, en ciruelo cvs. Larry Ann y Friar, en la provincia de Badajoz, y se tomaron medidas de erradicación. Un año después se detectó un nuevo foco en ciruelo en esta provincia y posteriormente, en 2007, dos nuevos focos en ciruelo han sido detectados, aplicándose también las medidas pertinentes. En 2003-2004 se identificó la mencionada bacteria en diversas variedades de ciruelo, melocotonero, almendro y nectarino en un vivero de Valencia y se tomaron medidas de erradicación. En 2004, se detectó también en ciruelo, melocotonero y nectarino en un vivero de Zaragoza, en material vegetal relacionado con el de Valencia, y se aplicaron asimismo las medidas pertinentes. En 2006, se detectó *X. arboricola* pv. *pruni* en plantaciones de almendro de la provincia de Alicante, dando origen al establecimiento de un programa de erradicación que actualmente sigue en vigor. El diagnóstico de esta bacteria es problemático ya que los síntomas que produce se suelen confundir, en muchos casos, con los debidos a otras causas y los análisis en laboratorio presentan varias dificultades. Hasta 2006, no se publicó un protocolo recomendado por la EPPO, pero en éste no hay incluidas técnicas moleculares, y los antisueros recomendados no están disponibles comercialmente. Además, no se dispone de protocolos validados para la detección del patógeno en plantas con infecciones latentes.

OS-20

EL FUEGO BACTERIANO EN CASTILLA Y LEÓN. DETECCIÓN DE UN FOCO EN LA PROVINCIA DE LEÓN

Palomo, J.L.¹, Barreñada, M.R.² y García-Benavides, P.¹

¹Centro Regional de Diagnóstico, Junta de Castilla y León, Apdo.61 37080 Salamanca. ²Sección de Sanidad y Producción Vegetal, Junta de Castilla y León, Av. Peregrinos s/n 24071 León. E-mail: palgomjo@jcyl.es

El fuego bacteriano, enfermedad causada por la bacteria *Erwinia amylovora*, es un patógeno de cuarentena incluido en la lista B de la U.E. (organismos nocivos cuya introducción y propagación deben prohibirse en algunas zonas protegidas), que afecta a varias especies de la familia de las rosáceas. España se considera zona protegida frente a esta enfermedad, realizándose controles periódicos en plantas hospedadoras. Para ello se han establecido itinerarios provinciales de prospección en zonas con especies sensibles (frutales, ornamentales, forestales). El primer foco de fuego bacteriano en España se detectó en Guipúzcoa en 1995. En Castilla y León se localizó por primera vez en 1996, en un vivero ornamental de la provincia de Segovia, en plantas procedentes de Bélgica. Entre 1996 y 2006 se ha confirmado la presencia de casos puntuales de la enfermedad en las provincias de Segovia, Burgos, Palencia, Valladolid y León. En todos los casos se han aplicado medidas de erradicación.

En agosto de 2006 se detectó un foco en la localidad de Quintana del Castillo (León) y se inició una investigación para determinar el alcance de la enfermedad. Al finalizar el año, se habían detectado fuego bacteriano en 7 términos municipales en la Comarca de La Cepeda, y los alrededores de León. Durante el año 2007 se intensificaron las inspecciones y los análisis en laboratorio, dando como resultado un total de 25 términos municipales afectados, algunos de ellos incluidos la comarca de El Bierzo, zona frutícola, cuya producción de manzana y pera tiene gran importancia económica.

La metodología de análisis empleada se basa en aislamiento en medios de cultivo (CCT y SNA) e identificación mediante inmunofluorescencia, PCR y de forma complementaria mediante pruebas bioquímicas. La confirmación del poder patógeno se efectúa mediante inoculación en peras inmaduras.

En todos los casos se han aplicado las medidas de erradicación establecidas en la legislación (Real Decreto 1201/1999), determinando una zona de seguridad de al menos 1 km alrededor del punto inicial, donde se ha arrancado y destruido toda planta sensible con síntomas. Durante el año 2006 se arrancaron 5.377 árboles, cifra que ascendió a 30.063 ejemplares en 2007 (24.215 en el Bierzo y 5.820 en el resto de León).

OS-21

CARACTERIZACIÓN DE *Pythium solare*, UNA ESPECIE NUEVA, AISLADA SOBRE JUDÍA VERDE EN EL SURESTE DE ANDALUCÍA

Serrano, Y.¹, Melero, J.M.², de Cock, A.³, Lévesque, A.⁴, Guirado, M.L.¹ y Gómez, J.¹

¹IFAPA. Centro La Mojonera. 04745, Almería. ²Instituto de Agricultura Sostenible (CSIC), Apartado 4084, 14080 Córdoba. ³Centraalbureau voor Schimmelcultures, Fungal Biodiversity Centre. Uppsalalaan 8, 3584 CT Utrecht, The Netherlands. ⁴Agriculture and Agri-Food Canada, Central Experimental Farm, 960 Carling Ave., Ottawa, K1A 0C6, Canada.
E-mail: juliom.gomez@juntadeandalucia.es

La judía verde (*Phaseolus vulgaris*) es extensamente cultivada en los invernaderos del sureste de Andalucía. *Pythium myriotylum*, *P. aphanidermatum*, *P. ultimum*, *P. irregulare* y *Pythium* sp. pueden producir en dicho cultivo necrosis en la base del tallo y/o en el sistema radicular. Aislados de *Pythium* con unos particulares oogonios ornamentados, obtenidos de varios invernaderos comerciales no pudieron ser encajados, por su morfología, en ninguna de las especies descritas. El estudio morfológico se realizó en los medios de cultivo: harina de maíz agar (CMA) y patata-zanahoria agar (PZA) y en trampas vegetales con hojas de grama y con pétalos inmaduros de clavel, incubados a (15–20°C) en bancada de laboratorio y a la luz del día. Las temperaturas cardinales para la especie se determinaron en PZA a temperaturas entre 3 y 36°C, con intervalos de 3°C.

Las características de *Pythium solare* sp.nov. fueron: colonias en CMA y PZA generalmente sumergidas en el medio, sin patrón especial. Crecimiento radial diario a 25°C de 30 mm o más en CMA y de 22-26 mm en PZA. Temperatura mínima de crecimiento 9°C, óptima 24°C y máxima 30-33°C. Por encima de los 33°C durante 24 horas fueron letales para los aislados ensayados. Las hifas principales tuvieron 8 µm de grosor. No se observaron esporangios, ni zoosporas, pero sí hinchamientos hifales entre 30 y 40 µm, globosos, lisos, terminales o intercalares. Oogonios laterales sésiles o con tallo corto, o terminales, globosos de 40 µm de diámetro medio, ornamentados con espinas digitadas romas de más de 30 µm de longitud. De 1 a 3 anteridios por oogonio, diclino o monoclino, terminal. Oosporas apleróticas, a menudo ausentes o abortivas, de 30.1 µm de diámetro medio con pared de más de 1.5 µm de espesor.

El aislado CBS 119359 de *P. solare* aparece dentro del clado I del agrupamiento realizado por Lévesque y de Cock (2004). Dentro de este clado, se muestra más estrechamente relacionado con *P. splendens* y en diferente grupo del complejo *P. ultimum*, diferenciándose claramente de éstos. La secuencia de la región ITS diverge 15-17.7% con *P. ultimum* y 13.8% con *P. splendens*.

OS-22**DIVERSIDAD MOLECULAR ENTRE AISLADOS DE RAZA 2 DE *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi***

Gómez-Lama Cabanás, C. y Pérez-Artés, E.

Instituto de Agricultura Sostenible. CSIC. Alameda del Obispo s/n, 14080
Córdoba. E-mail: ag1peare@uco.es

La Fusariosis Vascular del Clavel, producida por *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* (*Fod*), es la enfermedad más importante de las que afectan a este cultivo en todo el mundo. Las poblaciones de *Fodi* presentan una notable diversidad genética expresada en términos de variabilidad patogénica (razas). Se han descrito 8 razas fisiológicas de *Fod* en base a diferencias en la virulencia mostrada sobre cultivares diferenciadores de clavel. De entre ellas, la raza 2 (R2) se encuentra distribuida por todo el mundo y en España es la que causa mayores problemas en las zonas productoras. La identificación precisa de dichas variantes patogénicas es esencial para el correcto desarrollo de programas de evaluación de cultivares resistentes al patógeno. Con el fin de identificar marcadores y desarrollar procedimientos moleculares para el diagnóstico diferencial de las variantes patogénicas de *Fod*, hemos realizado un análisis de polimorfismos amplificados al azar (RAPDs) con los ADNs de una colección de aislados de *Fod* representativa de la diversidad racial presente en España (R1 y R2), aislados de otras razas procedentes de Italia, aislados de *F. oxysporum* no patogénicos sobre clavel, así como aislados de otras *formae especiales* y otras especies de *Fusarium*, y aislados de otros Géneros. El ADN se extrajo a partir de micelio liofilizado y pulverizado utilizando el kit DNeasy Plant Mini Kit. Los ADNs se amplificaron mediante reacciones RAPD-PCR utilizando 4 iniciadores aleatorios pertenecientes a los kits E y H de Operon. Cada uno de estos iniciadores dio lugar a la amplificación de entre 5 y 24 fragmentos reproducibles de ADN. Con la información proporcionada por los RAPDs se construyó una matriz binaria de 0 y 1 en la que '1' representa la presencia de un fragmento de un determinado tamaño, y '0' la ausencia del mismo. El análisis de similaridad entre aislados se llevó a cabo con el programa filogenético TREECON for Window 1.3b, basado en el método Nei and Li para el cálculo de la distancia genética. El agrupamiento promedio se realizó mediante el método de pareo de grupos no ponderado utilizando promedios aritméticos (UPGMA). Como resultado de dicho análisis se ha obtenido un árbol filogenético del que se infieren dos datos destacables: a) existe una buena agrupación de los aislados en base a su identidad racial, y b) los aislados de Raza 2 de España no constituyen un grupo homogéneo sino que se distribuyen en dos grupos bien diferenciados.

Investigación financiada por el Proyecto AGL2006/03252.

OS-23

**PATOGENICIDAD DE ESPECIES DE *BOTRYOSPHAERIACEAE* EN
DIVERSAS VARIEDADES Y PORTAINJERTOS DE VID**

Martos, S. y Luque, J.

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

En este estudio se ha llevado a cabo una caracterización de la patogenicidad de seis especies de Botryosphaeriaceae procedentes de viñedos muestreados en Cataluña (*Botryosphaeria dothidea*, *Diplodia seriata*, *Dothiorella viticola*, *Neofusicoccum luteum*, *N. parvum* y *N. vitifusiforme*). Al mismo tiempo, se ha evaluado la susceptibilidad, frente a estas especies, de distintos portainjertos y variedades de uva ampliamente distribuidos en Cataluña. Para ello, se realizaron inoculaciones artificiales con los anteriores patógenos sobre el sarmiento de tres variedades de uva blanca (Macabeo, Parellada y Xarel·lo) y tres variedades de uva tinta (Cabernet-Sauvignon, Garnacha tinta y Tempranillo), así como sobre el tallo de cuatro portainjertos (41B, 140Ru, 110R y SO4). La patogenicidad de los hongos y la susceptibilidad de las vides se evaluó mediante dos variables: la seca del sarmiento o del tallo inoculado y la longitud de las necrosis vasculares causadas por los hongos.

Las seis especies de Botryosphaeriaceae ensayadas mostraron distintos niveles de virulencia, de igual forma que las variedades y patrones presentaron una susceptibilidad diferenciada a los distintos patógenos. *Neofusicoccum luteum* y *N. parvum* fueron las especies más virulentas, causando la seca de algunos sarmientos inoculados, aunque en ningún caso entre los portainjertos. Estas mismas especies mostraron necrosis que en muchos casos superaron la decena de centímetros. *Dothiorella viticola*, *N. vitifusiforme* y *Di. seriata* causaron las necrosis vasculares más pequeñas (entre 1,9 y 2,3 cm), mientras que las necrosis debidas a *B. dothidea* mostraron valores intermedios (3,2 cm). *Diplodia seriata* ofreció mucha variabilidad en los parámetros analizados, lo que no dejó clara su virulencia en *Vitis vinifera*. El patrón Ru140 fue el menos susceptible mientras que 41B fue el más susceptible a las dos especies más virulentas. Las variedades de uva no mostraron un comportamiento diferenciado entre variedades tintas y blancas. Globalmente, los tamaños de las lesiones fueron muy similares entre las seis variedades ensayadas, aunque Garnacha fue más sensible a *N. luteum* y Macabeo a *N. parvum*.

OS-24

INTERACCIÓN ENTRE *Diplodia pinea* Y *Diplodia scrobiculata*, DOS PATÓGENOS FÚNGICOS DEL GÉNERO PINUS

Santamaría, O.¹, Smith, D.R.² y Stanosz, G.R.²

¹Dept. Ingeniería de Medio Agronómico y Forestal. Universidad de Extremadura. Escuela de Ingenierías Agrarias. Ctra. de Cáceres s/n 06071 Badajoz. E-mail: osantama@unex.es

²Dept. Plant Pathology. University of Wisconsin-Madison. 1630 Linden Dr. Madison, WI 53706. USA.

La especie fúngica conocida anteriormente como *Sphaeropsis sapinea* (syn. *Diplodia pinea*) es un patógeno que causa severos daños sobre diversas coníferas, especialmente del género *Pinus* y se distribuye de forma bastante amplia por todo el mundo. Recientemente esta especie ha sido dividida en otras dos diferentes: *Diplodia pinea* (el conocido como tipo A de *S. sapinea*) y *Diplodia scrobiculata* (el anterior tipo B). Ambas especies, que son patógenas aunque difieren en agresividad, se han encontrado en los mismos hospedantes, e incluso en el mismo pie, sin que hasta el momento se conozca bien como interactúan entre ellas. Por tanto, el objetivo del presente trabajo consistió en evaluar el papel que desempeña cada una en el desarrollo de la enfermedad y el tipo de interacción que se produce cuando aparecen juntas.

Para ello se inocularon en invernadero plantas de una savia de *Pinus banksiana*, y de dos savias de *P. resinosa* con micelio del hongo después de eliminar un fascículo de acículas a unos 2 cm del ápice. Se utilizaron dos aislamientos de cada patógeno y los tratamientos fueron: con un solo patógeno (4 tratamientos: 2 especies * 2 aislamientos/especie), con ambos patógenos en la misma planta (4 tratamientos: los cruces de dos aislamientos/especie), y solo con agar (controles). Después de 4 semanas se midió la longitud de la necrosis causada por el patógeno y se cortaron las plantas y se llevaron al laboratorio. Con el fin de determinar que especie era la causante de las necrosis, se cortaron secciones de 1 cm de largo a 0, 3, 6, 9, 12 y 15 cm del punto de inoculación, de las que se extrajo el ADN y se amplificó con los primers específicos de cada una. Todo el experimento fue repetido a las 2 semanas.

Los resultados indicaron que *D. pinea* fue bastante más agresiva que *D. scrobiculata* sobre los hospedantes estudiados y que la presencia de *D. scrobiculata* en la planta parece reducir la longitud de las necrosis causadas por *D. pinea*, al menos en los aislamientos menos agresivos, indicando un claro efecto antagonista entre ellas.

El presente proyecto fue financiado por el Ministerio de Educación y Ciencia a través del programa José Castillejo.

OS-25

PROTEÍNAS RELACIONADAS CON LA SUPRESIÓN DE RESISTENCIA A *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* RAZA 5 EN LÍNEAS DE GARBANZO CO-INFECTADAS POR *Meloidogyne artiellia*

Palomares Rius, J.E.¹, Tena, M.², Jiménez-Díaz, R.M.^{1,3}. y Castillo, P.¹

¹Instituto de Agricultura Sostenible, CSIC, Apdo. 4084, 14080 Córdoba. ag1cascp@uco.es. ²ETSIAM, Universidad de Córdoba (UCO), Edificio C6- "Edificio Severo Ochoa", Carretera de Madrid Km 396, Campus de Rabanales, 14071 Córdoba. ³ETSIAM-UCO, Edificio C4- "Celestino Mutis", Carretera de Madrid Km 396, Campus de Rabanales, 14071 Córdoba.

La utilización de cultivares de garbanzo resistentes al patógeno es la estrategia de control más práctica y económicamente eficiente de la Fusariosis Vascular. Sin embargo, la eficiencia de dicha estrategia es limitada por la variabilidad patogénica de *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* (*Foc*) y la coinfección de la planta por el nematodo nodulador de cereales y leguminosas, *Meloidogyne artiellia*. El objetivo de esta investigación ha sido determinar la naturaleza de los mecanismos que pueden estar implicados en las interacciones de dichos patógenos en la planta, mediante un abordaje proteómico de expresión diferencial basado en la separación de proteínas por electroforesis bidimensional en geles de poliacrilamida (2-DE) y su análisis e identificación mediante espectrometría de masas. Para ello, hemos utilizado las líneas de garbanzo CA 336.14.3.3 e ICC14216K cuya resistencia a *Foc* raza 5 es anulada o permanece inalterada, respectivamente, en coinfecciones de la planta por *Foc* y *M. artiellia*. La respuesta proteómica de los dos genotipos de garbanzo tras la infección por cada uno de los patógenos se evaluó en diversos periodos de la infección. El análisis en las etapas iniciales de la infección (4 y 8 ddi) no reveló una respuesta proteica consistente en la planta infectada por *Foc* raza 5, probablemente debido a una dilución de la respuesta por la magnitud del tejido muestreado empleado para ello. Sin embargo, cuando se utilizaron secciones radicales noduladas e infectadas por el nematodo, por *Foc* raza 5, y por ambos patógenos conjuntamente, el análisis proteómico reveló una respuesta diferencial en los dos genotipos de garbanzo, así como proteínas que presentaban un patrón similar en ambos. La línea CA 336.14.3.3 presentó una mayor proporción de proteínas cuya expresión se vio modificada por los tratamientos. Entre las proteínas de expresión diferencial en ambas líneas y con mayor significación fitopatológica destacan la 2'-hidroxi-isoflavona reductasa y un precursor de quitinasas de clase I. Asimismo, se ha evaluado la expresión proteica diferencial en el fluido extracelular de ambas líneas y en el cultivar JG62 altamente susceptible a *Foc* raza 5, apreciándose una respuesta proteica débil en las líneas resistentes.

Investigación subvencionada por el Proyecto AGL2003-00640.

OS-26

EL SILENCIAMIENTO VÍA RNAI DEL GEN DE VIRULENCIA *FTF1* DE *Fusarium oxysporum* PRODUCE UNA PERDIDA DE VIRULENCIA

de Vega Bartol, J.J., Thomma, B.P.H. y Díaz Minués, J.M.

Centro de Investigaciones Agrarias Luso Español (CIALE). Universidad de Salamanca. Campus de Villamayor. C/ Río Duero, 12. 37185 – Villamayor SALAMANCA

Fusarium oxysporum es un hongo del suelo, ubicuo y responsable de la fusariosis vascular, una vez que ha penetrado por las raíces y colonizado los haces vasculares de la planta hospedadora. En estudios previos, hemos aislado y caracterizado un factor de transcripción denominado *ftf1* con características de un gen de virulencia: tiene una distribución limitada solamente a los aislados altamente virulentos de varias formas especiales y una expresión significativa solamente *in-planta*. Así mismo, *ftf1* es un gen multicopia cuyo número varía según las diferentes formas especiales (por ejemplo cuatro copias en *f.sp. phaseoli* y nueve en *f.sp. lycopersici*). Esta característica dificulta el estudio de su función mediante técnicas *knock-out*, por lo que con el objetivo de determinar si el gen de virulencia *ftf1* es necesario para la patogenicidad, se construyó un vector de silenciamiento basado en RNA de interferencia. La introducción del plásmido en *F. oxysporum* mediante *Agrobacterium tumefaciens* permitió obtener distintos transformantes, en los que se analizó su velocidad de crecimiento en medio rico, su virulencia en ensayos de infección desarrollados en invernadero y la expresión de *ftf1* mediante real-time Q-PCR.

Los resultados preliminares muestran una clara pérdida de virulencia de los transformantes silenciados tras inocularlos en tomate, en comparación con la virulencia de las líneas silvestres. Actualmente estamos estudiando la expresión y fenotipo del gen *ftf1* en distintas formas especiales, en especial *f.sp. phaseoli*. Consideramos que este trabajo confirma el potencial del silenciamiento génico mediante RNA de interferencia en el estudio de genes multicopia y su potencial uso en el caso concreto de *Fusarium oxysporum*.

OS-27

ESTUDIO DEL BIOTROFISMO DE *Plasmopara viticola*, EL MILDIU DE LA VID, SOBRE ESPECIES HUÉSPEDES Y NO HUÉSPEDES

Díez-Navajas, A.M.¹, Wiedemann-Merdinoglu, S.², Greif, C.² y Merdinoglu, D.²

¹NEIKER-Tecnalia. Granja Modelo Arkaute. E-01080 Vitoria-Gazteiz. Tel: +34 945 121313. Fax: +34 945 281422.

²Unité Mixte de Recherche 1131, INRA-ULP Santé de la Vigne et Qualité du Vin. 28 rue de Herrlisheim, F-68021 Colmar cedex, France. Tel: +33 (0) 3 89 22 49 00. Fax: +33 (0) 3 89 22 49 33.

Plasmopara viticola (Berk. & Curt.) Berl. & de Toni, el mildiu de la vid, es un oomiceto biotrofo obligado que depende exclusivamente de células vivas para su crecimiento y propagación. Se estudió el desarrollo infectivo de este patógeno a nivel histológico en diferentes especies vegetales, huésped y no-huésped, con el fin de establecer el momento exacto que determina el comienzo de su biotrofismo.

Tres especies de vid con diferente nivel de resistencia a *P. viticola*: *Vitis vinifera* (susceptible), *V. riparia* (parcialmente resistente) y *Muscadinia rotundifolia* (totalmente resistente), y tres especies herbáceas: *Beta vulgaris*, *Lactuca sativa* y *Capsicum annuum*, fueron inoculadas con *P. viticola*.

Durante los primeros estadios de la infección, determinados por el enquistamiento de las zoosporas en el estoma vegetal, la penetración del tubo germinativo y la producción de la vesícula subestomática y la hifa primaria, no había diferencia que pudiera marcar la distinción entre las especies huésped y no-huésped, ya que en todas se observaron estas estructuras tras la inoculación con el oomiceto objeto de estudio.

La principal diferencia entre las especies vegetales inoculadas fue observada durante la formación del haustoria, las estructuras intracelulares que produce el parásito para el intercambio de nutrientes y moléculas señal con el huésped. En todas las especies de vid inoculadas el haustoria era visible. Las respuestas de defensa en las especies de vid resistentes eran provocadas cuando el haustoria era perfectamente visible y se correspondían con respuestas de hipersensibilidad, que se manifestaban como puntos necróticos alrededor de los estomas infectados varias horas después de la inoculación. En los tejidos de las especies no-huésped, la infección se detenía por respuestas de defensa asociadas a la pared celular, debidas a la deposición de callosa en los puntos de formación del haustorium.

Estas observaciones denotan que la formación del haustorium de *P. viticola* no sólo es clave para determinar su biotrofismo, sino que también determina la especificidad de su huésped y el reconocimiento de los factores de resistencia de las especies de vid.

OS-28

CARACTERIZACIÓN DE LAS PROTEÍNAS P1 Y HCPro DEL IPOMOVIRUS DEL MOTEADO SUAVE DE LA BATATA (SPMMV) EN SUPRESIÓN DE SILENCIAMIENTO GÉNICO.

Giner Rubio, A.¹, García Chapa, M.¹, Lakatos, L.², Burgyan, J.² y López-Moya, J.J.¹.

¹Centre de Recerca en Agrigenómica (CRAG) CSIC-IRTA-UAB, Jordi Girona 18-26, 08034, Barcelona, y ² Agricultural Biotechnology Center, ABC, Gödöllő, Hungría. E-mail: agrgmy@cid.csic.es

El silenciamiento génico postranscripcional (PTGS) es un componente esencial de la respuesta antiviral en plantas. Dobles cadenas de RNA generadas como intermediarios de replicación de virus, o bien zonas muy estructuradas del RNA viral, pueden desencadenar la respuesta defensiva mediada por PTGS. Los virus, parásitos intracelulares obligados, son capaces de contrarrestar el fenómeno ya que poseen proteínas con funciones supresoras de silenciamiento, como se demostró inicialmente para la proteína HCPro de potyvirus. Los mecanismos de actuación de estas proteínas supresoras son variados.

Los géneros *Potyvirus* e *Ipomovirus* pertenecen a la familia *Potyviridae*, que engloba importantes patógenos de cultivos. El virus del moteado suave de la batata (SPMMV), miembro tipo del género *Ipomovirus*, causa moteado foliar, clorosis en venas, y retraso de crecimiento en plantas de batata. Su RNA genómico de cadena sencilla y polaridad positiva, codifica para al menos diez proteínas maduras, entre ellas HCPro. También dentro del mismo género, el virus del amarilleamiento de las venas de pepino (CVYV) carece de proteína HCPro, y en su lugar una duplicación de la proteína P1 es la que presenta capacidad de supresión de silenciamiento.

En SPMMV hemos estudiado *in vitro* e *in vivo* las funciones de P1 y HCPro, diseñando construcciones que permiten expresar estas proteínas de manera transitoria mediante agroinfiltración en plantas de *Nicotiana benthamiana*.

Nuestros resultados muestran que P1 es la proteína viral que presenta actividad supresora de silenciamiento en SPMMV, mientras que su HCPro no presenta esta actividad de forma individual, aunque podría tener un papel auxiliar en la función de supresión, ya que prolonga sus efectos al expresar en *cis* ambas proteínas.

Continuando con la caracterización funcional, estamos aplicando sistemas que nos permitan determinar el modo de interferencia de estas proteínas en la ruta del PTGS. El estudio de los mecanismos moleculares de actuación de supresores virales de silenciamiento puede contribuir al conocimiento de las interacciones huésped-patógeno y de la evasión de respuestas defensivas tanto en plantas como en animales.

OS-29

ANÁLISIS DE LA ACTIVIDAD SUPRESORA DEL SILENCIAMIENTO DE LA PROTEÍNA 16kDa del *Tobacco rattle virus* Y SU INTERFERENCIA CON RUTAS REGULADAS POR PEQUEÑOS RNAs ENDÓGENOS

Martínez-Priego, L.¹, Donaire, L.¹, Barajas, D.², Llave, C.¹

¹ Departamento de Biología de Plantas. Centro de Investigaciones Biológicas. CSIC, Ramiro de Maeztu, 9, 28040 Madrid. Spain.

llucimarpri@cib.csic.es

El silenciamiento génico constituye un mecanismo de defensa de las plantas frente a infecciones virales. Durante la infección, el virus induce silenciamiento mediante la formación de RNAs bicatenarios (regiones genómicas altamente apareadas y/o RNAs virales de doble cadena formados por RNA polimerasas RNA dependientes, del virus o del huésped). En este proceso se generan señales que propagan la respuesta antiviral de forma sistémica a partes distantes de la planta. Los virus de plantas codifican proteínas supresoras para contrarrestar total o parcialmente los efectos del silenciamiento. Estas proteínas son heterogéneas en estructura, origen y modo de acción. Algunos supresores impiden la formación del complejo proteico efector del silenciamiento (RISC) al secuestrar pequeños RNAs interferentes (siRNAs). Otros supresores virales interfieren específicamente con diversos componentes de la ruta de silenciamiento. Algunos supresores provocan alteraciones en el metabolismo de los microRNAs y por consiguiente alteraciones en transcriptoma de la planta. Si bien este efecto podría deberse a que ambos procesos comparten elementos comunes, la interferencia con la ruta de los miRNAs durante la infección podría constituir un aspecto crítico en la patogénesis viral.

En este trabajo analizamos la función supresora de la proteína 16kDa (TRV-16K) del *Virus del cascabeleo del tabaco* (*Tobacco rattle virus*, TRV). Mediante estudios de expresión transitoria hemos mostrado que TRV-16K inhibe el silenciamiento génico inducido por RNA de cadena simple o doble, indicando que debe bloquear un paso posterior a la formación de dsRNA. Sin embargo, su actividad supresora se ve comprometida por dosis moderadas y altas de dsRNA lo que sugiere TRV-16K probablemente actúa en el límite de la inducción del silenciamiento. TRV-16K previene parcialmente el movimiento célula a célula y el de larga distancia de la señal de silenciamiento, si bien no interfiere con la formación de pequeños RNAs secundarios (transitividad). Finalmente, nuestro trabajo indica que ni TRV ni TRV-16k causan una desregulación generalizada de las rutas controladas por miRNAs en *Arabidopsis*, sugiriendo que la interferencia con la biología de los miRNAs no constituye un prerrequisito para TRV, ni probablemente para otros muchos virus de plantas, para desarrollar infecciones sistémicas en plantas.

OS-30**TRÁFICO INTRACELULAR DE LA PROTEÍNA DE MOVIMIENTO p7B DEL VIRUS DE LAS MANCHAS NECRÓTICAS DEL MELÓN (MNSV)**

Genovés, A., Navarro, J.A. y Pallás, V.

Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas, UPV-CSIC. Av. De los Naranjos s/n, 46022 Valencia, España.

Un gran número de recientes observaciones han puesto de manifiesto que los virus de plantas aprovechan las rutas celulares establecidas para moverse desde los lugares de replicación a los plasmodesmos (PD), a través de los cuales alcanzan el citoplasma de la célula vecina. En el presente trabajo se ha estudiado el transporte intracelular de la proteína de membrana p7B, previamente descrita como proteína de movimiento del MNSV (Genovés *et al.*, 2006). Estos estudios se han abordado mediante el uso de una construcción en la que la p7B se ha fusionado al extremo C-terminal de la GFP.

En los primeros estadios de expresión transitoria, la construcción GFP-p7B se localiza asociada a la red del retículo endoplásmico y la envoltura nuclear. Posteriormente, la fusión pasa a localizarse en corpúsculos, que se mueven por el citoplasma de manera dependiente de los microfilamentos de actina, y en puntos discretos a nivel de la periferia celular. La localización con marcadores de orgánulos celulares ha revelado una correlación de estas estructuras con el aparato de Golgi y con los PD. Además, el tratamiento con brefeldina A (BrA), metabolito fúngico inhibidor de la ruta secretora de la célula, retiene a la fusión GFPp7B en la red del retículo endoplásmico, bloqueando su paso al aparato de Golgi y a los PD. Este resultado sugiere que el transporte de la proteína de movimiento p7B a los PD celulares, como destino final, tiene lugar a través de la vía secretora de manera dependiente del aparato de Golgi. Por otro lado, mediante experimentos de mutagénesis dirigida de la p7B se han desvelado determinantes de secuencia y estructurales implicados en su función en el movimiento viral. Asimismo, con la utilización de mutantes, se ha puesto de manifiesto una fuerte correlación entre la localización subcelular de esta proteína y el movimiento del virus. Estas observaciones son funcionalmente consistentes con la ralentización del movimiento del virus observada en presencia de BrA en el tejido infectado.

Estos resultados constituyen la primera evidencia directa de la implicación de la vía secretora, a través del aparato de Golgi, en el transporte intracelular de un virus de plantas al PD.

OS-31

ANÁLISIS DE LA INTERACCIÓN ENTRE GENOTIPOS DE UN VIRUS DURANTE LA COLONIZACIÓN DE UN HUÉSPED SISTÉMICO

González-Jara, P.¹, Canto, T.², Fraile, A.¹ y García-Arenal, F.¹

¹Centro de Biotecnología y Genómica de Plantas y Dpto. de Biotecnología, Universidad Politécnica de Madrid, ETSI Agrónomos, 28040 Madrid.

²Dpto. de Biología de Plantas, Centro de Investigaciones Biológicas, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Ramiro de Maeztu 9, 28040 Madrid.

Las infecciones múltiples son comunes en virus de plantas y dan lugar a interacciones de diversa naturaleza, bien caracterizadas cuando implican especies distintas de virus. La coinfección por genotipos distintos de una misma especie se ha estudiado menos, a pesar de su universalidad, y de su importancia en la generación de variabilidad genética. Se ha descrito que la coinfección de un huésped por dos genotipos de un virus conduce a su separación espacial en los tejidos de la planta. Estos estudios no consideran la cinética del proceso de colonización, y sus resultados están en aparente contradicción con la evidencia de recombinación o de complementación de mutantes deletéreos, que requieren la coinfección de una misma célula por distintos genotipos.

Para examinar esta cuestión se ha analizado la cinética de la infección de *Nicotiana benthamiana* por dos genotipos del virus del mosaico del tabaco (TMV) que difieren en la expresión de un marcador, la proteína fluorescente verde o roja, GFP o RFP, identificables por microscopía de epifluorescencia. Las cinéticas de las infecciones simples de TMV-GFP o de TMV-RFP en plantas de *N. benthamiana* mostraron un aumento del porcentaje de células infectadas hasta los 11 dpi, con más del 65% de las células infectadas. Esta misma cinética se observa en las plantas coinfectadas por ambos genotipos, en las que la gran mayoría de las células aparecían infectadas sólo por uno u otro desde los estadios iniciales de la colonización, de acuerdo con las observaciones de separación espacial. Sin embargo, una fracción menor de las células aparecía infectada por ambos genotipos, saturándose a 7 dpi en un 2,5%. Estos resultados demuestran que la separación espacial coexiste con una fracción no desdeñable de células coinfectadas, lo que permitiría la recombinación y la complementación, considerando además que la estima obtenida es un umbral inferior. La saturación del porcentaje de células coinfectadas sugiere la exclusión de uno de los dos genotipos a tiempos tardíos tras la infección. Experimentos de coinfección realizados en protoplastos apoyan esta hipótesis.

OS-32

INCIDENCIA Y EFECTO DE LAS VIROSIS EN VID “TEMPRANILLO” EN DENOMINACIONES DE ORIGEN CONTRAPUESTAS

Legorburu, F.J.¹, Recio, E.¹, López, E.², Remesal, A.², Baigorri, J.², Larreina, M.², Caminero, L.³, Cibriain, F.³, Aguirrezábal, F.³, Suberviola, J.³, Rodríguez, R.⁴ y Cabaleiro, C.⁵

¹NEIKER-Tecnalia, Apartado 46, E-01080 Vitoria/Gasteiz,
jlegorburu@neiker.net

²Servicio de Viticultura y Enología, Diputación Foral de Álava,

³EVENA-Estación de Viticultura y Enología de Navarra

⁴Sanidade Vexetal Ourense, Consellería do Medio Rural, Xunta de Galicia

⁵Escola Politécnica Superior, Universidade de Santiago de Compostela

Se han prospectado mediante técnica ELISA en sarmiento 20 viñas en Rioja Alavesa y Navarra (DOC Rioja) y 15 en Galicia (DOs Ribeira Sacra y Monterrei). El Tempranillo es mayoritario y tradicional en la primera DO, de clima mediterráneo, y minoritario y recientemente introducido en las segundas, de clima atlántico.

El virus del entrenudo corto infeccioso (GFLV, *Nepovirus*) es frecuente en Rioja (con incidencias hasta el 30%), mientras que no se detectó en Galicia. En cuanto a los enrollados más graves (GLRaV-1 y -3, *Ampelovirus*), el nº 1 es raro en Rioja y frecuente en Galicia (sobre todo en infección mixta con otros enrollados), mientras el nº 3 es frecuente en ambas DOs. Los virus leves, jaspeado (GFkV, *Maculavirus*) y enrollado nº 2 (GLRaV-2, *Closterovirus*) son muy frecuentes y pueden superar el 50% de incidencia.

En Rioja, la distribución de las plantas enfermas de entrenudo corto por rodales sugiere una transmisión activa por nematodos. Por el contrario, la distribución aleatoria de las plantas con GLRaV-3, más la falta de infección en las plantaciones clonales más antiguas (20 años) sugiere una escasa actividad de cochinillas. Esto contrasta con la probada transmisión en campo en otras variedades y DOs gallegas, aunque en Tempranillo la distribución espacial de plantas enfermas sugiere que los virus llegaron con las plantas.

Se detectaron pérdidas significativas de peso de uva debidas a GFLV en Rioja. Como consecuencia, se obtuvieron vinos con más grado y color. El efecto de la infección por GLRaV-3 sobre la calidad, aunque menor que el de la añada y el pago, es significativo; disminuyendo el azúcar en mosto tanto en Galicia como en Rioja. En microvinificaciones se observó pérdida de color.

Trabajo financiado por el INIA, proyecto RTA2005-00201-C03.

OS-33

INCIDENCIA DE LA ENFERMEDAD DE LA MADERA NEGRA EN DIFERENTES ÁREAS VITIVINÍCOLAS DEL PAÍS Y SU RELACIÓN CON EL VECTOR *Hyalesthes obsoletus* Sign.

Sabaté, J.¹, Laviña, A.¹, Legorburu, J.², Fortanete, J.³, Caminero, L.⁴, Perez Marín, J.L.⁵, Reyes, J.⁶ y Batlle, A.¹

¹Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentaries, Ctra Cabrils Km 2, 08348 Cabrils, Barcelona. ²Neiker, Instituto Vasco de Investigación y Desarrollo Agrario, Álava. ³Centro de Protección Vegetal, Zaragoza. ⁴EVENA, Estación de Viticultura y Enología de Navarra. ⁵CIDA-La Rioja. Agricultura y Desarrollo Económico, Logroño, ⁶DAR-Servei Sanitat Vegetal. Barcelona.

E-mail: assumpcio.batlle@irta.es

La enfermedad de la madera negra o Bois Noir (BN) (stolbur phytoplasma) fue identificada en España por primera vez en 1994, pero en los últimos años se ha observado un incremento de su incidencia en algunas de las áreas vitivinícolas del país. Con la finalidad de determinar la relación existente entre la presencia de *Hyalesthes obsoletus*, principal vector de la enfermedad en el centro de Europa y el incremento de la misma, se realizó durante 2006 y 2007, un seguimiento de la población de esta especie, así como de otros vectores potenciales, en las áreas vinícolas de La Rioja, Aragón, Rioja Alavesa, Cataluña y Navarra.

Los insectos se capturaron mediante aspiración en los márgenes e interior de las parcelas de viña y una vez clasificados se analizaron mediante PCR, para determinar el porcentaje de individuos portadores de fitoplasmas.

No se determinaron poblaciones elevadas de *H. obsoletus*, pero si se observó en general, una correlación positiva entre la importancia de este vector y la incidencia de la enfermedad. Las poblaciones más elevadas del mismo se identificaron en las parcelas con una elevada incidencia de BN (55-70%), como es el caso de Aragón (Viñas del Vero y Estadilla), seguidas de las parcelas de Navarra (Montitura y Monteagudo) y de las de La Rioja (Aranzana, Cardenas y Manjarrés), aún así, el número total de individuos capturados en siete fechas de muestreo, no supero los 21 en la parcela donde se capturó el mayor número. En las parcelas con una incidencia menor de BN (sobre 5%), como es el caso de las parcelas de Álava, el número total de *H.obsoletus* osciló entre 2 y 5 en los dos años de muestreo. Las capturas más importantes de *H. obsoletus* fueron las que se realizaron sobre *Convolvulus arvensis*, por lo que se confirma la asociación de este vector a esta especie vegetal. El porcentaje de individuos de *H.obsoletus* portadores del fitoplasma osciló entre el 20 y el 100%. Otra especie que se ha relacionado con la incidencia de BN es *Euscelidius variegatus*, esta especie fue identificada en trabajos anteriores como transmisor de la enfermedad en condiciones experimentales y vector potencial en campo. Se ha identificado en todas las parcelas muestreadas, con poblaciones muy elevadas en algunas de ellas, pero con un porcentaje de individuos portadores del fitoplasma menor, que oscilo entre el 0 y el 15% en 2006, mientras que en 2007 llegó al 40% en una de las parcelas. Los picos de población de ambas especies se produjeron entre mediados de junio y mediados de julio los dos años de muestreo.

Trabajo financiado con el proyecto INIA RTA05-156

OS-34

EPIDEMIOLOGÍA Y CARACTERIZACIÓN DE CEPAS DE *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* AGENTE CAUSAL DE LA NECROSIS APICAL DEL MANGO

Gutiérrez-Barranquero, J.A.¹, Pérez-García, A.¹, Codina, J.C.¹, Murillo, J.², De Vicente, A.¹ y Cazorla, F.M.¹.

¹Grupo de Microbiología y Patología Vegetal, Departamento de Microbiología, Facultad de Ciencias, Universidad de Málaga. 29071-Málaga. E-mail: jagutierrez@uma.es; ²Laboratorio de Patología Vegetal, ETS de Ingenieros Agrónomos, Universidad Pública de Navarra. 31006-Pamplona.

La Necrosis Apical del Mango (NAM), producida por la bacteria fitopatógena *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* (*Pss*) limita la producción del cultivo del mango en el sur de España y Portugal. El objetivo de este trabajo es caracterizar y llevar a cabo un estudio epidemiológico de cepas de *Pss* para determinar el origen de los aislados patógenos y su distribución. En estudios previos a este trabajo se han puesto a punto diferentes técnicas para caracterizar a nivel genético y fenotípico cepas de esta bacteria fitopatógena. AP-PCR (Arbitrarily primed) es una técnica ampliamente utilizada para llevar a cabo estudios epidemiológicos. Cuatro set de cebadores diferentes (ERIC1R-ERIC2, BOXA1R, GTG-5 y CAG-5) han sido utilizados para el análisis de 125 cepas de *Pss* procedentes de distintas fincas, años y épocas del mismo de la principal zona productora, la Axarquía (Málaga). También se han analizado aislados de otras zonas productoras de Málaga, Huelva, Canarias, Italia, Israel y Portugal. Para profundizar en la variabilidad fenotípica de esta bacteria fitopatógena además de un estudio exhaustivo de la resistencia a antibióticos, se realizaron ensayos de resistencia a cobre y análisis de hibridación mediante dot-blot y bioensayos para determinar la producción de las principales toxinas antimetabolito: mangotoxina, faseolotoxina, coronatina y tabtoxina. En los últimos años la eficacia de los compuestos derivados del cobre para controlar la NAM se ha visto disminuida considerablemente. Los determinantes de la resistencia a cobre han sido clonados y caracterizados para cepas de *Pss*, y frecuentemente se encuentran asociados a plásmidos nativos. Existen varios plásmidos descritos, destacando el plásmido de 62Kb que presenta secuencias homólogas a los genes de resistencia a cobre (operón *copABCD*). En este estudio se ha llevado a cabo la caracterización de los genes de resistencia a cobre, apoyando la hipótesis de que la adquisición de los determinantes de resistencia proviene de diversas fuentes, debido a la elevada diversidad de los mismos. Para intentar corroborar esta hipótesis se ha realizado también un estudio del gen *repA* (gen de la replicasa de plásmidos PFP's) sugiriendo el posible origen de los plásmidos de 62Kb.

OS-35

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE AISLADOS DE *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* DE LAS ISLAS CANARIAS

De León, L.¹, Rodríguez, A.^{1,2}, Llop, P.³, López, M.M.³ y Siverio, F.⁴

¹Departamento de Protección Vegetal. Instituto Canario de Investigaciones Agrarias (ICIA). Apdo. 60, 38200 La Laguna, Tenerife, Islas Canarias

²Departamento de Microbiología y Biología Celular. Facultad de Farmacia. Universidad de La Laguna, 38207 La Laguna, Tenerife, Islas Canarias

³Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA). Carretera de Moncada a Náquera Km 4.5, 46113 Moncada, Valencia

⁴Laboratorio de Sanidad Vegetal de la Consejería de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentación del Gobierno de Canarias. Tenerife, Islas Canarias

El chancro bacteriano del tomate producido por *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* se detecta por primera vez en las Islas Canarias en el año 2002 ocasionando cuantiosas pérdidas económicas en el sector. Aunque desde entonces la incidencia de la enfermedad se ha reducido considerablemente, la bacteria sigue apareciendo de forma ocasional en algunas parcelas. El objetivo de este trabajo ha sido evaluar la diversidad de la población de este patógeno en las Islas Canarias y aportar información sobre su posible origen. Para ello, se seleccionó una muestra representativa de 54 aislados de *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* obtenidos entre 2002 y 2007 y 19 cepas de diferentes regiones geográficas para su caracterización molecular.

El análisis de los perfiles de bandas obtenidos para todos los aislados por RAPD-PCR y BOX-PCR mostró un alto grado de similitud (>80% y >75%, respectivamente) para la población de *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* de las Islas Canarias. Por el contrario, los aislados obtenidos en diferentes orígenes mostraron una gran heterogeneidad que en los análisis de agrupamiento generaron divisiones formadas en su mayoría por una sola cepa. El análisis mediante AFLP de 29 de los aislados generó perfiles de bandas con más del 90% de similitud para los aislados de las Islas Canarias y un elevado polimorfismo entre las cepas obtenidas de diversas regiones geográficas. Las tres técnicas de caracterización agruparon a las cepas US-BR-4R1 (EEUU) y ES-2686.1 (Granada) con las obtenidas en las Islas Canarias, lo que podría indicar un origen común de estos aislados.

La gran diversidad observada en *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* comparada con la homogeneidad de los aislados obtenidos en las Islas Canarias sugieren que la población de la bacteria en esta región se ha originado a partir de una única introducción.

OS-36**EL TIPADO CON SECUENCIAS DE INSERCIÓN DISTINGUE TRES LINAJES EN *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* QUE SE CORRELACIONAN CON EL COMPLEMENTO DE GENES DE VIRULENCIA**

Führer, M.E., Navarro de la Fuente, L. y Murillo, J.

Departamento de Producción Agraria, ETS Ingenieros Agrónomos, Universidad Pública de Navarra, Pamplona; email: jesus.murillo@unavarra.es

Pseudomonas syringae pv. *phaseolicola* (Pph) causa la grasa de la judía, una de las enfermedades de mayor importancia de este cultivo, y es un modelo de investigación en fitobacteriología. La escasa variabilidad genética de bacterias aisladas de judías enfermas en distintos sitios del mundo sugiere que la semilla es la principal fuente de diseminación del patógeno. Las epidemias de grasa en España, sin embargo, son causadas frecuentemente por bacterias atípicas que carecen de la isla de patogenicidad (PAI) para la biosíntesis de la toxina faseolotoxina y de una PAI plasmídica que contiene genes de efectores esenciales para la infección del huésped. Igualmente, se conocen otras cepas atípicas que muestran características intermedias. En nuestro grupo, hemos evaluado la variabilidad genética de estos grupos de Pph para un mejor entendimiento de su epidemiología y de los mecanismos de evolución de los genes de virulencia. Para ello, hemos analizado 52 cepas representativas de la variabilidad previamente encontrada en el patógeno y que incluyen las nueve razas patogénicas descritas en Pph, así como tres cepas del patógeno relacionado *P. syringae* pv. *glycinea* (Pgy). Hemos evaluado la variabilidad genética mediante cuatro elementos de inserción, utilizando dos enzimas de restricción diferentes. La hibridación con elementos de inserción reveló entre 19 y 42 bandas polimórficas, con más de 200 bandas polimórficas. A partir de los patrones de bandas se construyeron dendrogramas de distancia utilizando diversos índices y los algoritmos Neighbor Joining y UPGMA, con los programas NTSYSpc y FreeTree. En todos los análisis realizados se distinguieron tres grupos bien definidos de cepas de Pph, y un grupo con las cepas de Pgy, que concuerdan con otros métodos de análisis. Los dendrogramas fueron en todos los casos muy similares, difiriendo únicamente en la posición relativa de dos de los grupos de Pph. Para dotar a estos dendrogramas de significado filogenético, y determinar el orden de ramificación, se evaluó la existencia de más de 50 inserciones y deleciones (indels) en distintas áreas del genoma mediante PCR; en la mayoría de los casos, los grupos de cepas y el orden de ramificación concordó plenamente con la presencia de indels, con sólo unas pocas variaciones en cepas próximas a puntos de ramificación. Esta genealogía sugiere la reciente adquisición de las dos islas de patogenicidad previamente mencionadas y nos está permitiendo construir hipótesis sobre los posibles mecanismos de evolución de las razas del patógeno y del complemento de genes de virulencia.

OS-37

SUPERVIVENCIA DE *Erwinia amylovora* EN EL CÁLIZ DE MANZANAS MADURAS

Ordax, M.¹, Biosca, E.G.², Wimalajeewa, S.³, López, M.M.¹ y Marco-Noales, E.¹

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

²Dpto. Microbiología y Ecología, Universidad de Valencia, Burjasot, Valencia.

³Apple and Pear Australia Limited (APAL), Melbourne, Victoria, Australia.

E-mail: ordax_mon@gva.es, ordax@ivia.es

Erwinia amylovora causa el fuego bacteriano, enfermedad grave que afecta a frutales de gran interés comercial como manzano, peral y níspero, causando importantes pérdidas. La severidad de sus síntomas y su difícil control han llevado a la aplicación de estrictas medidas fitosanitarias en ciertos países libres de fuego bacteriano, como la prohibición de importar frutos de aquellos donde la enfermedad es endémica. De hecho, *E. amylovora* ha sido aislada del cáliz de manzanas maduras asintomáticas procedentes de árboles muy afectados, aunque su diseminación a larga distancia a través del transporte de fruta madura aún no ha sido demostrada. Dado que el cáliz representa un ambiente desfavorable para la bacteria, constituido en su mayoría por tejido muerto sin nutrientes y deshidratado, el objetivo que se planteó en este estudio fue averiguar si *E. amylovora* era capaz de sobrevivir largos períodos en el interior del cáliz de manzanas maduras que podrían constituir un reservorio del patógeno. Para ello, se inocularon manzanas Royal Gala de cultivo biológico con 4 cepas (CFBP1430 y NCPPB2080, y un transformante de cada una marcado con GFP) a dos dosis (10^5 y 10^3 ufc/ml), y se mantuvieron 35 días a 26 o 5°C. Asimismo, se ensayó el efecto del tratamiento con cobre (0.01 y 0.1 mM CuSO₄) 48h después de la inoculación de los frutos. En los cálices no tratados y mantenidos a 26°C, una parte de la población de *E. amylovora* permaneció cultivable, y otra, adoptó el estado denominado “viable no cultivable” (VNC), mientras que a 5 °C la mayoría de la población inoculada mantuvo su cultivabilidad. Por el contrario, en los cálices tratados con cobre toda la población viable del patógeno entró en el estado VNC en ambas temperaturas, aunque la entrada fue más rápida a 26°C y con la concentración de cobre más alta ensayada. Sin embargo, las células VNC del cáliz recuperaron su cultivabilidad tanto *in vitro* (en medio King B líquido) como *in vivo* (en brotes de peral), así como su poder patógeno. Además, mediante microscopía de fluorescencia y confocal se observó que las células del patógeno aparecían en grupos alrededor de los estambres de la antigua flor. Puesto que *E. amylovora* es capaz de sobrevivir en el cáliz de manzanas maduras sin inducir síntomas, así como de recuperar su cultivabilidad y patogenicidad cuando las condiciones son favorables, el riesgo de diseminación mediante el transporte de fruta madura, aunque mínimo, no debería ser descartado.

Agradecimientos: a las entidades Apple and Pear Australia Ltd. (APAL) y Horticulture Australia Ltd. (HAL) por su financiación.

OS-38

EPIDEMIOLOGIA DE LA PODREDUMBRE PARDA DEL MELOCOTONERO

Villarino, M.¹, Melgarejo, P.¹, Casals, C.², Lamarca, N.², Usall, J.², Segarra, J.³ y De Cal, A.¹

¹INIA. Carretera de La Coruña km 7. 28040 Madrid. ² UdL-IRTA, Avenida Rovira Roure 191. 25198 Lleida, ³Universidad de Lleida. Avenida Rovira Roure 191. 25198 Lleida. E-mail: cal@inia.es

La podredumbre parda causada por *Monilinia* spp. es una de las enfermedades más importantes de los frutales de hueso, especialmente grave en su aparición en poscosecha y sobretodo en el punto de venta. En condiciones climáticas favorables, la enfermedad puede causar importantes pérdidas económicas como resultado de la podredumbre de los frutos. En España, la podredumbre parda del melocotonero (*Prunus persica* (L.) Batch) está causada principalmente por las especies *M. laxa* y *M. fructigena*. Sin embargo, recientemente se ha detectado en algunos campos del Valle del Ebro la especie *M. fructicola* que está incluida en la lista A2 de enfermedades de cuarentena de la Unión Europea y que hasta el momento estaba ausente. La nueva especie *M. fructicola*, puede producir apotecios y ascosporas durante el periodo invernal, cosa que no ocurre con las otras dos especies de *Monilinia*, presenta una mayor esporulación en su forma asexual y un mayor potencial de desarrollo de resistencia a fungicidas. Estas tres características la hacen más peligrosa que las otras dos especies ya existentes en nuestro país, *M. laxa* y *M. fructigena*. Ante esta nueva situación los fruticultores de la zona están preocupados por las pérdidas potenciales que esta nueva especie pueda causar.

Por esto el principal objetivo de este trabajo es la caracterización de la dinámica de la enfermedad en esta nueva situación. Se eligieron 3 campos de melocotonero situados en distintas zonas del Valle del Ebro. En cada campo se marcaron aleatoriamente 30 árboles en los cuales se evaluó la incidencia de la enfermedad y la distribución espacial a lo largo de todo el período vegetativo. La enfermedad se diagnosticó visualmente en campo y posteriormente se aislaron e identificaron las especies de *Monilinia* morfológica y molecularmente. Además se estudió el inóculo primario y secundario, la contaminación superficial de los frutos y la incidencia de infecciones latentes durante los años 2006 y 2007. En cada campo se recogieron los datos climáticos correspondientes.

M. fructicola ha sido detectada en dos de los tres campos utilizados. Sin embargo, todavía no se han observados apotecios y ascosporas que puedan modificar el inóculo inicial tradicionalmente compuesto por conidias sobre momias o brotes secos. Durante los dos años de ensayo se han observado cambios en cuanto al inicio de los primeros síntomas de enfermedad y a la aparición de infecciones latentes, que en algunos casos parecen estar más relacionados con los factores climáticos que con la nueva especie.

OS-39

HOSPEDANTES SECUNDARIOS DE ESPECIES DE BOTRYOSPHAERIACEAE PATÓGENAS DE VID: SUSCEPTIBILIDAD DE DIVERSAS ESPECIES LEÑOSAS ACOMPAÑANTES DEL CULTIVO

Martos, S.¹, Garcia-Figueres, F.² y Luque, J.¹

¹Dep. Protecció Vegetal, Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentàries (IRTA). Ctra. de Cabrils km 2, 08348 Cabrils. E-mail: jordi.luque@irta.es;

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

En los últimos años se han descrito en España hasta siete especies fúngicas de la familia Botryosphaeriaceae asociadas a enfermedades de madera de la vid: *Botryosphaeria dothidea*, *Diplodia mutila*, *D. seriata*, *Lasiodiplodia theobromae*, *Neofusicoccum luteum*, *N. parvum* y *N. vitifusiforme*. Una característica notable de estas especies es la gran variedad de hospedantes que pueden colonizar. Por tanto, determinar la susceptibilidad de las especies vegetales que comparten hábitat con la vid es interesante para conocer así su rol como potenciales hospedantes alternativos. En un ensayo se inocularon nueve especies leñosas de interés agroforestal (almendro, avellano, encina, jara, melocotonero, nogal, olivo, pino y romero) con cuatro patógenos de vid (*B. dothidea*, *D. seriata*, *N. luteum* y *N. parvum*), y se estudiaron los síntomas desarrollados tras las inoculaciones.

Encina, jara, nogal, y en especial almendro y melocotonero, mostraron una gran susceptibilidad a los distintos patógenos, de acuerdo con la longitud de las necrosis vasculares y la mortalidad observadas. En contraste, olivo, pino y romero resultaron ser menos susceptibles. Las necrosis vasculares fueron significativamente distintas de sus controles respectivos en todas las especies vegetales estudiadas, excepto las causadas en pino por *D. seriata*, y en olivo por *B. dothidea* y *D. seriata*. *Neofusicoccum luteum* y *N. parvum* causaron la muerte del tallo inoculado en un número variable de individuos de almendro, encina, jara, melocotonero y nogal.

Los resultados obtenidos sugieren que algunas de las especies vegetales ensayadas, especialmente las más susceptibles, podrían actuar como hospedantes secundarios de las especies de Botryosphaeriaceae patógenas de vid. Las investigaciones futuras deberían confirmar si los hospedantes más susceptibles son capaces de infectarse de forma natural en el campo, lo que confirmaría la importancia de estas especies vegetales como hospedantes alternativos a los patógenos de madera de la vid.

OS-40

PROSPECCIONES DE FOCOS DE SECA DE *Quercus ilex* EN CÁCERES A FIN DE ESTABLECER SU RELACIÓN CON LA TEXTURA DEL SUELO, Y LA PRESENCIA DE *Phytophthora cinnamomi* Y DE MICORRIZAS

Vivas, M., Pérez, A., Moreno, G. y Solla, A.

Ingeniería Técnica Forestal. Universidad de Extremadura. Av. Virgen del Puerto 2, 10600 Plasencia. E-mail: asolla@unex.es

El decaimiento de los *Quercus* es probablemente el problema fitosanitario forestal de mayor envergadura en Extremadura y, por su gravedad, amenaza seriamente la persistencia de ecosistemas frágiles y de alto potencial productivo como las dehesas de encina (*Q. ilex*) y alcornoque (*Q. suber*). Se tiene como hipótesis que las alteraciones generadas en el suelo por el ganado (compactación superficial y toxicidad por amonio-urea) y por la maquinaria de laboreo (compactación subsuperficial) inciden negativamente en el estado sanitario de *Q. ilex* e influyen en la micorrización. Se pretende indagar en las causas que generan decaimiento en Extremadura, en base a la información generada en una prospección de focos de seca, ya realizada en 2003, y realizada de nuevo en 2008.

Se seleccionaron 48 focos en la provincia de Cáceres, atendiendo a las siguientes tipologías de textura de suelo y de orografía: (i) suelo arenoso en ladera, (ii) arenoso en vaguada, (iii) arcilloso en ladera, y (iv) arcilloso en vaguada (n=12). En cada foco se evaluó la incidencia e intensidad del decaimiento en 20 encinas, y se describió la hidromorfía edáfica bajo 3 encinas con decaimiento moderado o incipiente (15-30 % de defoliación) y bajo 3 encinas sanas (control). Bajo estas 6 encinas se cuantificó la compactación edáfica mediante la densidad aparente y un penetrógrafo, y con la ayuda de una pala excavadora se extrajeron muestras de suelo y de raíces a 0-49, 50-99 y 100-150 cm de profundidad. Los niveles de amonio edáfico, y la presencia, abundancia y tipos de micorizas se cuantificaron en los 49 cm superficiales. La presencia y abundancia de *Phytophthora cinnamomi* y de *Pythium* sp. en suelo y raíces se obtuvo con los métodos tradicionales de captura por cebos, siembra de raíces en PARPH, y conteo de colonias por extensión de suelo en placa a 0-49, 50-99 y 100-150 cm de profundidad.

La siembra de raíces en PARPH ha permitido aislar *P. cinnamomi* en el 18% de los focos, y tan sólo 9% en las zonas sanas. El 91% de los aislamientos se lograron en vaguadas, y el 9% en laderas. La frecuencia de los aislamientos fue indiferente a la textura y profundidad del suelo. La presencia de puntas de raíz micorrizadas fue de 38% para los árboles en zonas sanas y de 27% para los árboles en zonas enfermas.

OS-41

SEGUIMIENTO DE LA DISPERSIÓN DE ESPORAS DE *Diplodia seriata* Y *Eutypa lata* EN VIÑEDOS DE LA RIOJA ALAVESA

Muruamendiaraz, A.¹, Luque, J.² y Legorburu, F.J.¹

¹NEIKER-Tecnalia, Instituto Vasco de Investigación y desarrollo Agrario, Apdo 46 ,01080 vitoria/gasteiz, Álava. e-mail: jlegorburu@neiker.net, amuruamendiaraz@neiker.net

²IRTA-Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentàries, Ctra. de Cabrils Km 2, 08348 Cabrils, Barcelona. e-mail: jordi.luque@irta.cat

Se lleva estudiando desde diciembre de 2006 la dinámica aerobiológica de conidios de *Diplodia seriata* y ascosporas de *Eutypa lata* en dos viñedos de la Rioja Alavesa, con la finalidad de avanzar en el conocimiento epidemiológico de estos patógenos y poder inferir la época de mayor riesgo de infección. Se instaló en cada viñedo un captador de esporas consistente en cuatro láminas portaobjetos colocadas verticalmente sobre un soporte fijo e impregnadas con vaselina filante, donde las esporas son retenidas por impacto. En el viñedo A se colocó otra trampa de características similares suspendida de un almendro en un extremo de la parcela. En el viñedo B se colocaron dos trampas de láminas portaobjetos individuales dirigidas a zonas de tejido estromático sobre madera, del tipo formado por *E. lata*, con el fin de adquirir nociones del ciclo biológico del hongo. Se ha realizado la recogida semanal de las láminas y el recuento de la captura de esporas al microscopio. Se cuenta en cada parcela con una estación agroclimática de donde se obtiene el registro de variables meteorológicas.

No se han extraído resultados concluyentes de las trampas individuales orientadas a lesiones de *E. lata*. Para *D. seriata*, los primeros resultados muestran que la época de mayor abundancia de esporas en el aire se da a mediados y finales de invierno. En primavera, los picos de abundancia coinciden con subidas de temperatura acompañadas por altas precipitaciones. Las informaciones obtenidas de la trampa colocada en el almendro, señalan una dinámica aérea diferente, siendo las capturas más abundantes en primavera. Aunque el número total de esporas capturadas es bastante bajo y estos resultados no son muy concluyentes en base a ellos se recomienda retrasar la poda y evitar los días posteriores a altas precipitaciones y aumento de temperatura.

Trabajo financiado por el INIA, proyecto RTA2007-00023-C04.

OS-42**EVALUACIÓN DE LA SUSCEPTIBILIDAD DE CULTIVARES DE OLIVO A LA ANTRACNOSIS CAUSADA POR *COLLETOTRICHUM* SPP.**

Moral, J. y Trapero, A.

Dpto. de Agronomía (Patología Agroforestal), Universidad de Córdoba, Campus de Rabanales, Edif. C4, 14071 Córdoba. E-mail: trapero@uco.es

La Antracnosis del olivo causada por *Colletotrichum acutatum* y *C. gloeosporioides* es una grave enfermedad en todas las regiones olivareras donde se cultivan variedades susceptibles. Sin embargo, el conocimiento existente sobre la resistencia o susceptibilidad del olivo a esta enfermedad es muy limitado. En este trabajo se han identificado los principales factores que influyen en la infección de aceitunas por estos patógenos y se ha desarrollado una metodología para evaluar la susceptibilidad de cultivares de olivo a esta enfermedad, tanto en condiciones controladas como en campo. La inoculación de aceitunas separadas del árbol ha puesto de manifiesto que los factores que tienen más influencia sobre la gravedad de las infecciones son la variedad de olivo y el estado de madurez de las aceitunas. Otros factores estudiados que tuvieron un menor efecto fueron la temperatura, la presencia de heridas, la densidad de inóculo, la especie de *Colletotrichum* y el método de inoculación. En varios campos experimentales de variedades de olivo se ha desarrollado y validado una escala para determinar la incidencia de aceitunas afectadas. La escala que mejor se adaptó a las observaciones experimentales presentó once valores enteros comprendidos en el rango 0-10. Estos valores se relacionan con la proporción de frutos afectados según la función logística: $Y = \frac{1}{1 + 3^{(7-X)}}$,

donde Y = proporción de aceitunas afectadas (0-1) y X = valor de la escala (0-10). El valor $X = 7$ se corresponde con el 50% de frutos afectados y es el punto de inflexión de la curva logística. Esta escala presenta una gran utilidad en estudios epidemiológicos y para evaluar colecciones de variedades y genotipos de olivo. La incidencia de la Antracnosis en 15 cultivares seleccionados en distintos campos varió entre 0 (< 0.05% de frutos afectados) y 10 (> 94% de frutos afectados), existiendo una correlación altamente significativa entre la incidencia en campo y la severidad de las infecciones en la inoculación artificial de los mismos cultivares. La mejor correlación ($r = 0.993$, $P < 0.001$) se obtuvo cuando se pulverizaron aceitunas sin heridas en el estado fenológico envero con una suspensión de 10^5 - 10^6 conidios / ml. Por ello, este método de inoculación se está utilizando para clasificar las variedades o genotipos no evaluados hasta ahora y para resolver los casos dudosos de las evaluaciones de campo.

OS-43

DIVERSIDAD GENÉTICA DE POBLACIONES DE *Sclerotium rolfsii* EN CULTIVOS DE REMOLACHA AZUCARERA EN REGIONES DE CLIMA MEDITERRÁNEO

Remesal, E.¹, Landa, B.B.¹, Jiménez-Díaz, R.M.^{1,2}, Jiménez-Gasco, M.M.³, y Navas-Cortés, J.A.¹

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

²ETSIAM, Universidad de Córdoba, Edificio C4, Campus de Rabanales, 14071 Córdoba. ³Dep. of Plant Pathology, The Pennsylvania State University, University Park, PA 16802, EE.UU. E-mail: jnavas@ias.csic.es

Las podredumbres de raíz causadas por *Sclerotium rolfsii* son enfermedades devastadoras en todo el mundo, incluyendo la remolacha azucarera en zonas de clima mediterráneo. En ausencia de otras medidas de control eficientes, el uso de cultivares resistentes se plantea como una medida eficaz para su control, pero su aplicación eficiente requiere conocer la estructura genética de sus poblaciones. Por ello, en este trabajo se ha analizado la estructura de poblaciones de *S. rolfsii* en 339 aislados mono-esclerociales obtenidos de remolacha azucarera de 16 regiones de clima mediterráneo, incluyendo Chile (siete), Italia (10), Portugal (62) y Andalucía (259). Para ello se ha analizado la compatibilidad-incompatibilidad micelial, identificándose 13 grupos de compatibilidad micelial (GCMs), de ellos, los GCM i y iii fueron los más frecuentes y más amplia distribución geográfica. Así, el GCM i (226 aislados) ha sido identificado en Andalucía y Portugal; y el GCM iii (77 aislados) en Portugal, Chile y Andalucía. El resto de GCMs lo componen uno o muy pocos aislados y de una sola localidad. La diversidad genética entre GCMs se estudió mediante análisis de polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLPs) de la región ITS del ADNr (RFLP-ITS) con los enzimas de restricción *AluI*, *HpaII*, *RsaI* y *MboI*. Los perfiles de RFLPs han permitido distinguir cuatro grupos RFLPs (1 a 4) asociados con los GCMs, tres de ellos específicos de *S. rolfsii*: el RFLP 1 mayoritario y asociado a los GCMs i, iii, iv, vii, viii y x-xiii; el RFLP 2 a los GCMs ii y vi; el RFLP 3 al GCM ix; y el RFLP 4 al GCM v similar al descrito para *S. delphinii*. Por otro lado, el análisis filogenético de Máxima Parsimonia (MP) de genes que codifican para la subunidad mayor de la ARN polimerasa II y el factor de elongación de la traducción (FET), indica la existencia de "clusters" asociados a GCMs y procedencia geográfica, con los aislados de *S. delphinii* (GCM v) diferenciados del resto de aislados de *S. rolfsii*. Además, los análisis RFLPs y de secuenciación de los genes de estudio y otros genes conservados (ITS y β -tubulina) indican que determinados GCMs pueden presentar variabilidad genética en el tipo y número de núcleos por célula manifestando un carácter heterocariótico.

Investigación subvencionada por el Proyecto AGL2005-00751

OS-44

¿POR QUÉ *Phytophthora ramorum* NO SE HA ESTABLECIDO EN ECOSISTEMAS FORESTALES DE EUROPA?

Moralejo, E. y Descals E.

Instituto Mediterráneo de Estudios Avanzados, IMEDEA (CSIC-UIB), Miquel Marqués 21, 07190, Esporles, Balearic Islands, Spain. E-mail: ieaemr@uib.es

El oomiceto *Phytophthora ramorum* es el agente causal de la muerte súbita de encinas en la costa oeste de Estados Unidos. Se sabe que desde finales del siglo pasado la misma especie está presente en el norte de Europa en viveros de algunas plantas ornamentales. A través del comercio internacional de plantas ornamentales ha sido distribuido ampliamente en el continente, incluido España. Sin embargo, a diferencia de lo sucedido en Norte América, sólo en casos muy puntuales y locales *P. ramorum* se ha escapado de los viveros para establecerse e infectar unos pocos árboles en Europa. Como causa principal de este comportamiento desigual en la incidencia de *P. ramorum* en ecosistemas forestales, se ha apuntado a posibles diferencias de virulencia y agresividad entre las dos sub-poblaciones del patógeno, aunque hasta ahora existen pocos estudios que avalen esta hipótesis.

En inoculaciones realizadas con aislados de ambas sub-poblaciones de *P. ramorum* sobre más de 45 especies forestales mediterráneas, sub-mediterráneas y de la laurisilva canaria, no se encontraron diferencias significativas de agresividad y virulencia entre aislados; si bien en promedio los aislados europeos causaron lesiones mayores que los americanos. Tampoco se observaron diferencias significativas en la capacidad de esporulación de los distintos aislados en hojas de hospedadores potenciales. En general, *P. ramorum* produjo un número limitado (c. 50-200) de esporangios sobre las lesiones foliares, que puede considerarse bastante reducido si se compara con otras *Phytophthoras* aéreas, como *P. infestans*, o con la formación de esporangios en medio de cultivo agar-zanahoria. Ello indica que la transmisión efectiva del patógeno depende, sobre todo, de la densidad de hospedadores y de la incidencia de condiciones ambientales que promueven la dispersión de esporangios por salpicadura (lluvia, riego). Tal combinación de factores se da de una forma constante en viveros de *Rhododendron* y *Viburnum* en Europa, lo que contribuye a que el hongo sea un problema endémico. Por el contrario, en los ecosistemas forestales europeos, tales condiciones sólo se producen en situaciones semi-naturales y muy aisladas en el norte de Europa, y localmente, aunque más extensas, en el sur, en áreas disyuntas normalmente alejadas de los viveros. El hecho de que no se haya producido ningún brote epidémico relevante en ecosistemas forestales de Europa puede tentar a una relajación en la aplicación de la normativa fitosanitaria en vigor. De ser así, se estaría aumentando el riesgo de exposición al patógeno de algunas comunidades vegetales del sur de Europa (ej. laurisilva canaria, *Rhododendron ponticum*-*Viburnum tinus*-*Quercus canariensis/suber*) cuyos miembros se han mostrado altamente susceptible en ensayos de patogenicidad.

OS-45

PARÁMETROS DE LA TRANSMISIÓN POR CONTACTO DE VIRUS DE PLANTAS

Díaz, M., Fraile, A., García-Arenal, F. y Sacristán, S.

Centro de Biotecnología y Genómica de Plantas y Departamento de Biotecnología, E.T.S.I. Agrónomos, Universidad Politécnica de Madrid 28040. Madrid.

La transmisión entre huéspedes es una parte fundamental del ciclo infectivo de los parásitos, que puede determinar la estructura genética y la evolución de sus poblaciones. En los virus de plantas se ha postulado que los acontecimientos de transmisión pueden causar cuellos de botella en el tamaño poblacional, dando lugar a procesos de deriva genética que contrarresten los efectos de la selección, siendo por tanto un factor evolutivo importante. Recientemente se ha estimado el tamaño efectivo de la población de un virus durante su transmisión por pulgones de forma no persistente. No existen estimas similares para otros tipos de transmisión. En concreto, no existen estimas del tamaño de los cuellos de botella durante la transmisión por contacto, de gran importancia para algunos géneros de virus y, en todo caso, en condiciones experimentales. También se desconoce la relación entre acumulación de virus y transmisión, o el número de contactos necesarios para que haya transmisión.

Hemos estudiado los aspectos anteriores usando como sistema experimental el virus del mosaico del tabaco (TMV) en plantas de tabaco. Se analizó la relación entre el número de contactos (roces) entre hojas infectadas y sanas, y entre la acumulación del virus en la hoja fuente, y la transmisión. Los ensayos se realizaron en huéspedes de infección sistémica o de infección localizada. En ambos casos los resultados fueron similares: la tasa de transmisión depende del número de contactos pero no de la acumulación viral en la hoja fuente, una diferencia importante con la transmisión por homópteros.

El tamaño efectivo de la población transmitida por contacto se estimó a través de la probabilidad de que la planta receptora se infecte por un sólo genotipo viral, cuando la planta fuente está coinfectada por dos genotipos de TMV. El tamaño de la población transmitida viene dada por el término N_{ef} en la ecuación $P_{0B} = P_{SA}^{N_{ef}}$, donde P_{0B} es la probabilidad de que la planta receptora no esté infectada con el genotipo B cuando ha sido puesta en contacto con una hoja coinfectada por los genotipos A y B, en la que el genotipo A está a la frecuencia P_{SA} . El tamaño efectivo de la población transmitida es de pocos viriones, resultado similar al obtenido para la transmisión por pulgones. Por tanto, parece que la transmisión horizontal de los virus de plantas conlleva cuellos de botella importantes, independientemente del mecanismo de transmisión. Esto tendría consecuencias relevantes en el tamaño efectivo de sus poblaciones, y en el peso de la selección en su evolución.

OS-46

IDENTIFICACIÓN DE SUPRESORES DEL SILENCIAMIENTO EN AMBAS MOLECULAS DE RNA DEL GENOMA DEL CRINIVIRUS *Tomato chlorosis virus*

Cañizares, M.C., Navas-Castillo, J. y Moriones, E.

Lab. Virología Vegetal, Estación Experimental "La Mayora", CSIC, 29750 Algarrobo-Costa (Málaga). E-mail: *carmen.canizares@eelm.csic.es*

Para causar una enfermedad los virus deben ser capaces de superar o evadir respuestas defensivas por parte de la planta tales como el silenciamiento por RNA. Para contrarrestar este mecanismo de defensa, muchos virus de plantas han evolucionado expresando proteínas supresoras del silenciamiento. *Tomato chlorosis virus* (ToCV, género *Crinivirus*) consta de dos largas moléculas de RNA, de cadena sencilla y polaridad positiva, y pertenece a la compleja familia *Closteroviridae*, en la que existen miembros que utilizan la estrategia de codificar en su genoma múltiples proteínas supresoras del silenciamiento. Para conocer si esta estrategia es comúnmente utilizada en este grupo de virus, hemos analizado el genoma de ToCV. En este estudio, utilizando ensayos clásicos de co-infiltración con *Agrobacterium tumefaciens*, hemos identificado a la proteína p22 codificada en el RNA1 como un efectivo supresor del silenciamiento. Así, p22 es capaz de suprimir el silenciamiento local inducido tanto por RNA de polaridad positiva como de doble cadena. Sin embargo, al contrario de lo que ocurre con el gen ortólogo p22 del crinivirus *Sweet potato chlorotic stunt virus* (SPCSV), no es capaz de interferir con el movimiento a corta o larga distancia de la señal de silenciamiento. Por otra parte, utilizando *Potato virus X* (PVX) como vector heterólogo, hemos demostrado la actividad supresora de la proteína de la cápsida (CP) y la proteína menor de la cápsida (CPm) codificadas en el RNA2. Con estos resultados, se muestra por primera vez la presencia de supresores del silenciamiento en ambas moléculas de RNA de un genoma bipartito dentro de la compleja familia *Closteroviridae*.

OS-47

ESTUDIO DE LA GENERACIÓN Y MANTENIMIENTO DE RNAs DEFECTIVOS DEL VIRUS DEL MOSAICO DEL PEPINO EN DIFERENTES HUÉSPEDES

García-Blázquez, D. y Ayllón, M.A.

Centro de Biotecnología y Genómica de Plantas, Dpto. de Biotecnología, E.T.S.I. Agrónomos, Universidad Politécnica de Madrid, Ciudad Universitaria, 28040 Madrid. E-mail: mariaangeles.ayllon@upm.es

Los RNAs defectivos (DRNAs) son moléculas delecionadas del RNA genómico del virus auxiliar del cual dependen para su replicación. En algunos sistemas virus-planta se ha observado que la presencia de DRNAs puede modificar el grado de acumulación del RNA genómico y modular la expresión de los síntomas inducidos por el virus. En general se ha observado una atenuación, excepcionalmente una intensificación, pero en algunas ocasiones no se ha visto ninguna modificación de los síntomas. La posibilidad de atenuar los síntomas hace que resulten interesantes para el control de virus. Además, también pueden ser muy útiles para el desarrollo de vectores virales o para el estudio de funciones básicas del virus como replicación, encapsidación o movimiento.

El virus del mosaico del pepino (*Cucumber mosaic virus*, CMV) es uno de los más importantes a nivel mundial por la amplia gama de huéspedes que infecta y la eficacia de transmisión por un gran número de especies de pulgones, lo que dificulta mucho su control. Es el miembro tipo del género *Cucumovirus*, está formado por tres moléculas de RNA monocatenario de sentido positivo (RNA1, RNA2 y RNA3) y es capaz de mantener la replicación de RNAs satélites y DRNAs. Se ha descrito la generación de DRNAs en plantas de *Nicotiana tabacum* y *N. benthamiana* infectadas con aislados de CMV. Estos DRNAs proceden del RNA3 por delección simple dentro del gen que codifica para la proteína de movimiento (3a) o del gen que codifica para la proteína de la cápsida (3b), o por una delección doble dentro de ambos genes.

En este estudio analizamos la generación y el mantenimiento de DRNAs en plantas de pepino y de tomate infectadas con aislados de CMV de los subgrupos IA (Fny) y II (LS). No se detectó la presencia de DRNAs en plantas de pepino infectadas con CMV, ni después de una serie de pases ni a lo largo del tiempo. Sin embargo, en las plantas de tomate se generaron DRNAs cuatro semanas postinoculación. La detección de estos DRNAs se realizó mediante RT-PCR en extractos de RNA total de hoja de las plantas infectadas con el virus de cuatro a quince semanas postinoculación. Todos los DRNAs detectados estaban asociados al aislado CMV Fny y en ninguna de las plantas infectadas se obtuvieron defectivos asociados con el aislado CMV LS. Además, todos los DRNAs encontrados se originaron por delecciones en los genes 3a o 3b del RNA3. Se analizarán los requerimientos de estos DRNAs para su generación, encapsidación y movimiento.

OS-48

ANÁLISIS DE LOS DETERMINANTES DE PATOGENICIDAD DEL VIRUS DEL MOTEADO SUAVE DE LA PÁPRIKA EN PLANTAS DE *Nicotiana tabacum*

Bonilla Martínez, A., Serra Yoldi, M. y García Luque, I.

Departamento de Biología de plantas. Centro de Investigaciones Biológicas. CSIC. c/ Ramiro de Maeztu, 9. 28040. Madrid. E-mail: igarcia@cib.csic.es

Las virosis constituyen un grave problema que afecta a una elevada proporción de los cultivos en el mundo, siendo el segundo causante de pérdidas a nivel agronómico y económico. Los tobamovirus constituyen un grupo de virus vegetales cuyo miembro tipo es el virus del mosaico del tabaco TMV y son considerados como uno de los agentes etiológicos que causan mayores pérdidas en cultivos de pimiento. El tobamovirus del moteado suave de la páprika (PaMMV) pertenece al grupo de patogenicidad patotipo P₁ de las *cepas pimiento de los tobamovirus* siendo incapaz de establecer una infección sistémica en plantas solanáceas de *N. tabacum*. En este contexto la identificación de los elementos virales que determinan la invasión sistémica del huésped, y de las barreras constitutivas o inducidas en la planta que impiden la infección generalizada del huésped y el esclarecimiento de la cadena de señales que da lugar a la respuesta de defensa constituyen los retos en los que hemos centrado nuestra investigación.

Mediante la construcción de virus quimeras entre PaMMV-H y el virus 1056a-derivado de TMV y TMGMV- se realizaron intercambios de las regiones genómicas que codifican para las diferentes proteínas, como son 126K/183K, 30K y CP, así como entre las regiones no codificadoras del extremo 5' de los virus. Tras diferentes análisis hemos podido determinar los factores de patogenicidad virales del PaMMV-H, que posibilitan el movimiento a larga distancia en *N. tabacum*. Por otro lado, hemos establecido que no existe una correlación ni entre las tasas de acumulación de los diferentes virus quimeras en las hojas inoculadas o en protoplastos, ni de la eficacia del movimiento local y la capacidad para producir una invasión sistémica.

Los resultados, por tanto, indican que la invasión sistémica del huésped viene determinada por la interacción de los determinantes de patogenicidad con factores del huésped, hoy en día desconocidos.

OS-49

MODULACIÓN DE LA INFECTIVIDAD Y LA PATOGÉNESIS DE HSVd EN CÍTRICOS

Serra, P.¹, Gago, S.² y Duran-Vila, N.¹

¹Centro de Protección Vegetal y Biotecnología, Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias, Apartado Oficial, 46113-Moncada, Valencia. ²Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas (UPV-CSIC), Universidad Politécnica de Valencia, 46022 Valencia. E-mail: pserra@ivia.es

La enfermedad de la cachexia de los cítricos está producida por el viroide del enanismo del lúpulo (HSVd, del inglés *Hop stunt viroid*). En cítricos, las razas patogénicas de HSVd difieren de las no patogénicas en un motivo de secuencia de seis nucleótidos (“motivo de expresión de cachexia”), localizado en el dominio variable (V) de la estructura secundaria de la molécula del viroide. Con el objetivo de determinar si estos nucleótidos eran todos indispensables para la infectividad e inducción de síntomas, se generaron mediante mutagénesis dirigida, cinco mutantes y se determinaron sus propiedades biológicas.

Mediante la introducción de los seis cambios nucleotídicos característicos del “motivo de expresión de cachexia” se generó a partir de una variante de secuencia no patogénica, una variante patogénica. Dicha variante patogénica M0 se empleó como molde para restaurar algunos de los cambios introducidos. Los mutantes obtenidos presentaron las siguientes propiedades: (i) M1, obtenido restaurando dos delecciones compensatorias, fue infeccioso pero no indujo síntomas en las plantas inoculadas; (ii) M2, obtenido restaurando una delección y un cambio, presentó una infectividad baja, y la progenie del viroide en las plantas infectadas reversionó a M0; (iii) M3, obtenido restaurando un único cambio en la hebra inferior de la estructura secundaria del viroide, fue infeccioso pero indujo síntomas muy suaves; (iv) M4, obtenido restaurando un único cambio en la hebra superior de la estructura secundaria del viroide, no fue infeccioso.

Estos resultados confirman que, a diferencia de otros viroides de la misma familia, en el caso de HSVd, el “motivo de expresión de cachexia” no se encuentra localizado en el dominio patogénico (P) sino en el dominio V. Se ha demostrado también que cambios muy sutiles dentro de dicho motivo afectan la agresividad de los síntomas inducidos e incluso suprimen la expresión de los mismos.

OS-50

INFECCIÓN SISTÉMICA DEL VIRUS DE LA TRISTEZA DE LOS CÍTRICOS EN UNA ESPECIE NO-HUÉSPED MEDIANTE AGROINOCULACIÓN

Ambrós, S.¹, Ruiz-Ruiz, S.², Peña, L.², Guerri, J.² y Moreno, P.²

¹Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias-Fundac. Agroalimed, ²IVIA. Centro de Protección Vegetal y Biotecnología. Ctra Moncada-Náquera Km.4.5, 46113 Moncada, Valencia. Email: sambros@ivia.es

Con el fin de desarrollar un sistema genético eficiente para el virus de la tristeza de los cítricos (CTV), se agroinfiltraron hojas de *N. benthamiana* (NB) con vectores binarios portadores de un clon infeccioso de cDNA del aislado T36 (Satyanarayana *et al.*, 1999, 2001). La acumulación viral en hojas infiltradas (HI) se prolongó durante más de 3 semanas, según se determinó mediante hibridación Northern y RT-PCR cuantitativa a tiempo real (qRT-PCR). Sorprendentemente, un mes después de la infiltración las plantas mostraron enanismo progresivo y epinastia, clorosis nervial y necrosis en las hojas nuevas. La infección sistémica, que en la mayoría de las condiciones ensayadas afectó al 75-100% de las plantas, y se consiguió incluso sin el uso de supresores del silenciamiento génico, se confirmó mediante ELISA, Northern, qRT-PCR u observación de la fluorescencia (en el caso de un clon portador del gen GFP, Satyanarayana *et al.*, 2008) en distintos órganos de la planta. Los tejidos infectados sistémicamente acumulaban más CTV (varios órdenes de magnitud) que las HI y contenían viriones de aspecto normal, altamente infectivos en plantas de cítricos inoculadas mecánicamente, en las que reproducían los síntomas característicos del aislado original. Este eficiente sistema genético se está utilizando para obtener un clon infeccioso de un aislado español más agresivo que T36 (T318A), que induce acanaladuras en la madera de pomelo y naranjo dulce, con el fin de localizar los determinantes genéticos de éstos síntomas. Tras comprobar que los viriones de T318A se replican en protoplastos de NB, se sintetizaron clones de cDNA de dos RNAs defectivos naturales que contienen los elementos en *cis* necesarios para su replicación y se clonaron en vectores BAC. La agroinoculación de NB con 14 de éstos clones dio lugar a la replicación y acumulación del RNA viral en HI. En los dos minireplicones con mayor eficacia replicativa se ha subclonado la zona central del genoma de T318A, obteniéndose 12 clones de longitud completa cuya capacidad replicativa en el nuevo sistema se ensayará próximamente.

OS-51

ALGUNOS HUÉSPEDES IMPIDEN EL MOVIMIENTO DE LOS RNAs DEFECTIVOS INTERFERENTES DEL BBMV PERO NO LOS RNAs GENÓMICOS DEL VIRUS.

Sandoval, C., Carazo, G y Romero, J.

Departamento de Protección Vegetal, INIA. Carretera de La Coruña Km. 7,5 28040-Madrid. E-mail: romero@inia.es

El *Bromovirus moteado del haba* (*Broad bean mottle virus*,BBMV) es capaz de generar RNAs defectivos interferentes (DI-RNAs), formados mediante una delección interna del RNA2. Los DI-RNAs son formados *de novo* mediante pases sucesivos sobre nuevas plantas de haba, sin embargo, no todos los huéspedes del BBMV son capaces de replicar y acumular estas moléculas, como es el caso de guisantes y judías.

Para estudiar el mecanismo de este comportamiento hemos construido DI-RNAs quiméricas que expresaban el gen de la proteína verde fluorescente (GFP) como marcador, que se podía observar en un microscopio de epifluorescencia invertido. Análisis de las plantas inoculadas con transcritos RNAs de esta construcción y de los RNAs genómicos del BBMV nos demostraron que en haba la fluorescencia se distribuyó de forma uniforme en las hojas inoculadas y superiores, mientras que en guisantes, la fluorescencia solo se observó en las hojas inoculadas de forma localizada, en las células del parénquima, los síntomas del virus se observaban en todas las hojas. Pases sucesivos de las plantas de guisantes inoculadas a otras nos mostraron que la fluorescencia se podía observar en las hojas inoculadas y superiores a partir del 2do ó 3er pase. Para determinar si este fenómeno era debido a la no encapsidación de los DI-RNAs, purificamos virus a partir de las hojas inoculadas y analizamos los RNAs virales por electroforesis, Northern blots y PCR, encontrando siempre que las DI-RNAs conteniendo el gen de la GFP eran encapsidados con los RNAs genómicos del BBMV. De estos resultados podemos concluir que los DI-RNAs en guisantes, a diferencia de los RNAs genómicos del virus, son afectados por algún mecanismo de defensa de la planta, impidiendo su movimiento a las hojas superiores, pero estos mecanismos son vencidos cuando los DI-RNAs alcanzan un determinado umbral o una adaptabilidad al huésped.

OC-52

**ANÁLISIS GLOBAL DE LA EXPRESIÓN GENICA EN FRUTOS CÍTRICOS
EN RESPUESTA A LA INFECCIÓN POR *Penicillium digitatum***

González-Candelas, L.¹, Alamar, S.¹, Ballester, A.R.¹, Sánchez-Torres, P.^{1,2}, Forment, J.³, Gadea, J.³, Lafuente, M.T.¹, Zacarías, L.¹ y Marcos, J.F.¹

¹Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos (IATA-CSIC), Ap. Correos 73, Burjassot, 46100-Valencia. ²Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias, Ctra Moncada - Náquera, Km. 4,5, Moncada, 46113-Valencia. ³Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas, CSIC/Universidad Politécnica de Valencia, Avenida de los Naranjos s/n, 46022-Valencia. E-mail: lgonzalez@iata.csic.es

Los proyectos de secuenciación de ESTs y las hibridaciones de micromatrices constituyen hoy en día dos de las principales aproximaciones genómicas para analizar procesos biológicos a nivel molecular. El empleo de estas aproximaciones está encontrando cada vez una mayor implementación en los estudios de fitopatología. Sin embargo, hasta la actualidad no hay estudios de esta naturaleza en el ámbito de la fitopatología postcosecha. En el presente trabajo presentaremos la caracterización molecular a un nivel global de las respuestas de defensa de los frutos cítricos a la infección por *Penicillium digitatum* (el principal patógeno postcosecha de los mismos) empleando varias aproximaciones genómicas complementarias.

Hemos construido genotecas de cDNA substractivas y no substractivas a partir de la piel de frutos cítricos infectados con *P. digitatum*. Con la información obtenida de un número elevado de ESTs de estas genotecas podemos tener una idea global de qué genes se expresan más (genotecas no substractivas) y de cuáles se expresan más diferencialmente (genotecas substractivas). Adicionalmente, hemos analizado la respuesta de los frutos a la infección por *P. digitatum* mediante hibridación con una macromatriz de cDNA obtenida con más de 1400 clones de la genoteca substractiva, así como con una micromatriz de cDNA que contiene aproximadamente 7000 genes de cítricos, generada en el Proyecto de Genómica Funcional de Cítricos (CFGP). Con estas herramientas hemos analizado además las respuestas del fruto a la herida, a etileno y a la inducción de resistencia. Presentaremos los resultados de este conjunto de análisis, destacando no sólo qué genes son los que sufren mayores cambios de expresión, sino integrando la información desde una perspectiva de que procesos y rutas metabólicas se ven afectados en mayor medida por los diferentes estímulos analizados.

OC-53

ESTUDIO MEDIANTE MICROSCOPIA CONFOCAL DE LA COLONIZACIÓN E INFECCIÓN DE RAÍCES DE AGUACATE POR *Rosellinia necatrix*

Pliego, C.¹, Kanematsu, S.², Ruano-Rosa, D.³, López-Herrera, C.³, de Vicente, A.⁴, Cazorla, F.M.⁴ y Ramos, C.⁵

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

²National Institute of Fruit Tree Science, Department of Apple Research, 92-24 Nabeyashi, Shimoduriyagawa, Morioka, 020-0123, Japón. ³Instituto de Agricultura sostenible, C.S.I.C, Apdo. 4084, Córdoba. ⁴Departamento de Microbiología, Universidad de Málaga, 29071-Málaga. ⁵Área de Genética, Universidad de Málaga, 29071-Málaga. E-mail: crr@uma.es

La podredumbre blanca, causada por *Rosellinia necatrix* Prill, es actualmente una de las enfermedades más importantes que afectan a las plantaciones de aguacate en Andalucía, así como al manzano, vid y peral en Japón. Los síntomas característicos de esta enfermedad son la podredumbre radicular, amarilleamiento, decaimiento, caída de hojas, y finalmente, muerte del árbol. Hasta la fecha, no se conoce en detalle el proceso de infección de raíces de aguacate por *R. necatrix*, permaneciendo éste ámbito en gran parte desconocido por la ausencia de estudios de visualización microscópica. En éste trabajo, se ha desarrollado un protocolo de transformación de protoplastos de *R. necatrix*, generados a partir de aislados que muestran diferentes grados de virulencia, con un plásmido portador del gen codificador de la GFP (plásmido pCPXHY1eGFP). Análisis microscópico de los transformantes obtenidos reveló que la GFP se expresa de forma homogénea en el micelio desarrollado en todos ellos, siendo claramente visible y estable en las hifas. La patogenicidad en plantas de aguacate de los diferentes transformantes-GFP fue idéntica a la observada para los aislados parentales. La colonización e invasión de raíces de aguacate por hifas del patógeno se ha visualizado mediante microscopía laser confocal y electrónica de barrido. Resultados preliminares muestran aspectos novedosos de este proceso, como la aparición en raíces jóvenes de estructuras de penetración en distintos puntos de la raíz entre las células de la epidermis. Tras la penetración, se produce una invasión y desorganización del parénquima cortical que tiene como resultado final el colapso de las células epidérmicas y corticales. Finalmente, las hifas atraviesan el periciclo alcanzando el cambium vascular. En raíces adultas, la invasión de los tejidos interiores parece tener lugar principalmente a través de las lenticelas. Un análisis más detallado del proceso de invasión de raíces de árboles frutales por *R. necatrix* contribuirá al desarrollo de métodos más eficientes para el control de la podredumbre blanca.

OC-54

EL FUEGO BACTERIANO (*Erwinia amylovora*) EN FRUTALES DE ARAGÓN: CARACTERIZACIÓN DE AISLADOS, DISTRIBUCIÓN ESPACIAL Y SISTEMAS DE PREDICCIÓN DE RIESGOS

Palacio-Bielsa, A.¹, López-Quílez, A.², Llorente-Cabrata, I.³, Cambra-Álvarez, M.A.⁴ y López, M.M.⁵

¹Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria de Aragón (CITA), Av. Montañana, 930, 50080 Zaragoza

²Universidad de Valencia, Dr. Moliner 50, 46100 Burjassot (Valencia)

³Institut de tecnologia Agroalimentària-CeRTA-CIDSAV. Universidad de Girona; Av. Lluís Santaló s/n 17071 (Girona)

⁴Centro de Protección Vegetal (CPV), Av. Montañana, 930, 50080 Zaragoza

⁵Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA), Ctra. Moncada-Náquera. Km 4,5, 46113 Moncada (Valencia)

El fuego bacteriano, causado por la bacteria *Erwinia amylovora*, es una de las enfermedades más graves que afecta, entre otras rosáceas, a los cultivos de peral y manzano. En la Comunidad Autónoma de Aragón, la superficie destinada al cultivo de dichos frutales supera las 14.000 ha.

Erwinia amylovora se ha detectado en frutales de Aragón durante el periodo 2000-2003, en un área de cinco km de radio en el Valle del Jalón Medio (Zaragoza). Desde un primer momento se han venido adoptando medidas de erradicación.

En este trabajo se han estudiado la caracterización molecular de aislados, el modelo de distribución espacial de en seis parcelas y la aplicación de diversos sistemas de predicción de riesgo de infección de *Erwinia amylovora* en nuestras condiciones agroclimáticas. Los datos obtenidos permiten el análisis de la epidemiología del fuego bacteriano en plantaciones frutales de Aragón.

La homogeneidad genética de los aislados de *E. amylovora* sugiere una fuente de inóculo común y la existencia de un único foco de fuego bacteriano.

El análisis estadístico de los patrones puntuales obtenidos en las parcelas con mayor incidencia muestra que la distribución de los árboles infectados dentro de una parcela presenta agregación.

La determinación del riesgo fenoclimático mediante el modelo Maryblyt muestra una correlación, aunque baja, entre los años con riesgo de infección elevado y la observación de la enfermedad en campo. El hecho de que la correlación no sea muy alta puede ser explicado por el bajo nivel de inóculo existente.

Las inspecciones realizadas han permitido una detección precoz de la enfermedad y las medidas de erradicación, rápidas y enérgicas, se están mostrando eficaces para prevenir su dispersión generalizada. En los últimos cinco años no se han producido nuevas detecciones.

OC-55

EVALUACIÓN DEL ESTADO SANITARIO DE PLANTAS MADRE DE VID Y ESTUDIO DE LOS PUNTOS POTENCIALES DE INFECCIÓN EN VIVEROS.

Aroca, A.¹, Gramaje, D.², Abad-Campos, P.², García-Jiménez, J.², Armengol, J.² y Raposo, R.¹

¹Instituto de Investigaciones Agrarias (INIA). CIFOR. Ctra. Coruña Km 7,5, 28040 Madrid. ² Instituto Agroforestal Mediterráneo, Universidad Politécnica de Valencia, Camino de Vera s/n, 46022-Valencia.

Los muestreos realizados en España de plantas de vid utilizadas para las nuevas plantaciones demuestran que están infectadas con los hongos que causan enfermedades de la madera. En este trabajo se ha evaluado el estado sanitario de las plantas madre utilizadas para portainjertos. Para ello se muestrearon 7 campos de plantas madre en 2006 y otros 7 campos en 2007. En cada campo, se muestrearon 20 plantas tomando 2 brotes de cada una de ellas. Los brotes fueron procesados para la identificación de hongos mediante su aislamiento en medio de cultivo.

Paralelamente, se tomaron muestras durante las distintas fases del proceso de producción de planta injertada en 5 viveros comerciales. Se muestrearon las tijeras utilizadas para el desyemado de las estacas y las máquinas de injertado mediante lavado con una solución de agua estéril y Tween-20 al 0,2%. Además se recogieron muestras del agua de las balsas de amerado o hidratación así como de la turba empleada en el enraizamiento de estacas. Estas muestras se analizaron mediante dos técnicas diferentes: PCR anidada utilizando los cebadores específicos para detectar *Phaeomoniella chlamydospora* y las especies de *Phaeoacremonium*, así como mediante filtrado sucesivo a 5 µm y 0,45 µm y siembra en medio de cultivo.

Los resultados demuestran que las plantas madre son una fuente importante de inóculo para los hongos implicados en enfermedades de madera, ya que en ellas se encontraron las especies *Pa. chlamydospora*, *Pm. aleophilum*, *Pm. parasiticum* y varias especies de *Botryosphaeriaceae* y de *Phomopsis*. También se ha demostrado que, además de las plantas madre, otros puntos de infección son: las balsas de amerado, las máquinas de injertado, las tijeras de poda para el desyemado y las turbas de enraizamiento, donde se han detectado los hongos *Phaeoacremonium* spp. y *Pa. chlamydospora*.

OC-56

FACTORES IMPLICADOS EN LA IMPORTANCIA Y DISTRIBUCIÓN ACTUALES DE LA VERTICILOSIS DEL OLIVO EN ANDALUCÍA

López-Escudero, F.J.¹, Roca, J.M.¹, Mercado-Blanco, J.², Valverde-Corredor, A.² y Blanco-López, M.A.¹

¹Departamentos de Agronomía, Universidad de Córdoba, Campus Universitario Rabanales, Edificio Celestino Mutis, 14071, Córdoba, Spain; y de ²Protección de Cultivos, Instituto Agricultura Sostenible (CSIC), Alameda del Obispo s/n, Apdo. 4084, 14080, Córdoba. E-mail: ag2loesj@uco.es

En los últimos años la Verticilosis del Olivo (VO) ha experimentado una extensión alarmante en Andalucía, y un importante incremento en la incidencia y severidad de las infecciones en zonas previamente afectadas. En este trabajo se han evaluado la importancia y distribución actual de la enfermedad en el Valle del Guadalquivir, y la relación con factores agronómicos y geográficos, y se han caracterizado morfológica y molecularmente los aislados de *Verticillium dahliae* obtenidos de las plantaciones afectadas.

Los resultados revelan que la VO está ampliamente distribuida por todo el Valle, encontrándose campos afectados en todos los municipios prospectados de las tres principales provincias productoras. Se visitaron 90 plantaciones afectadas, detectándose una incidencia media de árboles enfermos en las provincias de Jaén, Córdoba y Sevilla del 25,7, 23,73 y 12% respectivamente, con una media del 20,42%, de 9.000 olivos inspeccionados.

Los árboles afectados presentaron una distribución aleatoria y la apoplejía fue el síntoma mas frecuente. Los aislamientos de *V. dahliae*, practicados en 270 plantas con síntomas, fueron positivos en el 49,6% de los casos, lo que confirmó la presencia del hongo en el 71,1% de los campos inspeccionados. El aislamiento fue más frecuente en olivares en regadío que en secano y superior en plantas de edad inferior a 10 años.

La incidencia de VO estuvo influenciada por diversos factores. Así, la incidencia de enfermedad fue superior en olivares en riego, en olivares jóvenes, en sistemas de no laboreo, en plantaciones con parcelas colindantes cultivadas con especies huéspedes del patógeno, en olivares de marco extensivo, en las plantaciones mas cercanas al Río Guadalquivir y en olivares establecidos sobre Entisoles y Vertisoles.

Las mediciones de los microesclerocios (ME) y los análisis moleculares de los aislados de *V. dahliae* realizados, reflejaron que los aislados con ME más alargados correspondían al patotipo Defoliante. Los resultados demuestran que el patotipo Defoliante de *V. dahliae* está ampliamente distribuido en el Valle del Guadalquivir.

OC-57

DINÁMICA ESPACIO-TEMPORAL DE EPIDEMIAS DE MILDUI (*Peronospora arborescens*) Y SUS CICLOS DE PATOGENESIS EN ADORMIDERA EN ANDALUCÍA

Navas-Cortés, J.A.¹, Montes, M.^{1,2}, Muñoz-Ledesma, F.J.³, Jiménez-Díaz, R.M.^{1,2} y Landa, B.B.¹

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

²ETSIAM, Universidad de Córdoba, Edificio C4, campus de Rabanales, 14071, Córdoba.³ Alcaliber, S.A. Ctra. Carmona-El Viso del Alcor, km 1,8, Carmona, Sevilla. E-mail: jnavas@ias.csic.es

El Mildiu de la adormidera (*Papaver somniferum*) se presenta como la enfermedad más importante del cultivo en Andalucía y el factor más limitante para su expansión a zonas de regadío. Aunque existen evidencias de la importancia de las oosporas de *Peronospora arborescens* como inóculo primario para epidemias de Mildiu, ésta no ha sido demostrada en condiciones naturales. Por ello, el objetivo de este trabajo fue determinar la dinámica espacial y temporal de epidemias de Mildiu a partir de inóculo primario localizado y situado *ad hoc*, así como establecer los ciclos de patogénesis de *P. arborescens*.

Para ello, se estableció una parcela experimental de 900 m² en Córdoba con semilla libre del patógeno, en la que actuó como única fuente de inóculo un área de 0,5 m² en la zona central de la parcela al incorporar suelo naturalmente infestado por oosporas de *P. arborescens*. En dicha parcela se determinó la incidencia de Mildiu durante todo el ciclo del cultivo, estableciéndose la dinámica espacio-temporal de las epidemias en distintos niveles de jerarquía espacial, incluyendo secuencias ordinarias, índices de dispersión, e índices de distancia (SADIE). Asimismo, al final del ciclo del cultivo se determinó la incidencia y distribución espacial de infecciones asintomáticas en cápsula y semilla mediante q-PCR y nested-PCR. Los resultados demuestran la capacidad de las oosporas de *P. arborescens* residentes en el suelo de actuar como inóculo primario para el inicio de epidemias de Mildiu, dando lugar a un patrón agregado de plantas afectadas, con incremento del número y tamaño de focos de enfermedad en el tiempo, existiendo asociación espacial en el tiempo, a excepción de las fases inicial y final de desarrollo de la epidemia en las que no existió asociación espacial. Estos hechos indican la ocurrencia de un ciclo primario de infección por oosporas residentes en el suelo, limitado en tiempo y espacio, y posterior existencia de varios ciclos secundarios de patogénesis favorecidos por las condiciones ambientales. Por ello, las estrategias para el control de la enfermedad deben ir dirigidas tanto a la reducción del inóculo inicial y/o la eficacia de éste en causar infección, como a limitar el desarrollo de ciclos secundarios de patogénesis.

Financiado por: PET2006_0444, MEC y Alcaliber, S.A.

OC-58

**EPIDEMIOLOGÍA DEL VIRUS DE LA SHARKA EN VIVERO Y
SUSCEPTIBILIDAD A LA INFECCIÓN NATURAL DE PATRONES DE
PRUNUS. CONTROL MEDIANTE ACEITES MINERALES**

Vidal, E., Moreno, A., Bertolini, E., Capote, N., Martínez, M.C., Gorris, M.T., Collado, C. y Cambra, M.

Centro de Protección Vegetal y Biotecnología. Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA). Carretera Moncada-Náquera km 5. 46113 Moncada, Valencia. e-mail: evidal@ivia.es

No existen datos de la epidemiología del virus de la sharka (*Plum pox virus* - PPV) en plantas de vivero, período durante el cual, los patrones se encuentran en el campo, donde pueden ser infectados por PPV antes de ser injertados. La utilización de patrones resistentes o menos susceptibles a la infección, así como tratamientos con aceites minerales son medidas que se pueden emplear para reducir la infección en bloques de vivero. El objetivo de este trabajo ha sido su evaluación. El estudio se realizó en Llíria (Valencia) en los años 2006-2008. Los patrones seleccionados fueron: Nemaguard, Mariana GF8-1, Adesoto 101, Cadaman, Mirobolan 29C y Garnem, los más comunes para *Prunus*. Los análisis de infección de la parcela se realizaron en tres ocasiones, octubre 2006, mayo 2007 y abril 2008 mediante ELISA-DASI (5B-IVIA) conforme al protocolo EPPO (2004). Los más susceptibles a la infección natural han resultado Mariana GF8-1 (96.09 %) y Adesoto 101 (96,92 %) mientras, Cadaman y Garnem no se infectaron durante el periodo ensayado.

Durante un año de cultivo (2006-2007) se utilizaron trampas amarillas Moericke y el método del plantón pegajoso, en los patrones Mariana GF8-1 y Nemaguard para monitorizar la población de pulgones que visitaba la parcela. El mes de mayo resultó ser el período en el que más capturas se obtuvieron por ambos métodos, estimándose que 71 pulgones visitaron cada patrón de Mariana GF8-1 y 50 pulgones los de Nemaguard, siendo la especie *Aphis spiraecola*, conocido vector de PPV, la mayoritaria con un 56.4% de las capturas. Se estima que anualmente aterrizan en cada patrón de Mariana GF8-1 129 pulgones y 87 en el caso de Nemaguard. Este hecho está directamente relacionado con la superficie foliar mayor en Mariana GF8-1 que en Nemaguard.

Los tratamientos con aceites minerales se realizaron durante los años 2006-2007, sobre los patrones Nemaguard y Mariana, utilizando "Sunspray Ultrafine" al 1% cada 10 días durante todo el año en el año 2006 y semanalmente en los meses de abril, mayo y junio en el año 2007. En ambos análisis (octubre 2006 y mayo 2007), se obtuvieron menores porcentajes de infección en las plantas tratadas con aceites, que en las no tratadas. Estadísticamente estas diferencias sólo fueron significativas en el análisis realizado en mayo 2007 en el patrón Mariana GF8-1. Se propone un protocolo de tratamiento preventivo a partir de los primeros pulgones virulíferos, determinados mediante escachado RT-PCR a tiempo real.

OC-59

DESARROLLO DE NUEVOS BACTERICIDAS Y FUNGICIDAS BASADOS EN PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS SINTÉTICOS Y PRODUCCIÓN EN PLANTAS COMO BIOFACTORÍA

Badosa, E.¹, Cabrefiga, J.¹, Planas, M.¹, Feliu, L.¹, Ferré, R.¹, Bardají, E.¹, Montero, M.¹, Nadal, A.¹, Pla, M.¹, Montesinos, L.^{1,2}, Coca, M.², San Segundo, B.², Marcos, J.F.³ y Montesinos, E.¹

¹CIDSAV, LIPPSO, Tecnología de Alimentos, Universitat de Girona;

²Departamento de Genética Molecular, Centre de Recerca en Agrigenòmica CSIC-IRTA-UAB; ³Departamento de Ciencia de los Alimentos, IATA-CSIC

Los péptidos antimicrobianos (PAM) son producidos por microorganismos, plantas y animales e intervienen en procesos de antibiosis o forman parte de la inmunidad innata. Su síntesis en los seres vivos puede ser ribosómica (bacteriocinas, defensinas) o no ribosómica (peptaiboles, surfactinas). Los PAM constituyen una nueva generación de antimicrobianos que presenta grandes expectativas como productos fitosanitarios para el control de enfermedades en las plantas. Sin embargo, los PAM son producidos en pequeñas cantidades dificultando su explotación directa a partir del organismo productor. Se han desarrollado péptidos sintéticos mediante métodos de química combinatoria basados en fragmentos de menor tamaño a partir de péptidos naturales (hexapéptido lactoferricina B, RRWQWR), quimeras (undecapéptido BP100, KKLFFKKILKYL) o de nuevo diseño (hexapéptido PAF26 o decapéptido cíclico BPC194). Los hexapéptidos obtenidos presentan actividad fungicida y son efectivos en el control de hongos causantes de podredumbres en postcosecha. BP100 y BPC194 presentan actividad bactericida y son efectivos en el control de bacteriosis causadas por *Erwinia amylovora*, *Pseudomonas syringae* y *Xanthomonas vesicatoria*. Además, poseen una baja toxicidad según estudios de actividad hemolítica y toxicología oral en ratón. Aunque se pueden producir mediante síntesis química convencional en fase sólida o por métodos quimioenzimáticos, una aproximación interesante es su producción biotecnológica en plantas. Sin embargo, la expresión de péptidos antimicrobianos lineales como los descritos para el control de enfermedades en cultivos de interés agronómico presenta problemas potenciales que deben resolverse. Entre los más relevantes figuran su pequeño tamaño, susceptibilidad a la proteólisis, posible toxicidad a grandes concentraciones para la planta y necesidad de alto rendimiento y bajo coste de procesado. Con el fin de resolver estos problemas se requiere el desarrollo de estrategias de expresión para su acumulación en orgánulos intracelulares (p.e. retículo endoplasmático, cuerpos proteícos, cuerpos lipídicos) o en tejidos u órganos específicos de la planta (p.e. endospermo de semilla). El procesado de la biomasa obtenida incluye etapas de homogeneización, clarificación, extracción de los componentes subcelulares que contienen los productos de expresión, procesado enzimático para recuperación de los productos nativos, y distintos niveles de formulación para su aplicación como productos fitosanitarios. Finalmente, dichos productos deben ser evaluados en ensayos de control de diversas enfermedades de cultivos de interés.

OC-60

DESVELANDO LOS SECRETOS DE *Bacillus subtilis* COMO AGENTE DE BIOCONTROL DE ENFERMEDADES DE CUCURBITÁCEAS

Romero, D., Zeriouh, H., García-Gutiérrez, L.A., de Vicente, A. y Pérez-García, A.

Grupo de Microbiología y Patología Vegetal. Departamento de Microbiología, Universidad de Málaga. 29071-Málaga. E-mail: adevicente@uma.es

El control biológico ha demostrado ser una medida de control a considerar entre el abanico de posibilidades disponibles para el control de enfermedades. No obstante, en ocasiones ha mostrado una cierta inconsistencia, debido, entre otros factores, al desconocimiento de las propiedades intrínsecas del agente de biocontrol y la enfermedad a controlar. La selección de un potencial agente de control biológico obliga a investigar los mecanismos mediante los cuales llevan a cabo su acción beneficiosa sobre la planta, ya que de su conocimiento se pueden derivar agendas de aplicación más eficaces y reducir los indeseables efectos colaterales. En nuestro laboratorio estamos interesados en el control de enfermedades aéreas de cucurbitáceas, especialmente el oídio, causada por el hongo *Podosphaera fusca*. En el presente estudio tratamos de demostrar como el desarrollo de un esquema de trabajo pluridisciplinar que abarque desde la evaluación biológica, pasando por la caracterización química y molecular permite seleccionar y optimizar el empleo de potenciales candidatos para el control biológico de enfermedades, en nuestro caso el oídio. De entre una colección de aislados bacterianos procedentes de las zonas productoras de melón en España, dos fueron seleccionadas por su amplia acción antifúngica, e identificadas como *Bacillus subtilis*. Estas bacterias mostraron un excelente comportamiento tanto *in vitro* como en ensayos de invernadero, reduciendo significativamente la incidencia y la severidad de la enfermedad. La eficiente colonización de la planta y la permanencia como células vegetativas durante un largo período de tiempo, y la producción de lipopéptidos sobre la planta (especialmente iturinas) demostraron ser elementos claves en esta acción protectora. Estos lipopéptidos son responsables de inducir destacables alteraciones en las membranas de las células de *P. fusca* conduciendo a su incapacidad para germinar, y paralelamente podrían participar en la capacidad de dispersión de las células bacterianas sobre la planta. Desde un punto de vista agronómico destaca su compatibilidad con otras medidas de control, como fungicidas o aceites comerciales. Recientes estudios, además, han confirmado la eficacia de estos agentes de biocontrol frente a algunas enfermedades bacterianas de cucurbitáceas, y han revelado su capacidad de inducir tanto el crecimiento (PGPR) como los mecanismos de defensa (ISR) de la planta tratada. Estos datos indican que estas cepas bacterianas son excelentes candidatas a incluir en programas de control integrado de enfermedades de cucurbitáceas y animan a seguir profundizando en su espectro de acción así como en el conocimiento de las estrategias implicadas en su acción de biocontrol.

OC-61

**INDUCCIÓN DE RESISTENCIA SISTÉMICA EN LAS PLANTAS POR LA
CEPA T34 DE *Trichoderma asperellum***

Segarra, G., Casanova, E. y Trillas, I.

Departament de Biologia Vegetal, Universitat de Barcelona. Avinguda Diagonal 645, 08028 Barcelona E-mail: gsegarra@ub.edu

El género de hongos *Trichoderma* contiene cepas con capacidad de actuar como agentes de control biológico contra fitopatógenos. Algunas de ellas interaccionan con las plantas de modo que mejoran la capacidad defensiva de éstas, aunque los mecanismos por los que se produce tal mejora han sido poco estudiados. En este trabajo se estudió el efecto de la colonización de la raíz de plantas de pepino por parte del agente de control biológico *Trichoderma asperellum* T34 o la infección por parte del patógeno *Rhizoctonia solani*. No se observó ningún efecto de T34 inoculado en el sustrato a 10^5 ufc/ml sobre los niveles de las hormonas ácido salicílico y jasmónico. *R. solani* produjo un incremento de las dos hormonas, tanto en la raíz como en los cotiledones. También se estudió el efecto de T34 inoculado a la raíz de las plantas de pepino a 10^5 , 10^6 y 10^7 ufc/ml sobre la actividad peroxidasa, los niveles de ácido salicílico y jasmónico y el proteoma de los cotiledones en las primeras horas de la interacción. T34 aumenta la actividad peroxidasa y eleva los niveles de las hormonas estudiadas de forma dependiente de la concentración. T34 inoculado a la concentración de 10^5 ufc/ml no produce cambios, mientras que a 10^7 induce cambios en el proteoma de los cotiledones afectando la expresión de proteínas relacionadas con la defensa contra patógenos. Este mismo tratamiento es capaz de inducir en la planta resistencia sistémica contra el patógeno foliar *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans*. En otro estudio se comprobó que T34 inoculado a 10^5 ufc/ml induce resistencia sistémica en plantas de *Arabidopsis* frente a los patógenos foliares *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, *Hyaloperonospora parasitica* y *Plectosphaerella cucumerina*. Esta resistencia sistémica es parecida a la *induced systemic resistance* (ISR) producida por rizobacterias no patogénicas. El uso de *Arabidopsis* mutantes permitió establecer que la ISR inducida por T34 es independiente del ácido salicílico y dependiente de las proteínas NPR1 y MYB72. Además, la ISR inducida por T34 se basa en el *priming*, ya que preconditiona las plantas a expresar el gen *LOX2* y a bloquear (calosa) las esporas de *H. parasitica* de forma más rápida e intensa en respuesta al ataque del patógeno. Estos resultados permiten establecer un modelo para la inducción de resistencia sistémica en planta por parte de la cepa T34 de *Trichoderma asperellum*.

OC-62**FO47 PROTEGE AL PIMIENTO FRENTE A *Verticillium dahliae***

Veloso, J. y Díaz, J.

Departamento de Biología Animal, Biología Vegetal e Ecología. Universidade da Coruña. Campus da Zapateira s/n 15071 A Coruña, Spain. Email: javier.veloso@gmail.com

Verticillium dahliae es un patógeno de pimiento (*Capsicum annuum*) que produce grandes pérdidas en su cultivo. La infección se produce en las raíces y continúa a través del tallo, invadiendo los haces vasculares, causando síntomas como enanismo y marchitez. *Fusarium oxysporum* Fo47, un aislado no patógeno¹, ha sido ensayado como agente de biocontrol frente a la verticilosis en plantas de pimiento. Las plantas se inocularon en primer lugar con Fo47 y 48h después fueron inoculadas con *Verticillium dahliae*. Se observó una disminución significativa de los síntomas de la verticilosis en plantas tratadas con Fo47. Se obtuvieron muestras de raíz y tallo a las 48h tras la inoculación con Fo47 y a las 24h tras la inoculación con *Verticillium dahliae* y se estudiaron las actividades enzimáticas peroxidasa y quitinasa, pero no se encontraron diferencias entre los tratamientos. Así mismo, se obtuvieron muestras de raíz y tallo a las 48h tras la inoculación con Fo47 para su análisis de expresión génica mediante la técnica de Real Time RT-PCR con cebadores específicos². Se estudió la actividad de tres genes relacionados con la defensa, una peroxidasa (*CAPO1*), una quitinasa (*CACH12*), y una proteína PR-1 (*CABPR1*). Las plantas tratadas con Fo47 mostraron una mayor expresión de los citados genes.

Agradecimientos

Apreciamos la amabilidad de Dr. Christian Steinberg (INRA, Francia) por la cesión del aislado Fo47.

Referencias

¹Alabouvette C, Lemanceau P & Steinberg C, 1993. Recent advances in the biological control of *Fusarium* wilts. *Pesticide Science* 37: 365-373.

²Silvar, C, Merino, F & Díaz, J. 2008. Differential activation of defense-related genes in susceptible and resistant pepper cultivars infected with *Phytophthora capsici*. *J. Plant Physiol.* (en prensa, doi:10.1016/j.jplph.2007.11.008).

OC-63

**SECUENCIAS DE ROTACIÓN CON TOMATE RESISTENTE EN
INVERNADERO PARA PRESERVAR SU DURABILIDAD EN EL MANEJO DE
*MELOIDOGYNE***

Talavera, M.¹, Verdejo-Lucas, S.², Ornat, C.³, Torres, J.⁴, Vela, M.D.⁵, Macias, F.J.⁵, Cortada, L.², Arias, D.J.⁵, Valero, J.⁶ y Sorribas, F.J.³

¹IFAPA Centro Camino de Purchil; ²IRTA. Protecció Vegetal; ³Departament d'Enginyeria Agroalimentària i Biotecnologia. UPC; ⁴Consell d'Eivissa; ⁵IFAPA Centro Chipiona; ⁶MA III. UPC. E-mail: francesc.xavier.sorribas@upc.edu

Aunque la eficacia y beneficio económico de cultivar tomate con el gen *Mi* de resistencia a *Meloidogyne* haya sido demostrada, su uso debe considerar la secuencia óptima de rotación para preservar su durabilidad y evitar la selección de poblaciones virulentas. Se realizaron ensayos en invernaderos ubicados en Barcelona, Ibiza y Cádiz, para determinar dicha secuencia con tomate resistente cv. Monika (R) y susceptible cv. Durinta (S) durante tres ciclos de cultivo consecutivos (1, 2 y 3). El cultivo se llevó a cabo de marzo a julio de 2005 (1), 2006 (2) y 2007 (3) en Barcelona e Ibiza, y de marzo a julio de 2006 (1), septiembre 2006 a febrero de 2007 (2) y de marzo a julio de 2007 (3) en Cádiz. Las secuencias ensayadas fueron: $R_1R_2S_3$, $R_1S_2S_3$, $S_1R_2S_3$, y $S_1S_2S_3$. Cada secuencia se repitió cinco veces. La densidad de población del nematodo al inicio (P_i) del estudio era de 247, 7 y 172 juveniles/250 cm³ suelo en Barcelona, Ibiza y Cádiz, respectivamente. La P_i del segundo y tercer cultivo fue menor ($P<0.05$) en las parcelas precedidas por uno o dos cultivos de tomate resistente en los tres invernaderos. La densidad de nematodos en suelo al final del cultivo y el número de huevos/g raíz era menor ($P<0.05$) en las parcelas con tomate resistente que susceptible, independientemente del ciclo de cultivo e invernadero. El número de huevos/g raíz fue similar entre ciclos de cultivo en la secuencia $S_1S_2S_3$ en Barcelona e Ibiza, pero en Cádiz, el nematodo produjo menos ($P<0.05$) huevos en el cultivo de septiembre a febrero que de marzo a julio. El Índice de Agallas en el cultivar resistente osciló entre 0,2 y 2,7, mientras que en el susceptible osciló entre 4 y 9. El Índice de reproducción [(huevos/g raíz resistente)/(huevos/g raíz susceptible)] en el cv. Monika (R) fue del 3 y 10% en Barcelona, del 0,3 y 25% en Ibiza, y del 2 y 5% en Cádiz. El promedio de producción de tomate en la secuencia $R_1R_2S_3$ fue 2,1 veces mayor que en la $S_1S_2S_3$ en Barcelona. Sin embargo, ni en Ibiza ni en Cádiz hubieron diferencias significativas. La secuencia óptima de rotación en Barcelona fue la $R_1R_2S_3$ ya que redujo las pérdidas de producción causadas por el nematodo y no afectó la durabilidad de la resistencia. En Ibiza no se justificaría el uso de la resistencia para el manejo del nematodo dada la baja P_i . En Cádiz, tanto uno como dos cultivos de tomate resistente reducían significativamente el desarrollo de las poblaciones del nematodo pero no incrementaban la producción debido posiblemente a una mala adaptación del cv. Monika a las condiciones agroclimáticas de la zona.

OS-64**ALTERNATIVAS A LOS FUNGICIDAS CÚPRICOS PARA EL CONTROL DEL REPILO DEL OLIVO CAUSADO POR *Fusicladium oleagineum***

Roca, L.F., Beltrán, J.A., Fuentes, M. y Trapero, A.

Dpto. de Agronomía (Patología Agroforestal), Universidad de Córdoba, Campus de Rabanales, Edif. C4, 14071 Córdoba. E-mail: ag3rocal@uco.es

La aplicación de fungicidas cúpricos, caracterizados por su eficacia y elevada persistencia, es la medida más extendida para el control del Repilo del olivo causado por *Fusicladium oleagineum*. También se ha demostrado la eficacia numerosos compuestos orgánicos registrados para su uso en olivar, aunque su menor persistencia ha hecho que no sean ampliamente utilizados. La reducción del número de materias activas disponibles, así como la limitación en la cantidad de cobre aplicada por hectárea y año, hacen necesaria la optimización de los tratamientos de cobre, tanto en dosis como en momentos de aplicación, así como la búsqueda de productos alternativos. El objetivo de este trabajo de investigación ha sido evaluar la eficacia, en el control del Repilo del olivo, de distintos productos cúpricos y mezclas de éstos a bajas dosis con sistémicos, así como de productos alternativos de origen biológico actualmente disponibles en el mercado. Los ensayos se llevaron a cabo durante varios años sobre olivos adultos del cultivar Picual en un olivar con alta incidencia de Repilo. Los tratamientos se realizaron con atomizador o con pulverizador autónomo. Se midió la persistencia de los productos cúpricos, para lo cual se tomaron periódicamente muestras de hojas tras los tratamientos e incubándolas en CIH 0,1N, se midió la cantidad de cobre en la solución resultante mediante espectrometría de absorción atómica. Se realizaron evaluaciones periódicas de la enfermedad, atendiendo a los parámetros de incidencia y severidad de la misma. La evaluación de productos biológicos se realizó simultáneamente en plantones inoculados en condiciones controladas. Durante los 4 años de estudio el nivel de enfermedad varió significativamente entre años y tratamientos, oscilando entre el 90% de hojas infectadas al comienzo del experimento y 0.2% en los mejores tratamientos. Se observaron diferencias significativas de persistencia entre los productos cúpricos, si bien todos ellos lograron un adecuado control de la enfermedad. La mezcla de compuestos cúpricos con sistémicos resultó menos efectiva. Sólo uno de los productos de origen biológico mostró una eficacia similar a la de los compuestos cúpricos, en plantones inoculados de forma artificial. Los productos biológicos evaluados en campo hasta ahora, han mostrado menor eficacia que los productos cúpricos, si bien alguno ha logrado reducciones de la enfermedad de hasta un 50% respecto al testigo.

OS-65

DENSIDAD DE INÓCULO E INFECTIVIDAD DE *Phytophthora cinnamomi* EN SUELOS TRATADOS CON ENMIENDAS ORGÁNICAS

Vicente, M.¹, Serrano, M.S.², De Vita, P.¹, Fernández-Rebollo, P.², Trapero, A.¹ y Sánchez, M.E.¹

¹Dpto. Agronomía (Patología Agroforestal), ²Dpto. Ingeniería Forestal Universidad de Córdoba. E-mail: ag1sahem@uco.es

Phytophthora cinnamomi es el principal patógeno responsable del decaimiento de encinas y alcornoques en el sur de la Península Ibérica. Con el objetivo de encontrar un método de control de *P. cinnamomi* en dehesas de *Quercus* que sea respetuoso con el medio ambiente, hemos ensayado la aplicación al suelo de distintas enmiendas orgánicas (estiércoles: gallinaza, porcino -purín-, ovino y vacuno). Las enmiendas proceden de varias explotaciones agropecuarias de la provincia de Córdoba.

Se prepararon bandejas de plástico (40 x 50 x 25 cm, 12 l de capacidad), con 8 Kg de suelo (limo:turba, 2:1) cada una. Cada bandeja se infestó con 200 ml de una solución de micelio y clamidosporas del aislado PE-90 de *P. cinnamomi* e inmediatamente se añadió el estiércol en dos cantidades (200 y 400 g) y se añadió agua hasta capacidad de campo (2 l), operación que se repitió semanalmente. Para cada tratamiento se realizaron tres repeticiones más el correspondiente testigo infestado sin ningún estiércol. Cada semana se recogió una muestra de 30 g de suelo y se secó al aire. Con 10 g de estos suelos, suspendidos en 100 ml de agar-agua, se prepararon extensiones en medio selectivo NARPH para determinar la densidad de inóculo. Con el resto de la muestra se prepararon suspensiones en agua con filodios de eucalipto como cebo biológico para determinar la infectividad del patógeno. A la 4ª semana se procedió a la siembra de plántulas de altramuz (*Lupinus angustifolius*), susceptible a la infección fúngica. Tras 5 semanas, las plantas fueron retiradas de las bandejas para evaluar los síntomas en la parte aérea y radical según una escala 0-4. El ensayo se prolongó hasta un total de 12 semanas con una temperatura diurna de 24º C y nocturna de 11º C.

Todos los estiércoles, excepto el de oveja y el purín (400 g), disminuyeron significativamente la densidad de inóculo con respecto al testigo. Además, la infectividad del inóculo disminuyó también en presencia de gallinaza y estiércol de vaca (400 g), si bien la gallinaza tuvo un efecto fitotóxico en las plántulas de altramuz, induciendo su muerte. Ningún tratamiento disminuyó significativamente los síntomas de podredumbre radical en altramuz. Sin embargo, los porcentajes de recuperación del patógeno en raíz de altramuz crecido en presencia de estiércoles variaron del 0 al 12,2%, mientras que en los altramuces testigo fue significativamente mayor, alcanzando un 40%. Esto indica que los síntomas detectados se deben más al efecto tóxico de los estiércoles sobre la raíz herbácea que a la infección fúngica.

OS-66

NUEVAS ESTRATEGIAS DE CONTROL DE *Stemphylium vesicarium* EN PERAL BASADAS EN LA DISMINUCIÓN DEL POTENCIAL DE INÓCULO

Vilardell, A.¹, Vilardell, P.², Moragrega, C.¹, Ruz, L.¹, Santamaria, G.¹, Montesinos, E.¹ y Llorente, I.¹

¹Institut de Tecnologia Agroalimentària- CeRTA-CIDSAV. Universitat de Girona. Av. Lluís Santaló s/n 17071 (Girona). E-mail: Isidre.llorente@udg.es

²IRTA-Mas Badia. Mas Badia. 17134 La Tallada d'Empordà (Girona)

La estemfiliosis causada por el hongo *Stemphylium vesicarium* es una de las enfermedades de mayor importancia económica en el cultivo del peral en determinadas zonas frutícolas Europeas. La utilización del modelo BSPcast para guiar los tratamientos fungicidas permite un ahorro medio del 30 % de aplicaciones en comparación con la estrategia estándar basada en una cadencia fija. La eficacia de control, en ambos casos, puede oscilar entre el 45% y el 95% de reducción de la enfermedad en función de su presión. Con el objetivo de incrementar la eficacia de control de la enfermedad actualmente se ensayan diferentes estrategias para disminuir la presión de la enfermedad mediante la reducción del potencial de inóculo.

En ensayos previos se determinó que la eliminación de los restos vegetales que quedan en las plantaciones de peral conjuntamente con la aplicación de organismos de control biológico basados en cepas del hongo *Trichoderma* spp. permiten disminuir la cantidad del reservorio de la enfermedad correspondiente a la forma invernal de *Pleospora allii*. Se realizaron varios ensayos en fincas comerciales de peral de la zona de Girona durante los años 2004, 2005 y 2006 en parcelas de 400 m². Se evaluó el efecto en la progresión de la enfermedad de la eliminación de restos vegetales durante el invierno, la aplicación de agentes de biocontrol basados en *Trichoderma* spp. y la aplicación de fungicidas según el modelo BSPcast. Paralelamente se realizaron ensayos bajo condiciones controladas para incrementar el conocimiento sobre los factores que afectan a la formación de inóculo.

Financiado por el proyecto MEC AGL2006-04987/AGR

OS-67

ACTIVIDAD *IN VITRO* DE EXTRACTOS DE PLANTAS Y EFECTO PROTECTOR DE *Phlomis purpurea* CONTRA *Phytophthora cinnamomi*

Neves, D.¹, Caetano, P.², Horta, M.², Sousa, N.², Dionísio, L.², Magan, N.³ y Cravador, A.^{2,4}

¹ Universidade do Algarve, Centro de Biomedicina Molecular e Estrutural (CBME), Campus de Gambelas, 8005-139 Faro, Portugal.

² Universidade do Algarve, Faculdade de Engenharia de Recursos Naturais (FERN), Campus de Gambelas, 8005-139 Faro, Portugal. E-mail: pcaetano@ualg.pt.

³ Institute of Biosciences and Technology, Cranfield University, Silsoe, Bedford, MK45 4TD, UK.

⁴ IBB/CGB, Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, Apartado 10103, 5001 Vila Real, Portugal.

Quercus suber (alcornoque) y *Q. ilex* subsp. *rotundifolia* (encina) son las principales especies forestales en los agro-sistemas en el sudoeste de la Península Ibérica (*montados* en Portugal y *dehesas* en España). Estos ecosistemas constituyen el motor del desarrollo económico en estas zonas y el decaimiento que en los últimos años afecta las encinas y alcornoques (seca de los *Quercus*) incide muy negativamente en las actividades y economía de las explotaciones, aprovechamientos e industrias agroalimentarias de estas regiones.

Entre los factores bióticos implicados en el decaimiento de los *Quercus*, se destaca la podredumbre radical causada por el oomiceto *Phytophthora cinnamomi*. Aún que se reconoce la importancia ecológica y socio económica de estos ecosistemas, faltan medidas efectivas de control de la enfermedad.

Muchas especies arbustivas y sub arbustivas típicas de la flora mediterránea que crecen en las dehesas o *montados* son huéspedes de *P. cinnamomi*, sin embargo algunas no lo son (*Helichrysum stoechas* y *Phlomis purpurea*). En este trabajo se ha estudiado el efecto de extractos de *Arbutus unedo*, *H. stoechas* y *P. purpurea* en el crecimiento *in vitro* de *P. cinnamomi*. El extracto más efectivo fue el de raíz de *P. purpurea* con la máxima porcentaje de inhibición de 78,3% a 1 mg/ml. Esta planta mostró un efecto significativamente protector contra la infección de *Q. ilex* en ensayos en invernadero. *Phlomis purpurea* reduce el inóculo en el suelo lo que sugiere una posible capacidad supresora para reducir la infección por *P. cinnamomi*. Esta planta es autóctona de la Península Ibérica y Marrocos y está presente en el hábitat de *Quercus suber* y *Q. ilex*.

Los resultados obtenidos indican que *P. purpurea* tiene potencial para controlar la infección por *P. cinnamomi* en *Q. ilex*. Se esperan los resultados de ensayos en invernadero para evaluar el efecto protector de *P. purpurea* en *Q. suber*.

OS-68

**BASES MOLECULARES DE LA RESISTENCIA A FUNGICIDAS DMI EN
OÍDIO DE LAS CUCURBITÁCEAS**

López-Ruiz, F.J.^{1,2,3}, Ridout, C.J.², Chartrain, L.², Torés, J.A.³, García, E.⁴, de Vicente, A.¹, Brown, J.K.M.² y Pérez-García, A.¹

¹Grupo de Microbiología y Patología Vegetal-Unidad Asociada a CSIC, Departamento de Microbiología, Facultad de Ciencias, Universidad de Málaga, 29071 Málaga. ²Disease and Stress Biology Department, John Innes Centre, Norwich NR4 7UH, UK. ³Estación Experimental “La Mayora” (CSIC), Algarrobo-Costa, 29750 Málaga. ⁴Laboratorio de Sanidad Vegetal, Rincón de la Victoria, 29738 Málaga. E-mail: aperez@uma.es

Uno de los principales factores limitantes para la producción de cucurbitáceas a nivel mundial es el oídio causado por *Podosphaera fusca*. El control de la enfermedad se basa fundamentalmente en el empleo de fungicidas, entre los que destaca el grupo de los inhibidores de la enzima C14 α -demetilasa o fungicidas DMI. En los últimos años en España la aparición de cepas con una baja sensibilidad a DMI ha provocado el aumento del número de aplicaciones con el consiguiente incremento en el gasto y perjuicio para el medio ambiente, y en algunos casos el fracaso total de estos tratamientos en el control de la enfermedad.

El principal objetivo de este estudio fue determinar si cambios en la diana del fungicida, la enzima C14 α -demetilasa (CYP51), eran los responsables de la variación en la sensibilidad de los aislados de *P. fusca* a los fungicidas DMI. Para ello se analizaron secuencias del promotor y de la región codificante del gen *CYP51* de 50 aislados de *P. fusca* procedentes de diferentes localizaciones y con distintas sensibilidades a fungicidas DMI. Dicho análisis reveló la existencia de un elemento transponible en la región 5' del promotor, así como 4 sustituciones de aminoácidos no sinónimas en dominios de la enzima relacionados con la unión al sustrato y la catálisis. Los aislados fueron clasificados en base a tres haplotipos básicos y se puso de manifiesto la existencia de niveles de sensibilidad distintos en cada uno de estos tres grupos. Utilizando la estructura cristalina de la proteína de *Mycobacterium tuberculosis* MtCYP51 como referencia, se modeló la enzima de *P. fusca* y se introdujeron las sustituciones detectadas en el modelo, mostrándose que todas ellas se distribuían en el canal que da acceso al centro catalítico de la enzima. Así, la sustitución A373S está relacionada con el anclaje del ligando al grupo hemo de la enzima. Estos resultados sugieren una posible relación entre cambios estructurales en la proteína y los distintos niveles de resistencia a DMI observados en *P. fusca*.

Finalmente, el análisis de la expresión de *CYP51* mediante PCR cuantitativa llevado a cabo con un grupo seleccionado de aislados parece indicar que en *P. fusca* no existe relación entre la expresión de *CYP51* y la resistencia a DMI.

OS-69

CONTROL DE LA RESISTENCIA AL CRINIVIRUS *Tomato chlorosis virus* EN *Solanum chmielewskii* EELM-821

García-Cano, E.¹, Navas-Castillo, J.¹, Moriones, E.¹ y Fernández-Muñoz, R.²

¹ Laboratorio de Virología Vegetal, ² Departamento de Mejora Vegetal; Estación Experimental "La Mayora", CSIC, 29760 Algarrobo-Costa, Málaga.

Tomato chlorosis virus (ToCV, *Crinivirus: Closteroviridae*) es un virus emergente transmitido por diferentes especies de mosca blanca (*Hemiptera: Aleyrodidae*), responsable de un síndrome de amarilleo que ocasiona importantes daños en el cultivo de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) en todo el mundo. En la actualidad no se dispone de cultivares comerciales de tomate con resistencia a este virus, pero el estudio de 306 entradas de especies silvestres y cultivadas de la colección del banco de germoplasma de la EELM-CSIC ha permitido localizar fuentes de resistencia. Este trabajo se ha centrado en las dos entradas más prometedoras, EELM-821 (*S. chmielewskii*), y EELM-802 (proveniente de un cruce entre *S. lycopersicum* x *S. peruvianum*) así como en líneas derivadas de ellas por autofecundación. La línea 802-11-1 mostró resistencia a ToCV que se manifestaba en ausencia de síntomas y una fuerte restricción a la acumulación viral incluso tras su injerto sobre planta susceptible infectada. La existencia de incompatibilidad en el cruzamiento con la especie cultivada ha impedido hasta el momento el estudio de la genética de la resistencia en esta línea. La resistencia en la línea 821-13-1 se manifestaba en ausencia o notable reducción en la expresión de síntomas, incluso sometida a condiciones extremadamente altas de infección, así como en un importante retraso en la acumulación viral bajo condiciones naturales de infección. Se analizó el comportamiento frente a ToCV de una familia de generaciones del cruce entre el parental susceptible (cv. Moneymaker) y el resistente (821-13-1) en base a la intensidad de la señal de hibridación molecular de improntas de peciolo de hoja joven. La mayoría de las plantas del parental resistente mostraron ausencia o baja señal de hibridación molecular mientras que las plantas del parental susceptible, en general, manifestaron fuerte señal de hibridación. Las plantas F₁ mostraron un comportamiento variable, y se observó segregación en la F₂ y en el BC₁ hacia el parental resistente. El estudio de la herencia de la resistencia a ToCV se realizó mediante métodos de genética cuantitativa debido al solapamiento observado entre las intensidades de improntas de los parentales y el F₁ que impedía establecer categorías claras de plantas resistentes o susceptibles. Las medias de las generaciones no se ajustaban a un modelo de aditividad-dominancia simple, por tanto, eran necesarios los efectos de interacciones epistáticas para explicar el control de esta resistencia. El modelo que mejor se ajustó a los datos incluía efectos significativos de aditividad y de dominancia, e interacciones digénicas de tipo aditividad x dominancia.

OS-70

MARCADORES MOLECULARES PARA LA DETECCIÓN DEL GEN *Mi-1.2* DE RESISTENCIA A *MELOIDOGYNE* EN PATRONES HÍBRIDOS DE TOMATE

Cortada, L.¹, Verdejo-Lucas, S.¹, Mantellin, S.² y Kaloshian, I.²

¹IRTA. Protecció Vegetal, ²Department of Nematology, University of California, Riverside

El uso de marcadores moleculares para la detección de genes de resistencia a patógenos en horticultura ahorra tiempo y dinero a los productores de semillas. En el caso del tomate, se utiliza el marcador molecular REX-1, diseñado específicamente para determinar la presencia del gen de resistencia *Mi-1.2* en híbridos *S. lycopersicum* × *S. peruvianum*. No obstante, este marcador es ineficaz en patrones de tomate (*S. lycopersicum* × *S. habrochaites* y/o *S. lycopersicum* × *S. chilense*). El uso del marcador REX-1 en este tipo de patrones híbridos provocó la detección de falsos positivos para el gen *Mi-1.2* de resistencia a nematodos puesto que dichos patrones resultaron ser susceptibles en las pruebas de patogenicidad. En este estudio, se evaluó la fiabilidad de cinco marcadores moleculares disponibles en la bibliografía para la detección del gen *Mi-1.2* en patrones de tomate; 2 de ellos localizados dentro de la secuencia del gen *Mi-1.2* (Mint-up/do y C1/2Do-C2S4) y otros 3 marcadores (PM3F/R, PMi3F/R y Mi-23) diseñados específicamente para la detección del gen en programas de selección de patrones híbridos de tomate. Para ello, se analizaron muestras de hojas de 10 patrones híbridos de tomate (*S. lycopersicum* × *S. habrochaites*), 4 cultivares resistentes (*S. lycopersicum* × *S. peruvianum*), 11 cultivares susceptibles (*S. lycopersicum*), 3 accesiones de *S. habrochaites*, 4 accesiones de *S. chilense* y 2 accesiones de *S. peruvianum*. Los marcadores moleculares Mint-up/do y C1/2Do-C2S4, no permitieron distinguir la amplificación del gen *Mi-1.2* respecto a otros homólogos del gen *Mi* presentes en las especies *S. habrochaites* y *S. chilense*. Los marcadores PMi3F/R y Mi-23 amplificaron bandas de un tamaño similar a las esperadas para el gen *Mi-1.2*, pero también lo hicieron en 3 de los 11 cultivares susceptibles al nematodo. El marcador PM3F/R fue el único capaz de detectar el gen *Mi-1.2* de forma consistente en los patrones híbridos de *S. lycopersicum* × *S. habrochaites*, pero no lo hizo en los híbridos de *S. lycopersicum* × *S. chilense*. Una limitación del marcador PM3F/R es que sólo permite determinar la presencia o ausencia del gen *Mi-1.2* ya que únicamente amplifica la región UTR del extremo 3' del gen, por lo que no indica si el gen se haya en homocigosis o heterocigosis. En resumen, ninguno de los marcadores analizados en este estudio pueden emplearse en programas de mejora genética ya que no son adecuados para determinar la presencia del gen *Mi-1.2* de resistencia en patrones de tomate.

OS-71**LAS VIRTUDES DE UN VIRUS DE PLANTA. UTILIZACIÓN DE LOS VIRUS VEGETALES EN LA PRODUCCIÓN DE MOLÉCULAS CON POTENCIALIDADES TERAPÉUTICAS**

Deana, A., Williams, L., Romero, A., Bronchalo, I., Pérez, M., Molina, A. y Lunello, P.

Agrenvec, S. L. Valle de Cares 22, 28669, Boadilla del Monte, Madrid.
www.agrenvec.es

El TMV es el miembro tipo del género *Tobamovirus*. A partir de su descubrimiento a finales de 1800 ha sido objeto de numerosos estudios que han contribuido enormemente al desarrollo y entendimiento, tanto de la virología clásica como de la biología molecular en general. Se lo ha estudiado desde los aspectos mas básicos y enfocados a sus características como patógeno (secuencia, estrategia de expresión, hospedantes, morfología, estructura), hasta otros aspectos que tienen que ver también con su hospedante, tales como resistencia, movimiento, acumulación, implicancias en el desarrollo, etc.. Una importante aplicación de estos conocimientos es la construcción de vectores virales derivados de TMV. Esto ha significado un cambio de enfoque acerca de un determinado virus considerándolo ahora no desde un punto de vista estrictamente fitopatológico sino como una maquinaria de síntesis y a la planta como una biofactoría.

En este trabajo hemos empleado un vector viral derivado del TMV en la expresión de la proteína AGV212, un inhibidor de proteasas con efectos potencialmente terapéuticos. Esta proteína disminuiría la activación de metaloproteasas que intervienen en la degradación de la matriz extracelular en determinados procesos tumorales. La secuencia codificante de AGV212 ha sido clonada en el vector viral TMV bajo el control del promotor sub-genómico de la CP. Mediante RT-PCR se ha evaluado la estabilidad del gen durante el proceso de infección. Por otra parte se ha determinado la presencia y acumulación de la proteína recombinante en diferentes tejidos de la planta (fuente y sumidero) y en diferentes variedades de *Nicotiana*. Ensayos preliminares indicarían un posible patrón de glicosilación específica de tejido, hecho que podría tener una especial relevancia a la hora de definir estrategias de purificación.

Se ha establecido un protocolo de purificación que permite la obtención de hasta 50 mg de proteína por Kg. de tejido fresco. Los ensayos de pureza y actividad así como los niveles de expresión nos permiten afirmar que el empleo de esta tecnología puede ser una excelente alternativa en la expresión de diferentes moléculas con interés en el campo biomédico.

OS-72

UN NUEVO PLÁSMIDO (pEI70) EN *E. amylovora*, INVOLUCRADO EN VIRULENCIA, ESTÁ AMPLIAMENTE DISTRIBUIDO EN CEPAS EUROPEAS

Llop, P.¹, González, R.¹, Dreo, T.²; Puławska, J.³, Bultreys, A.⁴, Cabrefiga, J.⁵; Barbé, S.¹, Montesinos E.⁵ y López, M.M.¹

¹Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA), Valencia, ²National Institute of Biology, Dept. of Biotechnology and Systems Biology, SI-1000 Ljubljana, Slovenia; ³Research Institute of Pomology and Floriculture, 96-100 Skierniewice, Poland; ⁴Département Biotechnologie CRA-W. 5030 Gembloux, Belgium; ⁵Instituto de Tecnología Agroalimentaria, Universidad de Girona, 17071 Girona, Spain. E-mail: pllop@ivia.es

La búsqueda de cepas de *E. amylovora* sin el plásmido pEA29, ha llevado al descubrimiento de cepas que poseen otro plásmido, de cerca de 70kb de tamaño, llamado pEI70. Hasta el momento, el plásmido pEI70 ha sido encontrado en cepas de 11 países europeos (España, Irlanda, Reino Unido, Grecia, Francia, Italia, Polonia, Bélgica, Alemania, Dinamarca, Suiza), con porcentajes variables, desde todas las cepas analizadas en un país (Irlanda) hasta un bajo porcentaje en otros. Actualmente se están realizando nuevas búsquedas en colecciones europeas y de otros continentes.

Se ha puesto a punto un protocolo de PCR multiplex para analizar la presencia de pEA29 y pEI70 en un solo ensayo. Los análisis de restricción e hibridaciones con sondas específicas han demostrado que este nuevo plásmido era el mismo en todas las cepas analizadas. Los estudios de estabilidad en experimentos de transferencia seriada con cepas conteniendo ambos plásmidos o únicamente el de 70kb han mostrado que pEI70 es muy estable después de 200 generaciones, con un 100% de mantenimiento, tanto en presencia como en ausencia de pEA29, y experimentos de conjugación han mostrado que este plásmido es conjugativo.

Los ensayos de agresividad en flores de peral no mostraron diferencias entre cepas con y sin este plásmido, pero las inoculaciones en fruta inmadura (pera, níspero) han demostrado que pEI70 tiene un efecto en el aumento de virulencia en *E. amylovora*. La secuenciación del plásmido y su anotación posterior no ha permitido encontrar genes involucrados en virulencia previamente descritos. La comparación de secuencias mediante bioinformática no ha encontrado homología con genes del cromosoma de *E. amylovora* ni con el plásmido de 29 kb. Se está investigando la localización de los genes responsables de ese aumento en la virulencia mediante el análisis de clones del plásmido, experimentos de inoculación en fruta inmadura y mutagénesis dirigida.

OS-73

ESTRATEGIAS PARA ESTUDIOS DE SUPERVIVENCIA DE *Xanthomonas citri* subsp. *citri*

Golmohammadi, M.¹, Llop P.¹, Gell, I.², Redondo, A.³, Graham, J.H.³, López, M.M.¹ y Cubero, J.²

¹Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA), Valencia, ²Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA) Madrid, ³Citrus Research and Education Center (CREC), Universidad de Florida, Florida, EEUU. E-mail: cubero@inia.es

La canchrosis de los cítricos causada por *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (*Xcc*), organismo de cuarentena en la UE, es una importante enfermedad de los cítricos que origina cuantiosas pérdidas económicas en los países en los que está presente. Se caracteriza por la aparición de lesiones necróticas en hojas, ramas y frutos, que se producen tras la entrada de la bacteria a través de estomas o heridas. En las lesiones *Xcc* se multiplica y en condiciones favorables emerge de las mismas y se dispersa de forma natural a través del viento y la lluvia.

En este trabajo se han abordado dos estrategias encaminadas a estudiar la supervivencia de la bacteria en diferentes ambientes. Por un lado se ha usado la proteína de fluorescencia verde (GFP) en su forma nativa y en una forma inestable que permite la visualización únicamente de células vivas. Usando estas dos variantes de GFP se pudo observar mediante microscopia confocal la presencia de la bacteria en el interior y en la superficie de los tejidos de la hoja y el fruto. Además se pudieron observar estructuras tipo biofilm, mediante microscopia electrónica de barrido.

La segunda estrategia está dirigida al empleo de ARNs como dianas para la detección por PCR en tiempo real de las células viables de *Xcc*, basada en la inestabilidad del ARN en comparación con la alta estabilidad del ADN incluso en células muertas. Para ello se seleccionaron varios genes de *Xcc* y se evaluó la persistencia de sus ARNs mensajeros en células vivas y muertas. Además se realizó el mismo estudio con el ARN ribosomal de la subunidad 16S, amplificando para ello dos fragmentos de longitud diferente. Los estudios de estabilidad se realizaron tanto mediante cuantificación absoluta (comparación de los ciclos umbrales o “threshold cycles”, Ct) como relativa de los ARN mensajeros (mediante el sistema de $\Delta\Delta Ct$) utilizando como gen endógeno de referencia un fragmento del ARN 16S. Los resultados obtenidos nos han permitido seleccionar un fragmento del gen *GumD* que desaparece en bacterias muertas por distintos tratamientos (temperatura, etanol) y que por tanto hemos considerado un buen marcador de la viabilidad en *Xcc*.

OS-74

CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DE HOPN1, UN EFECTOR DE *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 IMPLICADO EN LA MODULACIÓN DE LA MUERTE CELULAR EN PLANTAS.

Cuartas Lanza, R., Sopena Torres, S., Rodríguez-Palenzuela, P. y López-Solanilla, E.

Centro de Biotecnología y Genómica de Plantas. E.T.S.Ingenieros Agrónomos. Universidad Politécnica de Madrid. Av. Complutense s/n 28040 Madrid. E-mail: emilia.lopez@upm.es

Pseudomonas syringae pv. *tomato* DC3000 es el agente causal de la mancha bacteriana en tomate y Arabidopsis. El sistema de secreción de efectores tipo III (TTSS) y el conjunto de proteínas que viajan a través de él al interior celular, juegan un papel fundamental en la virulencia de esta bacteria. Uno de estos efectores es HopN1 (denominado anteriormente como HopPtoN) que ha sido descrito cómo una cisteín proteasa capaz de suprimir la muerte celular asociada, tanto a la respuesta hipersensible (HR) en plantas resistentes, como a la enfermedad causada por esta bacteria en tomate. Este hecho apoya la hipótesis de que ambos tipos de muerte celular deben compartir mecanismos comunes en su desencadenamiento en la planta. La actividad supresora de la muerte celular programada asociada a la HR ha sido descrita para otros efectores poniéndose de manifiesto que se trata de una estrategia que beneficia el desarrollo del patógeno en la planta huésped.

En este trabajo estamos llevando a cabo la caracterización del mecanismo de acción de HopN1 en la actividad moduladora de la muerte celular en plantas. Las aproximaciones empleadas son las siguientes: (1) Identificación de la diana de HopN1 en la planta, (2) Análisis de la evolución de la población in planta, bajo distintas condiciones, de la cepa afectada en la producción de HopN1, con el fin de estudiar su contribución específica en la patogenicidad de esta bacteria y (3) Estudio del efecto de la sobre-expresión de HopN1 sobre la virulencia de otros patógenos con comportamientos patogénicos distintos a *P. syringae*.

Los experimentos de pull-down empleando la proteína HopN1 purificada nos han permitido obtener varias fracciones diferenciales que están en proceso de identificación mediante análisis MS/MS. Se están calculando los índices de competencia in planta entre la cepa silvestre y el mutante en la proteína HopN y se está analizando a nivel microscópico la evolución de la población mutante marcada con GFP. La sobreexpresión de HopN1 en *Dickeya dadantii* modifica la virulencia de este patógeno afectando a las primeras etapas de la infección y sugiriendo un papel importante de la muerte celular programada durante las mismas. Se presentarán los resultados concretos obtenidos a través de estas aproximaciones.

OS-75

ANÁLISIS DIFERENCIAL DEL PROTEOMA DE POBLACIONES DE *Meloidogyne javanica* VIRULENTAS Y AVIRULENTAS PARA EL GEN MI DE RESISTENCIA EN TOMATE

Andres, M.F.¹, Verdejo-Lucas, S.² y Escobar, C.³

¹Instituto de Ciencias Agrarias. CCMA. CSIC. Serrano 115, 28006-Madrid.

²IRTA. Protecció Vegetal . Ctra de Cabrils Km 2. 08348 Cabrils (Barcelona).

³ Fac. CC. del Medio Ambiente. Universidad de Castilla-La Mancha. Avda Carlos III s/n. 45071 Toledo.

El gen *Mi* en tomate confiere resistencia a *Meloidogyne arenaria*, *M. incognita* y *M. javanica*. La virulencia, definida como la capacidad del nematodo de reproducirse en plantas que poseen uno o más genes de resistencia, ocurre de forma natural en algunas poblaciones de *Meloidogyne*. Sin embargo, también puede adquirirse tras el cultivo reiterado de tomates resistentes.

El proteoma de *Meloidogyne* y la variabilidad de su expresión apenas ha sido estudiado y los pocos estudios realizados se han enfocado principalmente hacia el diagnóstico y filogenia de especies mediante la aplicación de la electroforesis de proteínas bidimensional (2D). Sin embargo, se acepta unánimemente que esta técnica presenta una serie de inconvenientes y limitaciones como son la difícil reproducibilidad de los geles y la dificultad en la estimación de abundancias. En contraste, la técnica 2D-DIGE, de reciente desarrollo, permite en el análisis comparativo de la expresión diferencial de las proteínas, ya que minimiza la variabilidad inter-gel, disminuye el tiempo de análisis, y permite una cuantificación muy precisa del perfil de expresión. En este estudio se ha analizado por primera vez, la variabilidad proteica de *Meloidogyne* a nivel intraespecífico en relación con la virulencia de las poblaciones y se ha aplicado, también por primera vez, la tecnología 2D-DIGE en nematodos fitoparásitos. Se ha estudiado la expresión proteica de las siguientes poblaciones de *M. javanica*: una población avirulenta nunca expuesta al gen *Mi*; una población con virulencia adquirida, generada a partir de la población avirulenta mediante el cultivo de un patrón de tomate resistente durante 3 ciclos consecutivos y por último, una población virulenta natural capaz de sobrepasar la resistencia conferida por el gen *Mi*. En el estudio comparativo de los proteomas de las poblaciones estudiadas, analizados cuantitativamente a partir de un gel Master con 2387 manchas proteicas, no se han encontrado diferencias significativas en la expresión de proteínas entre la población avirulenta y la población con virulencia adquirida. Sin embargo, es importante destacar que en el proteoma de éstas dos poblaciones se detectaron 219 manchas proteicas que mostraban una expresión diferencial significativa respecto al de la población virulenta natural. El análisis de la huella peptídica y la microsecuenciación de péptidos de las manchas proteicas diferenciales más abundantes contribuirá a la identificación de las proteínas cuya expresión está relacionada con la virulencia.

OS-76

NUEVAS ENFERMEDADES DEL AGUACATE CAUSADAS POR HONGOS Y OOMICETOS DESCRITAS EN ANDALUCÍA

Martín-Sánchez, P.M., Zea-Bonilla, T. y Pérez-Jiménez, R.M.

Instituto Andaluz de Investigación y Formación Agraria (IFAPA), Centro de Churriana. Cortijo de la cruz s/n, Churriana, 29140, Málaga. E-mail: pedrom.martin.ext@juntadeandalucia.es

Con el objetivo de determinar el estado fitosanitario de fincas de aguacate con manejo ecológico o convencional localizadas en la comarca de la Axarquía (Málaga), durante los dos últimos años se muestrearon 41 árboles localizados en 7 fincas de la zona. En este trabajo se presentan los resultados de especies de hongos y oomicetos que se han detectado durante la realización de estos estudios y que se han descrito por primera vez en aguacate en Andalucía.

Muestras de distintos tejidos se procesaron mediante métodos convencionales realizando aislamientos en diferentes medios de cultivo. Se seleccionaron aislados de los géneros de hongos y oomicetos que crecieron de forma consistente y que se encuentran descritos asociados al aguacate. La identificación de estos aislados se llevó a cabo mediante descripciones morfológicas y estudios moleculares. Posteriormente se realizaron pruebas de patogenicidad de las especies que resultaron más interesantes desde el punto de vista fitopatológico siguiendo diferentes métodos de inoculación.

En la mayoría de los árboles analizados se aisló *Pythium vexans* a partir de raíces absorbentes, también se aisló *Phytophthora capsici* a partir de muestras de raíz y de fruto de aguacate. Las pruebas de patogenicidad confirmaron la capacidad infectiva de estos oomicetos en plantas de aguacate. Por otro lado, se detectaron hongos de las especies *Neofusicoccum parvum* y *Lasiodiplodia theobromae* a partir de fragmentos de ramas y/o de cuello. Igualmente, las pruebas realizadas confirmaron la patogenicidad de estas especies.

A pesar de que los principales patógenos que limitan la producción del aguacate en Andalucía son *Phytophthora cinnamomi* y *Rosellinia necatrix*, los cuales han alcanzado una amplia distribución en la zona, la detección de *Py. vexans* y *P. capsici* causando podredumbres de raíz, y de *N. parvum* y *L. theobromae* causando seca de ramas, pone de manifiesto la necesidad de realizar estudios más detallados sobre posibles co-infecciones, de las epidemiologías de cada uno de éstos patógenos o sobre los métodos de control apropiados que se deberían aplicar.

OS-77**DIVERSIDAD FENOTÍPICA Y MOLECULAR DE AISLADOS ESPAÑOLES DE *Phaeomoniella chlamydospora***

Tello, M.L.¹, Gramaje, D.², Gómez, A.¹, Abad-Campos, P.² y Armengol, J.²

¹ Instituto Madrileño de Investigación y Desarrollo Rural, Agrario y Alimentario (IMIDRA), Autovía A-2, Km. 38,200, 28800 Alcalá de Henares.

² Instituto Agroforestal Mediterráneo, Universidad Politécnica de Valencia, Camino de Vera s/n, 46022 Valencia. E-mail: marisa.tello@madrid.org

Phaeomoniella chlamydospora es el principal hongo patógeno implicado en la enfermedad de Petri. Esta enfermedad afecta a vides jóvenes y constituye un grave problema sanitario en todo el mundo, tanto en vivero como en los primeros años de plantación en campo. Sin embargo, hasta el momento no se había llevado a cabo un estudio de la variabilidad fenotípica y molecular de este hongo en España, lo que ha constituido el principal objetivo de este trabajo. Para ello se han seleccionado 57 aislados de *Pa. chlamydospora* representativos de un amplio rango de zonas vitícolas españolas y de combinaciones variedad/portainjerto, obtenidos de vides sintomáticas entre los años 2001 y 2005. Como aislados de referencia se incluyeron en el estudio tres aislados de colección (CBS 117179, CBS 23974 y CBS 101571) y un aislado de *Pa. zymoides* (CBS 121168), especie muy relacionada filogenéticamente. Para la caracterización fenotípica se estudiaron: la producción del sinanamorfo tipo *Phoma*, la capacidad de esporulación y la tasa de crecimiento micelial in vitro a 5, 10, 15, 20, 25, 30 y 35 °C. La caracterización molecular mediante marcadores de ADN se realizó mediante el análisis de 5 marcadores ISSR y 24 marcadores RAPD.

El estudio ha permitido fijar las temperaturas cardinales para los aislados españoles y para el aislado de *P. zymoides*, encontrándose algunas diferencias con respecto a lo publicado para aislados de otros países. Además, se confirmó la formación del sinanamorfo en todos los aislados. Tanto los datos fenotípicos como los moleculares mostraron una gran homogeneidad entre todos los aislados españoles de *Pa. chlamydospora* independientemente de su origen geográfico, año de obtención o material de procedencia.

Este trabajo ha sido financiado por los proyectos RTA2007-00023-C04-03 y RTA2007-0023-C04-04 del Programa Nacional de Recursos y Tecnologías Agrarias, Ministerio de Educación y Ciencia.

OS-78

HONGOS ASOCIADOS AL DECAIMIENTO DE *Pinus pinaster* EN ESPAÑA

Alvarez, G.¹, Fernández, M.² y Díez, J.J.¹

¹Departamento de Producción Vegetal y Recursos Forestales.

²Departamento de Ciencias Agroforestales

ETSIIAA Palencia. U. De Valladolid. Avda. Madrid, 57. 34004 Palencia. España. jdcasero@pvs.uva.es

El presente trabajo ha tratado de identificar los hongos asociados al decaimiento del *Pinus pinaster* en nuestro país. Para ello, se tomaron muestras de varios pinares afectados por esta enfermedad, en La Horra (Burgos) y San Esteban del Valle (Ávila). En cada uno de estos pinares se cortaron 9 pinos, 3 de ellos sanos, 3 enfermos y 3 muertos. De cada uno de estos árboles se tomaron muestras de floema y xilema en cinco alturas distintas del árbol: el cuello de la raíz, el tronco antes de la primera rama, el punto intermedio entre las dos anteriores, la primera rama viva y el rabeón. Además, se tomaron muestras de acículas y se recogió la entomofauna asociada a los pies apeados. Estas muestras fueron cultivadas en cámara húmeda y en medio de cultivo Malta-Agar con tetraciclina, para evitar las colonias bacterianas. Tras un periodo de dos semanas en cultivo se procedió a la identificación microscópica de las especies presentes en el material vegetal.

En total, se han identificado 21 especies distintas asociadas al decaimiento del *Pinus pinaster*. De las variables consideradas para justificar la presencia de los hongos, las alturas 1 (basal) y 6 (acículas), los distintos tipos de tejido y las procedencias geográficas de las muestras han dado niveles de explicación bajos, pero estadísticamente han resultado significativas. Once de las especies identificadas han correspondido con Ofiostomatales. *Ophiostoma minus* se muestra claramente relacionada con el problema estudiado, y el hecho de que esté considerada como un fitopatógeno virulento por estudios previos, refuerza la posibilidad de que sea un importante factor responsable del decaimiento. Sin embargo, en Ávila, *Ophiostoma ips* y *Ceratocystiopsis fasciata* muestran una incidencia importante sobre los pies afectados y seguramente también se comporten como agentes causantes. La mayoría de las especies de insectos recogidas sobre los pies afectados pueden actuar como vectores de los hongos Ofiostomatales identificados. *Orthotomicus erosus* ha sido el más abundante de todos, y puesto que ataca las partes más delgadas del árbol, pudiera ser el responsable de la alta diversidad de Ofiostomatales que aparecieron en el rabeón.

OS-79

LA PODREDUMBRE RADICAL DE LA TREMOSILLA (*Lupinus luteus*) Y SU INFLUENCIA EN EL DECAIMIENTO DE LA ENCINA

Serrano, M.S.¹, Fernández-Rebollo, P.¹, De Vita, P.², Trapero, A.² y Sánchez, M.E.²

¹Dpto. Ingeniería Forestal ²Dpto. Agronomía (Patología Agroforestal), Universidad de Córdoba. E-mail: ag1sahem@uco.es

Desde hace 15 años se viene observando un importante decaimiento de los *Quercus* en las dehesas del sur de España y Portugal, ocasionando una elevada mortalidad de *Q. suber* y *Q. rotundifolia*, debido entre otros factores, al oomiceto *Phytophthora cinnamomi*. *Lupinus luteus* es una leguminosa comúnmente sembrada en estas dehesas como pasto para el ganado. Dado que las especies de *Lupinus* constituyen uno de los escasos huéspedes herbáceos susceptibles a *P. cinnamomi*, se han llevado a cabo inoculaciones artificiales de semillas pregerminadas de cuatro variedades de *L. luteus* (Cardiga, Juno, Nacional y Paris) con un aislado de *P. cinnamomi*. Además se ha inoculado *L. angustifolius*, especie muy susceptible al patógeno. Los porcentajes de emergencia obtenidos en sustratos infestados fueron un 70% menores que en los testigo. En post-emergencia, la severidad de los síntomas aéreos y radicales resultó significativamente más elevada en las cuatro variedades de tremosilla que en *L. angustifolius*. A los 5 días del trasplante, la tasa de mortalidad de la tremosilla fue mayor del 80%, mientras para *L. angustifolius* fue del 10%.

En cuatro dehesas seleccionadas que habían cultivado tremosilla en 2006-2007, se realizaron muestreos en rodales con síntomas de marchitez a principios de primavera, cuando *Lupinus* está a comienzo de floración, y a principios de verano, cuando la planta, infectada o no, está seca. En 10 parcelas contiguas de 1 m² de superficie se tomaron muestras de suelo y de raíz y se evaluó la severidad de los síntomas de la parte aérea de las plantas. En las cuatro fincas se consiguió aislar *P. cinnamomi* de las muestras de raíz. En el primer muestreo, en tres de las fincas la densidad de inóculo varió entre 6,6 y 19,3 ufc/g de suelo seco, mientras que en la finca restante fue de sólo 0,3 ufc/g. En el segundo muestreo, los valores se mantuvieron o aumentaron, excepto en una finca que se trató con purín de cerdo, donde disminuyó significativamente la densidad de inóculo.

Por lo tanto, se debe cuestionar la siembra de tremosilla en dehesas afectadas por la podredumbre radical de *Quercus* causada por *P. cinnamomi*, ya que puede aumentar la densidad de inóculo en el suelo. A su vez, la fertilización con purín podría constituir un interesante método de control, que requiere ser evaluado.

PANELES

ETIOLOGÍA Y DIAGNÓSTICO

PANELES VIRUS	135 (P-1)
PANELES BACTERIAS	157 (P-23)
PANELES HONGOS	171 (P-37)
PANELES NEMATODOS	211 (P-77)
PANELES OTROS	217 (P-83)

P-1**DETECCIÓN DE *Pea enation mosaic virus* (PEMV), SINTOMATOLOGIA Y DIAGNOSTICO EN GUISANTE Y HABA.**

Tornos, T.¹, Cebrian, M.C.², Córdoba-Sellés, M.C.², Alfaro-Fernández, A.², Herrera-Vasquez, J.A.², Font, M.I.², Camí, B.³ y Jorda, M.C.²

¹ Laboratori de Sanitat Vegetal. Departament d'Agricultura, Alimentació i Acció rural (DAR). Generalitat de Catalunya. Via Circulació Nord, Tram VI, c/3, 08040 Barcelona. E-mail: ttornos@gencat.cat

² Instituto Agroforestal Mediterráneo (IAM). Universidad Politécnica de Valencia (UPV). Camino de la Vera 14, 46022 Valencia.

³ Associació de Defensa Vegetal del Baix Llobregat.. Can Comes- Camino de la ribera sn, 08076 El Prat de Llobregat. Barcelona.

En España se ha detectado por primera vez PEMV en infección natural afectando a distintas variedades de guisante y haba en varias comarcas del meridional catalán. En este trabajo se describen los síntomas producidos en infecciones naturales por PEMV así como los métodos de diagnóstico ELISA y RT-PCR para su identificación.

La enfermedad de las enaciones y mosaico del guisante está producida por una simbiosis obligada entre dos virus distintos: *Pea enation mosaic virus-1* (PEMV-1) perteneciente al género *Enamovirus*, y *Pea enation mosaic virus-2* (PEMV-2) del género *Umbravirus*. Nos referimos a PEMV como el conjunto de PEMV-1 y PEMV-2. La gama de huéspedes está limitada a la familia *Fabaceae*.

Desde Marzo de 2007 muestras de guisante con síntomas de la enfermedad, procedentes de 10 campos de cultivo distintos, se analizaron mediante la técnica DAS-ELISA con anticuerpos comerciales Loewe Biochemmika GMBH para detectar la presencia de PEMV, *Broad bean wilt virus 1* (BBWV-1), *Beet western yellow virus* (BWYV), *Bean yellow mosaic virus* (BYMV), *Alfalfa mosaic virus* (AMV), *Tomato spotted wilt virus* (TSWV); y con anticuerpos comerciales Agdia para *Potyvirus*. Se detectó PEMV en todas las muestras. 54% de estas muestras también resultaron positivas a BWYV pero no se han observado diferencias en la expresión de los síntomas debidas a infecciones mixtas con este virus. PEMV también se detectó en haba, mostrando mosaico amarillo internervial en hojas y frutos deformados.

Para confirmar la identidad del virus, se diseñaron a partir de la secuencia genómica del PEMV-1 (GenBank Accession No. L04573) unos cebadores específicos: PEMV-D (5'-TGACCATGAGTCCACTGAGG-3'), PEMV-R (5'-AGTATCTTCCAACAACCACAT-3'). Se analizó una muestra de guisante positiva por DAS-ELISA mediante RT-PCR. El amplicón fue purificado y directamente secuenciado (GenBank Accession No. EU652339). La secuencia, al comparar con otras secuencias del GenBank, mostró un 95% de homología con PEMV-1 (GenBank Accession No. L04573).

P-2**DETECCIÓN DE VIRUS DE LA VID A PARTIR DE MATERIAL
PROCEDENTE DE VIVERO EN CASTILLA- LA MANCHA**

Muñoz, R.M., Lerma, M.L. y Lunello, P.

Servicio de Diagnóstico y Asistencia Fitosanitaria (SEDAF) del Instituto Técnico Agronómico Provincial de Albacete. Apdo. Correos 451. 02006 Albacete. E-mail: rmg.itap@dipualba.es

El cultivo de la vid en Castilla- La Mancha se extiende en 550.000 ha., aproximadamente el 50% de la superficie española. Las enfermedades de origen vírico en la vid pueden ocasionar fuertes reducciones en el rendimiento, menor enraizamiento o prendimiento de injerto, disminución de la vida de la planta y/o descenso en la calidad de los mostos, afectando a la rentabilidad del cultivo.

La principal fuente de diseminación de las virosis es el material vegetal asintomático. Por este motivo, antes de llevar a cabo el establecimiento de nuevos viñedos, es importante valorar la calidad fitosanitaria del material y, en concreto, la presencia de las virosis recogidas en el Reglamento Técnico de Control y Certificación de plantas de vivero de vid.

En este trabajo se presenta el análisis de 203 lotes de material procedente de vivero. Cada lote consiste en una a varias plantas (494 plantas en total), en su mayoría injertadas, que pueden representar el material vitícola utilizado en las plantaciones acogidas a los recientes planes de reestructuración del viñedo de Castilla- La Mancha. Las muestras se han analizado mediante la técnica serológica DAS-ELISA con anticuerpos para los siguientes virus: entrenudo corto (*Grapevine fanleaf virus*, GFLV), enrollado razas 1 y 3 (*Grapevine leafroll-associated 1, 3*, GLRaV-1, GLRaV-3), jaspeado (*Grapevine fleck virus*, GFKV) y virus del mosaico del Arabis (*Arabis mosaic virus*, ArMV).

En total, se ha detectado un 16,8% de lotes infectados por alguna virosis. El número de lotes testados en los años 2005 y 2006 ha sido considerablemente superior, obteniéndose esos años, respectivamente, porcentajes del 20,3 y 27,3% de lotes infectados por alguno de estos virus.

Del total de virosis testadas, el virus del enrollado 3 (GLRaV-3) es el más frecuentemente detectado, presente en el 14,8 % de lotes analizados. Este virus ha sido diagnosticado en el 100% de los lotes infectados del año 2005, así como en el 83% de los del año 2006. Por otra parte, es importante destacar la presencia del mayor problema vírico de este cultivo, el virus GFLV en el 2% de los lotes analizados.

La variedad más frecuente en los lotes testados es syrah, con el 5,1% de lotes positivos para GFLV y el 12,8% para GLRaV-3. La mayoría de lotes presentaban el portainjerto 110R, con porcentajes de infección del 2%, 22% y 14% para los virus GFLV, GLRAV-3 y GFKV, respectivamente.

Con el fin de mejorar la sensibilidad en el diagnóstico, se ajustó la técnica molecular IC-RT-PCR para la detección de los virus GFLV y GFKV.

P-3**IDENTIFICACIÓN DE UN NUEVO BEGOMOVIRUS DE TOMATE EN PERÚ MEDIANTE LA AMPLIFICACIÓN POR CÍRCULO RODANTE (RCA)**

Márquez-Martín, B.¹, García-Andrés, S.¹, Aragón, L.², Navas-Castillo, J.¹ y Moriones, E.¹

¹ Estación Experimental “La Mayora”, CSIC, 29760 Algarrobo-Costa (Málaga). E-Mail: moriones@eelm.csic.es

² Facultad de Agronomía, Universidad Nacional Agraria La Molina (UNALM), La Molina, Perú.

En un muestreo llevado a cabo en 2003 en distintas zonas de cultivo de tomate en Perú, se observaron plantas con síntomas virales que incluían clorosis, mosaicos, necrosis y deformación foliar que hacían sospechar de infecciones por begomovirus. Se obtuvieron extractos de ácidos nucleicos totales a partir de muestras foliares desecadas de 6 plantas sintomáticas [4 de Carabaylo (provincia de Lima) y 2 de Huaral (provincia de Huaral)]. El análisis mediante PCR utilizando oligonucleótidos específicos descartó la presencia de begomovirus monopartitos del complejo del rizado amarillo del tomate (“TYLCV”). La amplificación utilizando oligonucleótidos genéricos diseñados para la detección del DNA-A del genoma de begomovirus generó un fragmento del tamaño esperado (≈ 1.1 kb) a partir de todas las muestras. La secuenciación de 4 de estos fragmentos confirmó la infección por begomovirus y mostró un 100% de identidad nucleotídica entre ellos. Una de las muestras recolectadas en Carabaylo se sometió además a la técnica de amplificación de DNA circular por círculo rodante (*rolling circle amplification*, RCA) utilizando la DNA polimerasa del fago $\phi 29$. La digestión con 19 enzimas de restricción mostró que 4 de ellas daban lugar a un corte único en el DNA amplificado, generando un fragmento de ≈ 2.7 kb correspondiente al tamaño esperado para el DNA-A del genoma de un begomovirus. El producto obtenido tras la digestión con el enzima *KpnI* se clonó y secuenció en su totalidad. El análisis de la secuencia obtenida confirmó su naturaleza viral, con la organización genómica típica del DNA-A de un begomovirus del Nuevo Mundo. Siguiendo los criterios de demarcación de especies establecidos para el género *Begomovirus* (familia *Geminiviridae*), el genoma secuenciado corresponde a una especie viral no descrita hasta el momento.

Este trabajo muestra la utilidad de la técnica RCA para el clonaje y caracterización de genomas completos de virus con DNA circular a partir de pequeñas cantidades de material vegetal desecado sin necesidad de disponer de datos previos de secuencia.

P-4**CARACTERIZACIÓN DE LA ESTRUCTURA EN CUASIESPECIES DE AISLADOS DE CAMPO DE *Tomato chlorosis virus***

Lozano, G.¹, Grande-Pérez, A.² y Navas-Castillo, J.^{1,2}

¹Estación Experimental “La Mayora”, CSIC. 29760 Algarrobo-Costa (Málaga).

²Departamento de Biología Celular, Genética y Fisiología, Universidad de Málaga. 29071 Málaga.

E-mail: jnavas@eelm.csic.es

Tomato chlorosis virus (ToCV, género *Crinivirus*, familia *Closteroviridae*) es el agente etiológico de la enfermedad del amarilleo del tomate. Su genoma está constituido por dos moléculas de RNA de cadena sencilla y lineal, RNA1 y RNA2, que se encapsidan formando viriones largos y flexuosos. ToCV está ampliamente distribuido en la cuenca mediterránea y otras zonas templadas del mundo. En España, se detectó por primera vez a finales de los años 90 en el sudeste peninsular e Islas Canarias.

En este trabajo se analiza la estructura poblacional y diversidad genética de 13 aislados de ToCV recogidos entre los años 1997 y 2004 en cultivos comerciales de tomate de las provincias de Almería, Málaga y Murcia. Se seleccionaron cuatro regiones genómicas situadas en ORFs que codifican para proteínas que desempeñan distintas funciones en el ciclo viral: la región RdRp en el RNA1 y las regiones Hsp70h, CP y CPM en el RNA2. Estos cuatro fragmentos representan aproximadamente el 15% (2548 nt) del genoma de ToCV. Para cada aislado, se amplificaron las cuatro regiones mediante RT-PCR y se obtuvo la secuencia de entre 12 y 20 clones moleculares así como su secuencia consenso. Se caracterizaron los espectros de mutantes de cada región mediante la comparación de las secuencias obtenidas y se analizó el tipo y la distribución de las mutaciones identificadas. Asimismo, se estimó la frecuencia de mutación, la entropía de Shannon, la diversidad nucleotídica y la presión y dirección de las restricciones selectivas que operaban en cada una de las regiones. ToCV genera, en aislados de campo de tomate, poblaciones constituidas por una secuencia maestra y una serie de variantes de ésta que constituyen su espectro de mutantes, características de las cuasiespecies virales. La complejidad y heterogeneidad de cada cuasiespecie varía en función del aislado y de la región genómica analizada. Se discuten los resultados obtenidos en comparación con los disponibles de otros miembros de la familia *Closteroviridae*.

P-5**SECUENCIA COMPLETA DEL GENOMA DE UN AISLADO DE LA CEPA “WEST AFRICAN” DEL CRINIVIRUS *Sweet potato chlorotic stunt virus***

Orílio, A.F., Trenado, H.P. y Navas-Castillo, J.

Estación Experimental “La Mayora”, CSIC, 29760 Algarrobo-Costa (Málaga).

E-mail: jnavas@eelm.csic.es

La batata [*Ipomoea batatas* (L.) Lam.], originaria del centro y sur de América, es el séptimo cultivo hortícola a nivel mundial y el quinto en países en vías de desarrollo. En estos países, donde se concentra el 95 % de la producción, constituye un cultivo de subsistencia esencial para paliar la escasez de alimentos y la malnutrición de la población. La acumulación y perpetuación de virus, favorecidas por su propagación vegetativa, puede constituir el mayor inconveniente para su cultivo. La “enfermedad viral de la batata” (*sweet potato viral disease*, SPVD), causada por el sinergismo entre el potyvirus *Sweet potato feathery mottle virus* (SPFMV) y *Sweet potato chlorotic stunt virus* (SPCSV), es la enfermedad más grave que afecta a este cultivo, llegando a provocar pérdidas de hasta el 98 % de la cosecha. SPCSV pertenece al género *Crinivirus* (familia *Closteroviridae*) y posee un genoma bipartito compuesto por dos moléculas de RNA de cadena sencilla, lineal y polaridad positiva. En África existen dos cepas de SPCSV distinguibles serológicamente, “East African” y “West African”. La cepa “West African” se ha encontrado además en Australia, América y la cuenca del Mediterráneo, incluida España.

En este trabajo hemos llevado a cabo la clonación y secuenciación del genoma completo (RNA1, RNA2) de un aislado español de la cepa “West African”, de la que sólo se disponía de escasas secuencias parciales. La comparación de la secuencia obtenida y de la organización genómica deducida con las de la cepa “East African” mostró: i) que no existía una alta identidad nucleotídica entre genes homólogos y ii) que existían marcos abiertos de lectura no presentes en la cepa “East African”. Se discuten las implicaciones que estas diferencias puedan tener sobre el estatus taxonómico de la cepa “West African” de SPCSV dentro del género *Crinivirus*.

P-6**LA PATATA ES UN HUÉSPED EXPERIMENTAL Y NATURAL DE *Tomato chlorosis virus***

Fortes, I.M. y Navas-Castillo, J.

Estación Experimental “La Mayora”, CSIC, 29760 Algarrobo-Costa (Málaga).
E-mail: jnavas@eelm.csic.es

Tomato chlorosis virus (ToCV, género *Crinivirus*, familia *Closteroviridae*) es el agente causal del amarilleo del tomate (*Solanum lycopersicum*) presente en Florida al menos desde 1989. Los síntomas producidos por ToCV en tomate consisten en clorosis internervial que aparece inicialmente en las hojas inferiores y que posteriormente se extiende hacia la parte superior de la planta. En fases avanzadas de la infección pueden aparecer manchas de color púrpura y necrosis. A finales de los años 90, ToCV se describió en numerosos países del viejo mundo. Actualmente, la presencia de ToCV ha sido confirmada en el Caribe, la Cuenca Mediterránea, Extremo Oriente y África. En España, ToCV se ha asociado con el amarilleo observado en cultivos de tomate bajo invernadero desde 1997 (Navas-Castillo *et al.*, 2000), con incidencias muy elevadas de hasta el 100%. Recientemente, ToCV se ha descrito infectando a pimiento (*Capsicum annuum*) en España (Lozano *et al.*, 2004).

En el verano de 2006, se observaron en un cultivo de pimiento al aire libre de la provincia de Málaga plantas de patata (*Solanum tuberosum*) escapadas del anterior cultivo de invierno fuertemente infestadas por la mosca blanca *Bemisia tabaci*. Muestras foliares de estas plantas se analizaron para la presencia de ToCV mediante hibridación molecular con una sonda específica del gen de la proteína de la cápsida y RT-PCR con cebadores específicos del mismo gen. Algunas de estas plantas resultaron positivas por ambos métodos. La secuenciación de los productos de PCR obtenidos de dos de estas muestras confirmó la presencia de ToCV, con una secuencia 99% idéntica a la región equivalente del aislado español AT80/99 totalmente secuenciado (Lozano *et al.*, 2006). Experimentos de transmisión en condiciones controladas a plantas de patata (cv. Safrane) mediante el biotipo Q de *B. tabaci* confirmaron que esta especie es huésped de ToCV. Además, las plantas de patata infectadas experimentalmente producían tubérculos con yemas infectadas que daban lugar a plantas que a su vez fueron fuentes de inóculo de ToCV en experimentos de transmisión a tomate. Todas las plantas de patata infectadas experimentalmente permanecieron asintomáticas. Ésta parece ser la primera descripción de patata como huésped experimental y natural de *Tomato chlorosis virus*.

P-7**DESARROLLO DE UN MÉTODO DE HIBRIDACIÓN MOLECULAR PARA LA DETECCIÓN DE VIRUS DE FRESA TRANSMITIDOS POR PULGONES**

Garzón, A. y Ayllón, M.A.

Centro de Biotecnología y Genómica de Plantas, Dpto. de Biotecnología, E.T.S.I. Agrónomos, Universidad Politécnica de Madrid, Ciudad Universitaria, 28040 Madrid; e-mail: mariaangeles.ayllon@upm.es

El cultivo de la fresa (*Fragaria ananassa* Duch.) es de gran importancia en España, siendo nuestro país el principal productor europeo y el segundo a nivel mundial. Las plantas de fresa se producen mayoritariamente en Castilla-León y se envían a distintas zonas de producción, entre las que destaca Huelva como la más importante.

Actualmente, se conocen más de veinte virus que infectan fresa. Los indicios de una infección viral son pérdida de vigor de la planta, enanismo y disminución de la producción. Aislados muy virulentos pueden causar por sí mismos graves daños, pero en general el principal problema son los complejos formados por varios virus que causan mayores pérdidas y producen una disminución acusada de la producción y una severa reducción de la calidad del fruto. Las enfermedades causadas por virus transmitidos por pulgones suelen ser las de mayor importancia económica debido a la ausencia de una sintomatología clara y a la mayor eficiencia de transmisión de los pulgones frente a otros vectores. Entre éstos destacan por su importancia económica los virus del moteado (*Strawberry mottle virus*, SMV), de la clorosis marginal leve (*Strawberry mild yellow edge virus*, SMYEV) y de la rizadura de la hoja del fresal (*Strawberry crinkle virus*, SCV). Los métodos de detección estaban basados en la observación de síntomas tras el injerto de hojas de plantas infectadas en variedades indicadoras de *Fragaria*. Este método es muy laborioso y requiere mucho tiempo por lo que, recientemente, se han desarrollado métodos de diagnóstico basados en técnicas moleculares.

En este trabajo se han diseñado cebadores para la detección mediante Retrotranscripción-PCR de SMV, SMYEV y SCV. Estos cebadores se han empleado con éxito para la detección de los tres virus a partir de extractos de RNA total de plantas infectadas. Sin embargo, uno de los principales problemas de la extracción de ácidos nucleicos totales de plantas de fresa es la gran cantidad de inhibidores de la PCR que quedan en los extractos, por ello se tiene que recurrir al empleo de métodos complejos de extracción o al uso de kits comerciales que resultan demasiado caros. Con el fin de evitar los problemas de la RT-PCR se ha desarrollado una estrategia de diagnóstico basada en la hibridación molecular. Para ello se han seleccionado zonas conservadas del genoma de dichos virus para la construcción de sondas marcadas con digoxigenina. Estas sondas han sido usadas en la detección de virus mediante hibridación molecular en extractos de RNA total y en improntas de plantas infectadas.

P-8**DETECCIÓN DEL VIRUS DEL BRONCEADO DEL TOMATE EN CULTIVOS HORTÍCOLAS COMARCA ESLA-CAMPOS (LEÓN)**

Lorenzana, A., Campelo, M.P., Marcos, M.F., De Barrios, M.A. y Gómez-Bernardo, E.M.

Laboratorio de Diagnóstico. Fundación Chicarro-Canseco-Banciella. E.S.T.I.Agraria. Universidad de León. Avda. de Portugal, 41. 24071 León. Correo-e: eialdi@unileon.es

La comarca Esla-Campos es una de las zonas hortícolas más importantes en la provincia de León, especialmente por la producción de pimiento “Morrón”, reconocido mediante la Indicación Geográfica Protegida “Pimiento de Fresno-Benavente”. La presencia del virus del bronceado del tomate (TSWV - *Tomato spotted wilt virus*) en la zona ha sido descrita en cultivos de pimiento y tomate por varios autores. En este trabajo se presentan los resultados de la prospección realizada en el año 2007 para conocer la incidencia de este virus en la comarca. A partir del mes de mayo se tomaron muestras de los cultivos hortícolas más representativos, tanto en invernadero como al aire libre. El material se recogió en dos épocas distintas (pre floración y cosecha). Se visitaron 17 parcelas de invernadero: ocho de pimiento, cuatro de tomate, dos de cebolla, una de berenjena y dos de judía, capturándose trips en uno de los invernaderos para proceder a su identificación. En el exterior se prospectaron 17 parcelas: seis en mayo (todas de lechuga) y el resto en julio y septiembre (siete de pimiento, tres de tomate y una de berenjena). El muestreo se hizo al azar tomando 25 hojas por parcela. Se aplicó la técnica ELISA-DAS utilizándose anticuerpos policlonales y se detectó de la presencia del virus en los cultivos de pimiento, tomate, lechuga y cebolla. Se identificaron como *Frankliniella occidentalis* (Pergande) los ejemplares de trips recogidos en invernadero. Hasta nuestro conocimiento, este resultado constituye la primera cita de la presencia del virus del bronceado del tomate en los cultivos de lechuga y cebolla en la provincia de León.

P-9**SECUENCIA NUCLEOTÍDICA COMPLETA DE UN AISLADO ESPAÑOL DEL VIRUS DEL MOTEADO DE LA PARIETARIA QUE INFECTA TOMATE (PMOV-T)**

Galipienso, L.¹, Aramburu, J.¹, Lopez, C.² y Soler, S.²

¹Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentariès (IRTA), Barcelona

²Instituto de Conservación y Mejora de la Agrodiversidad Valenciana (COMAV-UPV), Valencia

PMoV-T, perteneciente al género *Ilarvirus*, fue detectado por primera vez en España en plantaciones de tomate de la provincia de Barcelona en el año 2001. Actualmente se ha constatado su presencia en este cultivo en Tarragona, Castellón y Valencia.

Se ha obtenido la secuencia nucleotídica completa de los RNAs 1, 2 y 3 del aislado CR8 recogido en la provincia de Barcelona. El RNA 1 tiene un tamaño de 3.514 nucleótidos (nts), cuatro menos que el aislado original (PMoV) y contiene un único marco de lectura abierto (ORF) que codifica para la proteína p1, en la que se han localizado los dominios conservados metil transferasa y ATPasa/helicasa. Este ORF está flanqueado por dos regiones no codificantes (5' y 3'-UTRs) de 35 y 185 nts respectivamente. El RNA 2 tiene un tamaño de 2.922 nts y contiene dos ORFs, que codifican para las proteínas p2 y 2b. En la proteína p2 se ha localizado el dominio conservado RNA polimerasa, mientras que la proteína 2b podría estar implicada en la inhibición del mecanismo de silenciamiento génico, que emplean las plantas para defenderse de diferentes patógenos. Ambos ORFs están flanqueados por dos UTRs de 34 y 123 nts respectivamente. El RNA 3 tiene un tamaño de 2.272 nts, cuatro más que PMoV y contiene dos ORFs, que codifican para las proteínas 3a y CP. Ambos ORFs están separados por una región intergénica no codificante (IGR) de 170 nts en los que se ha localizado la región promotora del RNA 4 subgenómico. En la proteína 3a se han detectado dos dominios contiguos con estructuras secundarias en α -hélice y hoja- β , muy conservados en *Ilarvirus* y que podrían estar implicados en el movimiento del virus en el interior de la planta. La CP de PMoV-T tiene 16 aminoácidos menos que PMoV. Ambos ORFs están flanqueados por dos UTRs de 298 y 304 nts respectivamente. Los 100 nts finales de las 3'-UTRs muestran altos niveles de homología en los tres RNAs y se han localizado estructuras secundarias en forma de bucles, que podrían estar implicadas en el proceso de activación génica, tal y como se produce en otros miembros del género *Ilarvirus*.

Los análisis filogenéticos realizados a partir de las secuencias completas de los tres RNAs muestran que PMoV-T forma un grupo separado de PMoV.

P-10**DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DEL VIRUS DEL MANCHADO FOLIAR DE LOS CÍTRICOS MEDIANTE RT-PCR EN TIEMPO REAL**

Ruiz-Ruiz, S.¹, Ambrós, S.², Vives, M.C.¹, Navarro, L.¹, Moreno, P.¹ y Guerri, J.¹

¹Centro de Protección Vegetal y Biotecnología. Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias, ²Fundac. Agroalimed-IVIA. Ctra Moncada-Náquera Km. 4.5, 46113 Moncada, Valencia. sruiz@ivia.es

El virus del manchado foliar de los cítricos (*Citrus leaf blotch virus*, CLBV), familia *Flexiviridae*, está distribuido en plantaciones de cítricos de distintos países. El virus se transmite por injerto y en menor proporción por semilla; por ello, para evitar su dispersión es necesario controlar el estado sanitario tanto de los árboles productores de yemas como de los árboles productores de semillas utilizadas en la producción de patrones. Para conseguir este objetivo es necesario disponer de métodos sensibles, rápidos y específicos de diagnóstico del virus. El bajo título y/o mala distribución del virus en algunas variedades de cítricos hace que su detección con los métodos actualmente disponibles resulte inconsistente. En este trabajo se ha desarrollado un protocolo de RT-PCR en tiempo real basado en la tecnología TaqMan que proporciona una detección de CLBV 1000 veces más sensible que la obtenida mediante RT-PCR convencional y permite la detección del virus en condiciones de campo en todas la variedades de cítricos ensayadas en cualquier época del año. Se preparó una curva patrón utilizando diluciones seriadas (10^1 a 10^{10}) de transcritos de RNA de una zona seleccionada del genoma del virus en extracto crudo de planta sana de cítrico. El ensayo permitió detectar hasta 10^2 copias y la respuesta fue lineal en un rango de siete ordenes de magnitud (10^3 a 10^9 copias), que es apropiado para estimar la acumulación del virus en todas las circunstancias ensayadas. La máxima acumulación de virus se observó en brotes jóvenes y flores, seguido por la corteza y las hojas viejas. La menor acumulación se detectó en raíces y albedo de frutos. Este nuevo método de diagnóstico mejora sustancialmente los actualmente disponibles y es una herramienta valiosa para los programas de saneamiento, cuarentena y certificación que se llevan a cabo en España y en otros países. Asimismo, se está utilizando para comparar la eficacia replicativa de distintas construcciones de un vector viral basado en un clon infeccioso de CLBV.

P-11**DETECCIÓN DE AISLADOS DEL VIRUS DEL MARCHITAMIENTO DEL HABA MEDIANTE HIBRIDACIÓN MOLECULAR**

Ferrer, R.M.¹, Luis-Arteaga, M.², Moreno, P.¹, Guerri, J.¹ y Rubio, L.¹

¹Centro de Protección Vegetal y Biotecnología. Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA), Valencia, España. ²Servicio de Investigación Agroalimentaria (SIA), Zaragoza, España

Los virus del marchitamiento del haba 1 (*Broad bean wilt virus*, BBWV 1) y 2 (BBWV 2), pertenecientes al género *Fabavirus*, familia *Comoviridae*, son transmitidos por unas 20 especies distintas de pulgones y afectan a una amplia gama de huéspedes en todo el mundo, entre ellos, muchos de interés agronómico (legumbres, alcachofa, lechuga, tomate, tabaco, pimiento, etc...). El desarrollo de métodos rápidos, fiables y específicos de detección de estos virus es necesario para los estudios de transmisión y epidemiología y para el desarrollo y aplicación de medidas de control. En este trabajo se han desarrollado métodos de hibridación molecular en formato dot-blot que permiten, por una lado, la detección universal de los aislados de BBWV-1 o de BBWV-2, y por otro, diferenciar cepas o grupos de aislados de BBWV-1 con secuencias divergentes. Para ello, se han diseñado sondas de DNA correspondientes a una zona conservada del genoma de BBWV-1 o de BBWV-2 cuya hibridación a 55°C ha permitido detectar todos los aislados pertenecientes a cada especie. A su vez, una hibridación en condiciones más selectivas (60°C) con sondas basadas en una zona más variable del genoma de BBWV-1 nos ha permitido diferenciar grupos de aislados dentro de esta especie viral. Nuestros resultados indican que la hibridación tiene lugar con aquellos aislados con identidad nucleotídica superior al 85%, pero no con aquellos cuya identidad es inferior al 80%, lo que significa que se pueden discriminar grupos de aislados en base a su proximidad genética.

P-12**PRODUCCIÓN DE UN ANTISUERO FRENTE A LA PROTEÍNA DE CUBIERTA RECOMBINANTE PARA LA DETECCIÓN DEL VIRUS DEL MOTEADO DE LA PARIETARIA (PMoV)**

Aparicio, F.¹, Aramburu, J.², Soler, S.³, Galipienso, L.², Nuez, F.³, Pallás, V.¹ y López, C.³

¹Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas, (UPV-CSIC), Valencia.

²Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentaries (IRTA), Barcelona.

³Instituto de Conservación y Mejora de la Agrodiversidad Valenciana, (COMAV-UPV), Valencia.

El virus del moteado de la parietaria (PMoV), perteneciente al género de los *Ilarvirus*, se detectó por primera vez en España infectando tomate en 2001 y posteriormente en pimiento. La infección provoca fuertes necrosis en hojas y tallos, así como decoloraciones, necrosis y deformaciones en frutos. Los primeros focos infectivos en España se localizaron en el entorno costero de Barcelona, aunque ya se han localizado nuevos brotes de infección en las Comunidades de Valencia y Andalucía.

Para la detección de PMoV se han desarrollado métodos basados en hibridación molecular no radiactiva y RT-PCR. Sin embargo, hasta la fecha no se dispone de ningún anticuerpo comercial para detectar el virus usando procedimientos más estandarizados tipo ELISA y sus variantes. En nuestro grupo hemos obtenido un antisuero específico frente a la proteína de cubierta del virus expresada en bacteria, el cual presenta una elevada especificidad en análisis tipo western y ELISA indirecto. Actualmente, se está evaluando la validez del antisuero para la inmunodetección mediante ELISA indirecto y DIBA para el diagnóstico rutinario en plantas de tomate.

P-13**DETECCIÓN SIMULTÁNEA DE SEIS VIRUS QUE INFECTAN TOMATE MEDIANTE UNA ÚNICA POLISONDA NO RADIATIVA**

Aparicio, F.¹, Soler, S.², Aramburu, J.³, Galipienso, L.³, Nuez, F.², Pallás, V.¹ y López, C.²

¹Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas, (UPV-CSIC), Valencia.

²Instituto de Conservación y Mejora de la Agrodiversidad Valenciana, (COMAV-UPV), Valencia.

³Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentaries (IRTA), Barcelona.

El tomate es el cultivo hortícola más importante en España. Su producción se ve disminuida por el efecto de diferentes virosis, que en ocasiones presentan carácter epidémico. Esta situación es particularmente importante en la franja mediterránea, donde se concentra la mayor parte del cultivo de tomate para consumo en fresco. Entre los virus de RNA que causan las mayores pérdidas económicas destacan los siguientes: virus del bronceado del tomate (TSWV), del mosaico del tomate (ToMV), del mosaico del pepino dulce (PepMV), del mosaico del pepino (CMV), del moteado de la parietaria (PMoV) y el virus Y de la patata (PVY).

Para la detección de plantas infectadas con virus se han desarrollado, entre otras, técnicas basadas en la hibridación molecular que utilizan precursores marcados con compuestos no radiactivos. En este trabajo hemos desarrollado una polisonda marcada con digoxigenina para la detección simultánea de los seis virus anteriormente citados. La polisonda es capaz de detectar cualquiera de los seis virus en una única hibridación con una sensibilidad similar a la que se obtiene con cada una de las sondas individuales. Además, se ha evaluado el uso de la técnica "tissue-printing" como método de evaluación de muestras para el diagnóstico rutinario en plantas de tomate.

P-14**IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE 4 ESPECIES DEL GÉNERO
PHAEOACREMONIUM MEDIANTE PCR EN TIEMPO REAL CON OLIGOS
DEGENERADOS.**

Aroca, A.¹, Raposo, R.¹ y Lunello, P.^{2*}.

¹Instituto Nacional Investigaciones Agrarias (INIA), C. Coruña km. 7.5, 28040 Madrid. ²Agrenvec, S. L. Valle de Cares 22, 28669, Boadilla del Monte, Madrid.

El género *Phaeoacremonium* se ha estudiado exhaustivamente debido a su asociación con dos de las enfermedades más perjudiciales en vid (*Vitis vinifera* L.), Yesca en plantas adultas y la enfermedad Petri en plantas jóvenes, las cuales causan graves pérdidas económicas del cultivo. Este género incluye actualmente 22 especies, aunque sólo 13 de ellas han sido citadas en vid. En este trabajo se ha diseñado un par de cebadores degenerados con homología en el gen de la β -tubulina de 11 especies de este género, con el propósito de amplificar y detectar cualquiera de estas especies en una reacción de PCR. Además, estos cebadores degenerados se han utilizado en combinación con cuatro sondas TaqMan[®] específicas diseñadas para las cuatro especies de *Phaeoacremonium* descritas hasta el momento en España, *P. aleophilum*, *P. parasiticum*, *P. viticola* y *P. mortioniae*. Estas sondas se marcaron con fluorocromos diferentes para permitir la identificación de estas cuatro especies tanto en reacciones individuales como en PCR multiplex.

Para comprobar la eficacia de detección de las combinaciones de dos, tres y las cuatro sondas en PCR multiplex en tiempo real, se utilizaron combinaciones de ADN de las cuatro especies de *Phaeoacremonium* testadas y preparadas a distintas concentraciones. Los resultados mostraron que no existían amplificaciones cruzadas en la PCR multiplex a tiempo real. Además, este método fue aplicado para identificar especies de *Phaeoacremonium* en fragmentos de madera de plantas de vid infectadas naturalmente. Los resultados fueron comparados con los obtenidos por detección mediante PCR anidada y medio de cultivo. La PCR en tiempo real permitió detectar las especies de *Phaeoacremonium* en el 100 % de los fragmentos analizados, mientras que por PCR anidada sólo se detectaron en el 62 % de las muestras analizadas.

P-15**DETECCION Y DIAGNÓSTICO DEL VIRUS DEL TORRADO DEL TOMATE, TOMATE TORRADO VIRUS (TOTV) EN CANARIAS**

Espino, A.I.¹, Botella, M.¹, Gómez, E.¹, Gómez, P.², Martín, R.³, Reyes, J.A.⁴, Monroy, D.⁵, Fontenla, E.⁵ y Paz, I.⁵

¹Laboratorio Sanidad Vegetal Tenerife, ²CSIC Murcia, ³Sanidad Vegetal Gran Canaria, ⁴Sanidad Vegetal Tenerife Merco, ⁵Canarias

Desde hace aproximadamente una década se detectó una nueva sintomatología en tomates de exportación de la variedad Daniela en Gran Canaria y en Tenerife tanto al aire libre como en invernadero. Las hojas presentaban un amarilleo en la base de los folíolos con una posterior lesión necrótica que avanzaba a cribado y los frutos con manchas circulares necróticas tipo cremallera. El ápice de la planta tomaba un aspecto de quemado. Esta sintomatología no estaba citada anteriormente y corresponde a los síntomas recientemente descritos en Murcia (2001) y diagnosticada por primera vez para la ciencia (2003) como una enfermedad de etiología viral propuesta con el nombre de "Tomato torrado virus"(ToTV). Se trata de un nuevo virus del grupo picorna-like, cuya posición taxonómica muestra características del virión y secuencia similares a la familia Sequiviridae. Estudios recientes en la Península muestran la asociación persistente del PepMV tipo EU y tipo Ch2 con ToTV. . Desde que apareció esta nueva enfermedad viral en los cultivos de tomate no existía hasta el 2006, ninguna herramienta disponible para su diagnóstico en el laboratorio.

Los objetivos de este trabajo han sido confirmar diferentes técnicas de diagnóstico para ToTV (RT-PCR, hibridación molecular con print y dot blot), así como conocer su distribución geográfica y la posible asociación de ToTV con PepMV. Durante las campañas 2006-2007 y 2007-2008 se han realizado prospecciones (31 explotaciones) y recibido muestras (68 explotaciones) con síntomas de la enfermedad de diferentes municipios de Tenerife (Güimar, Arico, Granadilla, Guía de Isora y Santiago del Teide) y Gran Canaria (Agüimes, Sta Lucía de Tirajana, La Aldea de San Nicolás y Telde) con un total de 260 muestras (aproximadamente).

Los resultados indican que tanto la hibridación molecular con dot blot como la RT-PCR funciona correctamente con sensibilidad y reproducibilidad por igual excepto en casos puntuales. La hibridación molecular con print no funciona, quizás por distribución o acumulación de ToTV en los tejidos vegetales. El ToTV se detecta en todas las zonas productoras de tomate de Tenerife y Gran Canaria. El PepMV tipo Ch2 no parece estar implicado en esta enfermedad como ocurre en Murcia, sin embargo el PepMV tipo EU si se detecta en gran porcentaje en muestras con síntomas de ToTV.

P-16**IDENTIFICACIÓN DE HUÉSPEDES DEL PHYTOPLASMA *Candidatus phytoplasma prunorum* Y DE SU VECTOR *Cacopsylla pruni***

Laviña, A., Sabaté, J. y Batlle, A.

IRTA, Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentaries, Ctra Cabrils Km 2, 08348 Cabrils, Barcelona. E-mail: amparo.laviña@irta.es

Candidatus phytoplasma prunorum, agente causal de la enfermedad denominada European stone fruit yellows, infecta distintas especies de *Prunus* silvestres y cultivados, tolerantes a la enfermedad, factor que favorece un ciclo natural, vector-*Prunus* silvestre-patógeno, pasando la presencia de la enfermedad inadvertida. La introducción de especies susceptibles como el ciruelo japonés (*Prunus salicina*) en un ecosistema con numerosas fuentes de inoculo, como es el caso del Baix Llobregat (Barcelona), y la presencia de un vector muy eficiente en la adquisición y la transmisión, ha propiciado que se produzca una rápida expansión de la enfermedad.

El vector, *Cacopsylla pruni*, se identificó por primera vez en la península Ibérica en el Baix Llobregat (Laviña et al., 2003). En las prospecciones realizadas en años posteriores en plantaciones de Extremadura, Valencia y Aragón, también se identificó el vector, principalmente en Extremadura.

Se ha estudiado el ciclo de *C.pruni* en el Baix Llobregat, realizando un seguimiento de esta especie en dos zonas de *Prunus* silvestres de la cordillera litoral, y en dos plantaciones comerciales de *P.salicina* con alta incidencia, situadas en el área agrícola próxima.

Durante cuatro años se ha seguido la presencia de *C.pruni* en *P.mahaleb* en la cordillera. Los adultos aparecen a mediados de febrero, llegando sus poblaciones a dos máximos, a finales de marzo y a principios de junio, determinándose antes y más abundantemente en la zona de muestreo más alta y soleada. En las plantaciones comerciales la especie presenta un patrón parecido, apareciendo el segundo pico ligeramente después que en *P.mahaleb*, y observándose fluctuaciones interanuales. *C pruni* fue capturada también en muestreos puntuales sobre *P.spinosa* en diferentes áreas.

El porcentaje de *C.pruni* portadores del fitoplasma osciló alrededor del 15 %. El fitoplasma fue detectado tanto en *Prunus* silvestres como cultivados. El ciclo de *C.pruni* comprende pues, su aparición en *Prunus* silvestres y cultivados en febrero (invernantes reinmigrados), desarrollo de ninfas durante la primavera (preferentemente en *Prunus* silvestres), y emigración a refugios invernales lejanos, al llegar a adultos. El hecho que el vector pueda completar su ciclo enteramente sobre huéspedes salvajes infectados, y emigrar a los cultivos con capacidad de transmisión, independientemente del manejo de las plantaciones, hace que los *Prunus* silvestres tengan un papel clave en la epidemiología del ESFY y por tanto en su posible control.

Trabajo financiado por el proyecto INIA RTA 04-0660

P-17**IDENTIFICACIÓN DE UN FITOPLASMA EN PLANTAS DE HIGUERA CON MOSAICO**

Sabaté, J.¹, Batlle, A.¹, Medina, V.² y Laviña, A.¹.

¹IRTA, Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentaries, Ctra Cabrils Km 2, 08348 CABRILS, Barcelona. ²ETSEA. Universitat de Lleida, 25198-Lleida

El mosaico de la higuera es una enfermedad ampliamente difundida en todos los países donde se desarrolla y cultiva esta planta. Estudios anteriores indican que el agente causal de esta enfermedad se transmite vegetativamente y también por el acaro *Aceria ficus* Cotte, pero no por semilla. Este síndrome ha sido atribuido a distintos virus, pero la observación de corpúsculos pleomórficos en las células del parénquima de las hojas infectadas, y referencias anteriores de fitoplasmas asociados con la enfermedad, obligan a una etiología más completa.

En este trabajo se presentan los estudios realizados para esclarecer la asociación o no del mosaico de la higuera con fitoplasmas. En el año 2004 se iniciaron prospecciones y se tomaron muestras de higueras sintomáticas y no sintomáticas, para ser analizadas mediante RT-PCR y PCR para la detección de distintos virus y fitoplasmas. Así mismo, se realizaron observaciones al microscopio electrónico de muestras de parénquima y floema.

La extracción de ADN para la detección de fitoplasmas se realizó a partir del floema de los pecíolos, de las nervaduras principales de las hojas y del tallo. La detección del fitoplasma se llevó a cabo mediante PCR-nido con los cebadores fP1/rTint y fU5/rU3 que amplifican fragmentos del gen ribosómico 16S rRNA, de 1700 pb y 800 pb, respectivamente. Así mismo, se realizó otra PCR-nido con distintos cebadores específicos de fitoplasmas del grupo X (apple proliferation), XII (stolbur) y I (Aster yellows).

Los resultados obtenidos mostraron que se producía amplificación con los cebadores universales para la detección de fitoplasmas y también con los cebadores fO1/rO1, específicos del grupo X, en las muestras de ADN procedentes de las plantas con síntomas, mientras que no se obtenía amplificación en plantas sanas obtenidas por cultivo "in vitro". La detección se obtuvo tanto en las muestras de floema de hoja como de tallo. Estos resultados se han repetido en las muestras con síntomas recogidas durante cuatro años, lo que indica que es posible que el fitoplasma este implicado en la expresión de síntomas, bien solo o en sinergismo con otros agentes infecciosos.

Actualmente se está llevando a cabo la secuenciación del producto de PCR para verificar si se trata de un fitoplasma y a que grupo taxonómico pertenece.

Trabajo financiado por el proyecto INIA RTA 04-066

P-18

INCIDENCIA DE DISTINTOS VIRUS EN EL CULTIVO DE AJO

Fernández-Marcos, S.¹, Ayllón, M.A.¹, Castillo, P.², García-Arenal, F.¹ y Fraile, A.¹

¹Centro de Biotecnología y Genómica de Plantas, Dpto. de Biotecnología, E.T.S.I. Agrónomos, Universidad Politécnica de Madrid, Ciudad Universitaria, 28040 Madrid; ²CULVIMAN, S.L.U. Ctra. Peñas de San Pedro, km 1,6, 02006 Albacete; e-mail: aurora.fraile@upm.es

El ajo (*Allium sativum* L.) constituye uno de los principales cultivos en algunas zonas castellano-manchegas de Albacete, Cuenca, Ciudad Real y Toledo, donde destacan Las Pedroñeras por su producción de ajo morado. Entre las enfermedades que afectan el cultivo del ajo destacan las causadas por virus ya que producen grandes pérdidas. El principal problema aparece cuando la infección es producida por complejos de distintos virus.

La detección temprana de virus evitaría la diseminación de los mismos entre las zonas productoras de planta (zonas de cultivo de ajos saneados) y las zonas productoras de ajo (zonas de multiplicación de ajos). Por ello en nuestro grupo, en colaboración con la empresa COOPAMAN, hemos analizado la presencia de los principales virus descritos en ajo en zonas de cultivo de ajos saneados y de multiplicación. Los virus analizados pertenecen a los grupos allexivirus (*Garlic virus A, B, C y D*, GarVA, B, C y D, virus de ajo A, B, C y D), potyvirus (*Onion yellow dwarf virus*, OYDV, enanismo amarillo de la cebolla, y *Leek yellow stripe virus*, LYSV, rayado amarillo del puerro), y carlavirus (*Garlic common latent virus*, GCLV, virus latente común del ajo, y *Shallot latent virus*, SLV, virus latente de la cebolla), y también el tospovirus, *Iris yellow spot virus* (IYSV), que se ha citado en Albacete en cultivos de cebolla y en cultivos de ajo en otros países. En este estudio se analizaron muestras, tanto de ajo blanco como de ajo morado, de distintas zonas de cultivo en las provincias de Albacete y Cuenca. Todas las muestras se analizaron mediante un test ELISA con sueros de la casa comercial DSMZ GmbH (Braunschweig, Alemania).

En los muestreos realizados se detectaron todos los virus considerados, siendo mayor su incidencia en cultivo de ajo blanco que en el de ajo morado. Los resultados obtenidos en dos campañas de cultivo se discutirán en función de la zona de cultivo y las condiciones climatológicas.

P-19

DETECCIÓN SIMULTANEA DE LOS PRINCIPALES VIRUS Y VIROIDES QUE AFECTAN A FRUTALES DE HUESO MEDIANTE LA TECNOLOGÍA DE 'POLISONDAS'

Sánchez-Navarro, J.A.¹, De la Torre, R.², Aparicio, F.¹ y Pallás, V.¹

¹Instituto de Biología Molecular y Celular de plantas, Universidad Politécnica de Valencia-CSIC, Avenida de los naranjos s/n, 46022 Valencia, España; ²FES-IZTACALA-UNAM, UBIPRO. Avenida De los Barrios 1, Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla, Estado de México. 54090. E-mail: jesanche@ibmcp.upv.es

Los frutales de hueso en España representan el 2.7% de la producción mundial ocupando el octavo lugar (FAO 2005). Este cultivo está sujeto a importantes afecciones de origen viral y/o viroidal que pueden ocasionar importantes pérdidas en el sector. Los síntomas presentan una gran variabilidad en función de la interacción virus-huésped estudiada pudiendo ocasionar bordeamientos y anillos cloróticos, anillos necróticos y mosaicos en las hojas, acortamiento y distorsión de flores, retraso en la maduración, deformación de frutos así como retrasos en el crecimiento e incluso la muerte del árbol. A diferencia de las infecciones provocadas por otro tipo de patógenos como hongos o bacterias, no existen métodos directos para el control de las enfermedades virales por lo que es importante su detección temprana para evitar su posterior propagación. Con este fin, los esfuerzos en los últimos años han ido encaminados al desarrollo de técnicas de diagnóstico lo suficientemente fiables y sensibles tales como la hibridación molecular, en donde la fusión en tándem de diferentes secuencias virales ha permitido la detección simultánea de varios virus mediante una única ribosonda o 'polisonda'.

Los principales virus y viroides que afectan a frutales de hueso son: *el virus de las manchas en anillo de los Prunus* (PNRSV), *el virus del enanismo del ciruelo* (PDV), *el virus del mosaico del manzano* (ApMV), *el virus de los arabescos del ciruelo* (APLPV), *el virus del enrollado de la hoja del manzano* (ACLSV), *el virus de la sharka* (PPV) y los viroides del *mosaico latente del melocotonero* (PLMVd) y del *enanismo del lúpulo* (HSVd). La puesta a punto de la tecnología de polisondas (Herranz y col., 2005; J. Virol. Methods 124, 49-55) ha permitido detectar, en un solo test y con la misma sensibilidad que las sondas individuales, los principales virus que afectan a frutales de hueso. En este trabajo hemos analizado la capacidad de la tecnología de polisondas para detectar simultáneamente los principales virus y viroides que afectan a frutales de hueso.

P-20**RECUPERACIÓN DEL CULTIVAR DE UVA DE TRANSFORMACIÓN
MESEGUERA EN EL CAMPO DE CARTAGENA.**

Marin, A.², Gonzalez, J.², Garcia, B.¹, Padilla, C.V.¹, Hita, I.¹, Martínez, J.J.³, Ochoa, J.³ y Padilla, V.¹.

¹Instituto Murciano de Investigación y Desarrollo Agrario y Alimentario (IMIDA)

²Universidad Politécnica Miguel Hernández (Orihuela)

³Universidad Politécnica de Cartagena
ventura.padilla@carm.es

El trabajo que se presenta plantea la recuperación del cultivar de uva para transformación Meseguera, vinífera cultivada en el Campo de Cartagena que hasta no hace muchos años tuvo una importancia considerable, originando unos caldos situados en el entorno de los vinos licorosos-rancios, dotados de una gran personalidad.

Por motivos varios, entre los que podemos destacar por un lado el auge de la agricultura de primor y con un valor añadido muy considerable (horticultura y citricultura), y por otro la “moda” de otros vinos con menos grado, más frescos, etc., comenzaron a desaparecer los viñedos de Meseguera. Tal situación nos ha llevado a elaborar un proyecto de recuperación de dicha variedad, habiendo encontrado una parcela plantada con Meseguera sobre la que actuamos con un protocolo de selección clonal sanitaria; eligiendo 114 cepas que respondían a las características genéticas de la Meseguera, y que una vez sometidas a diagnóstico frente a las virosis contempladas en la actual legislación, nos han proporcionado 33 plantas libres de GFLV, ArMV, y los tipos 1 y 3 de GLRaV. Esta situación nos lleva a incidir en este año sobre dichas cepas y someterlas a continuación al proceso de indexage biológico, con el fin de establecer una parcela de material inicial que permita disponer de planta certificada.

P-21**DETECCIÓN CUANTITATIVA DE VARIANTES AGRESIVAS Y NO AGRESIVAS DEL VIRUS DE LA TRISTEZA DE LOS CÍTRICOS CON SONDAS LNA**

Ruiz-Ruiz, S.², Moreno, P.² y Ambrós, S.¹

¹Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias-Fundac. Agroalimed, ²IVIA. Centro de Protección Vegetal y Biotecnología. Ctra Moncada-Náquera Km.4.5, 46113 Moncada, Valencia. Email: sruiz@ivia.es

Los aislados del virus de la tristeza de los cítricos (CTV) difieren ampliamente en el tipo e intensidad de síntomas que inducen. Para evitar sus daños se necesitan métodos sensibles y rápidos que detecten los aislados potencialmente más agresivos que contienen variantes de secuencia asociadas con la producción de acanaladuras en la madera de pomelo o naranjo dulce (SP). Recientemente, hemos desarrollado un protocolo de RT-PCR cuantitativa (qRT-PCR) que estima la acumulación de RNA genómico de CTV aunque no permite identificar genotipos específicos. Para el diagnóstico inequívoco de aislados potencialmente peligrosos hemos desarrollado un nuevo sistema de qRT-PCR usando tres sondas TaqMan con nucleótidos modificados (sondas LNA) que detectan específicamente variantes de secuencia características de los aislados poco agresivos (asintomáticos o que sólo causan síntomas en huéspedes o combinaciones sensibles) (sonda NA), de los aislados muy agresivos (sonda SP) o de los aislados moderadamente agresivos tipo T36 (sonda T36). La detección con cada sonda fue muy reproducible y específica con un límite de detección de 10^2 copias. Las sondas se validaron con 55 aislados de CTV de distintos orígenes geográficos y características patogénicas y todos ellos reaccionaron con al menos una de las sondas pero ninguno con las tres. Los aislados poco agresivos sólo reaccionaron con la sonda NA, mientras que la reacción de los agresivos fue más diversa: un 32% reaccionó sólo con la sonda SP, un 7.1% sólo con la sonda T36 y el 60.9% restante lo hizo con dos sondas (43% con SP+NA, 14.3% con NA+T36 y 3.6% con SP+T36), indicando la presencia en estos últimos aislados de dos tipos de variantes, según se pudo confirmar secuenciando los amplicones. El 96% de los aislados que reaccionaron con la sonda SP inducen SP, por lo que la reacción con las sondas SP y NA con el protocolo desarrollado permite la discriminación temprana y fiable entre aislados poco agresivos y aquellos que pueden ser potencialmente peligrosos por contener en su población variantes del tipo SP.

P-22**DISEÑO DE UN TEST RÁPIDO PARA EL DIAGNÓSTICO CUANTITATIVO DE LOS AISLADOS DE *Parietaria mottle virus* (PMoV) DE TOMATE Y PIMIENTO MEDIANTE PCR A TIEMPO REAL EN UN SOLO PASO**

Segundo, E.¹, Lozano, G.² y López Pedrosa, A.A.²

¹IFAPA-Almería, Autovía del Mediterráneo km 420, 04745 La Mojonera;

²Savia Biotech, Avenida Sudamérica, Urbanización Roquetas de Mar, 04740 - Roquetas de Mar, Almería

Parietaria mottle virus (PMoV) infecta a dos de los principales cultivos de solanaceas, pimiento y tomate. La primera detección de PMoV en España fue en la región oriental de Cataluña en el año 2001 (Aramburu *et al*, 2001). Hasta ese momento, PMoV solamente había sido aislado de cultivos de tomate en Italia, Francia, Grecia y España (Ramasso *et al*, 1997; Marchoux *et al*, 1999; Roggero *et al*, 2000; Aramburu, 2001), sin embargo, en cultivos de invernadero, al Sureste de Almería, Janssen *et al*. describen en el año 2005 el pimiento como un nuevo hospedador de PMoV, obteniendo una secuencia parcial del aislado de PMoV que infecta a pimiento, la cual posee 97% de identidad aminoacídica con los aislados de tomate. Debido a la importancia económica de los cultivos que son infectados por este virus, se hace imprescindible la elaboración de metodologías que nos permitan el diagnóstico precoz, rápido y sensible de éste de la forma más eficaz. Por ello, en este trabajo hemos desarrollado una herramienta para la detección eficiente de los aislados de tomate y pimiento disponibles de PMoV. Este método de detección combina la transcripción reversa con la PCR en Tiempo Real, usando la química del SYBR[®] Green y todo ello en un solo paso, lo que acorta los tiempo de análisis considerablemente. El método se desarrolló usando cebadores específicos diseñados sobre la secuencia nucleotídica conservada tanto de los aislados de tomate, como del aislado de pimiento de PMoV disponibles en el GenBank. Obtuvimos un amplicón único y del mismo tamaño (confirmado en electroforesis de gel de agarosa) en la curva de melting, tanto en las muestras de tomate como de pimiento infectadas por el virus, lo cual fue confirmado posteriormente por secuenciación. Concluyendo, hemos desarrollado un método de diagnóstico más rápido y sensible que los métodos convencionales disponibles como el de hibridación molecular, con un uso inmediato en el diagnóstico rutinario a gran escala. Además, el uso de la tecnología de Tiempo Real nos permite cuantificar la carga vírica de los diferentes individuos, lo cual puede ser de gran utilidad en el rastreo de plantas sensibles o resistentes al virus en procesos de mejora genética, interacción virus-vector y otras aplicaciones.

P-23**LA MANCHA BACTERIANA DEL CHAMPIÑÓN: IDENTIFICACIÓN DEL AGENTE CAUSAL, VALORACIÓN DE DAÑOS Y MEDIDAS DE CONTROL**

Gea, F.J.¹, Navarro, M.J.¹ y González, A.J.²

¹Centro de Investigación, Experimentación y Servicios del Champiñón (CIES), 16220 Quintanar del Rey (Cuenca); ²Laboratorio de Fitopatología. Servicio Regional de Investigación y Desarrollo Agroalimentario (SERIDA), 33300 Villaviciosa. Asturias. E-mail: fjgea.cies@dipucuenca.es

La mancha bacteriana se puede manifestar a lo largo de todo el año en las explotaciones de cultivo de champiñón, aunque su incidencia es mayor durante las estaciones de primavera y otoño, debido a que se registra una mayor amplitud térmica y las precipitaciones suelen ser más abundantes.

La enfermedad se presenta en forma de manchas en el sombrero del champiñón que varían entre el color pardo-amarillento y pardo-oscuro, pueden ser pequeñas (1-4 mm de diámetro) o bien cubrir la práctica totalidad del sombrero, e incluso llegar a ocasionar lesiones ligeramente cóncavas. Estos daños deterioran la calidad del producto, lo que hace casi imposible su comercialización.

Para identificar el agente causal se tomaron muestras de champiñón con síntomas, que se procesaron mediante dislaceración de los tejidos afectados y posterior siembra en medio general King B. Las placas se incubaron a 25°C. De todas las muestras analizadas se obtuvieron aislamientos cuyas características fenotípicas coincidieron con las de *Pseudomonas tolaasii* (Gram negativa, fluorescente, oxidativa, levano -, oxidasa +, patata -, arginina +, tabaco -). Para confirmar la identificación de este patógeno, se amplificó y secuenció el ADNr 16S de dos de los aislamientos. Las secuencias de ambos fueron idénticas entre sí y presentaron una similitud del 99% con las depositadas en bases de datos correspondientes a *P. tolaasii*.

Se ha realizado el seguimiento de 4 ciclos de cultivo desarrollados entre los años 2006-2008, en los que se ha valorado la producción total y por floradas de champiñón sano, la pérdida de rendimiento debida a la mancha bacteriana y la influencia de las condiciones medioambientales (temperatura, humedad relativa, evaporación) del local de cultivo en la aparición de esta enfermedad. Las pérdidas de rendimiento por mancha bacteriana se han situado entre el 3-10% de la producción total, siendo la segunda florada la que aparece más afectada. También se ha observado que el descenso del nivel de evaporación favorece la aparición de mancha bacteriana. En este sentido, se proponen una serie de recomendaciones dirigidas a controlar la enfermedad mediante el adecuado manejo del riego y posterior secado de los champiñones.

P-24**ESTUDIO DE LA TRANSMISIÓN POR SEMILLA DE LA BACTERIOSIS CAUSADA POR *Erwinia persicina* EN JUDÍA (*Phaseolus vulgaris*, L.)**

Marín, F.J., Martínez, S., Sáez, M., Santos, M., Diáñez, F., Carretero, F.J., García-Alcázar, M. y Tello, J.C.

Departamento de Producción Vegetal. Universidad de Almería. Cañada de San Urbano, s/n. 04120. Almería. E-mail: *fmarin@hotmail.com*.

En 2004 se llevó a cabo el aislamiento de la bacteria fitopatógena *Erwinia persicina* a partir de cultivos de judía variedad "Donna" del sureste español afectados por una patología desconocida, basada en la aparición de manchas cloróticas y necróticas en hojas y deformación de las vainas. Esta extraña patología lleva asociada una reducción de la producción de hasta un 50 % y desde entonces se ha manifestado la enfermedad a lo largo de estos años. Dada la importancia económica de este cultivo en el sureste español, se hizo necesario la realización de ensayos encaminados a determinar si la bacteriosis causada por *E. persicina* se transmite por semilla.

Para ello, se utilizaron semillas comerciales de la variedad "Donna". Asimismo, y a fin de comprobar la transmisión del patógeno en plantas enfermas, se obtuvieron semillas de resiembra procedente de varias plantas afectadas de una explotación del T.M. de El Ejido. De ambos tipos de semillas, se tomaron 120 unidades que fueron pregerminadas, sembradas y cultivadas de manera separada, en cámara de cultivo con condiciones controladas de temperatura, humedad relativa y fotoperiodo, a fin de determinar si sobre las plantas resultantes se reproducía la sintomatología. De cada una de estas semillas se tomaron los tegumentos y los cotiledones, tras la pregerminación y germinación, respectivamente. Ambos tejidos fueron analizados mediante la técnica serológica del DAS-ELISA y PCR para comprobar así la presencia/ausencia del patógeno.

Por otro lado, uno de los cotiledones de cada planta fue desinfectado, macerado y sembrado en medio YCG, a fin de obtener los distintos aislados bacterianos presentes en las muestras. Posteriormente, se determinó la patogeneicidad de los aislados obtenidos mediante la reacción de hipersensibilidad en plantas de tabaco (Klement et al., 1964) y se aplicaron técnicas como la tinción de Gram y el test API 20 E para determinar sus características bioquímicas y su similitud con las de *E. persicina*. Finalmente, se llevó a cabo el diagnóstico mediante la técnica serológica DAS-ELISA y PCR. Por último, se inocularon algunos aislados obtenidos sobre plantas de judía, para demostrar el 3^{er} Postulado de Koch-Pasteur. Los resultados demuestran la transmisión de esta enfermedad por semilla.

P-25**PRESENCIA DE *Erwinia persicina* EN SUELOS CULTIVADOS CON JUDÍA BAJO INVERNADERO**

Sáez, M., Santos, M., Diáñez, F., Martínez, S., Marín, F., García-Alcázar, M., Miñano, J., de Cara, M. y Tello, J.C.

Departamento de Producción Vegetal. Universidad de Almería. Carretera de Sacramento s/n. La Cañada de San Urbano, Almería 04120.

msantos @ual.es

En los últimos años ha surgido en el cultivo de judía bajo invernadero una patología de etiología desconocida que se manifiesta con los siguientes síntomas: clorosis internerviales en hojas y necrosis, abollonadura de las mismas, deformación de las vainas de la judía y disminución de la producción de judía, cuyo agente causal de la enfermedad es una bacteria del género *Erwinia*.

A partir de muestras de suelo y raíz de un invernadero comercial de la población de Pampanicos, El Ejido (Almería); se realizaron diferentes análisis para determinar la presencia de esta bacteria en el suelo. Se procedió de dos formas. Primeramente se realizó un ensayo en suelo, en condiciones controladas y de esterilidad, para ver si la bacteria estaba presente en el suelo. Para ello se tomaron 10 muestras de suelo, con 4 repeticiones por cada una, además de colocar los correspondientes testigos (sin suelo). Por cada muestra se peso una cantidad de suelo en proporción 1:6 respecto a la vermiculita estéril que se empleo como medio de cultivo. Se sembraron semilla de *Phaseolus vulgaris* var. Donna y Helda y se anotaron los síntomas observados además del porcentaje de germinación de las semillas. Se tomaron muestras de hojas de ambas variedades para su análisis mediante técnica DAS-ELISA.

En segundo lugar a partir de 19 muestras de raíz se aisló la presencia de la bacteria en el interior de la planta. Para ello se cultivaron en medio YGC 5 trozos de raíz de aproximadamente 1cm de longitud, previamente desinfectados en lejía al 2% durante 2 minutos, tanto en siembra directa, es decir, los trozos directamente en el medio; como a partir del macerado de raíz en agua. Los aislados bacterianos obtenidos se identificaron posteriormente.

Se identificaron 4 tipos de bacterias *Pseudomonas putida*, *Bacillus circulans*, *Pseudomonas kosensis* y *Enterobacter hormaechei*, no dando ningún tipo de sintomatología las inoculaciones realizadas con estas bacterias. En cuanto al ensayo de suelo a pesar de observarse clorosis internerviales en la primera hoja verdadera, no se pudo identificar la presencia de la bacteria en las muestras de hojas tomadas en la cámara.

P-26**PATOLOGÍA EN LOS CULTIVOS DE JUDÍA VERDE DEL SURESTE ESPAÑOL**

Santos, M., Martínez, S., Diánez, F., Marín, F., Sáez, M., García-Alcázar, M. y Tello, J.C.

Departamento de Producción Vegetal. Universidad de Almería. Carretera de Sacramento s/n. La Cañada de San Urbano, Almería 04120.

msantos@ual.es

A finales del año 2003 se observó en los cultivos de judía verde del sureste español una patología desconocida la cual comenzaba manifestándose con un ligero amarillamiento internervial que se iba acentuando progresivamente adquiriendo una tonalidad dorada que finalmente acababa necrosando las hojas manteniendo los nervios verdes. Además, los frutos se mostraban deformes, “enganchillados”, presentando las semillas muy marcadas, lo que provocaba su difícil comercialización.

La importancia de este cultivo radica en que España es el principal productor de judía para consumo en fresco dentro de la Unión Europea, estando la producción concentrada principalmente en las provincias de Almería, Málaga y Granada, por esta razón, se vió la necesidad de comenzar distintos estudios que pudiesen determinar el agente causal de citada enfermedad.

La realización del ensayo tubo lugar a partir de muestras de judía prospectadas en la campaña 2007 en 3 invernaderos diferentes ubicados en la localidad de Pampanicos, perteneciente al T. M. El Ejido (Almería) donde se había cultivado de forma reiterada judía de enrame y en los que había aparecido citada patología de forma generalizada los últimos años, provocando una disminución de la producción de mas del 50%. Una vez desinfectadas las muestras, se aislaron independientemente los distintos aislados bacterianos obtenidos en medio YGC y se procedió a la identificación de los mismos mediante el estudio de sus características bioquímicas a traves de diferentes técnicas tales como la tinción Gram, test API así como la técnica serológica DAS-ELISA, identificando de forma mayoritaria la bacteria fermentativa *Erwinia persicina*, corroborando los resultados obtenidos mediante PCR mediante la amplificación directa por y secuenciación del gen 16S rRNA de las cepas analizadas.

Para comprobar los postulados de Koch – Pasteur, se hizo crecer la bacteria en medio king B líquido hasta obtener del orden de 10^8 cfu/ml en la escala de McFarland y se realizaron pulverizaciones de la suspensión bacteriana sobre el envés de hojas de plántulas sanas de judía. Una vez inoculadas se cubrieron con bolsa de plástico transparente durante 48 horas. Transcurrido este tiempo, se retiraron las bolsas, se observaron los síntomas durante 50 días y se tomaron muestras de las plantas enfermas. Todas las muestras inoculadas mostraron la sintomatología característica observada en el campo.

P-27

***Erwinia persicina* ASOCIADA A LOS CULTIVOS DE TOMATE Y MELÓN EN EL SUDESTE ESPAÑOL**

González, A.J.¹, González-Varela, G.¹ y Tello, J.²

¹Laboratorio de Fitopatología, Servicio Regional de Investigación y Desarrollo Agroalimentario (SERIDA), carretera de Oviedo s/n, 33300 Villaviciosa. Asturias. ²Escuela Politécnica Superior, Universidad de Almería. e-mail: anagf@serida.org

E. persicina se encontró en España por primera vez en 2004 en cultivos de judía verde y posteriormente en guisante (cv. *Tirabeque*). Esta bacteria había sido descrita como patógena de judía en EEUU (1981) y asociada a tomate, banana y pepino en Japón (1990).

Durante los años 2006-2008 se han analizado 25 muestras de tomate procedentes del sudeste español para determinar la presencia de bacterias fitopatógenas. Las muestras, que presentaban manchas en hojas y tallos, se procesaron mediante dislaceración de los tejidos y posterior siembra en medio general King B. De ellas se han aislado bacterias con características correspondientes a *E. persicina* en el 16% de las muestras analizadas, todas ellas del año 2006. La identificación de la bacteria se corroboró mediante la secuenciación del ADNr 16S en un aislamiento de cada muestra encontrándose una similitud del 99% con las depositadas en bases de datos correspondientes a *E. persicina*. Para conocer su poder patógeno se utilizaron dos aislamientos para inocular plántulas de tomate mediante pulverización de una suspensión bacteriana correspondiente al cultivo de una noche (aproximadamente 10^8 ufc/ml), cubriendo las plántulas con bolsas de plástico transparentes durante 48 h. Las plántulas se mantuvieron en cámara climática con fotoperíodo de 16 h día, humedad del 80% y temperatura de 25°C. Los síntomas fueron manchas foliares y una producción de raíces adventicias poco usual por la cantidad y tamaño de las mismas. Muy pocas plantas produjeron fruto, aunque no murieron.

En 2007 se analizaron cuatro muestras de melón de similar procedencia que presentaban manchas foliares y decoloraciones en zonas internerviales que llegaban a empardecer y podían causar la podredumbre total de las hojas. En tres de ellas había frutos pequeños en los que se observaban manchas acuosas y podredumbres. Las muestras se procesaron tal como se describió anteriormente para las de tomate y en este caso en las cuatro muestras se aisló *E. persicina*. Además de realizar pruebas fenotípicas, se llevó a cabo la secuenciación del ADNr 16S para corroborar su identificación y se obtuvo una similitud del 99% con las secuencias depositadas en bancos de datos correspondientes a dicha especie. Se reprodujeron los síntomas observados mediante inoculaciones siguiendo la metodología ya descrita anteriormente. Por tanto, podemos decir que se ha podido asociar la bacteria *E. persicina* a muestras de tomate y melón procedentes del sudeste español.

P-28

**BACTERIAS DEGRADADORAS DE TEJIDOS VEGETALES ASOCIADAS
A PLANTAS DE *Posidonia oceanica***

Águila-Clares, B.¹, Ordax, M.¹, Garcías-Bonet, N.², Marbà, N.², Duarte, C.M.², López, M.M.¹ y Marco-Noales, E.¹

¹IVIA, 46113 Moncada (Valencia). ²IMEDEA (CSIC-UIB), Esporles (Islas Baleares). E-mail: marco_est@gva.es

Posidonia oceanica (L.) Delile es una angiosperma marina que forma extensas y productivas praderas a lo largo de toda la costa del Mediterráneo. Este ecosistema tiene un importante papel ecológico debido a su alta producción primaria, la gran variedad de fauna y microbiota asociada, y a que constituye una barrera para prevenir la erosión costera. Las praderas de *P. oceanica* están en regresión en el Mediterráneo, debido probablemente a una combinación de factores físico-químicos, consecuencia de la actividad humana y de fenómenos naturales. Aunque hasta el momento no se ha estudiado el papel de posibles patógenos, éstos podrían contribuir de algún modo a la mortalidad que se observa en las plantas.

En este estudio se han aislado y caracterizado cepas bacterianas a partir de distintos tejidos de *P. oceanica* (rizoma, raíz y hoja). Las plantas procedían de diferentes praderas de las Islas Baleares con distintos índices de mortalidad, pero no presentaban una sintomatología clara. Varios de los aislados mostraron actividades enzimáticas de interés, relacionadas con la degradación de tejidos de la planta, como el almidón, la celulosa y la pectina. Los aislados del género *Pseudoalteromonas* fueron los que degradaron el almidón en mayor proporción, seguidos de los de *Vibrio* spp. y *Alteromonas* spp. Algunas cepas, especialmente relevantes, mostraron más de una de las tres actividades ensayadas. Un elevado porcentaje de aislados de *Alteromonas* spp. (75%) y un porcentaje importante de aislados de *Pseudoalteromonas* spp. (20%) fueron capaces de degradar también agar. Se han seleccionado 25 cepas, con el objetivo de evaluar su patogenicidad en material vegetal, pues debido a su potencial enzimático podrían influir en el estado sanitario de la planta, causando erosiones o pequeñas lesiones que pueden hacer la planta de *P. oceanica* más susceptible a determinados tipos de estrés ambiental.

P-29**MARCHITEZ DE PLANTAS INJERTADAS DE TOMATE: EFECTO DE PEPMV O INCOMPATIBILIDAD**

Guerrero, M.M.¹, Martínez, M.A.¹, Martínez, M.C.¹, Contreras, J.², Contreras, J.A., Fernández, J.A.², Martínez, J.A.², Lacasa, A.¹ y Bielza, P.²

¹Biotecnología y Protección de cultivos, IMIDA, C/ Mayor s/n 30.150 La Alberca (Murcia) mariam.guerrero@carm.es

²Producción Vegetal, ETSIA, UPCT. Paseo Alfonso XIII, s/N 30.203 Cartagena (Murcia)

El virus del mosaico del pepino dulce (PepMV) produce, en condiciones climáticas y fenológicas concretas, un marchitamiento en las plantas de tomate que puede ser pasajero y reversible o continuado, y, en este caso originar el colapso o la muerte súbita. El injerto se ha mostrado como la forma más eficaz de paliar estos efectos del PepMV, aunque en algunos patrones se presentan marchitamientos reversibles. Desde la campaña 2004-2005 se han venido presentando casos de combinaciones variedad/patrón, donde los marchitamientos han sido ocasionalmente más acentuados de lo habitual llegando a desecarse toda la parte de la planta o a provocar pérdidas de cosecha, lo que suscitaba dudas sobre la posibilidad de incompatibilidad variedad/patrón o sobre la manifestación del virus. Se han realizado inoculaciones con diferentes aislados de PepMV, en condiciones controladas y en invernaderos a plantas de Boludo no injertadas e injertadas sobre los patrones Beaufort, Maxifort, Big Power, King Kong, WS-4103. Un 10% de las plantas inoculadas y no injertadas sufrieron colapso y más de 80% presentaron marchitamientos reversibles, ninguna de las injertadas e inoculadas presentó síntomas de colapso y la proporción de las que presentaron marchitez reversible varió entre el 54% y el 20% según el patrón. No se presentaron marchitamientos en las plantas no inoculadas (injertadas o sin injertar) ni en las del patrón Beaufort inoculadas. Similares resultados se obtuvieron en condiciones controladas, donde el porcentaje de plantas marchitas varió también con el aislado del virus utilizado.

P-30

EVALUACIÓN DE LA SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD DE UN PROTOCOLO DE PCR PARA EL DIAGNÓSTICO DE *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni*.

Peñalver, J.¹, Quesada, J.M.¹, Roselló, M.², Llop, P.¹, Morente, M.C.¹, López M.M.¹

¹Departamento de Protección Vegetal y Biotecnología. Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA). Ctra. Moncada-Náquera km 4.5, 46113, Moncada, Valencia. E-mail: penyalver_jav@gva.es

²Laboratorio de Diagnóstico, Generalitat Valenciana, Ctra. Alicante-Valencia, km 276.5, 46460, Silla, Valencia. E-mail: rosello_monper@gva.es

La mancha bacteriana de los frutales de hueso está causada por *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni* (antes *X. campestris* pv. *pruni*), patógeno de cuarentena en la UE. Los síntomas característicos de esta bacteriosis son la aparición de lesiones en frutos, hojas y ramas. La enfermedad puede ocasionar pérdidas cuantiosas, ya que los frutos afectados no tienen valor comercial y también puede provocar severas defoliaciones y debilitamiento del árbol. La mancha bacteriana se detectó por primera vez en España en 2001 en Extremadura y posteriormente se ha detectado también en la Comunidad Valenciana. En el protocolo EPPO para el diagnóstico de la enfermedad sólo se incluye el aislamiento de la bacteria causante y no hay ningún método molecular validado.

Por ello, para evaluar la sensibilidad y especificidad de un método de detección de *X. arboricola* pv. *pruni* mediante PCR, se utilizaron los iniciadores Y17CoF e Y17CoR (Pagani, 2005) con el protocolo descrito por dicho autor con diversas modificaciones. La sensibilidad de las variantes de PCR ha sido evaluada tras extracción del ADN en extractos de hojas de almendro, albaricoquero, ciruelo e híbrido GF-677 conteniendo diferentes concentraciones bacterianas y también con muestras vegetales sanas y naturalmente infectadas. Para la evaluación de la especificidad de los distintos protocolos se seleccionaron 99 cepas de *X. arboricola* pv. *pruni*, 15 bacterias fitopatógenas de distintas especies y muestras vegetales naturalmente infectadas.

Se observó que el mejor nivel de sensibilidad se obtuvo en los extractos de hojas de almendro con un protocolo optimizado y que pueden existir diferencias de varios órdenes de magnitud según la variante empleada. Con dicho protocolo se obtuvo también una alta especificidad ya que amplificaron todas las cepas de *X. arboricola* pv. *pruni* ensayadas y ninguna de las otras especies. Además, los resultados de los análisis de las muestras vegetales naturalmente infectadas han confirmado la validez del método optimizado y la correlación obtenida con los resultados del aislamiento de la bacteria, según el protocolo EPPO.

P-31**DETERMINACIÓN DE *STREPTOMYCES* SPP. EN EL CULTIVO DE PATATA EN GALICIA**

Abelleira, A., Aguín, O., Montenegro, D. y Mansilla J.P.

Estación Fitopatológica do Areeiro. Deputación de Pontevedra. Subida a la Robleda s/n 36153 Pontevedra. E-mail: aabelleira@efa-dip.org

La sarna común es una de las enfermedades más importantes en el cultivo de la patata a nivel mundial, causada por especies del género *Streptomyces* entre las que destacan *S. scabiei*, *S. acidiscabies* y *S. turgidisdiscabies*. En este trabajo se pretende conocer la especie o especies que puedan estar implicadas en el desarrollo de esta enfermedad en la Comunidad Autónoma Gallega. Para lo cual se han recogido muestras de diferentes lotes de patatas con síntomas de sarna común suministradas por el Consejo Regulador de la I.G.P. "Patata de Galicia" cuya sede está en Xinzo de Limia (Ourense). Según el tipo de lesión que presentaban, los síntomas se clasificaron en lesiones profundas, que podían ser cóncavas o protuberantes y lesiones superficiales, aisladas o reticuladas.

Todas las muestras fueron sembradas en el medio de cultivo Agar Agua para el aislamiento de colonias típicas de *Streptomyces*. Para la caracterización morfológica y fisiológica las colonias se sembraron en los medios recomendados por el Internacional *Streptomyces* Project (ISP).

La identificación molecular se llevó a cabo mediante PCR y secuenciación de diferentes regiones del ADN. La extracción de ADN se realizó a partir directamente de las lesiones de la patata o de colonias aisladas en medios de cultivo. Para la detección de los genes *txtAB*, responsables de la patogenicidad en la mayoría de especies de *Streptomyces*, se utilizaron los cebadores Stx1a y Stx1b, que amplifican una región de 402 pb.

Para todo tipo de lesiones se aislaron colonias con morfología típica de *Streptomyces* spp. La caracterización molecular detectó la presencia de las thaxtominas a/b en las lesiones profundas y en las superficiales reticuladas de patata así como en algunas colonias aisladas, a partir de esas lesiones, que son las cepas que se han seleccionado para su posterior estudio. Hasta el momento, los datos obtenidos en la caracterización morfológica y molecular de las colonias seleccionadas, no coinciden totalmente con las descritas para las especies de *Streptomyces* más comunes implicadas en el desarrollo de la sarna común de la patata. Es necesario continuar con estas investigaciones para lograr la identificación de las especies patógenas de *Streptomyces* presentes en Galicia.

P-32

AISLAMIENTO, IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* A PARTIR DE UNA COLECCIÓN INTERNACIONAL DE SEMILLAS DE JUDÍA, SOJA Y CAUPÍ

Izuriaga, C., Martínez-Bilbao, A. y Murillo, J.

Laboratorio de Patología Vegetal, Dpto. Producción Agraria, ETS Ingenieros Agrónomos, Universidad Pública de Navarra, 31006 Pamplona; E-mail: jesus.murillo@unavarra.es

Pseudomonas syringae pv. *phaseolicola* (*Pph*) es el agente causal de la grasa de la judía (*Phaseolus vulgaris* L.), una de las enfermedades de mayor importancia económica en este cultivo especialmente en zonas de clima templado. Este patógeno se transmite principalmente por semilla y su control es difícil, siendo las medidas más efectivas la utilización de semilla sana y de variedades con resistencia genética. Sin embargo, estas medidas de control presentan problemas debido a la estructura genética de las poblaciones del patógeno y a que los métodos más sensibles para la identificación de *Pph* están basados en la detección por PCR de secuencias de DNA implicadas en la biosíntesis de la faseolotoxina, y no identifican los aislados no toxigénicos que carecen de esta región y que también producen la enfermedad. Así es necesario conocer la importancia y distribución de las cepas de *Pph*, tanto como la existencia de cepas no toxigénicas en otros lugares del mundo. Para ello se analizaron un total de 80 muestras de semillas de judía originarias de Europa (31), Asia (21), África (4), América (20) y Oceanía (4), así como 10 muestras de soja y caupí. De cada muestra estudiada se aislaron colonias bacterianas individuales en medios semiselectivos y la identificación de cepas de *Pph* se llevó a cabo mediante las pruebas LOPAT, diversos tests bioquímicos, tests de patogenicidad y PCR con cebadores específicos para cepas toxigénicas y no toxigénicas. En tres de las muestras (Australia, Colombia y Uruguay), se identificó la presencia de aislados de *Pph* no toxigénicos, mientras que en otras dos (Bulgaria y Polonia), se obtuvieron aislados toxigénicos. Estos resultados ponen de manifiesto la existencia de cepas de *Pph* no toxigénicas en diversos países, por lo que se hace necesario desarrollar métodos de diagnóstico y detección apropiados que detecten la presencia de grupos de *Pph* con importancia epidemiológica que permitan la certificación de semilla sana libre de *Pph*.

P-33**ESTRATEGIAS Y PROBLEMAS PARA LA SECUENCIACIÓN DEL
COMPLEMENTO DE PLÁSMIDOS DE *Pseudomonas savastanoi* pv.
savastanoi NCPPB3335**

Murillo, J.¹, Pérez-Martínez, I.², Sundin, G.W.³, Bardají, L.¹ y Ramos, C.²

¹Dept. Producción Agraria, ETSI Agrónomos, Universidad Pública de Navarra, Pamplona; ²Dept. Biología Celular, Genética y Fisiología, Facultad de Ciencias, Universidad de Málaga, Málaga; ³Dept. Plant Pathology, Michigan State University, East Lansing, MI, EE.UU. email: crr@uma.es

Pseudomonas savastanoi pv. *savastanoi* NCPPB3335 es una bacteria modelo para el estudio de las bases moleculares de la producción de tumores en plantas leñosas. Normalmente, las cepas de esta especie y especies relacionadas contienen uno o más plásmidos nativos que, con frecuencia, portan genes de relevancia en el ciclo de vida de la bacteria. Por ello, y como parte de un proyecto de genómica más amplio, hemos acometido la secuenciación de los tres plásmidos nativos presentes en la cepa NCPPB3335: pPsv48A (73 Kb), pPsv48B (45 Kb) y pPsv48C (44 Kb). Inicialmente, el plásmido pPsv48A fue purificado y se secuenció siguiendo una estrategia de secuenciación tipo shotgun. Los contigs resultantes no cubrieron el plásmido en su totalidad y no pudieron ensamblarse en una estructura cerrada debido a la presencia de un gran número de secuencias repetidas, que incluyen al menos tres copias de un gen hipotético conservado de gran tamaño (8 kb) y varias copias de al menos tres secuencias de inserción. Del análisis de la secuencia, sin embargo, pudimos deducir en parte el contenido génico del plásmido, que incluye genes de replicación, de transferencia, un gen de biosíntesis de citoquininas y un gen de efectores. Con el fin de minimizar los problemas derivados de la existencia de secuencias repetidas, presentes también en los otros dos plásmidos, hemos abordado la secuenciación mediante una estrategia mixta que implica la purificación separada de cada plásmido, mediante la obtención de derivados marcados con un transposón y su propagación en cepas libres de plásmidos; la clonación de fragmentos de restricción específicos y su secuenciación mediante primer walking (Sanger), y el ensamblaje de las secuencias mediante PCR, utilizando cebadores diseñados con las secuencias terminales de los fragmentos de restricción. En algunos casos, y por la cantidad de DNA repetido presente en algunos fragmentos de restricción, ha sido necesario abordar otras aproximaciones para la secuenciación completa de los mismos. Se discutirán otros problemas encontrados con esta estrategia y las soluciones aportadas, así como el análisis del contenido génico de los tres plásmidos.

P-34**DETECCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE UNA CEPA DE *Ralstonia solanacearum* SIN CRECIMIENTO EN MEDIO SMSA. IDENTIFICACIÓN DEL INHIBIDOR Y PROPUESTA DE MODIFICACIÓN DEL MEDIO.**

Palomo, J.L.¹, García-Benavides, P.¹, Álvarez, B.², Morente, C.² y López, M.M.²

¹Centro Regional de Diagnóstico, Junta de Castilla y León. Apdo. 61, 37080 Salamanca. ²Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias. Ctra. Moncada a Náquera, Km 4,5. 46113 Moncada (Valencia). E-mail: palgomjo@jcy.es.

Ralstonia solanacearum, bacteria de cuarentena incluida en la lista A2 de la Unión Europea (Directiva 2000/29/CE), causa marchitez y podredumbre parda en patata. En los últimos años se han detectado algunos focos de esta enfermedad, tanto en España como en otros países europeos. Para su control preventivo se realizan prospecciones oficiales con el fin de detectar y erradicar posibles focos (Directiva 98/57/CE). El diagnóstico en laboratorio tiene como una prueba básica el aislamiento en medio selectivo SMSA.

En 2007 se analizó una muestra procedente de Torquemada (Palencia) con resultado positivo en inmunofluorescencia para *R. solanacearum*, pero con resultado negativo en aislamiento en SMSA. El resultado positivo se confirmó mediante PCR, pero fue imposible aislar la bacteria en SMSA, incluso en tubérculos con síntomas claros. Sin embargo, *R. solanacearum* se aisló sin problemas en medio LPGA, lo que puso de manifiesto la sensibilidad de esta cepa (CRD 07/C71) a algún componente del SMSA. Este hecho resulta preocupante ya que siguiendo la metodología oficial el aislamiento selectivo puede utilizarse como prueba discriminadora en algunos laboratorios.

La cepa CRD 07/C71 se ha caracterizado bioquímica, serológica (inmunofluorescencia, ELISA-DASI) y molecularmente (PCR, co-PCR, Real Time-PCR), coincidiendo todos los resultados con los obtenidos para otras cepas de *R. solanacearum*. La cepa pertenece al biovar 2 y su patogenicidad se ha comprobado mediante inoculación en planta de tomate. La caracterización molecular se ha completado mediante rep-PCR.

Para identificar el componente del medio que impide el crecimiento, se sembró la cepa en medio base de SMSA con cada uno de los inhibidores, comprobando que se inhibía en presencia de cristal violeta y cloranfenicol a las concentraciones de dicho medio. La concentración mínima inhibitoria (CMI) se estimó utilizando diferentes concentraciones de cloranfenicol y cristal violeta. La inhibición de crecimiento de la cepa 07/C-71 se inició a partir de una concentración de 1 mg/l de cloranfenicol y de 1,15 mg/l de cristal violeta. Se ha estudiado la interacción de ambos inhibidores, recomendando una modificación del medio que permita el crecimiento de esta cepa y de otras con características similares.

P-35***Pseudomonas phaseolicola* EN MALAS HIERBAS ASOCIADAS AL CULTIVO DE LA JUDÍA TIPO GRANJA ASTURIANA**González, A.J.

Laboratorio de Fitopatología, Servicio Regional de Investigación y Desarrollo Agroalimentario (SERIDA), carretera de Oviedo s/n, 33300 Villaviciosa. Asturias. E-mail: anagf@serida.org

El cultivo de la judía tipo granja asturiana es un importante recurso que complementa las rentas de los agricultores asturianos. La bacteria *Pseudomonas phaseolicola*, agente causal de la enfermedad conocida como “grasa de la judía”, se aisló en Asturias en 1996 en muestras de campo de la zona occidental y desde esa fecha, la enfermedad ha ido extendiéndose por esa zona teniendo mayor o menor presencia dependiendo de las condiciones climatológicas. Esta bacteria se transmite por semilla y nos interesaba conocer si afectaba también a las malas hierbas que siempre acompañan al cultivo de la judía. Para ello se recogieron muestras en fincas afectadas por grasa, que consistieron en vainas con síntomas de la enfermedad y diferentes malas hierbas asociadas al cultivo, alguna de las cuales también mostraba síntomas de enfermedad.

Tanto las vainas como las malas hierbas se analizaron para presencia de la bacteria mediante dislaceración de los tejidos y siembra en medio King B. La identificación de las bacterias aisladas se realizó mediante pruebas fenotípicas que incluían gram (-), fluorescencia (+), pruebas LOPAT (+---+), test de oxidación-fermentación de la glucosa (oxidativa), hidrólisis de la esculina (-), gelatina (-) y caseína (-), y utilización de diversos compuestos como única fuente de carbono como manitol (-), sorbitol (-), mio-inositol (-), eritritol (-) y sacarosa (+). También se realizó una determinación genética mediante PCR para detectar la presencia de los genes responsables de la producción de la faseolotoxina.

Se ha podido aislar la bacteria en todas las vainas analizadas a excepción de las que ya estaban secas. En cambio, la bacteria sólo se aisló en tres muestras de malas hierbas distintas, dos de ellas procedentes de la misma explotación. Se van a realizar nuevos análisis de malas hierbas, incluyendo muestras que no presenten síntomas de enfermedad para poder conocer los huéspedes potenciales de la bacteria que acompañan al cultivo de la judía.

La presencia de *P. phaseolicola* en malas hierbas nos indica que éstas pueden jugar un papel importante en la prevalencia de la enfermedad, lo que se vería agravado por la escasa rotación de cultivos que se practica en Asturias debido a las complicadas y costosas infraestructuras necesarias para el tutorado del cultivo.

P-36

UNA BACTERIA PRÓXIMA A *Pseudomonas viridiflava* CAUSA DAÑOS EN SOJA

González, A.J.¹, González-Varela, G.¹ y Rodicio, M.R.²

¹Laboratorio de Fitopatología, Servicio Regional de Investigación y Desarrollo Agroalimentario (SERIDA), carretera de Oviedo s/n, 33300 Villaviciosa. Asturias. ²Área de Microbiología, Dpto. de Biología Funcional, Universidad de Oviedo, c/ Julián Clavería 6, 33006 Oviedo. E-mail: anagf@serida.org

En un cultivo de soja forrajera localizado en Villaviciosa (Asturias), se observaron en las hojas manchas de color marrón-rojizo oscuro que acabaron afectando a todas las hojas de las plantas infectadas. Las plantas enfermas se retiraron del cultivo y una muestra fue analizada.

De la muestra analizada se aisló una bacteria cuyas características correspondían con *Pseudomonas*. Se seleccionaron tres aislamientos de los cuales se estudiaron sus caracteres fenotípicos, mostrando que eran todos gram -, oxidativos, levano -, oxidasa-, arginina-, tabaco +, hidrolizaban la esculina, la gelatina y la caseína, utilizaban como única fuente de carbono manitol, mioinositol, eritritol, betaina, trigonelina, quinato y lactato, y no utilizaban sorbitol, D-tartrato, sacarosa, adonitol y homoserina. Sin embargo, diferían en la capacidad de producir pectinólisis en rodaja de patata (uno + y dos -) y en la fluorescencia (dos + y uno -), por lo que se podían considerar tres biotipos atendiendo a las dos características diferenciales: F- P-; F+ P- y F+ P+.

Se realizaron pruebas de patogenicidad en soja con dos de las tres cepas (F+ P- y F+ P+) para lo cual se inocularon en plántulas de soja mediante pulverización de una suspensión del cultivo de una noche y se mantuvieron en cámara climática con condiciones de temperatura, fotoperíodo y humedad controladas. En las condiciones ensayadas fue posible reproducir los síntomas observados en campo. Posteriormente, dada la importancia que el cultivo de la judía tiene en Asturias, se llevó a cabo un ensayo de inoculación en plántula de judía tipo granja asturiana, no apareciendo en este caso ningún daño en las plantas inoculadas.

Para identificarlas se obtuvo la secuencia completa del ADNr 16S que fue idéntica para las tres cepas y, en su comparación con las depositadas en las bases de datos, se observó una similitud del 98% con *P. viridiflava*. Además, se amplificaron y secuenciaron los genes *gyrB*, *rpOD* y *gltA* de las tres cepas para realizar un análisis multiloci, utilizando como cepa de referencia la número 458 de la Colección Española de Cultivos Tipo, que corresponde a *P. viridiflava*. Nuevamente, los resultados pusieron de manifiesto la relación de los tres aislamientos con esta especie, cuya capacidad de producir daños en soja se demostró en este trabajo.

P-37**DESARROLLO DE UN MÉTODO MEJORADO PARA LA DETECCIÓN EN VID DE *Phaeomoniella chlamydospora* Y LAS ESPECIES DE PHAEOACREMONIUM**

Aroca, A.¹, Gramaje, D.², Armengol, J.² y Raposo, R.¹

¹Instituto de Investigaciones Agrarias (INIA). CIFOR. Ctra. Coruña Km 7,5, 28040 Madrid. ² Instituto Agroforestal Mediterráneo, Universidad Politécnica de Valencia, Camino de Vera s/n, 46022-Valencia.

Phaeomoniella chlamydospora y algunas especies pertenecientes al género *Phaeoacremonium* están asociadas a dos de las enfermedades más destructivas de la vid, las enfermedades de Petri (en planta joven) y Yesca (en planta adulta). Estos hongos son patógenos vasculares, que crecen lentamente en los medios de cultivo generales y, por tanto, su detección mediante métodos tradicionales por crecimiento en placa a partir de un fragmento de madera puede ser enmascarada fácilmente por otros hongos presentes en la planta. En este trabajo se ha desarrollado un método que mejora la detección de estas especies en madera de vid, basado en la extracción del contenido vascular mediante el lavado de los vasos con agua estéril de un brote de la planta, aplicando el vacío. Esta solución se utilizó para la detección de las especies de *Phaeoacremonium* y *Phaeomoniella chlamydospora* por dos métodos: uno, mediante filtrado sucesivo a 5 µm y 0,45 µm y siembra en medio de cultivo semiselectivo. y otro, por extracción de ADN y posterior detección de estos patógenos mediante la técnica de la PCR, utilizando cebadores específicos. La sensibilidad de la detección de estos dos métodos se comparó con la del método tradicional de aislamiento a partir de fragmentos de madera e incubación en medio de cultivo MEAS.

Los resultados de este trabajo mostraron que el uso del jugo extraído por el lavado de los vasos vasculares para la detección de estos patógenos, tanto por incubación en medio de cultivo semi-selectivo, como por detección mediante la técnica de PCR, detectó un mayor número de patógenos, al mismo tiempo que se redujeron los falsos negativos. Además, la extracción de ADN del jugo de los vasos resultó más sencilla, ya que se evitó la necesidad de pulverizar los fragmentos de madera con nitrógeno líquido, así como la extracción del propio ADN de la madera de vid y de los posibles inhibidores de la PCR presentes en ella.

P-38

LA TRISTEZA DEL PIMIENTO PARA PIMENTÓN EN LOS VALLES DE LOS RÍOS TIÉTAR Y ALAGÓN (CÁCERES)

Rodríguez-Molina, M.C.¹, Morales Rodríguez, M.C.¹, Palo Núñez, E.J.¹, Palo Osorio, C.¹, Verdejo Alonso, M.E.², Duarte Maya, M.S.¹ y Espárrago Rodilla, G.²

¹Centro de Investigación de la Finca La Orden-Valdesequera. Consejería de Economía, Comercio e Innovación. 06187 Guadajira (Badajoz). E-mail: carmen.rodriguez@juntaextremadura.net

²Servicio de Sanidad Vegetal. Consejería de Agricultura y Desarrollo Rural. Avda. de Portugal s/n. 06800 Mérida (Badajoz).

El pimiento para pimentón es uno de los cultivos más característicos de Extremadura, localizándose su producción en los valles de los ríos Tiétar y Alagón, con una superficie acogida a la Denominación de Origen Pimentón de la Vera en torno a las 1000 ha. En los años 2006 y 2007 se realizaron prospecciones en la zona de cultivo con el objetivo de evaluar la gravedad de la enfermedad de la *Tristeza* del pimiento y determinar el agente causal. Los síntomas observados en las plantas afectadas eran marchitamientos generalizados en verde, chancros en el cuello, necrosis en la raíz principal y en raíces secundarias con pérdida más o menos acusada del sistema radicular. En 2006 se prospectaron 36 parcelas de pimiento con síntomas de *Tristeza*. En los análisis no se detectó *Verticillium* spp. en ninguna de las muestras, mientras que en la mayoría de ellas (75%) se detectó *Phytophthora* spp., en algunos casos asociada a *Rhizoctonia solani* o a *Sclerotium rolfsii*. La prospección de 16 parcelas en el año 2007 confirmó las observaciones del año anterior. Se realizó la identificación específica de 30 aislados de *Phytophthora* spp. procedentes de las plantas enfermas analizadas, y todos ellos se identificaron como *P. parasitica* en base a las características del micelio, de los esporangios, las clamidosporas, los anteridios y las oosporas. Los cruzamientos con aislados de referencia de compatibilidad A1 y A2 y las observaciones de cultivos de los aislados después de 4 meses de incubación para determinar su condición de homo/heterotalismo indicaron que todos los aislados eran del mismo tipo de compatibilidad, A2, y que todos ellos eran heterotálicos.

Para confirmar el poder patógeno de los aislados identificados se inocularon 19 de ellos en plantas de pimiento de las variedades Jaranda y Jariza, las más habituales en la zona de cultivo. Se inocularon 10 plantas de cada variedad en estado de 3-4 hojas verdaderas. Todos los aislados resultaron patógenos en las dos variedades, y 8 de ellos llegaron a causar la mortalidad de todas las plantas de Jaranda, mientras que 5 de ellos causaron mortalidad total en Jariza. Se confirma, por tanto, que *P. parasitica* es el agente causal de la *Tristeza* del pimiento para pimentón en los valles de los ríos Tiétar y Alagón.

P-39**CARACTERIZACIÓN DE LA RESISTENCIA A *VERTICILLIUM* SPP. DE VARIEDADES DE FRESA Y DESARROLLO DE UN MÉTODO SENCILLO Y FIABLE DE DETECCIÓN DE *VERTICILLIUM* SPP. EN FRESA**

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

Departamento de Protección Vegetal, CIT-INIA, Carretera de La Coruña 7,500, 28040 Madrid. E-mail: ilarena@inia.es

España es el principal productor de fresa-fresón (*Fragaria ananassa* Duch.) en Europa y el tercero del mundo tras China y Estados Unidos. La marchitez causada por *Verticillium* spp en plantas de fresa es una de la enfermedades que mayores pérdidas provoca en la producción de planta. El control de esta enfermedad se ha realizado mediante la aplicación de bromuro de metilo, prohibido en la UE el 1 de enero de 2005. Esto nos lleva a la urgente necesidad de encontrar otras alternativas como el uso de variedades resistentes y desarrollo de métodos de detección rápidos, sensibles y específicos, que nos permitan trabajar con material vegetal libre de patógenos.

Debido a ello nos planteamos realizar un estudio de caracterización de variedades comerciales e históricas de fresa frente a la infección por *Verticillium* spp. en cámara de cultivo. Las variedades suministradas por el grupo del IFAPA-CIFA (Churriana) fueron: Camarosa, Candonga, Aguedilla y Ventana (comerciales), Sieger, Deutsch Evern y Africa (históricas), Carisma (control susceptible) y Pandora (control resistente). Estas variedades una vez aclimatadas se inocularon con el patógeno (*V. dahliae* y/o *V. albo-atrum* de distinto origen y virulencia) y se evaluaron durante 8 semanas (10 plantas/selección e inóculo). Al finalizar el ensayo se confirma la presencia/ausencia de *Verticillium* spp. en todas las plantas. Las variedades históricas resultaron ser más resistentes a la infección del patógeno que las comerciales.

Para detectar y cuantificar *Verticillium* spp. en plantas de fresa se utilizó la PCR en tiempo real, diseñándose tres parejas de cebadores. En una primera aproximación la detección de los amplificados se hizo utilizando como marcador de fluorescencia SYBR Green. Estas amplificaciones nos permitieron seleccionar una única pareja de cebadores como la más específica y sensible en la detección del patógeno: ILV132-380F/ILV132-454R. Se mejoró la técnica empleando una sonda TaqMan®. A partir de las suspensiones de conidias de *V. dahliae* se alcanzaron sensibilidades de detección de 10 conidias por ml. La eficiencia de la reacción de PCR en tiempo real fue siempre superior al 80 % con coeficientes de regresión (R^2) cercanos al 0.99. Actualmente se está procediendo a la cuantificación del patógeno en material vegetal sintomático.

P-40**GRUPOS DE COMPATIBILIDAD VEGETATIVA DE *Fusarium oxysporum* f.sp. *melonis* EN EL ESTADO DE COLIMA (MÉXICO)**

García-Alcázar, M., Carretero, F.J., Marín, F.J., de Cara, M., Santos, M., Diáñez, F., Miñano J. y Tello, J.C.

Departamento de Producción Vegetal. Universidad de Almería. Cañada de San Urbano, s/n. 04120. Almería. E-mail: mga800@gmail.com

Siguiendo la metodología de trabajo empleada previamente para determinar los Grupos de Compatibilidad Vegetativa (VCGs) de *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-cucumerinum* (García-Alcázar *et al.*, 2006) se ha comenzado a realizar un estudio con aislados de *Fusarium oxysporum* f.sp. *melonis* procedentes de México.

La motivación de este estudio se basa en que el cultivo de melón (*Cucumis melo* L.), presente en más de 1000 ha del Estado de Colima en México, se enfrenta con la siguiente problemática. Durante los años 2001, 2002 y 2003 se pudo comprobar como en los campos de mayor antigüedad para el melón, los tratamientos al suelo para controlar patógenos, que les eran desconocidos por no haberse hecho identificaciones previas, empezaban a ser ineficaces (de Cara García *et al.*, 2004). Los síntomas en el campo se correspondían, fundamentalmente, con los descritos para la fusariosis vascular del melón, causada por *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* (Fom) (Messiaen y Lafon, 1970; Messiaen *et al.*, 1991; Gómez Vázquez y Tello Marquina, 2000). Tras los trabajos publicados por de Cara García *et al.* (2004) se puede afirmar la uniformidad de la presencia del patotipo 1 de Fom en estos suelos cultivados.

De la uniformidad patogénica del patotipo 1 se deriva la cuestión de la variabilidad genética de los aislados presentes. Para intentar arrojar más luz y obtener información sobre el patógeno estudiado, se ha decidido aplicar la técnica de los Grupos de Compatibilidad Vegetativa. Los resultados obtenidos muestran una gran homogeneidad, obteniéndose que el total de aislados estudiados pertenece al VCG 0136, ya citado en México (Jacobson y Gordon, 1991). Esto implica que todos los aislados estudiados hasta la fecha tienen la capacidad de realizar anastomosis entre sí, y por tanto de formar heterocariones, con la consiguiente probabilidad de recombinación en sus células somáticas (Puhalla y Spieth, 1983).

P-41***Inonotus hispidus*: NUEVO HONGO ASOCIADO AL COMPLEJO DE YESCA EN VIÑEDOS DE LA ZONA MEDITERRÁNEA DE ESPAÑA.**

Sánchez-Torres, P., Hinarejos, R. González, V. y Tuset, J.J.

Centro de Protección Vegetal y Biotecnología. Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias. Ctra. Moncada-Náquera km 4,5. 46113 Moncada-Valencia. E-mail: sanchez_paltor@ivia.gva.es

La “yesca” es una enfermedad parasitaria de la vid y los primeros estudios sobre la enfermedad han puesto de manifiesto la existencia de dos grupos de microorganismos asociados a las sintomatologías observadas, y probablemente actuando en una sucesión ecológica. Se han caracterizado especies pertenecientes a los géneros mitosporicos *Phaeoacremonium* y *Phaeomoniella*, citadas habitualmente como especies pioneras, que son probablemente sustituidas en el tiempo por basidiomicetos lignícolas.

Entre los basidiomicetos, numerosos autores han atribuido una mayor incidencia en la “yesca” a *Fomitiporia*, sobre todo en las condiciones climáticas de la cuenca mediterránea. No obstante, en la mayoría de las localidades prospectadas en la Comunidad Valenciana se ha constatado repetidamente la presencia de *Stereum hirsutum* (Willd.) Pers con similar o mayor incidencia.

Durante el período 2005-2007 se realizaron muestreos en viñas de la zona costera del Norte de Alicante (Comunidad Valenciana) afectadas por el síndrome de la Yesca que mostraron la presencia de numerosos basidiocarpos colonizando los troncos. Los cuerpos fructíferos fueron inicialmente identificados por análisis morfológicos como pertenecientes a género *Inonotus* y se asociaron siempre con viñas de entre 30-40 años de la variedad Moscatel “Romano” que habían manifestado síntomas de Yesca durante 10 años. Tras un muestreo sistemático en la zona afectada durante los tres años de estudio *Inonotus* sp. fue el único hongo basidiomiceto aparte de la presencia en la corteza de *S. hirsutum* que pudiera ser el responsable de los síntomas de yesca en esta región, en lugar de otros basidiomicetos como *Fomitiporia mediterranea* M. Fisch. Ensayos *in vitro* han demostrado su gran capacidad lignícola en madera de vid. Un estudio en mayor profundidad teniendo en cuenta tanto caracteres morfológicos como una caracterización molecular, nos permitió identificarlo como *Inonotus hispidus* (Bull.) P. Karst. (*Hymenochaetaceae*, Basidiomycetes). Es la primera identificación de este hongo en viñedos del Mediterráneo español.

P-42

DIVERSIDAD DEL HONGO *Cryphonectria parasitica* EN LOS CASTAÑARES ASTURIANOS

González-Varela, G. y González, A.J.

Laboratorio de Fitopatología. Servicio Regional de Investigación y Desarrollo Agroalimentario (SERIDA). Carretera de Oviedo s/n, 33300 Villaviciosa, Asturias. E-mail: ggonzalez@serida.org

El chancro del castaño, enfermedad causada por el hongo *Cryphonectria parasitica*, presenta una alta incidencia en los castaños asturianos, como se comprobó en un muestreo realizado en las masas de castaño del Principado de Asturias que permitió, además, establecer una colección en el SERIDA de 800 cepas aproximadamente.

Las cepas hipovirulentas del hongo se caracterizan por la presencia de un hipovirus de ARN de doble cadena, que les confiere una menor virulencia y se transmite a través de los conidios y por anastomosis hifal entre cepas compatibles; de esta manera, el castaño afectado por este tipo de cepas puede seguir desarrollándose. La propagación de este hipovirus está condicionada por la diversidad del hongo, por ello, para realizar cualquier actuación de lucha biológica con cepas hipovirulentas, se requiere conocer los grupos de compatibilidad vegetativa (GCV) presentes en la zona y la posibilidad de que se produzca reproducción sexual.

Para conocer los GCV presentes en la colección se siguió el método barrera / fusión, realizando los experimentos al menos cuatro veces. Se encontraron tres GCV que se denominaron PA-I, PA-II y PA-III, y que agruparon al 96%, 3% y 0.03% de las cepas de la colección, respectivamente. Cuando se enfrentaron con los GCV de referencia europeos (EU-1 a EU-20) se pudo asociar el GCV PA-I con el EU-I y el GCV PA-III con el EU-III. Por el momento, los resultados obtenidos con el PA-III no fueron concluyentes.

Por otra parte, la reproducción sexual de *C. parasitica* está controlada por un gen con dos alelos que se denominan *MAT-I* y *MAT-II*. La predominancia de uno de ellos en una población determinada indica su carácter clonal. Para conocer la distribución de estos alelos se seleccionaron 300 cepas de la colección, a las que se extrajo el ADN y los genes se amplificaron por PCR utilizando la pareja de iniciadores M1-GS1n / M1-GS3-rev para detectar el alelo *MAT-I* y la pareja M2-GS3 / gs1-d-1 para el alelo *MAT-II*. El 73% de las cepas presentaron la banda correspondiente al *MAT-I* y el 27% restante la del *MAT-II*. Esto coincide con los resultados obtenidos en otras comunidades españolas como Castilla-León y Galicia, y países europeos como Grecia e Italia en los que se ha encontrado como mayoritario el *MAT-I*.

La baja diversidad observada en la colección de cepas de *C. parasitica* en estudio permite augurar buenas perspectivas para la implantación de un sistema de control biológico en las masas de castaño asturianas.

P-43**UNA NUEVA ENFERMEDAD DE FRESA EN ESPAÑA CAUSADA POR
*Fusarium oxysporum***

Llergo, Y., Arroyo, F.T., Aguado, A. y Romero, F.

Departamento de Protección Vegetal. IFAPA Centro Las Torres-Tomejil, Apdo oficial, 41200. Alcalá del Río (Sevilla)

Email: yolanda.llergo.ext@juntadeandalucia.es

En las campañas 2006/07 y 2007/2008 en un invernadero multitúnel dedicado al cultivo hidropónico, ubicado en la provincia de Huelva, se detectaron plantas de fresa de los cultivares 'Camarosa' y 'Ventana' con síntomas de marchitamiento generalizado alcanzando el 8 % del total de la plantación. Después de caracterizar y describir las lesiones se realizaron aislamientos de distintas partes de la planta, coronas, raíces, hojas y flores, obteniéndose consistentemente *Fusarium* spp.

Las pruebas de patogenicidad del aislado sobre plantas sanas de fresa de los cultivares mencionados confirmaron la reproducción de los síntomas iniciales y el reaislamiento del patógeno. Los tests de patogenicidad fueron repetidos tres veces.

La caracterización morfológica y molecular mediante PCR y DGGE indican que se trata de *Fusarium oxysporum*.

Esta enfermedad conocida como Fusarium wilt de fresa (*Fusarium yellow*) no ha sido descrita hasta ahora en España y tampoco hay constancia de que lo haya sido en Europa.

P-44

LA FUSARIOSIS DE LA BASE DEL TALLO DEL CALABACÍN

Gómez, J.¹, Guerra, J.M.¹, Sánchez-Guerrero, M.C.¹, Melero, J.M.² y Serrano, Y.¹

¹IFAPA. Centro La Mojonera. 04745, Almería. ²Instituto de Agricultura Sostenible. CSIC, Apdo. 4084. 14080, Córdoba.
E-mail: juliom.gomez@juntadeandalucia.es

En la primavera de 2007, plantas adultas de calabacín (*Cucurbita pepo*) cultivadas en tres explotaciones comerciales de El Ejido (Almería) mostraron necrosis en la base del tallo, marchitez y muerte. En uno de los invernaderos la enfermedad se observó en pocas plantas, mientras que en los otros dos, la incidencia de plantas muertas fue 20-30%. *Fusarium solani* fue consistentemente aislado en PDA de las plantas con síntomas, obteniéndose cultivos puros del hongo que fueron luego clasificados por sus características morfológicas y moleculares. Las secuencias de ADN ribosómico de la región ITS1 y de la ITS2 fueron idénticas para los seis aislados estudiados. El aislado Fsc1-4 fue depositado en el GenBank con el No. AM940070.

La patogenia de los seis aislados se evaluó en dos experimentos de inoculación en invernadero. Semillas pregerminadas de calabacín cv. Cónsul fueron sembradas en contenedores rellenos de vermiculita. Las plantas se inocularon con *F. solani* ($2.0-8.4 \times 10^5$ propágulos/ml) once y cinco días después, en los experimentos 1 y 2, respectivamente. Placas de Petri con las colonias fúngicas fueron trituradas en 500 ml de agua estéril. El inóculo fue añadido a razón de 50 ml/planta. El diseño experimental utilizado fue de bloques completamente al azar con tres repeticiones, con parcelas elementales de cuatro plantas. En los dos experimentos sirvieron como testigos un número igual de plantas no inoculadas (12). Las plantas se mantuvieron 1 mes después de la inoculación con temperaturas medias comprendidas entre 20.7 y 24.6°C para el exp. 1, y entre 23.3 y 29.8°C para el exp. 2. Durante ese periodo se evaluaron los síntomas mostrados por las plantas, que fueron similares a los observados en invernaderos comerciales. En el primer experimento, los síntomas de marchitez se observaron 9 días después de la inoculación, y 14 días más tarde habían muerto todas las plantas inoculadas con los aislados de *F. solani*. Al finalizarse el experimento, las plantas no inoculadas, con 12-14 hojas verdaderas, permanecían sin síntomas. Los resultados obtenidos en el segundo fueron semejantes. El patógeno fue consistentemente reaislado de las plantas con síntomas. Aunque *Fusarium solani* f. sp. *cucurbitae* raza 1 ha sido citado en calabaza (*Cucurbita maxima*) en España, este es el primer registro de *F. solani* como agente causal de necrosis de la base del tallo en el cultivo del calabacín en los invernaderos del sureste.

P-45**INCIDENCIA DE PODREDUMBRES DE POSTCOSECHA EN MANZANA REINETA DEL BIERZO SOMETIDA A DIFERENTES TRATAMIENTOS DURANTE EL CULTIVO**

Marcelo, V.¹, Guerra, M.¹, Valenciano, J.B.¹, Casquero, P.A.¹, Lorenzana, A.^{1,2}, Campelo, M.P.^{1,2} y Marcos, M.F.²

¹Departamento de Ingeniería y Ciencias Agrarias. Universidad de León. Avda. de Portugal, 41. 24071 León.

²Laboratorio de Diagnóstico. Fundación Chicarro-Canseco-Banciella. E.S.T.I.A. Universidad de León. Avda. de Portugal, 41. 24071 León.

El manzano es un cultivo importante en la comarca de El Bierzo (León) y fue reconocido en el año 1999 por la Junta de Castilla y León mediante la Denominación de Origen (D.O.) "Manzana Reineta del Bierzo" por las cualidades físicas y organolépticas especiales del fruto. Los tratamientos fitosanitarios y nutricionales realizados durante el cultivo influyen en la conservación y en la aparición de fisiopatías y pudriciones durante su conservación y, por tanto, en la calidad de los frutos expedidos para el consumo. En este trabajo se presentan los resultados obtenidos en la evaluación de la incidencia de podredumbres de postcosecha en Reineta Blanca sometida a diferentes tratamientos durante el cultivo orientados a reducir la incidencia de "*bitter-pit*". Se diseñó el ensayo en parcelas subdivididas, con dos factores y tres repeticiones sobre un total de 18 árboles. El factor principal consistió en la aplicación de productos para mejorar la disponibilidad del calcio en la planta: Blanco y 2 tratamientos con proteína Harpin (3%). El factor secundario fue la aplicación de microelementos: Blanco, 4 tratamientos con CaO (55,4%), 8 tratamientos con CaO (55,4%) a media dosis. La recolección se realizó a mediados de septiembre, tomándose 80 frutos por árbol que se almacenaron en cámara en condiciones de frío normal (temperatura de 1°C y humedad relativa del 95%). Estos se inspeccionaron los meses 1, 3, 5 y 8 tras la recolección, retirándose aquellos que presentaban pudriciones. Estas inspecciones se completaron con la identificación en laboratorio de hongos implicados. El análisis estadístico de los datos recogidos no detectó diferencias significativas para ninguno de los factores considerados, si bien en los análisis del tercer y quinto mes se observó mayor incidencia de pudrición en las manzanas no tratadas. Los géneros identificados y el porcentaje sobre el total de muestras analizadas fueron *Cladosporium* (78%), *Penicillium* (40%), *Alternaria* (35%), *Monilia* (4%), *Acremonium* (4%), *Botrytis* (4%), *Stemphylium* (4%), *Fusarium* (3%), *Mucor* (3%), *Ulocladium* (1%).

Este trabajo ha sido financiado por el Consejo Regulador de la D.O. "Manzana Reineta del Bierzo".

P-46**HONGOS ENDOFITOS, PATOGENOS Y SAPROFITOS ASOCIADOS A
*Eucalyptus globulus***

Sánchez Márquez, S.¹, Bills, G.F.², Collado, J.² y Zabalgogezcoa, I.¹

¹Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología, CSIC. Apartado 257, 37071 Salamanca. Email: izabalgo@usal.es

²Centro de Investigación Básica de España. Merck, Sharp & Dohme. Josefa Valcarcel 38, 28027 Madrid.

Se ha estudiado la micobiota asociada a hojas jóvenes, hojas adultas y hojarasca de *Eucalyptus globulus* en varias plantaciones de la provincia de La Coruña en las cuales hay una elevada incidencia de micosis foliares causadas por *Mycosphaerella* spp. En hojas jóvenes se han identificado 50 especies fúngicas en partes asintomáticas de hojas y 73 especies en bordes de lesiones; 19 especies se detectaron en ambas zonas de las hojas. En hojas maduras se detectaron 55 especies en partes sanas y 38 en bordes de lesiones; 11 especies se detectaron en ambas zonas de las hojas. Nueve especies fueron detectadas en ambos tipos de hoja en tejido sano y enfermo, algunas de estas especies (ej. *Hormonema* sp., *Botryosphaeria eucalyptorum*, *Mycosphaerella vespa*), se detectaron en un elevado número de muestras. Solo un pequeño porcentaje de las especies que han sido aisladas de hojas son patógenos previamente descritos en *E. globulus*.

Al analizar hongos presentes en muestras de hojarasca, se detectaron una media de aproximadamente 57 especies por muestra. En estas muestras algunas de las especies más abundantes, en número de aislados pertenecen al género patógeno *Mycosphaerella*.

P-47**CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA DE ESPECIES DE *EPICHLÖE* A PARTIR DE DATOS ESPECTRALES**

Petisco, C., García Ciudad, A., Zabalgozcoa, I., Vázquez de Aldana, B.R. y García Criado, B.

Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología, IRNA-CSIC, Apdo. 257, 37071 Salamanca. Email: izabalgo@usal.es.

El criterio más común para la identificación de especies de hongos es la diferenciación en base a caracteres morfológicos o moleculares. Sin embargo, la tecnología NIRS (espectroscopía de infrarrojo cercano) puede presentar ventajas sobre los métodos citados: la preparación de la muestra es más sencilla, los costes de laboratorio son menores y es ambientalmente más respetuosa, puesto que no se requieren reactivos químicos.

El propósito del presente trabajo es el desarrollo de un modelo para la clasificación de tres especies, muy similares morfológicamente, de hongos endofíticos del género *Epichloë* asociados a gramíneas. Para abordar el estudio se registran espectros en la región del visible e infrarrojo cercano (Vis-NIR, 400-2498 nm) sobre micelio de 34 aislados de *Epichloë sylvatica*, 32 de *Epichloë typhina* y 38 de *Epichloë festucae*. A continuación se aplica un método de análisis discriminante basado en la regresión por mínimos cuadrados parciales (PLS2), empleando distintas transformaciones matemáticas para la corrección de los datos espectrales. Mediante PLS2 se clasificaron correctamente el 90% de las muestras de validación externa de *E. typhina* y el 100% de las de *E. festucae* y *E. sylvatica*.

Este trabajo presenta la novedad de ser la primera vez en la que se identifican diferentes especies de hongos filamentosos mediante Vis-NIR. Aunque en este caso particular, se han tenido en cuenta tres especies de *Epichloë* como material experimental, el éxito en los resultados obtenidos genera expectativas para su empleo con otras especies de hongos.

P-48**PROSPECCIÓN DE ENFERMEDADES PRODUCIDAS POR *FUSARIUM* SPP. EN PALMERAS EN LAS ISLAS CANARIAS.**

Hernández, J.M.¹, Espino, A.², Rodríguez, J.M.³, Pérez- Sierra, A.⁴, León, M.⁴, Abad-Campos, P.⁴ y Armengol, J.⁴

¹ ICIA, Departamento de Protección Vegetal, Ctra. El Boquerón, S/N, Apdo. 60, Valle Guerra, La Laguna 38270, Tenerife. ² Laboratorio de Sanidad Vegetal, Consejería de Agricultura, Ganadería y Pesca, Gobierno de Canarias, Ctra. El Boquerón S/N, Valle Guerra, La Laguna 38270, Tenerife, ³ Laboratorio de Fitopatología, Granja Agrícola, Cabildo de Gran Canaria, Ctra. Del Norte, Km. 7,5, 35400, Las Palmas de Gran Canaria, ⁴ Instituto Agroforestal Mediterráneo, Universidad Politécnica de Valencia, Camino de Vera S/N, 46022 Valencia. E-mail: jhernand@icia.es

Entre 2006 y 2007 se prospectaron palmeras que presentaban síntomas de marchitez y muerte en jardines y en palmerales naturales de las Islas Canarias. Se realizaron aislamientos en PDAS de tejidos afectados de la corona, hojas y de fragmentos de tejido vascular de plantas sintomáticas. Después de la incubación, se hicieron cultivos monospóricos de las colonias de *Fusarium* spp. obtenidas, que se transfirieron a PDA y a SNA para la identificación morfológica. La identificación de *F. oxysporum* f. sp. *canariensis* fue confirmada por PCR con los cebadores específicos HK66 y HK67 los cuales amplifican un fragmento de 567 pares de bases. La fusariosis vascular causada por *F. oxysporum* f. sp. *canariensis* se detectó en 54 ejemplares de *Phoenix canariensis* y está ampliamente distribuida en cuatro islas: Gran Canaria, Fuerteventura, La Palma y Tenerife. *Fusarium proliferatum* se detectó en dieciséis palmeras (11 *P. canariensis*, 2 *P. dactylifera*, 2 *Roystonea regia* y 1 *Vetchia joannis*) localizadas en las islas de Gran Canaria y Tenerife. En todos los casos, las dos especies de *Fusarium* se detectaron sólo en plantas enfermas en jardines y nunca en palmerales naturales. Estos resultados muestran la importancia de la fusariosis vascular en *P. canariensis* en las Islas Canarias y se cita por primera vez la presencia de *F. proliferatum* afectando a diferentes especies de palmeras.

P-49**POBLACIONES DE *Fusarium oxysporum* f. sp. *canariensis*, AGENTE CAUSAL DE LA FUSARIOSIS VASCULAR DE LA PALMERA CANARIA (*Phoenix canariensis* Hort. ex Chabaud) PRESENTES EN CANARIAS.**

Santos, E.¹, Espino, A.², Rodríguez, J.M.³ y Hernández, J.M.¹

¹ICIA, Departamento de Protección Vegetal, Ctra. El Boquerón, S/N, Apdo. 60, Valle Guerra, La Laguna 38270, Tenerife. ²Laboratorio de Sanidad Vegetal, Consejería de Agricultura, Ganadería y Pesca, Gobierno de Canarias, Ctra. El Boquerón S/N, Valle Guerra, La Laguna 38270, Tenerife, ³Laboratorio de Fitopatología, Granja Agrícola, Cabildo de Gran Canaria, Ctra. Del Norte, Km. 7,5, 35400, Las Palmas de Gran Canaria; E-mail : jhernand@icia.es

La fusariosis vascular de la palmera canaria (*P. canariensis*) producida por *F. oxysporum* f. sp. *canariensis* es una de las enfermedades más graves de esta palmera, cuya incidencia va en aumento en las Islas Canarias. Un estudio realizado durante los años 2006-2007 permitió detectar 54 casos localizados en las islas de Fuerteventura, Gran Canaria, La Palma y Tenerife, la mayoría de ellos en esta última isla. Con la finalidad de conocer la diversidad genética de *F. oxysporum* f. sp. *canariensis* en Canarias, se ha realizado un estudio con un subgrupo de 22 aislados, previamente identificados morfológicamente y por técnicas moleculares. La determinación de los grupos de compatibilidad vegetativa (VCGs) se realizó utilizando los protocolos habituales de inducción de mutantes *nits* en medio mínimo más clorato, fenotipado en medios específicos y enfrentamiento de *nits* complementarios. De los 22 aislados estudiados, el 41 % forman un grupo con aislados de todas las islas muestreadas. Un segundo grupo que representa el 32 %, incluye aislados de Tenerife y un aislado de Gran Canaria. Otros 2 grupos identificados, incluyen cada uno un 13% de aislados. Uno de ellos, sólo contiene aislados de un Jardín de La Laguna (Tenerife). El otro grupo, sólo contiene aislados de Tenerife. Estos resultados preliminares sugieren que *F. oxysporum* f. sp. *canariensis* presenta en Canarias un moderado nivel de diversidad genética con respecto a la complementación vegetativa, como se había sido sugerido en estudios previos.

P-50

PRESENCIA DE PERITECIOS DE *Eutypa lata* SOBRE VID EN LA RIOJA ALAVESA

Muruamendiaraz, A.¹, Lecomte, P.² y Legorburu, F.J.¹

¹NEIKER-Tecnalia, Instituto Vasco de Investigación y desarrollo Agrario Granja Modelo de Arkaute, Apdo 46, 01080 Vitoria-Gasteiz

²INRA Bordeaux-Aquitaine, Boîte Postale 81, F-33883 Villenave d'Ornon-Cedex, Francia

A pesar de las condiciones pluviométricas favorables para la producción de ascosporas y la expansión de la eutipiosis en los viñedos de la Rioja Alavesa, no se habían encontrado cuerpos de fructificación del hongo *Eutypa lata* en campo. Es común sin embargo encontrarlo en su forma asexual, como *Libertella blepharis*, que produce conidias carentes de capacidad infectiva. Al no poderse completar el ciclo infectivo del patógeno, se planteaba la cuestión de si lo que denominábamos “eutipiosis” estaría producida por hongos del género *Botryosphaeria*, el cual provoca lesiones similares en la madera.

Se inspeccionaron viñedos viejos de la Rioja Alavesa en busca de peritecios de *E. lata*, puesto que es sobre madera muerta y ennegrecida donde se da mayor probabilidad de hallar los cuerpos fructíferos del hongo.

Se encontraron peritecios en una plantación de Tempranillo de 80 años situada en la localidad de Laguardia y se procedió a su identificación mediante estudios de morfometría. La morfología y medidas de los peritecios y de las ascosporas; así como las características miceliares de los aislados obtenidos de éstas concuerdan con las que se describen para la especie *E. lata*. Puesto que la diferenciación morfológica de las especies dentro de la familia *Diatrypaceae* es poco clara, se realizó un análisis molecular, empleando cebadores específicos diseñados por Lecomte et al. (2000). Éstos amplificaron una fracción de rDNA de la región ITS1 y ITS2, consiguiendo un producto de entre 340 y 400 bp, correspondiente al hongo *E. lata*. Para mayor certeza, se purificó y secuenció el producto de la PCR, procediendo a comparar las secuencias obtenidas con las de la base de datos GenBank de la NCBI. Se empleó el programa MEGA para la construcción de la filogenia, introduciendo secuencias de cada grupo de la familia *Diatrypaceae* y *Neurospora crassa* como referencia de otra familia (*Sordariaceae*). La filogenia corroboró los anteriores resultados, puesto que agrupaba los aislados obtenidos por nosotros a partir de ascosporas con cepas de *E. lata* y *E. armeniacae* (considerados sinónimos) con una fiabilidad de un 97%. Confirmada la presencia de la fase sexual del hongo, existen en Rioja Alavesa todos los componentes necesarios para completar el ciclo infectivo de la enfermedad.

P-51

**HONGOS ASOCIADOS A SEMILLAS DE ALUBIA DE LA ZONA DE
PRODUCCIÓN DE LA INDICACIÓN GEOGRÁFICA PROTEGIDA (I.G.P.)
“ALUBIA DE LA BAÑEZA-LEÓN”**

Campelo, M.P.^{1,2}, Reinoso, B.² y González, A.J.³

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

²Departamento de Ingeniería y Ciencias Agrarias. Universidad de León. Avda. de Portugal, 41. 24071 León. ³Servicio Regional de Investigación y Desarrollo Agroalimentario (SERIDA). Ctra. de Oviedo, s/n. 33300 Villaviciosa. Asturias. Correo-e: piedad.campelo@gmail.com

La alubia (*Phaseolus vulgaris* L.) es un producto tradicional de los regadíos de las provincias de León y Zamora reconocido mediante la Indicación Geográfica Protegida “Alubia de La Bañeza – León”. El cultivo en la región se ve afectado por numerosas enfermedades de etiología fúngica cuya transmisión por semilla ha sido descrita. En nuestro laboratorio se desarrollan estudios para la identificación de los hongos presentes en la simiente que posibiliten el establecimiento de métodos de saneamiento. En este trabajo se presenta el inventario de la micobiota presente en 130 lotes de semilla (92 de seleccionada y 28 de destrío), de 14 variedades locales, producida entre los años 2003 y 2006 en 33 municipios de las seis comarcas agrarias que ampara la I.G.P. De cada lote se sembraron, sin desinfectar, en medio agar de patata glucosado, 20 repeticiones de cinco semillas, incubándose en bancada (18-25 °C) durante quince días y haciéndose recuentos de semillas afectadas, colonias y géneros presentes a los seis días y al final del ensayo. De los resultados cabe destacar que a pesar de que la semilla selecta no mostraba síntomas visibles de infección el porcentaje de contaminadas superó el 30% en todos los lotes frente al 75% que se registró en el menos contaminado de los de destrío. De un total de 13.000 semillas se aislaron 17.882 colonias pertenecientes a 18 géneros fúngicos diferentes (porcentaje de lotes de semilla seleccionada/destrío en los que está presente): *Penicillium* (100%/100%), *Rhizopus* (87%/96%), *Alternaria* (87%/89%), *Cladosporium* (80%/68%), *Aspergillus* (77%/59%), *Fusarium* (72%/96%), *Mucor* (57%/79%), *Ulocladium* (42%/54%), *Trichoderma* (30%/50%), *Botrytis* (26%/14%), *Chaetomium* (20%/7%), *Epicoccum* (14%/21%), *Trichothecium* (13%/11%), *Nigrospora* (9%/4%), *Stemphylium* (8%/11%), *Sclerotinia* (5%/14%), *Rhizoctonia* (<1%/14%) y *Gonatobotrys* (<1%/-). Casi todos han sido citados en España como espermatoflora de la semilla de judía. La mayoría de los aislamientos se consideran potencialmente alterantes de la calidad en condiciones de almacenamiento, sin embargo, los géneros *Botrytis*, *Fusarium*, *Rhizoctonia* y *Sclerotinia* se asocian a severos problemas del cultivo en la zona de estudio. En la actualidad se continúa trabajando para completar la identificación de las especies aisladas y verificar su poder patógeno en las variedades locales con mayor interés comercial.

P-52**IDENTIFICACIÓN MORFOLÓGICA Y MOLECULAR DE HONGOS ASOCIADOS AL DEBILITAMIENTO DEL PINO CARRASCO EN ESPAÑA.**

Botella, L. y Diez, J.J.

Universidad de Valladolid. Dpto. Producción Vegetal y Recursos Forestales.
ETSIIAA de Palencia. Campus "La Yutera", Avda. Madrid 57. 34071 Palencia.
E-mail: lbotella@pvs.uva.es

El pino carrasco (*Pinus halepensis* Mill.) es una de las especies con las que más se ha repoblado en los últimos decenios en toda la región mediterránea. A pesar de su resistencia a condiciones adversas, el *Pinus halepensis* Mill. está sufriendo un debilitamiento generalizado en toda la Península Ibérica, tanto en masas naturales como en repoblaciones.

El presente estudio tiene como objetivo analizar la diversidad de la población de endófitos presentes en pies sintomáticos de *Pinus halepensis* procedentes de 56 parcelas de la "Red Europea De Seguimiento De Daños En Los Bosques (Nivel I)" repartidas por todo el área de distribución del pino carrasco en España. Las parcelas se visitaron durante los meses de Julio y Agosto de 2006, tomándose tres muestras de material vegetal correspondientes a tres árboles diferentes que presentaran síntomas de decaimiento. Un total de 336 muestras (168 muestras de acículas y de ramillos) fueron procesadas en el laboratorio.

De cada aislamiento se realizaron cultivos monospóricos de los cuales se extrajo el ADN fúngico mediante la adaptación del protocolo de Vainio et al., 1998. Las regiones ITS del ADN ribosomal fueron amplificadas mediante PCR utilizando los iniciadores fúngicos universales ITS1 e ITS4. Los productos de PCR se purificaron y se secuenciaron en ambas direcciones utilizando los iniciadores ITS1 y 4 a través del servicio de secuenciación de la Universidad de Salamanca.

Morfológicamente se han identificado 32 especies de hongos endófitos, observándose una mayor diversidad de hongos en parcelas de la zona Mediterránea y Andalucía que en las parcelas del interior peninsular. Dentro del material vegetal, en los ramillos la diversidad fue mayor que en las acículas, que tuvieron menor diversidad de endófitos asociados. En las acículas se detectó la presencia de dos hongos específicos que apenas aparecieron en los ramillos, pero que no fue posible su identificación. La altitud de la parcela, la edad y aspecto de los árboles no tuvieron influencia en la diversidad de hongos.

P-53**ANÁLISIS DE VCGs , MARCADORES MOLECULARES, Y PATOGENICO DE AISLADOS DE *Verticillium dahliae* QUE INFECTAN OLIVO EN TURQUÍA**

Dervis, S.¹, Erten, L.², Valverde-Corredor, A.³, Mercado-Blanco, J.³ y Pérez-Artés, E.³

¹Mustafa Kemal University, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, 31034 Antakya, Hatay, Turkey.

²Olive Research Institute, Turkish Ministry of Agriculture and Rural Affairs, 35100 Bornova, Izmir, Turkey.

³Instituto de Agricultura Sostenible, CSIC. Alameda del Obispo s/n. 14080 Córdoba, España. E-mail: ag1peare@uco.es

Turquía es uno de los principales países productores de olivo, con 129 millones de árboles en un área aproximada de 700.000 ha. La Verticilosis del olivo (VO), causada por *Verticillium dahliae* Kleb, es un factor limitante de la producción en este cultivo. En este trabajo se ha llevado a cabo el análisis molecular y de VCGs de una colección de 115 aislados de *V. dahliae* de olivo, procedentes de 4 diferentes regiones climáticas (14 provincias) en Turquía. La asignación a VCGs se ha realizado mediante ensayos de complementación entre mutantes *nit* de cada uno de los aislados y de testores universales de los grupos 1A, 2A, 2B, 3, 4A y 4B. El análisis molecular se ha basado en la amplificación de marcadores PCR que previamente han sido correlacionados con pertenencia a VCG y/o patotipo defoliante (D) o no-defoliante (ND) en olivo en España. De los 115 aislados analizados, 89 (77,4%) pertenecían al VCG 1A, 16 (13,9%) al VCG2A, y 4 (3,5%) al VCG 4B. Un aislado resultó ser autoincompatible (HSI) y los 5 restantes no complementaron con ninguno de los testores. Todos los aislados asignados al VCG 1A amplificaron el marcador de 334 pb asociado a este grupo, pero no el de 462 pb que, adicionalmente, caracteriza a los aislados del VCG 1A de España. Los aislados de los VCGs 2A y 4B amplificaron el fragmento de 824 pb asociado a los aislados españoles de estos grupos. Al objeto de determinar posibles diferencias en virulencia asociadas a diferentes grupos genéticos y/o moleculares, 17 aislados seleccionados de la colección, representativos de los distintos VCGs y de las diferentes localizaciones geográficas, se utilizaron en tests de patogenicidad frente al cultivar Manzanilla y a los cultivares locales "Ayvalik" y "Gemlik"; en el test se incluyó también 1 aislado del VCG 1A de España. Los resultados indicaron que los aislados pertenecientes al VCG 1A, a pesar de mostrar entre sí diferencias en virulencia, produjeron síntomas más severos de VO sobre todos los cvs que los aislados de los VCGs 2A o 4B.

P-54

ESPECIES DE *ARMILLARIA* ASOCIADAS A PLANTACIONES FORESTALES Y VIÑEDO EN EL PAÍS VASCO

Pérez-Sierra, A.¹, Iturrutxa, E.², León, M.¹, García-Serna, I.², Heppe, E.² y García-Jiménez, J.¹

¹Instituto Agroforestal Mediterráneo, Universidad Politécnica de Valencia, Camino de Vera s/n, 46022 Valencia; ²Neiker, Granja Modelo de Arkaute, Apartado 46 CP 01080 Vitoria.

Hongos del género *Armillaria* causan enfermedades radiculares importantes en plantaciones forestales y viñedo en el País Vasco. El objetivo de este trabajo fue estudiar la incidencia de esta enfermedad en masas forestales, en plantaciones forestales jóvenes y en viñedos, correspondientes a las diferentes zonas climáticas presentes en el País Vasco. Durante tres años consecutivos (2004 a 2006) se llevaron a cabo prospecciones durante los meses de verano y de otoño. Se realizaron aislamientos de cuerpos fructíferos, rizomorfos o micelio de las raíces infectadas. Las especies de *Armillaria* se identificaron culturalmente en medio de agar extracto de malta, por compatibilidad somática (enfrentando los aislados diploides obtenidos de los aislamientos con las cepas de referencia haploides), y mediante la utilización de la técnica PCR-RFLP con los cebadores LR12R y O-1 y los enzimas de restricción *Alu* I, *Nde* I and *Bsm* I.

Se aisló *Armillaria* de 78 de las plantas prospectadas entre las que se incluían los siguientes hospedantes: *Pinus radiata*, *P. nigra*, *P. pinaster*, *Quercus robur*, *Q. pirenaica*, *Fraxinus excelsior*, *Alnus glutinosa*, *Chamaecyparis lawsoniana* y *Vitis vinifera*. *A. mellea* se aisló de *P. radiata*, *Quercus* sp., *F. excelsior*, *C. lawsoniana* y *V. vinifera*; *A. ostoyae* de *P. radiata*, *P. nigra* y *P. pinaster*; *A. gallica* de *A. glutinosa*, *P. radiata* y *Q. robur*; *A. cepistipes* de *P. radiata* y *A. tabescens* de *Q. robur*. Mediante la técnica de PCR-RFLP se detectaron siete patrones de restricción correspondientes a las cinco especies identificadas: *A. mellea* (patrones 1 y 2), *A. ostoyae* (patrones 1 y 2), *A. cepistipes*, *A. gallica* y *A. tabescens*. De la zona climática eurosiberiana se aislaron todas las especies citadas anteriormente mientras que de la zona mediterránea sólo se aisló *A. mellea*.

P-55**NUEVAS ESPECIES DEL GÉNERO *PHAEOACREMONIUM* DETECTADAS EN VID EN ESPAÑA**

Gramaje, D.¹, Alaniz, S.¹, Aroca, A.², Colino, M.I.³, Santiago, R.³, Pérez-Sierra, A.¹, Abad-Campos, P.¹, García-Jiménez, J.¹, Raposo, R.² y Armengol, J.¹

¹Instituto Agroforestal Mediterráneo, Universidad Politécnica de Valencia, Camino de Vera s/n, 46022 Valencia. ²Instituto de Investigaciones Agrarias (INIA). CIFOR. Ctra. Coruña Km 7,5, 28040 Madrid; ³Servicio de Sanidad Vegetal, Ctra. de San Vicente, 3, 06071 Badajoz.

Los hongos pertenecientes al género *Phaeoacremonium* están siendo ampliamente estudiados en la actualidad debido a su implicación como agentes causales de las enfermedades de Petri y la Yesca de la vid. Hasta la fecha, se han descrito en el mundo 13 especies de *Phaeoacremonium* aisladas en este hospedante. En España, las prospecciones realizadas durante los últimos años en parcelas de vid y en viveros que mostraban síntomas asociados a estas enfermedades, permitieron obtener aislados de *Phaeoacremonium* pertenecientes a cuatro especies no descritas hasta la fecha: *P. inflatipes*, *P. mertoniae*, *P. scolyti* y *P. viticola*. La identificación de los aislados de estas especies se llevó a cabo mediante estudios morfológicos en los cuales se observó la coloración de los diferentes aislados en medio de cultivo PDA y MEAS, y se caracterizaron y se midieron los conidióforos, fiálidas y conidios. Además, su identidad fue confirmada mediante la amplificación por PCR de la región ITS del ADNr, usando los cebadores específicos del género *Phaeoacremonium* (Pm1 y Pm2) y la posterior digestión con las enzimas de restricción *Bss*KI, *Eco*O109I y *Hha*I. Adicionalmente, se secuenció un fragmento del gen de la beta tubulina para cada especie (amplificado con los cebadores universales T1 y Bt2b). Para confirmar su patogenicidad, suspensiones de conidios de estas especies se inocularon a plántulas de vid de 2 meses de edad. Al cabo de dos meses las plantas mostraban reducción del crecimiento, hojas cloróticas, defoliación y decaimiento o muerte. Los controles no mostraron ninguno de estos síntomas. Todas las especies inoculadas fueron reaisladas de los tejidos internos del tallo de las plántulas, completando así los postulados de Koch. La presencia de estas especies en España, junto a *P. aleophilum* y *P. parasiticum* ya descritas anteriormente, muestran la complejidad de este género afectando a vid.

P-56**DIVERSIDAD GENÉTICA Y DE VIRULENCIA EN *Cylindrocarpon liriodendri* Y *C. macrodidymum*, AGENTES CAUSALES DEL PIE NEGRO DE LA VID**

Alaniz, S., Armengol, J., León, M., García-Jiménez, J. y Abad-Campos, P.

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

La diversidad genética de una colección de 82 aislados españoles y 5 de referencia de las especies fúngicas *Cylindrocarpon liriodendri* y *C. macrodidymum*, agentes causales del pie negro de la vid, fue analizada mediante la técnica "Inter-Simple Sequence Repeat" (ISSR). Se evaluaron un total de diez cebadores de los cuales, sólo cuatro, (GT)₇, (CCA)₅, (CGA)₅ y (TCG)₅, produjeron patrones de bandas polimórficas y reproducibles. Este análisis detectó diversidad genética en ambas especies siendo ésta mucho mayor en *C. macrodidymum*; el índice de diversidad genética de Nei fue $H=0,06$ en *C. liriodendri* y $H=0,16$ en *C. macrodidymum*. El análisis de agrupamiento de las bandas obtenidas con la técnica ISSR mostró 21 genotipos diferentes que fueron agrupados arbitrariamente en siete grupos (G1 a G7) con una similitud entre ellos del 68% y el 79%, mientras que la similitud entre los aislados dentro de cada grupo era de, al menos, el 88 %. Dos de estos grupos (G1 y G2) correspondieron a la especie *C. liriodendri* y cinco (G3 a G7) a *C. macrodidymum*. Para estudiar la diversidad en virulencia entre los diferentes grupos se seleccionaron un total de 19 aislados. Éstos se inocularon en plántulas de semillas obtenidas del cultivar Tempranillo mediante riego con 20 mL de una suspensión de conidios (10^6 conidios /mL). Las plántulas fueron incubadas en invernadero a 25-30 °C durante 2 meses. Durante el ensayo se registraron periódicamente los síntomas desarrollados en la parte aérea y, al final del experimento, se evaluaron los síntomas en las raíces, y el peso seco de la raíz y de la parte aérea. Los resultados obtenidos mostraron que los aislados inoculados de la especie *C. macrodidymum* correspondientes a los grupos G6 y G7, fueron significativamente más virulentos que el resto de aislados de esta especie o de *C. liriodendri*.

P-57

ESTRUCTURA DE POBLACIÓN, SENSIBILIDAD A FUNGICIDAS Y PATOGENICIDAD DE *Phytophthora ramorum* EN ESPAÑA

Abad-Campos, P.¹, Pérez-Sierra, A.¹, Álvarez, L.A.¹, Fuster, L.¹, Landeras, E.² y García-Jiménez, J.¹

¹Instituto Agroforestal Mediterráneo, Universidad Politécnica de Valencia, Camino de Vera s/n, 46022 Valencia. ²Laboratorio de Sanidad Vegetal, Lucas Rodríguez, 4-bajo, 33011 Oviedo.

En el año 2002 se detectó por primera vez *Phytophthora ramorum* en España afectando a plantas de *Rhododendron*. Desde entonces se han llevado a cabo prospecciones para detectar este patógeno en viveros de plantas ornamentales, en centros de jardinería, en jardines públicos y en masas forestales. En medio selectivo PARBH se realizaron aislamientos de plantas de *Rhododendron*, *Viburnum* y *Camellia* que mostraban síntomas típicos de la enfermedad: manchas necróticas foliares y muerte de brotes. Se obtuvo un total de 89 aislados de *Phytophthora* procedentes de diferentes zonas geográficas de España, que fueron identificados como *P. ramorum* basándose en las siguientes características: morfología de la colonia, ratio de crecimiento, temperaturas cardinales de crecimiento y morfología y dimensiones de los esporangios. Los aislados se aparearon con las cepas de referencia A1 y A2 de *P. cryptogea* en medio CPA (agar con porciones de zanahoria). Todos los aislados complementaron con la cepa A2. Para el análisis de la diversidad genética se utilizó la técnica de ISSR (Inter Simple Sequence Repeat) con cuatro cebadores de dinucleótidos y seis cebadores de trinucleótidos. No se observó variación entre genotipos. Se llevaron a cabo ensayos de resistencia a metalaxil (el 89,9 % de los aislados resultaron sensibles, el 2,2 % con sensibilidad intermedia y el 7,9 % fueron resistentes) y mefenoxam (94,4 % sensibles y 5,6 % con sensibilidad intermedia). Sólo los aislados de *Camellia* de 2007 resultaron con sensibilidad intermedia o resistencia a ambos fungicidas. Las pruebas de patogenicidad se llevaron a cabo utilizando 8 aislados de *P. ramorum* con diferentes grados de sensibilidad a ambos fungicidas elegidos según zona geográfica de procedencia y hospedante. Cada aislado seleccionado se inoculó en 10 hojas de *Rhododendron*, *Viburnum* y *Camellia* con una suspensión de 10^4 zoosporas ml^{-1} . Las hojas inoculadas se incubaron a 22 °C en cámara húmeda durante 4 días. Se evaluó el área de la lesión (mm^2) desarrollada sobre cada hoja y los datos se analizaron estadísticamente. Los ensayos se repitieron 2 veces. Los resultados mostraron que los aislados resistentes fueron significativamente ($P < 0,05$) más agresivos que los aislados sensibles. Los aislados no mostraron especificidad al hospedante.

P-58**IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE AISLADOS ESPAÑOLES DE *Pythium tracheiphilum* EN LECHUGA Y ESCAROLA**

Berbegal, M., Álvarez, L.A., Pérez-Sierra, A., García-Jiménez, J. y Armengol, J.

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

Desde 2003 la “necrosis vascular” causada por *Pythium tracheiphilum* afecta a lechuga en zonas productoras de Asturias y Castellón, principalmente durante los meses de invierno. En 2008, una enfermedad de similar etiología a la observada en lechuga se detectó por primera vez en escarola (*Cichorium endivia* L.) en Castellón. La sintomatología observada se caracterizaba por un desarrollo irregular de las plantas y necrosis vascular. De estas plantas se obtuvieron consistentemente aislados de *P. tracheiphilum* que se caracterizaron morfológica, fisiológica y molecularmente junto con aislados de lechuga procedentes de Asturias y Castellón.

Morfológicamente, las características de los aislados se ajustaron a las descritas para *P. tracheiphilum*. La identificación se confirmó mediante la secuenciación de la región ITS con los primers ITS4-ITS6 y comparación con las secuencias de aislados de esta especie depositadas en el GenBank. En el caso de los aislados de lechuga procedentes de Asturias, características fisiológicas tales como la temperatura máxima de crecimiento (27 °C), ratio de crecimiento diario a 23 °C (9 mm día⁻¹), y el aspecto de la colonia en medio PDA (petaloide), coincidieron con las descritas para aislados de *P. tracheiphilum* de referencia. Sin embargo, la temperatura máxima de crecimiento de los aislados de lechuga y escarola procedentes de Castellón fue de 29 °C, su ratio de crecimiento diario superior a 25 mm día⁻¹ y el aspecto de la colonia no petaloide.

Se realizaron ensayos de patogenicidad en diferentes variedades de lechuga (tipos romana, acogollada y roja) y escarola (tipos hoja lisa y rizada) en condiciones controladas a 23 °C. Para ello, se inocularon dos aislados de *P. tracheiphilum* de lechuga procedentes de Asturias y Castellón, respectivamente, y un aislado de escarola procedente de Castellón, evaluando la severidad de los síntomas en las plantas una semana después de la inoculación.

No se observó especificidad patógena de los aislados inoculados pero sí una virulencia diferencial. El aislado de lechuga de Asturias resultó menos virulento que el resto en los diferentes tipos de lechugas inoculadas. La variedad de lechuga Romana resultó significativamente más susceptible que las otras a los aislados de *P. tracheiphilum* procedentes de lechuga.

Las diferencias observadas entre los aislados estudiados evidencian una adaptación de *P. tracheiphilum* que puede estar asociada a las diferentes condiciones climáticas entre regiones geográficas. Se trata de la primera cita en España de *P. tracheiphilum* causando necrosis vascular en escarola.

P-59**PRESENCIA DE *Fusarium circinatum* EN ESTRUCTURAS REPRODUCTIVAS DE *Pinus pinaster* EN GALICIA**

Pintos, C., Pérez- Otero, R., Aguín, O., Mansilla, J.P., González-Penalta, B. y Rial, C.

Estación Fitopatológica do Areeiro. Deputación de Pontevedra. Subida a la Robleda s/n. 36153 Pontevedra. E- mail: cpintos@efa-dip.org

Estudios anteriores, realizados en la Estación Fitopatológica do Areeiro (EFA), han mostrado la presencia del hongo *Fusarium circinatum* (hongo de cuarentena en Europa) sobre plántulas de vivero, madera y semillas de pinares gallegos. Tratando de conocer mejor la biología del patógeno y sus posibles vías de entrada planteamos el estudio de las flores, como estructuras reproductivas del ciclo vital del pino, implicadas directamente en la formación de las semillas; para ello, en este trabajo se recogen los datos de la presencia de *F. circinatum*, sobre semillas y flores masculinas de *P. pinaster*, en la provincia de Pontevedra. Se muestrearon 102 puntos en pinares con árboles adultos de *P. pinaster*, donde se tomaron piñas maduras, en primavera de 2006, para obtener las semillas. Tras su análisis en laboratorio, los aislados positivos del patógeno determinaron los puntos de muestreo, de las flores masculinas, en la primavera de 2007, siendo un total de 62, de los cuales sólo se pudo tomar muestra en 51, debido a la pérdida de masa forestal por incendio.

En laboratorio se sembraron, sin esterilizar, semillas o flores en medio K (Komada). Las colonias de *Fusarium* sp. obtenidas se transfirieron a medio SNA (Spezieller Nährstoffarmer Agar), creciendo 10 días a 25° C, en oscuridad. La identificación de *F. circinatum* se hizo por morfología y técnicas moleculares. La extracción del ADN se realizó a partir de micelio crecido sobre celofán en el medio SNA. La amplificación se llevó a cabo con los cebadores CIRC1A y CIRC4A, obteniéndose un fragmento de 360 pb en caso positivo. Los resultados muestran que de los 51 puntos, cuyas semillas resultaron positivas, en más de la mitad (30 puntos), las flores masculinas también estuvieron infectadas por *F. circinatum*. Esto sugiere la posibilidad de que pueda ser el proceso de polinización, previo a iniciarse el desarrollo de las semillas, una de las vías de entrada de las esporas del hongo en el interior de la piña, sin embargo, serán necesarios más estudios sobre la capacidad infectiva de *F. circinatum* en las estructuras florales del pino, masculinas y femeninas, para conocer mejor su biología.

P-60

DETECCIÓN DE CEPAS HIPOVIRULENTAS DE *Cryphonectria parasitica* EN CASTAÑOS DE GALICIA

Montenegro, D.¹, Aguín, O.¹, Sainz, M.J.² y Mansilla, J.P.¹

¹Estación Fitopatológica de Areeiro. Deputación de Pontevedra. Subida a la Robleda s/n 36153 Pontevedra. E-mail: oaguin@efa-dip.org

²Departamento de Producción Vegetal. Universidad de Santiago de Compostela. Campus Universitario s/n. 27002 Lugo.

El cancro del castaño, causado por *Cryphonectria parasitica*, es una enfermedad ampliamente extendida en Galicia. Las únicas perspectivas para su control se basan en el conocimiento de las características de las poblaciones del hongo en las zonas afectadas y en la introducción de cepas hipovirulentas, que tienen una virulencia atenuada debido a que están infectadas por un virus de ARN bicatenario (ARNbc) denominado *Cryphonectria hypovirus* (CHV). Las cepas hipovirulentas pueden transmitir el hipovirus a las cepas virulentas mediante anastomosis hifal, provocando la cicatrización de las lesiones. El objetivo de este trabajo fue caracterizar los tipos de compatibilidad vegetativa (vc) y la virulencia de las poblaciones de *C. parasitica* en sotos de dos provincias gallegas para investigar la presencia de cepas hipovirulentas que fuesen compatibles con los tipos vc presentes en las zonas de estudio.

Durante el año 2007, se recogieron muestras de corteza con síntomas de cancro en masas de castaños de Lugo y Ourense, de las que se obtuvieron 612 aislados de *C. parasitica*. La virulencia de los aislados se determinó mediante la observación de las características morfológicas en cultivo (coloración del micelio, ausencia/presencia de picnidios) y la extracción del ARNbc. El estudio de la compatibilidad vegetativa se realizó mediante el método de barrera/fusión en medio PDAg. De los 612 aislados, solo cuatro, procedentes de la provincia de Lugo, mostraron fenotipo hipovirulento y presencia de ARNbc. El tamaño del ARN extraído, de aproximadamente 12,7 kb, coincidió con el descrito para la especie *Cryphonectria hypovirus* tipo 1 (CHV1). Dos cepas hipovirulentas fueron compatibles con el tipo vc A, el más abundante en Galicia, otra cepa se correspondió con el tipo vc C, el segundo más abundante en la comunidad gallega, y la cuarta con el tipo vc B. La detección de cepas hipovirulentas compatibles con los tipos vc mayoritarios en las poblaciones de *C. parasitica* en Galicia facilitará la puesta en marcha de un programa de control biológico contra el cancro en las masas de castaño de Lugo y Ourense.

P-61**HONGOS ASOCIADOS A PROCESOS DEGRADATIVOS DE LA MADERA DEL KIWI EN GALICIA**

Pintos, C., Aguín, O., González-Penalta, B. y Mansilla, J.P.

Estación Fitopatológica Do Areeiro, Deputacion De Pontevedra, Subida a la Robleda s/n E-36153 Pontevedra. E- mail: cpintos@efa-dip.org

El cultivo del kiwi en Galicia ha experimentado, desde su puesta en marcha en la década de los ochenta hasta la fecha actual, diversos procesos de reconversión orientados a obtener una producción de mayor calidad. Dentro de estos estándares de calidad, el aspecto fitosanitario del cultivo también ha ido evolucionando. La presencia, en este momento, de plantaciones de mas edad ha dado lugar a la aparición de nuevas patologías fúngicas, algunas de ellas ya citadas en otros países, como Italia, Francia o Chile, la mayoría de las cuales también han sido identificadas formando parte del proceso degradativo de la madera del viñedo en nuestra comunidad. Desde que en el año 2000 se aísla *Diaporthe actinidiae*, como importante patógeno del kiwi, el estudio de los hongos de madera ha sido una prioridad para nosotros.

En este trabajo presentamos los resultados de un muestreo realizado en las principales plantaciones de kiwi, de la provincia de Pontevedra, en el cual se recogieron muestras sintomáticas de madera, las cuales presentaban, en la mayoría de los casos, necrosis sectoriales o centrales duras o blandas y/o carpóforos fúngicos y en otros casos una hipertrofia del tronco (elefantiasis) el cual, en secciones trasversales, aparecía con un oscurecimiento irregular de los anillos de crecimiento. Las muestras fueron analizadas siguiendo los procedimientos de laboratorio habituales y los hongos aislados se identificaron siguiendo técnicas morfológicas y moleculares. Para el análisis molecular la extracción del ADN se realizó a partir de micelio aislado en cultivo y/o directamente de la madera. La amplificación se llevó a cabo con iniciadores universales y específicos. Los resultados moleculares se confirmaron por secuenciación. Los principales hongos aislados han sido hifomicetos como *Fusarium solani*, *Cylindrocarpon liriodendri*, *Verticillium luteoalbum* y *Cadophora malorum*, ascomicetos como *Neofusicoccum parvum* y *Botryosphaeria dothidea* y basidiomicetos, principalmente *Chondrostereum purpureum*, *Schizophyllum commune* y *Fomitiporia mediterranea*. La etiología del proceso degradativo de la madera del kiwi, no está clara, los distintos hongos parecen jugar diferentes papeles en el mismo, pudiendo actuar algunos como precursores de los otros, utilizando en la mayoría de las casos, una herida de poda como principal vía de penetración y pudiendo ser la fuente de inóculo los restos de poda o el propio suelo.

P-62

ESPECIES DE *FUSARIUM* PRESENTES EN TALLO DE MAÍZ: ENSAYO DE SEIS HÍBRIDOS EN TRES LOCALIDADES GALLEGAS

Pintos, C.¹, Aguín, O.¹, González- Penalta, B.¹, Mansilla, J.P.¹, Malvar, R.² y Santiago, R.²

¹Estación Fitopatológica Do Areeiro, Deputación De Pontevedra. Subida a la Robleda s/n, E-36153 Pontevedra, España. E- mail: cpintos@efa-dip.org

²Misión Biológica de Galicia, CSIC- Apartado 28, 36080 Pontevedra, España
E-mail : rmalvar@mbg.cesga.es, rsantiago@mbg.cesga.es

Muchas de las especies del género *Fusarium* son productoras de micotoxinas fundamentalmente, fumonisinas, tricotecenos y zearalenona, las cuales tienen efectos tóxicos sobre plantas, animales e incluso humanos. Para determinar las especies de *Fusarium* presentes en el tallo de seis híbridos de maíz hemos diseñado un ensayo en el cual dichos híbridos fueron sembrados, en tres localidades de la provincia de Pontevedra (Barrantes, Valongo y Pontevedra) y en dos fechas de siembra (temprana y tardía), siguiendo un diseño en bloques al azar con tres repeticiones. En recolección se tomaron muestras de tallo, por debajo de la mazorca principal, procedentes de tres plantas por parcela, en cada uno de los seis ensayos.

Trozos de tallo, de las zonas próximas a los entrenudos, fueron sembrados en medio komada (K). Los aislados de *Fusarium* obtenidos fueron transferidos a medio PDA (Patata Dextrosa Agar) y CLA (Carnation Leaf Agar) para el estudio de sus características fisiológicas y morfológicas: color, velocidad de crecimiento, forma tamaño y distribución de los microconidios, clamidosporas, forma de los macroconidios, etc. El análisis molecular se llevó a cabo a partir de micelio aislado en medio PDA. El ADN amplificado, con los primers EF1-EF2, fue secuenciado y el análisis de las secuencias se realizó con las bases de secuencias del GenBank y *Fusarium* Database.

Las especies de *Fusarium* identificadas fueron: *F. avenaceum*, *F. begoniae*, *F. croockwellense* (*F. cerealis*), *F. culmorum*, *F. foetens*, *F. graminearum*, *F. oxysporum*, *F. poae*, *F. sambucinum*, *F. sporotrichioides*, *F. sterilihyphosum* y *F. verticillioides*; siendo las especies mas frecuentes, ya que aparecen en todas las parcelas y en todos los genotipos, *F. begoniae*, *F. graminearum* y *F. verticillioides*. *F. graminearum* y *F. verticillioides* han sido ampliamente citadas como patógenos de caña y grano de maíz siendo, así mismo, importantes productoras de micotoxinas, sin embargo, en el caso de *F. begoniae*, hasta la fecha únicamente se ha comprobado su papel como productor de micotoxinas (moniliformin) en inoculaciones artificiales de grano pero no existen citas de infecciones naturales en grano o tallos de maíz.

P-63

ETIOLOGÍA DE LA MONILIOSIS DEL MEMBRILLERO EN LA PROVINCIA DE CÓRDOBA

Cabello, D.¹, Moral, J.¹, Lovera, M.², Arquero, O.² y Trapero, A.¹

¹Dpto. de Agronomía (Patología Agroforestal), Universidad de Córdoba, Campus de Rabanales, Edif. C4, 14071 Córdoba. E-mail: trapero@uco.es

²Dpto. Fruticultura IFAPA "Alameda del Obispo". Apdo. 3290, 14080 Córdoba

El cultivo del membrillero (*Cydonia oblonga*) en la sierra Subbética cordobesa se ve afectado por varias enfermedades, la más grave es la necrosis de brotes y momificado de frutos jóvenes o Moniliosis, cuyo agente causal es *Monilia linhartiana* (anamorfo *Monilinia cydoniae*).

Los conidios, obtenidos de hojas naturalmente infectadas, aparecían en cadenas unidos a través de disyuntores, eran hialinos, limoniformes y de $10.88 \pm 1.73 \times 8.48 \pm 1.11 \mu\text{m}$. Los apotecios se formaron sobre frutos momificados caídos al suelo, en grupos de 1-13 apotecios por fruto y media de 3.95. Cuando éstos alcanzaban la madurez eran de $5.61 \pm 3.49 \text{ mm}$ de altura y de $3.06 \pm 0.94 \text{ mm}$ diámetro de copa. Los apotecios fueron clasificados en función de su desarrollo en cuatro estados: 1) copa sin formar. 2) principio de formación de copa "catavino". 3) copa ensanchada "copa de champán". 4) copa abierta "disco". Los estados 3 y 4 se correspondieron a apotecios maduros. Las ascas se agrupaban sobre la superficie del himenio, siendo claviformes, no-operculadas y de $98.73 \pm 24.69 \times 7.18 \pm 1.93 \mu\text{m}$. Junto a ellas se observaron parafisos claviformes. Las ascosporas eran elipsoidales, hialinas de pared delgada y de $10.12 \pm 0.98 \times 5.64 \pm 0.63 \mu\text{m}$.

La formación de conidios se estudió en siete medios de cultivo distintos: Patata-Dextrosa-Agar (PDA), PDA+Acetona, Harina de Avena, Patata-Sacarosa-Agar (PSA), V8-Agar, V8-Agar+Membrana de celulosa y Melocotón-Agar. En ninguno de ellos se desarrollaron conidios aunque en PSA se observó la formación de microconidios que están asociados a procesos de reproducción sexual. En este mismo medio el patógeno mostró un amplio rango de temperaturas de crecimiento micelial (5-30°C) y un óptimo de 22.4°C.

La caracterización patogénica se realizó inoculando membrillos maduros con un disco de PDA más micelio del patógeno. Como testigos se usaron *M. fructigena* y *M. laxa*. En membrillos maduros *M. linhartiana* no resultó patogénica, en cambio lo fueron las otras dos especies estudiadas.

La caracterización molecular se realizó mediante la secuenciación de la región ITS1-5.8S-ITS2 del ADN ribosómico. *M. linhartiana* se localizó en el grupo de especies de *Monilinia* con especialización parasitaria y conidios con disyuntores (grupo *Disjuntoriae*) y en el subgrupo de especies que afectan a rosáceas, próxima a *M. amelanchieris*. Esta es la primera vez que se secuencia la citada región en *M. linhartiana*, siendo distinta de las secuencias conocidas del resto de especies de este género.

P-64**DESARROLLO Y EVALUACIÓN DE MEDIOS SEMISELECTIVOS PARA EL AISLAMIENTO DE *COLLETOTRICHUM* SPP. EN OLIVO**

Cherifi, F., Moral, J. y Trapero, A.

Dpto. de Agronomía (Patología Agroforestal), Universidad de Córdoba, Campus de Rabanales, Edif. C4, 14071 Córdoba. E-mail: trapero@uco.es

La Antracnosis del olivo causada por *Colletotrichum acutatum* y *C. gloeosporioides* es la principal enfermedad del fruto de este cultivo. La dinámica poblacional del patógeno en los distintos tejidos del huésped no es conocida. Por ello, disponer de un medio de cultivo semiselectivo sería fundamental para abordar este aspecto. El efecto sobre el desarrollo micelial del patógeno se estudió calculando la Inhibición Relativa del Crecimiento (IRC%) en 14 medios de cultivo compuestos por Agar Patata Dextrosa (PDA) más distintos fungicidas y antibióticos, seleccionados de trabajos publicados sobre aislamiento de *Colletotrichum* spp. de otros huéspedes. Los medios seleccionados por causar una IRC (%) significativamente menor (ANOVA; Tukey, $P = 0.05$) fueron aquellos que contenían Iprodiona y/o Sulfato de Cobre (SO_4Cu). Los medios complejos fueron desestimados por causar una elevada IRC ($> 60\%$). Posteriormente, se evaluó el efecto de cuatro fungicidas (Benomilo, Fenarimol, Iprodiona y Vinclozolina) y un antibiótico (Nistatina) a dosis crecientes (0.2, 1, 5, 25 y 125 ppm) sobre el crecimiento micelial del patógeno y de especies de cinco géneros fúngicos saprófitos más frecuentes en olivo: *Alternaria*, *Aureobasidium*, *Fusarium*, *Mucor* y *Phoma*. De los 5 productos evaluados, se seleccionó Iprodiona ya que, para este fungicida, *Colletotrichum* spp. mostró una Dosis de Inhibición 50% (DI_{50} ; test Probit) significativamente (ANOVA, Tukey, $P = 0.05$) mayor que *Alternaria* sp. y *Phoma* sp., principales contaminantes de los tejidos aéreos del olivo. En evaluaciones realizadas en hojas y ramitas procedentes de olivos gravemente afectados por Antracnosis se observó que el medio PDA+Iprodiona (100 ppm) redujo significativamente (ANOVA; LSD, $P = 0.05$) el aislamiento de *Alternaria* sp. respecto al PDA sin fungicida sin afectar al aislamiento de *Colletotrichum* sp. En cambio, el medio PDA+ SO_4Cu (100 ppm) fue el más efectivo para la cuantificación de *Colletotrichum* sp. en aceitunas momificadas del suelo ya que disminuyó el número de contaminantes de este sustrato. Actualmente, los medios de semiselectivos PDA+Iprodiona (100ppm) y PDA+ SO_4Cu (100 ppm) acidificados con ácido láctico [2.5 ml (25% vol/vol) por litro] están siendo utilizado de forma satisfactoria para estudiar las poblaciones de *Colletotrichum* spp. en los tejidos aéreos y los frutos momificados de olivo, respectivamente. Además, el medio PDA acidificado + Iprodiona (40 ppm) + SO_4Cu (100 ppm) está permitiendo cuantificar los conidios del patógeno producidos en las hojas del olivo.

P-65

SUSCEPTIBILIDAD DE ESPECIES ARBÓREAS ACOMPAÑANTES DEL PINSAPO A LA INFECCIÓN POR *Heterobasidion abietinum*

De Vita, P.¹, Luchi, N.², Capretti, P.², Trapero, A.¹ y Sánchez, M.E.¹

¹Dpto. Agronomía (Patología Agroforestal), Universidad de Córdoba.

²Dip. di Biotecnologie Agrarie, Sez. Patologia Vegetale, Università degli studi di Firenze, Italia. E-mail: paolodevita@hotmail.it

Los últimos trabajos realizados sobre la podredumbre radical que afecta a *Abies pinsapo* en Andalucía han identificado al agente causal como *Heterobasidion abietinum*. En marzo de 2007 empezó un proyecto para el control de la podredumbre radical del pinsapo. El objetivo de este trabajo ha sido estudiar la susceptibilidad a *H. abietinum* de las especies arbóreas con las que el pinsapo comparte su hábitat.

Se inocularon con aislados de *H. abietinum* plantones de las especies más comunes en el pinsapar (*Pinus halepensis*, *Pinus pinaster*, *Quercus faginea*, *Quercus rotundifolia*), todas procedentes de viveros andaluces y de edad comprendida entre los 4 y los 7 años. La inoculación se realizó mediante discos de MA (agar-malta al 1,5%) con micelio en crecimiento activo, aplicados en heridas practicadas en la base del tronco. Lo mismo se hizo con los testigos, aplicando a éstos el agar libre del patógeno. Para la inoculación se utilizaron aislados de *H. abietinum* heterocarióticos procedentes de pinsapo y conservados en la micoteca del Grupo de Patología Agroforestal de la UCO. Al cabo de 4 meses, durante los cuales las plantas permanecieron en umbráculo bajo un régimen de riego de 2-3 veces por semana, los tallos de cada planta, previamente troceados, se incubaron en cámara húmeda durante 2 semanas a 25° C, para estimular la esporulación del hongo y así poder detectarlo y medir la colonización del patógeno.

Excepto *Q. faginea*, todas las especies estudiadas fueron susceptibles a la infección por *H. abietinum*. *Pinus halepensis* y *P. pinaster* mostraron un grado de colonización que no difirió significativamente de la del pinsapo. *Quercus rotundifolia*, por el contrario, mostró una susceptibilidad significativamente menor que las coníferas. Estos resultados indican que las especies de *Pinus* que crecen en la zona podrían servir para la multiplicación y dispersión del patógeno, por lo que se debería favorecer el desarrollo de bosques mixtos *Abies-Quercus*.

P-66

ETIOLOGÍA DE LA ROYA DEL MEMBRILLERO-ENEBRO EN LA SIERRA SUBBÉTICA CORDOBESA

Pérez, M.¹, Moral, J.¹, Arquero, O.² y Trapero, A.¹.

¹Dpto. de Agronomía (Patología Agroforestal), Universidad de Córdoba, Campus de Rabanales, Edif. C4, 14071 Córdoba. E-mail: trapero@uco.es

²Dpto. de Fruticultura, IFAPA "Alameda del Obispo". Apdo 3092, 14080 Córdoba.

El membrillar ocupa en la provincia de Córdoba unas 900 ha concentradas en la comarca de la sierra Subbética. En prospecciones realizadas durante el 2005-08 para evaluar su estado fitosanitario se han observado infecciones de roya afectando hojas, frutos y sus pedúnculos. Sobre estos tejidos se detectó el estado ecial del patógeno. En el haz de la hoja se observaron espermogonios anaranjados en grupos de 7 a 16 y de 149 a 197 μm de diámetro. Los ecios eran tubulares de $0.67\pm0.23 \times 0.46\pm0.1$ mm. Las eciosporas eran globoides, marrón-pálido de 23.1 ± 1.9 μm de diámetro y con 3-6 poros germinales. Las células del peridio eran rectángulo-irregulares y rugosas de $71.3\pm10.5 \times 24.1\pm6.4$ μm . Atendiendo a su estado ecial el género del patógeno fue identificado como *Gymnosporangium*. A finales de invierno el estado telial del patógeno fue detectado en enebro (*Juniperus oxycedrus*). Sobre éste se diferenciaron claramente dos síndromes:

1) En el primero el patógeno producía acortamiento de los entrenudos y disminución del tamaño de las hojas formándose escobas de brujas que daban a la planta un aspecto achaparrado. El patógeno coloniza sistémicamente ramas gruesas y finas formando numerosos telios anaranjados y fusiformes de $1.10\pm0.23 \times 0.43\pm1.72$ mm. Las teliosporas eran bicelulares, marrón-amarillentas, fusiformes o lanceoladas de $46.24\pm5.13 \times 13.28\pm1.23$ μm , pared de 1.6 ± 0.44 μm y con un pedicelo cilíndrico y largo hasta 209 μm . Estos caracteres permiten identificar al patógeno como *G. clavariiforme*.

2) El segundo síndrome observado se localizaba en ramas gruesas y consistía en engrosamientos acompañados de chancros, que en ocasiones producían su muerte. Sobre la lesión se formaban telios marrones oscuros, aterciopelados y de forma cónica irregular de $2.25\pm0.44 \times 1.84\pm0.43$ mm. Se detectaron dos tipos de teliosporas bicelulares; así, el 83% eran marrón-pálido, fusiformes, de $45.68\pm4.24 \times 20.52\pm1.82$ μm , con pared de 1.63 ± 0.39 μm y pedicelo cilíndrico hasta 612 μm . En cambio, el 17%, eran marrón-oscuro, de $46.24\pm5.13 \times 13.28\pm1.23$ μm , pared de 1.63 ± 0.39 μm . y pedicelo cilíndrico hasta 228 μm . Estos caracteres permiten identificar al patógeno como *G. confusum*.

Para estudiar la incidencia de la roya en enebro se muestrearon 171 individuos de los cuales el 65% mostraban infección por una de las dos especies, el 28% por *G. confusum*, el 26% por *G. clavariiforme* y el 11 % mostraban infecciones dobles. El estado ecial también fue detectado en majuelo (*Crataegus monogyna* subsp. *brevispina*) en la misma comarca. La secuenciación de la región (5.8S-ITS2-28S) del ADN ribosómico ha permitido identificar de momento a *G. clavariiforme* en membrillero y las dos especies mencionadas en majuelo.

P-67**UN ESTUDIO COMPARATIVO DE DISTINTOS PROTOCOLOS qPCR EN TIEMPO REAL PARA LA DETECCIÓN CUALITATIVA Y CUANTITATIVA DE *Verticillium dahliae* EN PLANTONES DE OLIVO**

Pérez-Serrano, V.M.¹, Landa, B.B.² y Jiménez-Díaz, R.M.^{1,2}

¹ETSIAM, Universidad de Córdoba, 14071, Córdoba; ²Dpto. de Protección de Cultivos. Instituto de Agricultura sostenible, CSIC, Apdo. 4084, 14080 Córdoba

La Verticilosis del olivo (VO) causada por *Verticillium dahliae* (Vd) es una de las enfermedades más importantes del olivar, para la cual no se dispone de medidas de control suficientemente eficientes. La aplicación de medidas previas a la plantación, como el uso de plantas libres del patógeno y su establecimiento en suelo libre de éste, junto con la utilización de cultivares que posean algún nivel de resistencia a los patotipos de Vd, son acciones de control válidas para frenar la extensión de la enfermedad. Por ello, es necesario disponer de tecnologías mejoradas en la eficiencia de detección y cuantificación de la infección temprana y/o asintomática de la planta por el patógeno. En este trabajo se ha realizado un estudio comparativo de tres protocolos de detección y cuantificación de ADN de Vd en olivo basadas en ensayos qPCR en tiempo real, de las cuales dos emplean SYBR® Green I como fluoróforo (SYB-M y SYB-P) y la otra la metodología SCORPION® (SCP). Los distintos protocolos de qPCR demostraron elevada sensibilidad y eficiencia (E) de cuantificación de Vd ($R^2 > 0.95$; E: 80-98%), pero dichos parámetros variaron entre protocolos y fueron influidos significativamente por la matriz de extracción del ADN de la planta (hoja, tallo y raíz). Las reacciones qPCR mostraron inhibición bajo un fondo de 40 ng de ADN de raíz de olivo respecto de la utilización de un fondo en agua; pero la utilización de un fondo de ADN de tallo u hoja determinó que la eficiencia de las amplificaciones no difiriera significativamente ($P > 0.05$), en general, respecto al control en agua. La cantidad mínima de Vd detectable consistentemente varió entre protocolos y fue de 10 a 100 pg de Vd para SYB-M y SCP, y de 1 pg para SYB-P en un fondo de 20 ng de ADN de hoja o tallo. Finalmente hemos constatado la utilidad del protocolo más eficiente, SYB-P, mediante la detección y cuantificación de Vd en hojas de olivos cv. Frantoio infectados por los patotipos defoliante (D) y no defoliante (ND) del patógeno. Los resultados demuestran que el patotipo D de Vd infecta las raíces de plantones de 'Frantoio' y coloniza extensamente los tejidos foliares de ellos, indicando que la reacción de este cultivar a D V. *dahliae* es de naturaleza tolerante y que es necesario desarrollar fuentes de resistencia al mismo.

P-68**MEDIO DE CULTIVO OPTIMIZADO PARA LA IDENTIFICACIÓN DE GRUPOS DE COMPATIBILIDAD MICELIAR EN *Sclerotium rolfsii***

Remesal, E. y Navas-Cortés, J.A.

Instituto de Agricultura Sostenible, CSIC, Apdo. 4084, 14080 Córdoba. E-mail: jnavas@ias.csic.es

La identificación de grupos de compatibilidad miceliar (GCMs) es ampliamente utilizada para el estudio de diversidad genética de poblaciones de diversas especies fúngicas, en particular en *Sclerotinia* spp., *Sclerotium* spp. o *Cryphonectria* spp. Esta técnica está basada en la reacción de antagonismo que se produce al entrar en contacto hifas de aislados incompatibles enfrentados entre sí. Metodológicamente simple, requiere no obstante de un medio de cultivo artificial que permita la identificación inequívoca de las reacciones de compatibilidad-incompatibilidad. En la aplicación de esta técnica para la identificación de GCMs en poblaciones de *S. rolfsii* observamos que los medios de cultivo habitualmente utilizados para ello en esta especie o especies próximas, no permitían diferenciar con claridad las reacciones entre parte de los aislados en el estudio. Por ello, nos planteamos el desarrollo de una técnica optimizada que permitiese su identificación y consiguiente caracterización en GCMs.

Para ello, partiendo de los dos medios de cultivo más utilizados en este tipo de estudios, Agar patata dextrosa (APD) y medio Patterson (AP, Patterson, 1985), se evaluó la influencia de: (i) tipo de medio base, i.e., APD vs. AP; (ii) Modificación de la cantidad de dextrosa del medio base; y (iii) Adición y concentración de colorante. Las diferentes combinaciones experimentales se evaluaron en seis aislados de *S. rolfsii* seleccionados en base a presentar distintos fenotipos de incompatibilidad.

Nuestros resultados indican que para el estudio de GCMs en poblaciones de *S. rolfsii*, el medio de cultivo AP adicionado con 3-6g/L de dextrosa, y enmendado con 180µl de colorante rojo, es el más adecuado para la caracterización de reacciones de compatibilidad-incompatibilidad entre aislados. La reacción de incompatibilidad fue fácilmente identificable por la formación en la zona de contacto de una franja de inhibición miceliar y aparición en el centro de ésta de una línea nítida de color rojo. Por el contrario, en reacciones de compatibilidad se observó un crecimiento miceliar continuo y sin formación de línea coloreada. Dicha reacción pudo además determinarse tras tan solo 5 días a 25°C en oscuridad. Adicionalmente, la reacción observada en el medio de cultivo optimizado se corroboró con observaciones microscópicas de la zona de contacto hifal en apareamientos entre aislados de *S. rolfsii* en cultivos en portaobjetos que demostró la utilidad de la técnica desarrollada.

Investigación subvencionada por el Proyecto AGL2005-00751

P-69

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE CEPAS DE *ASPERGILLUS* NEGROS PRODUCTORAS DE OCRATOXINA A AISLADAS EN UVAS DE LA COMUNIDAD VALENCIANA

Crespo-Sempere, A., Sánchez, M. y Martínez –Culebras, P.V.

Departamento Medicina Preventiva, Universidad de Valencia, Campus de Burjasot, 46100, Valencia. pmartinez@iata.csic.es

La ocratoxina A (OTA) es una micotoxina que se encuentra presente en productos derivados de la uva como el vino, zumo de uva y las uvas pasas. Ello ha lo que ha motivado que la Comisión Europea (ver Reglamento CE Nº 123/2005) haya establecido un máximo tolerable de OTA de 2 ppb, tanto en vino como en otros productos derivados de la uva. La prevención de la contaminación de las uvas en el campo por los hongos productores se considera la medida más eficaz para reducir el nivel de OTA en el vino. Para ello es necesario llevar a cabo estudios de identificación y control de la micoflora contaminante,

Los últimos estudios demuestran que las especies de *Aspergillus* de la sección *Nigri* (*Aspergillus* negros) son la principal fuente de contaminación del vino por OTA. La taxonomía de este grupo de hongos, basada fundamentalmente en criterios morfológicos, es una de las más complejas del género. En este trabajo se ha llevado a cabo una caracterización molecular mediante ap-PCR de 150 cepas de *Aspergillus* de la sección *Nigri* aisladas en la Comunidad Valenciana. Los aislados se agruparon en tres clusters que se corresponden con las especies *A. niger*, *A. tubingensis* y *A. carbonarius*. Las cepas que presentaron diferentes patrones se ap-PCR se seleccionaron para llevar a cabo un análisis filogenético mediante secuenciación de las regiones ITS e IGS del ADN ribosomal. Las cepas representantes se agruparon en dos clusters principales que se corresponden con las especies del agregado *A. niger* y *A. carbonarius*. Los resultados indican una gran variabilidad genética dentro del cluster correspondiente al agregado *A. niger*. Por el contrario en el cluster de *A. carbonarius* apenas se encontró variabilidad y todas las cepas presentaron idéntica secuencia. La caracterización molecular de una amplia colección de cepas de *Aspergillus* negros junto con el análisis filogenético y la comparación con especies de referencia, ha sido de utilidad para resolver los problemas taxonómicos que presentan los *Aspergillus* pertenecientes a la sección *Nigri*. La correcta caracterización de este tipo de hongos es importante para realizar estudios de distribución en la naturaleza y poder establecer relaciones entre tipos moleculares y habilidad para producir OTA.

P-70**ANÁLISIS COMPARATIVO DE LOS GRUPOS DE COMPATIBILIDAD VEGETATIVA Y PATOGENICIDAD DE *Fusarium circinatum* Y *Diplodia pinea* EN CONÍFERAS DEL PAÍS VASCO.**

García-Serna, I. y Iturritxa, E.

Neiker-Tecnalia. Departamento de Producción y Protección Vegetal-Sanidad Forestal. Granja Modelo de Arkaute. Apartado 46 CP01080 Vitoria-Gasteiz.

En este estudio se analiza la diversidad fenotípica de las poblaciones de hongos mediante el estudio de los grupos de compatibilidad vegetativa y la patogenicidad de los aislados.

Para la consecución de los aislados estudiados se realiza un muestreo jerarquizado en tres niveles: Área, plantación y árbol. Se analizan un total de 120 aislados.

Se comparan los resultados obtenidos en las poblaciones de *Fusarium circinatum* y *Diplodia pinea* del País Vasco. Las diferencias significativas en cuanto a la estructura de los grupos de compatibilidad entre los dos hongos indican la posibilidad del origen de la enfermedad del chancro en el País Vasco, generada por *Fusarium circinatum*, a partir de una única introducción. En cuanto a la diversidad de grupos detectada en las poblaciones de *Diplodia pinea* apunta, por contra, tanto hacia múltiples introducciones posibles a partir de semilla importada, como a poblaciones nativas asociadas a bosques naturales de coníferas. Todo ello está relacionado con las diferencias intrínsecas en relación con la naturaleza parásita y saprofita de las dos especies.

P-71

HONGOS DEL COMPLEJO “ASCOCHYTA” EN PROTEAGINOSAS Y LEGUMINOSAS DE CASTILLA Y LEÓN

García-Benavides, P.¹, Martín Zamorano, P.M.¹ y Palomo Gómez, J.L.¹

Centro Regional de Diagnóstico, Junta de Castilla y León, Apdo.61 37080 Salamanca. E-mail: pgb@usal.es

La superficie de secano dedicada en Castilla y León al cultivo de proteaginosas supera las 30.000 ha, destacando el cultivo de guisantes proteaginosos con mas de 24.000 ha.

Durante la primavera de los dos últimos años se han recibido muestras de guisantes con lesiones negras en la base de los tallos, y podredumbre del pié. Otras presentaban hojas con lesiones puntiformes negras que posteriormente se convierten en manchas oscuras zonificadas, hojas y vainas con lesiones circulares de pequeño tamaño con el borde oscuro y el centro de color marrón claro donde se podían observar picnidios. En general, en la parte basal de los tallos se apreciaban zonas necróticas de color oscuro que colapsaban el tallo afectado.

Fragmentos de las zonas necróticas observadas en la base del tallo se sembraron en medio PDAS (suplementado con streptomicina). Asimismo los picnidios se extrajeron de las plantas afectadas, y se dilaceraron en eppendorf con agua estéril y se sembraron diluciones 1/1, 1/10, 1/100 y 1/1000 en PDAS con objeto de obtener cultivos monosporicos.

El diagnóstico morfológico basado en la morfología y biometría de picnidios y conidios ofrece dificultades por su similitud, por lo que se procedió a suplementarlo con diagnóstico molecular.

Para la extracción del DNA genómico de los distintos aislados fúngicos se empleo el REDExtract-N-Amp™ Plant PDR Kit de SIGMA. La amplificación del ADN extraído se llevó a cabo mediante amplificación de la región ITS del ADN ribosomal con los primers ITS 4 ITS 5. 100ng/Kb. del DNA purificado se remitió a la universidad de Salamanca donde se llevo a cabo la reacción de secuenciación. Las secuencias obtenidas se analizaron con el programa Chromas y se compararon con las disponibles en la base de datos del Nacional Center for Biotechnology Information (NCBI) y de European Bioinformatics Institute (EMBL-EBI) utilizando la aplicación Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) (Altschul *et al.*, 1997).

Como resultado de los estudios expuestos anteriormente, los aislados procedentes de las necrosis y picnidios presentes en las plantas analizadas corresponden a las especies: *Phoma medicaginis* var. *pinodella*, *Fusarium equiseti*, *Phoma medicaginis* var. *medicaginis*, *Phoma herbarum*, *Ascochyta pisi*, *Mycosphaerella pinodes* en plantas de guisantes. *Ascochyta lentis* en lenteja. *Colletotrichum truncatum* y *Sclerotinia sclerotiorum* en vezas

P-72

DETECCIÓN DE *Phytophthora citrophthora* EN PAULOWNIA

García Benavides, P.¹, Martín Zamorano, P.M.¹, Redondo García, J.², y Palomo Gómez, J.L.¹

¹Centro Regional de Diagnóstico, Junta de Castilla y León, Apdo.61 37080 Salamanca. E-mail: pgb@usal.es

²Sociedad Cooperativa General Agropecuaria ACOR: E-mail: jrg1953@hotmail.com

La paulownia es un árbol originario de los bosques templados de china, existen varias especies pero es *Paulownia fortunei* con un rápido desarrollo y un crecimiento uniforme y regular la mas solicitada.

En Julio de 2007 se reciben en el laboratorio del Centro Regional de Diagnostico de la Junta de Castilla y León muestras de plantones de Paulownias, procedentes de una plantación experimental para la obtención de biomasa situada en Noharre (Avila). La muestra se componía de árboles secos y otros con retraso de crecimiento. De la zona peri radicular de las plantas afectadas mediante el empleo de trampas de pétalos de clavel se observó la presencia de esporangios. Fragmentos de pétalos de clavel colonizados se sembraron en distintos medios PDAS, PARPH₅, Agar guisantes, y CMA

El diagnóstico inicial se efectuó en función de la morfología y biometría de las estructuras características según las claves de D.J. Stamps y col, C.A.B 1990, y conducían hacia *Phytophthora citrophthora*, pero ante la falta de referencias se optó por el diagnóstico molecular.

Para la extracción del DNA genómico de los distintos aislados fúngicos se empleo el REDExtract-N-AmpTM Plant PDR Kit de SIGMA. La amplificación del ADN extraído se llevó a cabo mediante amplificación de la región ITS del ADN ribosomal con los primers ITS 4 ITS 5. 100ng/Kb. del DNA purificado se remitió a la universidad de Salamanca donde se llevo a cabo la reacción de secuenciación. Las secuencias obtenidas se analizaron con el programa Chromas y se compararon con las disponibles en la base de datos del Nacional Center for Biotechnology Information (NCBI) utilizando la aplicación Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) (Altschul *et al.*, 1997). Todos los aislados secuenciados presentaban una homología superior al 99% frente a *Phytophthora citrophthora*.

P-73**INFLUENCIA DE LA EDAD Y CALIDAD DE ESTACIÓN EN LA APARICIÓN DE HONGOS ENDÓFITOS EN *Populus x euramericana* (DODE) GUINIER “I-214”**

Martín-García, J., Espiga, E. y Diez, J.J.

Laboratorio de Entomología y Patología Forestal. E.T.S. Ingenierías Agrarias. Avda. Madrid 44, 34004. Palencia. E-mail: jorgemg@pvs.uva.es

En la actualidad se hace patente el interés que los investigadores están otorgando a los hongos endófitos, debiéndose la importancia del estudio de estos organismos a la posibilidad de aplicación en varios campos de investigación. En este trabajo se pretende incrementar la escasa información que existe acerca de los hongos endófitos presentes en la especie *Populus x euramericana* (Dode) Guinier “I-214”. Para estudiar la posible relación existente entre la frecuencia de aparición de endófitos con distintas variables como el tejido (hoja ó ramillo), la calidad de estación y la edad de la masa, se seleccionaron 12 parcelas, cada una de ellas con un estado de desarrollo diferente (distintas edades y calidades). A su vez, dentro de cada parcela se seleccionaron los 2 árboles que presentaban una mayor y menor defoliación, y en cada uno de ellos se tomaron muestras de hojas y ramillos, procedentes de las 4 orientaciones del tercio superior de la copa.

En total, fueron aisladas 43 especies de hongos endófitos, 3 pertenecieron a la división Ascomycotina y las restantes a la división Deuteromycotina. Mediante un modelo lineal mixto se observó que la edad y la interacción edad x calidad influyeron en el número de especies, siendo las parcelas jóvenes las de mayor riqueza fúngica, mientras que las parcelas adultas y de calidad pobre fueron las que presentaron una menor riqueza de especies. Finalmente, mediante un análisis multivariante (DCA) se pudo observar como las comunidades fúngicas se diferenciaban claramente en función de la calidad de estación, y en menor medida, en función de la edad de la parcela.

P-74

DIVERSIDAD FÚNGICA ENDOFÍTICA EN RODALES DE *Pinus sylvestris* CON DIFERENTES TASAS DE CRECIMIENTO

Sanz Ros, A.V.¹, Müller, M.² y Diez, J.J.¹

¹Departamento de Producción vegetal y Recursos Forestales. Universidad de Valladolid. Avenida Madrid, 44.. Campus La Yutera. Edificio E, Palencia, Castilla y León, España, C.P. 34003. tonisanz@pvs.uva.es, jdcasero@pvs.uva.es

²The Finnish Forest Research Institute. Vantaa Research Unit, Vantaa Unit . Address: PL 18, FI-01301 Vantaa, Finland. michael.mueller@metla.fi

La comunidad fúngica endófito presente en especies arbóreas puede tener un relevante papel en procesos relativos al desarrollo y a la patología vegetal. Estos hongos permanecen dentro del árbol de forma latente de modo que, en momentos de debilidad del hospedador, que puede ser causada por diversos factores, aprovechan para parasitarlo, causando enfermedad o incluso la muerte. El papel de estos hongos no se conoce bien, ni tampoco las interacciones que puedan generar por la presencia de ciertas especies clave. Su diversidad dentro de un mismo hospedador puede llegar a ser bastante alta y, dependiendo de cual sea su composición, se pueden producir diversas reacciones sobre el hospedador, que van desde la enfermedad hasta la protección contra otros hongos patógenos.

Para este estudio, tras una esterilización en superficie, fueron obtenidos 500 aislados a partir de 120 ramillos de *P. sylvestris* en cultivos puros en PDA (agar patata dextrosa). Estos taxones fueron agrupados, en una primera instancia, por la morfología de las colonias. Posteriormente se procedió, para cada grupo, a la extracción del ADN genómico, amplificación de las regiones ITS del ADN ribosómico con los cebadores ITS1F e ITS4, purificación y cuantificación de este material genético, para su posterior secuenciación. Dichas secuencias fueron comparadas con las obtenidas previamente por otros investigadores y almacenadas en el banco mundial de genes (GeneBank, NCBI), con lo que se asignó a cada aislado el taxón genéticamente mas cercano en el GeneBank. Los hongos fueron obtenidos de 15 parcelas de *Pinus sylvestris* en las que se tomaron muestras biológicas de dos árboles en cada una de ellas. De cada árbol se sacó un canutillo, el cual fue montado y analizado con WinDendro para obtener la edad y tasa de crecimiento media de los últimos 5 y 10 años. Posteriormente fue obtenido el numero de hongos presentes en cada parcela, para su posterior estudio, con el software CANOCO, de los patrones de agrupación de estos hongos respecto de diferentes tasas de crecimiento. El objetivo de este trabajo fue el estudio de la diversidad fúngica presente en pies con diferentes tasas de crecimiento, con el fin de evaluar el papel de estos organismos en procesos de desarrollo en coníferas. Los resultados muestran la presencia de 93 grupos funcionales, que hasta el momento se han clasificado dentro de 60 taxones diferentes, pertenecientes a 40 géneros fúngicos.

Palabras clave: Hongos endófitos, tasa de crecimiento, diversidad fúngica, coníferas.

P-75

FOTOGRAFÍA HEMISFÉRICA COMO HERRAMIENTA PARA LA ESTIMACIÓN DE LA DEFOLIACIÓN EN MASAS DE PINO CARRASCO

Sanz Ros, A.V.¹, Valladares, F.^{2,3} y Diez, J.J.¹

¹Departamento de Producción vegetal y Recursos Forestales. Universidad de Valladolid. Avenida Madrid, 44.. Campus La Yutera. Edificio E, Palencia, Castilla y León, España, C.P. 34003. tonisanz@pvs.uva.es, jdcasero@pvs.uva.es

²Instituto de Recursos Naturales. CCMA. CSIC. Serrano 115. E-28006 Madrid. España.

³Departamento de Biología y Geología, Escuela Superior de Ciencias Experimentales y Tecnológicas, Universidad Rey Juan Carlos, c/ Tulipán s/n, 28933 Móstoles, España.

La Red Europea de Daños a los Bosques (EU/ICP Forests) se viene realizando anualmente desde 1985, y fue puesta en marcha como respuesta al decaimiento observado del estado sanitario en masas forestales de muchos países industrializados. Los resultados de este monitoreo pusieron de manifiesto la existencia de ciertos síntomas, como defoliación y decoloración, que se presentaban, en mayor o menor grado, en todas las parcelas estudiadas. De hecho, el parámetro defoliación ha sido ampliamente utilizado como indicador de sanidad forestal. La defoliación, en este monitoreo, es estimada mediante un parámetro similar, aunque más amplio, denominado transparencia de copa, término que incluye, además de la defoliación *sensu stricto*, otros factores que reducen la cantidad de hoja que presenta el arbolado. Este parámetro es estimado de forma visual mediante la comparación de cada árbol con unas fotografías de referencia que representan los diferentes niveles de cantidad de follaje. Esta metodología puede ser mejorada con el ánimo de reducir la subjetividad y el sesgo durante la evaluación de éstos síntomas. En el presente trabajo se propone una nueva metodología para la estimación indirecta de la defoliación en parcelas de *Pinus halepensis*, que implica el uso de fotografía hemisférica como primer paso para la construcción de un modelo integrado que prediga el grado de defoliación a partir de variables que caracterizan el ambiente luminoso, la arquitectura arbórea y la estructura selvícola de la masa. Para ello, primero se realizó un análisis de componentes principales para reducir la dimensionalidad, y posteriormente se utilizaron modelos generales lineales. En este estudio se demuestra que la defoliación en especies de coníferas es un proceso complejo en el que, además de la presencia de agentes bióticos que provoquen una pérdida de hoja, son necesarias ciertas condiciones para que ésta se produzca. Esta metodología podría ser integrada en los monitoreos forestales que actualmente se llevan a cabo, como el Inventario Forestal Nacional o la Red Europea de Daños a los Bosques.

Palabras clave: Defoliación, Transparencia de copa, Fotografía hemisférica, Indicador, salud forestal, monitoreo.

P-76

EVALUACIÓN DEL ESTADO FITOSANITARIO DE LAS MASAS DE PINO PIÑONERO EN LA RESERVA BIOLÓGICA DE DOÑANAValdezate, M., Pando, V., Pajares, J.A., Alves, F.M. y Diez, J.J.

Departamento de Producción Vegetal y Recursos Forestales. ETSIIAA
Palencia. U. De Valladolid. Avda. Madrid, 57. 34004 Palencia. España.
jdcasero@pvs.uva.es

El presente estudio analizó el grado de defoliación y los hongos asociados a las masas de pino piñonero (*Pinus pinea* L.) presentes en la Reserva Biológica de Doñana. Para ello, se tomaron muestras de acículas sintomáticas (coloración amarilla-marrón) y de ramillos, material que fue analizado con el fin de determinar su flora fúngica. El grado de defoliación y decoloración de las copas se cuantificó según la metodología del ICP Forest. El análisis de las acículas se hizo mediante cámara húmeda.

Como resultado del estudio llevado a cabo se han determinado 50 especies fúngicas. De ellas 37 pertenecen a la subdivisión Deuteromycotina, 12 a la subdivisión Ascomycotina y 1 a la subdivisión Mastigomycotina. La mayoría de las especies fueron saprófitas. Aparecieron un total de 12 hongos patógenos, incluyendo *Pestalotia hartigii*, *Pestalotia stevensonii*, *Scirrhia pini*, *Spaeropsis sapinea*; cuya presencia fue muy baja en la gran mayoría de los casos. El material más colonizado fueron las acículas. No se encontró relaciones entre la defoliación y la presencia de las especies fúngicas en el arbolado. La defoliación media de las parcelas fue de un 25,9%. Sólo 5 parcelas presentaron defoliaciones superiores al 60%. En líneas generales se puede concluir que las masas de pino piñonero de la Reserva Biológica de Doñana gozan de un buen estado fitosanitario, ya que la presencia y daños producidos por hongos patógenos fue relativamente baja. Sin embargo, es preciso tener en cuenta a estos hongos, ya que en condiciones favorables podrían llegar a causar graves problemas a las masas.

P-77**DETECCIÓN DE *P. thornei* EN PLANTAS DE GARBANZO MEDIANTE “nested”-PCR**

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

Instituto de Agricultura Sostenible. CSIC. Alameda del Obispo s/n. 14080 Córdoba. E-mail: ag1peare@uco.es

Los nematodos lesionadores de raíz (*Pratylenchus* spp.) atacan y dañan plantas de garbanzo en la Cuenca Mediterránea y el Subcontinente Indio. La especie mas extendida y que causa un perjuicio más severo es *P. thornei*, el nematodo lesionador de cereales y leguminosas. El control de *P. thornei* mediante la rotación de cultivos se hace difícil debido al amplio rango de plantas huéspedes de esta especie de nematodo. La dispersión de estos patógenos de suelo es pasiva y está asociada al movimiento de suelo infestado y/o sistemas radicales infectados o infestados, maquinaria agrícola, agua de riego, etc. Por estas razones, es de gran interés científico y técnico disponer de herramientas precisas, fiables y de rápida aplicación que permitan detectar *Pratylenchus* spp. en suelos infestados por el mismo y/o raíces de plantas, lo que permitirá poner en marcha la estrategia de control mas adecuada a cada situación, o evitar la introducción de una especie en un área determinada.

En este trabajo se ha puesto a punto un método basado en PCR específica para la detección de *P. thornei* en muestras de raíces de garbanzo infectadas artificialmente. Para el desarrollo del método de diagnóstico *in planta* se ha partido de materiales diferentes de complejidad creciente: 1) mezclas de los ADNs purificados a partir de liofilizado de nematodos y liofilizado de raíz, respectivamente, 2) mezclas de liofilizados de nematodos y de material vegetal, obtenidos de forma independiente, y 3) liofilizados de plantas de garbanzo inoculadas con *P. thornei*. En todos los casos, los análisis PCR para la puesta a punto del método diagnóstico *in planta* estuvieron basados en protocolos nested-PCR. Las parejas de iniciadores utilizadas en las reacciones de amplificación se diseñaron a partir de SCARs previamente identificados y específicamente asociados a *P. thornei*. Los resultados pusieron de manifiesto la validez del método desarrollado para detectar la presencia de cantidades del orden de picogramos de ADN de nematodo en mezclas con 20 ng de ADN vegetal, así como el ADN de nematodo en muestras de raíces de garbanzo infectadas.

Investigación financiada por el Proyecto AGL98/0878

P-78

CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA Y MOLECULAR DEL NEMATODO FORMADOR DE QUISTES DE LA PATATA (*GLOBODERA* SP.) EN CASTILLA Y LEÓN

García Benavides, P.¹, López Robles, J.² y Martín Zamorano, P.¹

¹Centro Regional de Diagnóstico (Junta de Castilla y León) Apartado 61 Salamanca y ²Área de Edafología y Química Agrícola. Facultad de Ciencias. Universidad de Burgos. E-mail: djlopez@ubu.es

La patata es un cultivo tradicional de los regadíos de Castilla y León con una superficie cultivada en el año 2007 de 22.600 ha, situándose la región como la primera productora de patatas a nivel nacional con unas 856.000 t, también cabe destacar las 1.978 ha destinadas a patata de siembra en las provincias de Burgos y Palencia, superficie que representa el 70 % del total nacional. Los nematodos formadores de quistes del género *Globodera* son los patógenos más importantes que afectan al cultivo de la patata, los daños económicos no sólo son debidos al descenso en los rendimientos que se producen, sino también por el descenso de la calidad de los tubérculos, ya que éstos son de menor calibre, con lo cual hay una mayor proporción de tubérculos no comerciales. El objetivo de este trabajo es el de comenzar a caracterizar en Castilla y León de una forma sistemática las distintas poblaciones de los nematodos formadores de quiste de la patata *Globodera rostochiensis* (Wollenwerber) Behrens y *Globodera pallida* (Stone) Behrens, y de este modo conocer su incidencia y distribución ante la próxima aplicación de la DIRECTIVA 2007/33/CE DEL CONSEJO de 11 de junio de 2007 relativa al control de los nematodos del quiste de la patata, y poder establecer sistemas de control integrado con la introducción de variedades resistentes que no seleccionen poblaciones virulentas.

En las zonas de estudio se han aislado poblaciones de *Globodera* las cuales se están reproduciendo y multiplicando en variedades de patata susceptibles bajo condiciones controladas. La caracterización morfológica se ha efectuado con 10 ejemplares de cada población, determinándose los caracteres morfométricos en huevos, juveniles de segundo estadio y quistes. La caracterización molecular se ha efectuado mediante Multiplex polymerase chain reaction (PCR) usando los primers ITS 5, PITsR3 y PITsR4, descritos en la literatura.

En los estudios realizados sobre las poblaciones aisladas se ha determinado *G. rostochiensis* en todas los casos, encontrándose mezcla de *G. rostochiensis* y *G. pallida* solamente en dos localidades de la provincia de Palencia.

P-79**COMPARACIÓN DE DIFERENTES PROTOCOLOS MOLECULARES PARA LA IDENTIFICACIÓN DE NEMATODOS DEL QUISTE DE LA PATATA**

Abelleira, A., Escofet, P., Aguín, O. y Mansilla, J.P.

Estación Fitopatológica do Areeiro. Deputación de Pontevedra. Subida a la Robleda s/n 36153 Pontevedra. E-mail: aabelleira@efa-dip.org

Los nematodos formadores de quistes del género *Globodera* que afectan al cultivo de la patata son *G. rostochiensis* y *G. pallida*. Ambas especies son organismos de cuarentena incluidas en el Anexo I de la Directiva 2000/29/EC y en la lista A2 de la EPPO. En Galicia están presentes las dos especies aunque la más abundante es *G. rostochiensis*.

Para facilitar su identificación y como complemento a su determinación morfológica, en los últimos años se han propuesto diferentes técnicas basadas en el estudio molecular. Por eso el objetivo de este trabajo fue comparar cinco protocolos basados en el análisis del ADN para establecer cual es el más idóneo para el diagnóstico de *G. pallida* y *G. rostochiensis*.

Se analizaron quistes viables de *Globodera* spp. recogidos en plantaciones de patata situadas en diferentes localizaciones de Galicia. La amplificación del ADN se llevó a cabo mediante cinco procedimientos que combinan primers específicos para *G. rostochiensis* y *G. pallida*. Tres métodos se basan en una multiplex-PCR y fueron desarrollados por Bulman y Marshall (1997); Pylypenko *et al.* (2005) y Jogaité *et al.* (2007); mientras que los otros dos, propuestos por Bates *et al.* (2002) y Madani *et al.* (2005), utilizan PCR en tiempo real. Para cada metodología se utilizaron extracciones de ADN obtenidas a partir de 1, 2 y 3 quistes.

Con los tres métodos de multiplex-PCR se ha obtenido la identificación de *G. pallida* y *G. rostochiensis*, tanto de forma individual como combinada; sin embargo, se han observado diferencias de sensibilidad y de duración del proceso, siendo los de Bulman y Marshall (1997) y Pylypenko *et al.* (2005) con los que se obtuvieron mejores resultados. Los protocolos en tiempo real también han demostrado ser de gran eficacia y sensibilidad, sobre todo para *G. pallida*, siendo además más rápidos que los de multiplex-PCR. En todos los casos, la amplificación del ADN se ha conseguido a partir de uno, dos y tres quistes, lo que facilita la caracterización molecular rutinaria de estas dos especies de *Globodera*, especialmente cuando se dispone de poca muestra.

P-80

EL GENERO *XIPHINEMA* ASOCIADO A LA VID EN GALICIA

Abelleira, A., Picoaga, A. y Mansilla, J:P:

Estacion Fitopatoloxica do Areeiro. Deputacion de Pontevedra. Subida a la Robleda s/n. 36153- Pontevedra . E-mail:aabelleira@afa-dip

El género *Xiphinema*, dentro de los nematodos fitoparásitos asociados a la vid, es uno de los que tiene mayor importancia, no solo por los daños directos que le ocasiona, sino también por el papel de transmisor de virus de algunas especies pertenecientes a este género.

Para este trabajo se han analizado un total de 65 muestras procedentes de un muestro, llevado a cabo durante 2006, en plantaciones de vid pertenecientes a la denominación de Origen Rías Baixas, a las que añadimos las muestras de suelo de vid recibidas en la Estación Fitopatológica do Areeiro, en las que se diagnosticaron estos nematodos.

Las muestras fueron procesadas por el método de Flegg y los nematodos extraídos fueron fijados en lactofenol de Amann.

Se han determinado cinco especies de *Xiphinema*: *X. index*, *X. diversicaudatum*, *X. pseudocoxi*, *X. pachtaicum* y *X. brevisicum*.

Destacaremos las especies vectoras de virus por lo que su presencia implica en el cultivo de la vid, *X. index*, con un 7% y *X. diversicaudatum*, con un 9%, ya que son transmisoras de enfermedades tan importantes en este cultivo, como son el entrenudo corto (GFLV) y el virus del mosaico del arabis (ArMV), respectivamente. Las otras especies patógenas según su porcentaje de incidencia son:

X. pachtaicum, perteneciente al grupo-*Xiphinema americanum*, está frecuentemente asociada a la vid y ampliamente distribuida por la cuenca mediterránea. Ha sido la especie más abundante, detectándose en un 42 %.

X. brevisicum, que aparece en un 12 %, ha sido descrita hasta el momento, en el norte de Portugal, sobre vid, pino y vegetación natural. Algunos autores la incluyen dentro de las especies del grupo-*X. americanum* y otros, que discrepan de esta inclusión, la asocian al grupo- *X. pachydermum*.

X. pseudocoxi, incluida en el complejo de *X. coxi*, con una presencia del 11%, ha sido citada en España en la vid y en especies forestales, entre otras.

Por último, en un 14% de las muestras, no se ha identificado la especie debido principalmente a la presencia de estadios juveniles.

P-81

NEMATODOS FITOPARÁSITOS QUE INFECTAN VIÑEDOS EN ANDALUCÍA.

Gutiérrez-Gutiérrez, C.¹, Landa, B.B.¹, Navas-Cortés, J.A.¹, Navas-Castillo, J.², Santos, M.T.³, Pérez Camacho, F.⁴, Jiménez-Díaz, R.M.^{1,4}, y Castillo, P.¹

¹Instituto de Agricultura Sostenible, CSIC, Apdo. 4084, 14080 Córdoba. pcastillo@ias.csic.es. ²Estación Experimental La Mayora, CSIC, 29760 Algarrobo-Costa, Málaga. ³INRP, Laboratório INIA, Oeiras, Portugal. ⁴ETSIAM, Universidad de Córdoba, Edificio C4- "Celestino Mutis", Carretera de Madrid Km 396, Campus de Rabanales, 14071 Córdoba

Las infecciones de la planta por nematodos fitoparásitos, particularmente *Xiphinema index*, *X. italiae*, *Meloidogyne* spp., *Pratylenchus* spp., y *Mesocriconema* spp., se han asociado frecuentemente con síntomas de decaimiento y pérdidas de vigor de los viñedos. En España, las investigaciones sobre nematodos que afectan al viñedo se han concentrado en la Comunidades Autónomas de Canarias, Castilla La Mancha y La Rioja. En Andalucía el estudio de la distribución y extensión de los ataques por nematodos fitoparásitos en viñedos es muy limitada, y ha estado circunscrita a los nematodos transmisores de virus. Por ello, el objetivo de esta investigación es determinar la distribución y extensión de los ataques por nematodos fitoparásitos en viñedos de Andalucía.

Para ello se han llevado a cabo prospecciones fitopatológicas de en las zonas de cultivo de vid con Denominación de Origen (Condado de Huelva, Jerez y Montilla-Moriles) en dos fases de desarrollo del cultivo, incluyendo los meses de mayo-junio y septiembre-octubre. Los nematodos detectados se han identificado mediante caracterización morfológica clásica. Adicionalmente, en el caso de especies de especial interés fitopatológico para la vid (*Meloidogyne* spp., *Xiphinema* spp. y *Pratylenchus* spp.) se llevó a cabo la determinación del patrón de esterasas del nematodo, así como amplificación por PCR específica y secuenciación parcial de las regiones del ADN ribosómico: ITS, 18S, y los fragmentos D2-D3 del gen 28S. Asimismo, una vez identificadas las especies de nematodos vectores de virus, se ha diagnosticado la presencia del virus del entrenudo corto infeccioso (*Grapevine fanleaf virus*, GFLV) mediante análisis ELISA-DAS y de RT-PCR a partir de extractos enriquecidos en ds-RNA.

Los estudios realizados han identificado severas infestaciones por diversos grupos de nematodos fitoparásitos en las tres zonas de Denominación de Origen estudiadas, entre los que destacan por su importancia fitopatológica en vid *Longidorus* sp., *Meloidogyne arenaria*, *M. incognita*, *M. javanica*, *Mesocriconema xenoplax*, *Pratylenchus vulnus*, *Trichodorus* sp., *Xiphinema index*, *X. italiae*, y *X. pachtaicum*.

Investigación subvencionada por el Proyecto P06-AGR-01360, CICE, Junta de Andalucía

P-82

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE AISLADOS DE *Meloidogyne hispanica* (NEMATODA, MELOIDOGYNIDAE) MEDIANTE ANÁLISIS FILOGENÉTICO DE DIFERENTES GENES DEL ADN.

Landa, B.B.¹, Palomares-Rius, J.E.¹, Vovlas, N.², Carneiro, R.M.D.G.³, Maleita, C.M.N.⁴, Abrantes, I.M. de O.⁴ y Castillo, P.¹

¹Instituto de Agricultura Sostenible, CSIC, Apdo. 4084, 14080 Córdoba. ag2lacab@uco.es. ²Istituto per la Protezione delle Piante, Sezione di Bari, CNR, Bari, Italy. ³Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, Brazil. ⁴Departamento de Zoologia, Universidade de Coimbra, Coimbra, Portugal.

Meloidogyne hispanica, el nematodo nodulador de Sevilla, ataca diversos cultivos herbáceos (tomate, calabaza, clavel, banana, ornamentales, caña de azúcar) y leñosos (melocotonero, vid, higuera). Originalmente *M. hispanica*, parecía estar restringido a la parte meridional de España y asociado con infecciones de *Prunus* spp., pero posteriormente su distribución geográfica se ha confirmado en diferentes regiones agrícolas de todo el mundo, incluyendo Europa, África, Asia, Australia, y América del Norte, Central y Sudamérica. La diferenciación de *M. hispanica* de otras especies de *Meloidogyne*, especialmente *M. arenaria*, resulta muy difícil basándose en caracteres morfológicos y/o biológicos. Ambas especies son bastante similares y se pueden confundir fácilmente en identificaciones taxonómicas no precisas. El objetivo de esta investigación ha sido caracterizar molecularmente tres aislados de *M. hispanica* de diferente origen geográfico (Brasil, Portugal, y España) mediante (i) PCR específicas para *Meloidogyne* spp. descritas en la literatura nematológica, y (ii) secuenciación parcial de las regiones del ADN ribosómico: ITS, 18S, y los fragmentos D2-D3 del gen 28S. Los análisis de PCR-específica con ADN de aislados de referencia de *M. arenaria*, *M. incognita* y *M. javanica*, produjeron los amplicones esperados de 1.200, 670 y 420 pb, respectivamente, para cada una de estas especies; mientras que no se produjo ninguna amplificación con ADN de los aislados de *M. hispanica*. Asimismo, las tres poblaciones estudiadas de *M. hispanica* presentaron secuencias idénticas para las tres regiones del rDNA. Asimismo, el análisis filogenético mediante Máxima Parsimonia de las tres regiones del rDNA demostró y confirmó la diferenciación y separación clara de *M. hispanica* de las especies de *Meloidogyne* de zonas templado-cálidas como *M. arenaria*, *M. incognita*, y *M. javanica*, y de todas las especies de nematodos noduladores descritas hasta el momento, así como de otras especies descritas recientemente en España, como *M. baetica* y *M. dunensis*. Estas aproximaciones moleculares son de gran utilidad para confirmar la diagnosis de nematodos en el pasado, y constituyen nuevas herramientas para ayudar a entender la biogeografía y la importancia de diferentes especies de nematodos en la agricultura.

P-83**DECAIMIENTO Y MUERTE DE CEPAS DE *Vitis vinifera* EN VIÑEDOS JOVENES: DIAGNOSTICO Y PRONOSTICO**

Pesqueira, A., Pan, J.R., García-Berrios, J. y Cabaleiro, C.

Escola Politécnica Superior, Campus Universitario s/n 27002 Lugo.

En viñedos que entran en plena producción ocasionalmente aparece un decaimiento progresivo de cepas que puede dar lugar a muerte. Las causas de este decaimiento pueden ser múltiples: bióticas, abióticas o combinaciones de ambas. En este trabajo se han estudiado las causas de decaimiento y muerte entre 2003 y 2008 de cepas de un viñedo comercial en alta pendiente del cultivar Mencía en Portomarín (Lugo), una zona límite para el cultivo de la vid dentro de la Ribeira Sacra.

Se evaluó la relación entre manejo del viñedo, condiciones ambientales desde la entrada en producción, condiciones físicas del suelo y presencia de patógenos de suelo y madera. Se hizo un estudio general de la parcela evaluando parámetros vegetativos, evolución temporal y distribución espacial de cepas muertas y un seguimiento más detallado de las zonas más afectadas tomando datos fenológicos, nivel de clorofila, vigor, cosecha y características de los mostos (2006/2007).

Se concluye que no hay un factor causante del deterioro de la plantación sino un conjunto de ellos: la elección del portainjertos (mal adaptado al encharcamiento) y el exceso de cosecha para una zona límite de cultivo; un suelo poco profundo y con capas de arcillas impenetrables, labrado a favor de la pendiente y con zonas de repecho que encharcan; las condiciones ambientales cálidas y secas de los años 2003-2006; la presencia de algunos patógenos de suelo y madera como *Phytophthora* spp. y *Botryosphaeria* spp. El número de cepas muertas aumenta progresivamente; hay focos claros de cepas muertas y un gradiente de deterioro hacia una zona del viñedo, marcada por las características físicas del suelo.

Para realizar un pronóstico de evolución y recomendaciones al viticultor, los parámetros más adecuados fueron el vigor, el perímetro del tronco y la carga de poda que se vio están relacionados con la proximidad a cepas muertas (focos). Durante la vegetación, los parámetros que dan indicios de decaimiento son el adelanto del envero y los menores niveles de contenido en clorofila, sobre todo al inicio y final de ciclo.

La producción de las cepas en proceso de decaimiento es menor desde que se inicia éste, debido, sobre todo, al menor tamaño de uvas. Los parámetros de calidad no se ven significativamente afectados aunque siempre hay valores que sugieren peor calidad en cepas debilitadas.

Se ha establecido un panel de medidas de control que podrían permitir la recuperación de las zonas afectadas.

P-84

DUPLEX PCR A TIEMPO REAL PARA LA DETECCIÓN DE *Verticillium dahliae* Y *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* EN OLIVO.

Bertolini, E.¹, Quesada, J.M.¹, Olmos, A.¹, Morera, B.², López, M.M.¹ y Cambra, M.¹

¹Centro de Protección Vegetal y Biotecnología. Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA). Carretera Moncada-Náquera, km 5. 46113 Moncada, Valencia. ²Servicio de Producción Agrícola. Laboratorio de Producción y Sanidad Vegetal de Sevilla. Apdo 121. 41089 Montequinto, Sevilla. e-mail ebertoli@ivia.es

Verticillium dahliae y *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* (Psv) causan la verticilosis y la tuberculosis del olivo, respectivamente, dos de las enfermedades más importantes del cultivo. Por su creciente expansión en nuevas plantaciones intensivas y por la dificultad que presenta su control, son una grave amenaza para el olivar español y para otros países que utilicen material vegetal infectado. La principal medida para evitar la dispersión de estas enfermedades es el uso de material vegetal sano. Para ello, son necesarias técnicas de detección fiables. Los métodos habituales de detección de estos patógenos están basados en la técnica de “nested” PCR, porque el aislamiento es poco fiable y en la mayoría de los casos, sólo se logra en material sintomático. PCR a tiempo real es una técnica, sensible, rápida y fiable, que permite el seguimiento de la reacción durante el proceso de amplificación, elimina los análisis post-PCR y reduce los riesgos de contaminación. Se ha puesto a punto un sistema de “duplex” PCR a tiempo real, usando la química de SYBR-Green, para la detección simultánea de *V. dahliae* y Psv. Se utilizaron los iniciadores descritos por Li et al. (1994) para *V. dahliae* y los descritos por Bertolini et al. (2003) para Psv. Para la extracción de DNA se utilizó el estuche comercial “Ultra Clean Plant DNA isolation Kit” de MoBio. La sensibilidad alcanzada por el sistema “duplex” PCR a tiempo real para *V. dahliae* fue superior a la de “nested” PCR descrita previamente, mientras que la sensibilidad para Psv fue similar a la de los métodos descritos anteriormente (1-10 cel/ml). Los resultados obtenidos en el análisis de 119 árboles de campo (con y sin síntomas) procedentes de Andalucía, Navarra y Valencia y de plantas madre de vivero revelan un porcentaje de infección en campo del 14% para *V. dahliae* y del 24% para Psv. No se detectaron *V. dahliae* ni Psv en las plantas madre de vivero. Este sistema a tiempo real facilita los análisis necesarios para la multiplicación exclusiva de material vegetal sano permitiendo un mejor control de estas enfermedades. Esta metodología permite la detección de *V. dahliae* en muestras de suelo tras extracción de DNA con el kit “Powersoil DNA Kit” de Mobio.

PANELES

EPIDEMIOLOGÍA

PANELES VIRUS	221 (P-85)
PANELES BACTERIAS	240 (P-104)
PANELES HONGOS	248 (P-112)
PANELES NEMATODOS	263 (P-127)

P-85

ANÁLISIS DE LA DIVERSIDAD GENÉTICA DE LOS BEGOMOVIRUS QUE INFECTAN POBLACIONES NATURALES DE PIMIENTO SILVESTRE (*Capsicum annum* var. *glabriusculum* L.) EN MÉXICO

Rodelo, M.¹, Betancourt, M.¹, Gonzalez-Jara, P.¹, Pagán, I.¹, Ayllón, M.A.¹, Fraile, A.¹, Piñero, D.² y García-Arenal, F.¹

¹Centro de Biotecnología y Genómica de Plantas y Departamento de Biotecnología, Universidad Politécnica de Madrid, ETSI Agrónomos, 28040 Madrid. ²Instituto de Ecología, Universidad Nacional Autónoma, Apdo. 70-275, México, D.F

Los *Begomovirus*, con un genoma de DNA mono o bipartido, y transmitidos por la mosca blanca *Bemisia tabaci*, constituyen uno de los géneros más importantes de virus de plantas en regiones tropicales y subtropicales y a menudo son ejemplos típicos de virus emergentes. En el suroeste de Estados Unidos, en México y en América Central causan epidemias importantes en cultivos de pimiento. No se sabe si los begomovirus que infectan al pimiento han coevolucionado con su huésped en esta región, aunque infectan pimientos silvestres. Tampoco se sabe si el impacto en las poblaciones de pimientos silvestres, con menor densidad y mayor variabilidad genética que los cultivos, es similar al que tienen en el pimiento cultivado o es menor, como postula una hipótesis clásica de la Patología Vegetal.

Para contestar a estas preguntas se han muestreado durante diferentes años poblaciones silvestres del antecesor del pimiento, *Capsicum annum* var. *glabriusculum*, en tres hábitats distintos en su área de distribución en México: poblaciones naturales en bosques tropicales semiáridos, poblaciones intervenidas por el hombre en lindes y pastizales, y poblaciones de esta variedad cuyo cultivo ha comenzado en fecha reciente. Se ha determinado la secuencia de nucleótidos del gen de la proteína de la cápsida de unos 130 aislados de begomovirus. La población viral se compone de variantes de sólo dos especies, *Pepper golden mosaic virus* (PepGMV) y *Pepper huasteco yellow vein virus* (PHYVV), descritas en cultivos de pimiento en esta región, no detectándose ninguna especie nueva. Se ha analizado la incidencia y la estructura genética de las diferentes poblaciones virales en los diferentes años y su relación con los distintos ecosistemas. La incidencia de estos virus fue pequeña (≈20%) en los bosques naturales y máxima en los cultivos, donde llega hasta el 75%; sin embargo, el porcentaje de infecciones mixtas fue similar en todas las poblaciones e independiente de la incidencia. No se detectaron recombinantes o pseudorecombinantes entre las dos especies en ninguna población. Por tanto, la ecología del huésped determina la incidencia de los virus, pero no la estructura genética de sus poblaciones.

Los resultados permiten concluir que el impacto de los begomovirus en la población de su huésped aumenta con la antropización del medio, pero no permiten derivar hipótesis sobre su origen.

P-86

ABUNDANCIA DE MICOVIRUS EN HONGOS ENDOFÍTICOS DE GRAMÍNEAS.

Herrero Asensio, N. y Zabalgogeoazcoa, I.

Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología, CSIC. Apartado 257, 37071 Salamanca. Email: izabalgo@usal.es

Se sabe de la existencia de virus capaces de infectar hongos desde 1962, año en que Hollings atribuyó a un virus la enfermedad de *La France* en champiñones. Desde entonces, han sido varios los virus descritos en distintas especies de hongos. Podría pensarse que estas infecciones son más o menos comunes, si bien, no existen hasta la fecha datos que cuantifiquen esta abundancia. En este trabajo hemos pretendido realizar un censo de los virus presentes en un grupo concreto de hongos, los endofitos de gramíneas. Por otro lado, hemos centrado parte de nuestro estudio en dos especies de endofitos que además son hongos entomopatógenos, *Cordyceps bassiana* y *Torrubiella confragosa*, para comprobar la variación en la infección por micovirus dentro de una misma especie.

Tras analizar 106 aislados de hongos endofíticos correspondientes a 57 especies diferentes, 12 resultaron estar infectadas por micovirus con genomas de RNA de doble cadena (dsRNA), obteniendo una incidencia entre especies de endofitos del 21.05 %. En vista de que solo se analizaron uno o dos aislados de muchas de las especies en estudio, esta incidencia podría considerarse como una infraestimación sobre la que se podría observar si se analizaran más aislados de cada especie.

En el caso de los endofitos entomopatógenos, de los 15 aislados analizados de *Cordyceps bassiana* el 67% resultaron infectados por micovirus, mientras que en *Torrubiella confragosa* el resultado de incidencia fue algo menor, 42.86%.

Otra parte de nuestro estudio está orientada hacia la caracterización molecular de algunos de estos micovirus. Hasta el momento, se han identificado dos de ellos en el hongo entomopatógeno *Tolypocladium cylindrosporum*. Sus secuencias se corresponden con las de un *Totivirus* y un *Chrysovirus*.

P-87**VIRUS DEL ENROLLADO DE LA VID (GLRV-1, 2 Y 3) EN CUATRO CULTIVARES TINTOS TRADICIONALES EN RÍAS BAIXAS**

Pan, J.R.¹, Pesqueira, A.M., Segura, A.² y Cabaleiro, C.¹

¹Escola Politécnica Superior, Campus Universitario s/n 27002 Lugo.

²Facultade de Biología, Campus Sur, Santiago de Compostela.

Los virus asociados al enrollado de la vid están ampliamente distribuidos en todas las zonas vitícolas por haberse dispersado principalmente con portainjertos americanos asintomáticos. Sin embargo, se han visto a veces diferencias importantes entre cultivares, sobre todo en aquellos tradicionales locales, multiplicados a partir de muy pocas cepas antiguas no injertadas, lo que indica que el material vegetal original de algunos cultivares estaba ya infectado. En 2006 y 2007 se realizó un estudio, dentro de un proyecto INIA, en un viñedo de 20 ha situado en O Rosal (Rías Baixas) en parcelas con cuatro cultivares tintos: Caiño tinto, Brancellao, Retinto y Castañal.

Se ha estudiado la presencia de los 3 principales virus del enrollado (GLRaV-1, 2 y 3), entrenudo corto (GFLV) y jaspeado (GFkV) en los cuatro cultivares. Los síntomas son claros en todas las variedades que presentan infección del GLRaV-3 y no tan evidentes cuando están presentes los otros dos virus, aunque la sintomatología y su evolución es muy variable entre cultivares. La utilización de anticuerpos de dos casas comerciales (AgriTest y Bioreba) ha permitido detectar cierta variabilidad en GLRaV-1 y 2 que ya se había observado en otras zonas y cultivares, pero también por primera vez en GLRaV-3, en el cultivar Brancellao. La presencia de los distintos virus varía de unos cultivares a otros; GFLV sólo se detectó en una cepa de Brancellao; GLRaV-1 es minoritario y aparece prácticamente sólo en el Caiño tinto (15%); GLRaV-2 está en los cuatro cultivares (10-30%) y también GLRaV-3 siendo este último, con diferencia, el virus con mayor incidencia: en el cultivar con menor índice de infección, Retinto, hay un 25% de las plantas analizadas pero el Castañal presenta más del 90%, incluidas todas las cepas antiguas localizadas en la zona; Brancellao y Caiño tinto tienen un 45% y 70% respectivamente. La presencia de jaspeado (GFkV) está generalizada (media de 40%), aunque el Caiño tinto sólo presenta un 10%.

Los análisis de mostos indican que en Brancellao el GLRaV-3 reduce hasta 3 °Brix el contenido en azúcar; es menos evidente en Retinto (1 °Brix) y no se ven diferencias entre las pocas cepas de Castañal y Caiño tinto libres de enrollado y la mayoría de infectadas.

P-88

INCIDENCIA Y DISTRIBUCIÓN DEL *Iris yellow spot virus* EN EL CULTIVO DE LA CEBOLLA EN LA PROVINCIA DE ALBACETE

Muñoz, R.M., Lerma, M.L., Martínez, E. y Lunello, P.

Servicio de Diagnóstico y Asistencia Fitosanitaria (SEDAF) del Instituto Técnico Agronómico Provincial de Albacete. Apdo. Correos 451. 02006 Albacete. E-mail: rmg.itap@dipualba.es

En los últimos años, Albacete se ha situado como la provincia de mayor superficie y producción dedicada al cultivo de la cebolla, con el 26,16% de la superficie y el 37,52% de la producción a nivel nacional. El *Iris yellow spot virus* (IYSV, familia *Bunyaviridae*, género *Tospovirus*) transmitido por el trips de la cebolla (*Thrips tabaci*), causa una emergente patología en este cultivo. Este virus está incluido en la lista de alerta de la Organización Europea y Mediterránea para la protección de las plantas (EPPO), debido al riesgo que supone para los cultivos de iris y cebolla, y teniendo en cuenta además que el vector está ampliamente distribuido en Europa.

Con objeto de determinar la incidencia de la enfermedad, así como la distribución temporal y espacial de este virus, se han llevado a cabo muestreos en parcelas de cebolla de Albacete en las campañas 2005 a 2007. Se han analizado más de 1900 plantas, procedentes de aproximadamente 100 parcelas, mediante DAS-ELISA.

En los muestreos se observa una elevada dependencia temporal en la detección de la enfermedad, aumentando el porcentaje de plantas positivas a partir del mes de agosto. En parcelas muestreadas en varias ocasiones, el número de plantas positivas va incrementándose con el tiempo. La incidencia de la enfermedad llega a alcanzar valores superiores al 90% de plantas positivas en septiembre, al final del ciclo del cultivo.

En el mes de julio solamente se han detectado dos parcelas infectadas, las únicas que presentaron importantes daños económicos, alcanzando el 50% de pérdidas en peso de bulbos. Las plantas afectadas mostraban un color verde grisáceo, con presencia de manchas características del IYSV (manchas secas, con forma de huso o de diamante y de color marrón claro). La presencia precoz de esta enfermedad en ambas parcelas puede explicarse debido a la plantación de plántulas infectadas a partir de semillero. En cuanto a la distribución espacial de este virus, los muestreos señalan que al inicio de la presencia del virus en la zona, las primeras plantas infectadas se hallan en el borde de la parcela, patrón coincidente con la expansión de la enfermedad a partir de un vector.

Además, a partir de muestras positivas se amplificó la región correspondiente a la secuencia codificante de la nucleocápsida viral, clonándose y secuenciándose a continuación. Las secuencias obtenidas se analizaron con el programa BLAST, obteniéndose altos valores de homología con el IYSV.

P-89**ANÁLISIS DE LOS COMPONENTES DE LA EFICACIA BIOLÓGICA Y DE LA DINÁMICA DE LAS POBLACIONES DEL VIRUS DEL MOSAICO DEL PEPINO Y SUS RNAs SATÉLITES EN DIFERENTES HUÉSPEDES**

Betancourt, M.¹, Escriu, F.², Fraile, A.¹ y García-Arenal, F.¹

¹Centro de Biotecnología y Genómica de Plantas y Departamento de Biotecnología, Universidad Politécnica de Madrid, ETSI Agrónomos, 28040 Madrid.

²Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria de Aragón (CITA), Unidad de Sanidad Vegetal, Apdo. 727 Zaragoza.

El virus del mosaico del pepino (CMV) es uno de los principales patógenos de cultivos hortícolas en el mundo. CMV es virus auxiliar de un RNA satélite (CMV-RNAsat), que actúa como un hiperparásito y modula los síntomas y la acumulación de CMV. Pueden distinguirse dos variantes de CMV-RNAsat de acuerdo a su fenotipo en tomate: satélites necrogénicos (RNAsat N) que causan necrosis sistémicas y satélites no necrogénicos (RNAsat A) que no alteran, o atenúan, los síntomas de CMV. Estos dos tipos de CMV-RNAsat tienen el mismo fenotipo en otros huéspedes. CMV + RNAsat N causan epidemias devastadoras de necrosis de tomate, que suelen ser escasas y de corta duración. Las condiciones de emergencia y desaparición de RNAsats N en las poblaciones de CMV son desconocidas. El estudio de una de esas epidemias, desarrollada en España entre 1988 y 1992, y la estima de los parámetros de eficacia biológica y de virulencia en tomate de las cepas de CMV con y sin RNAsat, permitió modelizar las condiciones necesarias para la emergencia de la necrosis del tomate. Este análisis no consideró el papel de otros huéspedes de CMV en la dinámica y evolución de las poblaciones CMV y CMV-RNAsats.

En este trabajo hemos estimado los parámetros de eficacia biológica, competición en infecciones mixtas, virulencia y transmisión de cepas de CMV con o sin RNAsat N y RNAsat A, en un huésped en el que éstas no se diferencian por su fenotipo y que es un huésped principal de CMV en España, el melón. A pesar de tener el mismo fenotipo en melón, los parámetros difieren para las distintas cepas. Hemos desarrollado un modelo analítico basado en un sistema de 10 ecuaciones que describe la dinámica de las distintas cepas en distintos huéspedes, y lo hemos aplicado al sistema tomate-melón introduciendo los parámetros determinados experimentalmente. Este modelo permite hacer predicciones sobre las condiciones de emergencia de cepas con RNAsat N en tomate, bajo supuestos más realistas, y evaluar el papel de los otros huéspedes como fuente de inóculo para los cultivos de tomate.

P-90**IMPACTO DEL CULTIVO DE MAÍZ TRANSGÉNICO (BT) EN LOS VIRUS DE MAÍZ**

Alonso-Dueñas, N., Subira, J., Serrano, L y Achón, M.A.

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

En 1998 se inicia en España la comercialización de la primera variedad transgénica de maíz que expresa la endotoxina δ de *Bacillus thuringiensis* Berliner (maíz-Bt) para el control de taladros. Desde entonces la superficie de maíz transgénico se ha incrementado, alcanzando las 54.280 ha en 2006, 50.000 ha en el Valle del Ebro, y evaluado el impacto ecológico que su cultivo a gran escala puede tener en otros insectos y organismos. Diferentes experimentos han indicado que el maíz-Bt no tiene efectos consistentes en otros organismos salvo aumentos en las densidades de pulgones y cicadélidos. Estos incrementos pueden tener un efecto positivo sobre la abundancia de los virus que transmiten. Prospecciones sistemáticas realizadas a lo largo de los años 2001-2006 en el Valle del Ebro, y en otras regiones maiceras de España indican que la ocurrencia de los virus de maíz ha cambiado coincidiendo con la introducción del maíz transgénico. Se ha observado una disminución en la presencia del virus más difundido, *Maize dwarf mosaic virus* (MDMV), un incremento en la presencia de *Sugarcane mosaic virus* (SCMV), y la emergencia y persistencia de *Maize rough dwarf virus* (MRDV). No obstante los resultados obtenidos indican que los cambios en la distribución y abundancia de estos virus no es un efecto directo del cultivo de maíz transgénico sino de la introducción de nuevas variedades de maíz, transgénicas o no, juntamente con otros factores epidemiológicos analizados en este estudio.

P-91

CUANTIFICACIÓN DE LA PÉRDIDA DE RENDIMIENTO EN VARIEDADES LOCALES DE ALUBIA DE LEÓN (*Phaseolus vulgaris* L.) INFECTADAS NATURALMENTE POR BCMV

Campelo, M.P.¹, Lorenzana, S.¹, Lorenzana, A.¹ y González, A.J.²

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

²Servicio Regional de Investigación y Desarrollo Agroalimentario (SERIDA). Ctra. de Oviedo, s/n. 33300 Villaviciosa. Asturias. Correo-e: piedad.campelo@gmail.com

Uno de los principales problemas sanitarios del cultivo de alubia en León es la incidencia del mosaico común (BCMV - *Bean common mosaic virus*), *Potyvirus* transmitido por semilla y por áfidos. En estudios previos se describe que tasas de infección del 4% y del 11% en las variedades locales Canela y Pinta, respectivamente, se corresponden en campo con el 100% y más del 90% de plantas infectadas al final del ciclo de cultivo. En este trabajo se presentan los resultados de los análisis realizados para cuantificar la pérdida de rendimiento en plantas infectadas de forma natural por BCMV de estas dos apreciadas variedades.

Se realizaron semilleros en invernaderos estancos y dotados de mallas anti-pulgón empleando semillas cuyo porcentaje de infección viral se determinó previamente mediante ELISA-Indirecto con extractos de 100 embriones, siendo 22% en Canela y 28% en Pinta. Se marcaron más de 600 plantas individualmente y se testaron en estado fenológico V3, procediéndose a transplantar 40 plantas infectadas y otras tantas sanas de cada variedad. Cada grupo de plantas se mantuvo aislado en módulos de invernadero separados y en 10 plantas aleatorias de cada uno se evaluaron parámetros habituales de los descriptores de judía referentes a la flor, hoja, vaina inmadura, vaina madura y semilla. Además, se cosecharon individualmente 35 plantas de cada grupo y se determinó el número de vainas por planta, el número de vainas sin semillas y con una, dos, tres, cuatro, cinco y seis o más semillas, el número total de semillas por planta y por vaina, y los pesos de la semilla y de la cosecha por planta. El análisis estadístico de los datos permitió detectar para ambas variedades diferencias al menos significativamente menores ($P < 0,05$) en plantas enfermas respecto a las sanas para los caracteres longitud, anchura y superficie del foliolo, distancia entre entrenudos, cuerda de la vaina verde y madura, número de vainas con cuatro semillas por planta, número de semillas por planta, número de semillas por vaina y peso de la cosecha por planta. Cabe destacar que, en cuanto al número de vainas por planta, componente del rendimiento de la judía considerado como el más importante, se observa en las plantas de Canela infectadas una reducción superior al 17% y en las de Pinta al 10%.

P-92

EPIDEMIOLOGÍA DEL VIRUS DEL MOTEADO DE LA PARIETARIA EN TOMATE (PMOV-T)

Aramburu, J.¹, Galipienso, L.¹, Aparicio, F.², Pallas, V.², Soler, S.³ y Lopez, C.³

¹IRTA, Crta. de Cabrils Km 2, 08348 Cabrils, Barcelona. ²IBMCP- CSIC ,
³COMAV , Universidad Politécnica de Valencia, 46022, Valencia

El virus del moteado de la parietaria (PMoV), perteneciente al género de los *Ilarvirus*, se detectó por primera vez en España infectando tomate en 2001 y pimiento en el año 2004. Desde entonces ya se ha constatado su presencia en las Comunidades de Cataluña, Valencia y Andalucía, aunque se desconoce el mecanismo por el que se transmite de forma natural. Con el propósito de conocer la epidemiología de este virus se ha realizado el seguimiento de la infección en diversas parcelas de tomate comercial, se ha determinado la infección en una gama de posibles huéspedes y se han realizado diversas pruebas para determinar el mecanismo de transmisión natural. Además, se han analizado las especies de malas hierbas que podrían servir como reservorio y la implicación del polen y la semilla en la dispersión de la enfermedad.

Los resultados obtenidos han demostrado que el virus en campo no se dispersa con facilidad y se encuentra agregado y siempre en las cercanías de plantas de *Parietaria officinalis*. Si bien es cierto que los aislados identificados en tomate presentan importantes diferencias desde el punto de vista molecular respecto a los de los primeros aislados identificados en *P. officinalis*, el virus se encuentran infectando ambas especies en condiciones de campo. La transmisión mecánica del virus a plantas de *Nicotiana benthamiana*, *Gomphrena globosa* o *Chenopodium quinoa* es eficaz, pero no tanto a plantas de tomate o pimiento y nula a plantas de *P. officinalis*. El virus se ha detectado en polen de tomate y de *C. quinoa* infectados y en semillas de *C. quinoa* aunque no se transmite a la descendencia.

En diversos ensayos de transmisión realizados desde plantas infectadas de *C. quinoa* en estado de floración a plantas de tomate jóvenes y en flor utilizando trips *Frankliniella occidentalis* o el pulgón *Aphis gossypii* nunca se ha conseguido su transmisión.

P-93**INFECTIVIDAD DE LOS AISLADOS DEL VIRUS DEL BRONCEADO DEL TOMATE (TSWV) QUE SOBREPASAN LA RESISTENCIA PROPORCIONADA POR EL GEN *Sw-5* EN TOMATE**

Aramburu, J.¹, Galipienso, L.¹, Soler, S.² y Lopez, C.²

¹IRTA, Ctra. de Cabrils Km 2, 08348, Cabrils, Barcelona.

²COMAV, Universidad Politécnica de Valencia, 46022, Valencia.

Los aislados del virus del bronceado (TSWV) capaces de sobrepasar la resistencia proporcionada por el gen *Sw-5* en tomate (tipo R), fueron detectados por primera vez en España en el año 2002. En dos años se extendieron rápidamente en las dos Comarcas costeras en torno a la ciudad de Barcelona, pero desde entonces se ha observado un estancamiento e incluso una recesión en la dispersión de estos nuevos aislados.

Para tratar de buscar una explicación a esta situación epidemiológica se han realizado diversos ensayos biológicos de infectividad y capacidad de transmisión. Con 20 clones biológicos, obtenidos a partir de muestras originales de 2 aislados de tipo R y 2 que no sobrepasan la resistencia (tipo S), se ha realizado un estudio de la variabilidad poblacional mediante el análisis de secuencias de un fragmento del genoma de 900 pares de bases. También se ha realizado un estudio de la estabilidad en el tiempo, después de mantener una infección 50 días o después de realizar 10 pases sucesivos. Finalmente, se han realizado ensayos de competitividad de aislados R vs. S en mezclas infectivas utilizando técnicas de RT-PCR-FRLP y ensayos biológicos para realizar el seguimiento de la infección.

Los resultados obtenidos han demostrado que todos los aislados de TSWV estudiados tienen un comportamiento biológico semejante para un huésped concreto, exceptuando en los híbridos de tomate y pimiento portadores de genes de resistencia. Tanto los aislados de tipo R como de tipo S analizados presentaron una variabilidad poblacional prácticamente nula y los cambios de nucleótidos producidos después de realizar los ensayos de estabilidad fueron escasos y la gran mayoría de tipo silencioso. Además, en los aislados de tipo R no se produjo reversión hacia aislados de tipo S. El predominio de unos aislados sobre otros en los ensayos de competitividad no parece estar relacionado con la capacidad o no para sobrepasar la resistencia.

Los cambios observados en las prácticas culturales podrían ser los responsables de la escasa dispersión de los aislados de tipo R, ya que por sí mismos no parecen acarrear un coste biológico adicional que lo justifique.

P-94**INCIDENCIA Y DISTRIBUCIÓN DE DIFERENTES VIRUS QUE AFECTAN AL CULTIVO DEL TOMATE EN LA COMUNIDAD VALENCIANA**

Soler, S.¹, López, C.¹, Aramburu, J.², Galipienso, L.² y Nuez, F.¹,

¹Instituto de Conservación y Mejora de la Agrodiversidad Valenciana, (COMAV-UPV), Valencia.

²Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentaries (IRTA), Barcelona.

El principal factor limitante de la rentabilidad del cultivo del tomate en España y en particular en la Comunidad Valenciana es la incidencia de virosis. Cabe destacar las graves pérdidas económicas debidas a las enfermedades causadas por el virus del bronceado (TSWV), el virus del rizado amarillo del tomate (TYLCV) y el virus del mosaico del pepino dulce (PepMV). Otras virosis con una menor importancia en el cultivo del tomate son las causadas por el virus Y de la patata (PVY), el virus del mosaico del tomate (ToMV), el virus del mosaico del pepino (CMV) y del virus del moteado de la parietaria (PMoV). Con el propósito de conocer la incidencia de estas virosis en la Comunidad Valenciana, se realizó una prospección de junio a septiembre de 2007 en parcelas de cultivo de tomate de 138 localidades. Las muestras vegetales recogidas fueron analizadas mediante serología para detectar la presencia del TSWV, PepMV, PVY, ToMV y CMV. En el caso del TYLCV y del PMoV se utilizó la hibridación molecular mediante el uso de sondas marcadas con digoxigenina.

La virosis que muestra una mayor incidencia es la causada por el PVY, detectándose en un 58% de las parcelas. El ToMV pudo detectarse en un 48% de las explotaciones visitadas, el CMV en un 19,5%, el PepMV en un 15%, el PMoV en un 6,5%, el TYLCV en un 5,8% y el TSWV en un 5%.

El PVY y el ToMV son los virus más extendidos en la Comunidad Valenciana. Hay que tener en cuenta que se han prospectado mayoritariamente variedades tradicionales, las cuales no incorporan genes de resistencia a estos virus. Lo mismo ocurre en el caso del CMV y del PepMV. Sin embargo, los dos primeros aparecen en la mayoría de comarcas de las tres provincias, mientras que el CMV y el PepMV aparecen sólo en algunas comarcas de Valencia y Castellón. EL TYLCV, el TSWV y el PMoV se detectaron en pequeñas áreas de la Comunidad. Es de destacar la detección por primera vez del virus del moteado de la parietaria. Este se encuentra en las comarcas de L'Alt y Baix Maestrat en Castellón, y la comarca de L'Horta, Ribera Baixa y Vall d'Albaida en Valencia.

P-95

ESTUDIO DEL MECANISMO DE RESISTENCIA A BEGOMOVIRUS EN LA LÍNEA BRASILEÑA DE TOMATE TX-468 Y SU EFECTO EN LA DISPERSIÓN DE *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV) POR *Bemisia tabaci*

Pereira-Carvalho, R.C.^{1,2}, Diaz-Pendón, J.A.¹, Fernández-Muñoz, R.¹, Resende, R.O.², Boiteux, L.S.³ y Moriones, E.¹

¹Estación Experimental "La Mayora", CSIC, 29750 Algarrobo-Costa (Málaga).
E-mail: moriones@eelm.csic.es

²Universidade de Brasília, 70.910-970 Brasília - DF, Brasil.

³Centro Nacional de Pesquisa em Hortaliça 70359-970 Brasília - DF, Brasil.

La enfermedad del rizado amarillo del tomate (TYLCD) constituye uno de los mayores factores limitantes del cultivo del tomate (*Solanum lycopersicum*) en regiones tropicales y subtropicales de todo el mundo. Esta enfermedad está causada por un complejo de especies virales del género *Begomovirus* (familia *Geminiviridae*), que en condiciones naturales son transmitidos por la mosca blanca *Bemisia tabaci*, siendo la más extendida *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV). El control de TYLCD es difícil y complejo por los métodos tradicionales siendo una práctica muy frecuente el uso intensivo de plaguicidas para controlar las poblaciones del vector. Sin embargo, el uso de pesticidas se muestra poco efectivo, tiene efectos perjudiciales para el medio ambiente y puede dar lugar a la selección de poblaciones de *B. tabaci* resistentes. Por tanto, el desarrollo de variedades resistentes es la estrategia más deseable como método de control de TYLCD. Recientemente hemos identificado una resistencia recesiva a TYLCV en la línea brasileña de mejora de *S. lycopersicum* TX-468, derivada del híbrido comercial 'Tyking', que se manifiesta en una limitación de la acumulación sistémica del virus y por la ausencia de síntomas.

En este trabajo hemos estudiado el mecanismo de la resistencia que opera en TX-468 y el uso potencial de esa línea en la reducción de la dispersión del TYLCV. Por un lado, se discuten los resultados de los estudios que se están llevando a cabo para discernir a que nivel o niveles actúa la resistencia encontrada en TX-468. Por otro lado, los ensayos preliminares en los que se usaron moscas virulíferas para la transmisión (durante un periodo de 48h) de TYLCV hacia TX-468 y Moneymaker (control susceptible) demostraron que TX-468 presenta una menor propensión a ser infectadas por TYLCV. Este resultado sugiere que esta resistencia recesiva, puede tener un gran efecto en la reducción de la dispersión primaria de TYLCV. Además, se está evaluando el efecto de las plantas de TX-468 infectadas como fuentes de inóculo en la dispersión secundaria de la enfermedad.

P-96

DINÁMICA POBLACIONAL DE LAS ESPECIES POTENCIALMENTE VECTORAS DE AMV EN UNA PARCELA DE ALFALFA EN ZARAGOZA

Escriu, F.¹, Martín-López, B.², Pérez, P.³, Bergua, M.¹, Barrio, M.² y Luis-Arteaga, M.¹

¹Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria, Av. Montañana, 930. 50059 Zaragoza.

²Escuela Politécnica Superior de Lugo. Universidad de Santiago de Compostela. Campus Universitario s/n 27002 Lugo.

³Instituto Agroforestal del Mediterráneo. Universidad Politécnica de Valencia C/ Ingeniero Fausto Elio s/n Edificio 8E esc. 6. 46011 Valencia.

El virus del mosaico de la alfalfa, se encuentra distribuido por todo el mundo y es capaz de infectar a más de 430 especies distintas de dicotiledóneas. La alfalfa (*Medicago sativa* L.) es su huésped principal. No obstante, otras especies forrajeras, diversos cultivos hortícolas, y herbáceos como la soja, son también infectados por este virus. Las principales formas de transmisión de AMV son, la transmisión por semilla y la transmisión no persistente por pulgones. A nivel mundial se han citado entorno a 20 especies distintas de pulgón capaces de transmitirlo. Sin embargo, algunas de las especies citadas como principales vectoras de AMV no están presentes en España.

A pesar de la amplia distribución mundial del AMV salvo excepciones (trabajos en alfalfa y otras leguminosas forrajeras en Australia, y soja en EEUU) existen pocos estudios sobre esta virosis. Los conocimientos actuales sobre la epidemiología de AMV y sobre la interacción entre las poblaciones de AMV, sus huéspedes y las poblaciones de vectores son escasos.

La alfalfa es un cultivo distribuido por toda España de singular importancia en el valle del Ebro. España es uno de los principales productores de alfalfa de la Unión Europea y el primero en forma de forraje deshidratado. El potencial de crecimiento de esta producción es muy elevado. En este contexto tiene particular interés el estudio de los distintos factores que intervienen en la epidemiología de AMV en los cultivos de alfalfa en nuestras principales zonas productoras.

En este trabajo se muestran los resultados de dos años (2006 y 2007) en los que se llevó a cabo el seguimiento de la dinámica de las poblaciones de pulgones en una parcela de alfalfa situada en Montañana (Zaragoza). Se han determinado las curvas de vuelo de pulgones mediante la colocación de dos trampas de baldosa en la parcela. Tanto en 2006, como en 2007, la época en la que se registro una mayor actividad de vuelo fue desde finales de julio a primeros de septiembre. La identificación de las especies capturadas y la estimación de sus frecuencias relativas, nos dan una idea de cuales especies pueden estar jugando un papel más importante en la dispersión de AMV en esta zona.

P-97**EL VIRUS DEL MOSAICO DE LA ALFALFA EN ZONAS PRODUCTORAS DE ALFALFA ESPAÑOLAS**

Bergua, M., Vargas-Mainar, M.E., Muñoz, F., Luis-Arteaga, M. y Escriu, F.

Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria de Aragón. Av. Montañana, 930. 50059 Zaragoza.

España es el tercer país productor de alfalfa (*Medicago sativa* L.) de la Unión Europea y el primero en cuanto a su producción en forma de forraje deshidratado. Este tipo de aprovechamiento ha sufrido un importante incremento durante los últimos años y ha supuesto la instalación de una industria de transformación prometedora para la economía de las zonas rurales productoras. Sin embargo, el futuro del sector pasa por la obtención de un forraje de calidad. La alfalfa es el principal huésped natural del virus del mosaico de la alfalfa (AMV), que se encuentra ampliamente distribuido en todas las zonas de producción del mundo, debido, probablemente, a su capacidad de ser transmitido por semilla en este huésped y hasta por 20 especies distintas de pulgones. Su gama de huéspedes es amplia e incluye algunos cultivos hortícolas con importancia económica en nuestro país. Entre los posibles efectos de la infección por AMV en alfalfa se han descrito el aumento de la susceptibilidad al frío y la reducción de la capacidad de nodulación y fijación de nitrógeno, que podrían afectar tanto al rendimiento de forraje como a su calidad nutritiva. Sin embargo, los síntomas que el virus induce en el cultivo pasan frecuentemente desapercibidos, y la información que existe acerca de la importancia del virus en alfalfa en condiciones de cultivo es escasa y a veces contradictoria.

En este trabajo se presentan datos de la incidencia de AMV en distintas zonas ecológicas de cultivo de alfalfa de los ecotipos Aragón (en el Valle del Ebro) y Ampurdán (en la provincia de Gerona), y de la tasa de infección en lotes de semilla de ambos ecotipos. Los resultados muestran porcentajes de infección elevados, que aumentan con la edad del alfalfar y difieren entre distintas zonas de cultivo, indicando que la tasa de infección de las semillas es un factor importante de la incidencia final del virus en el cultivo. También se evalúan los efectos de la infección en ecotipos españoles de alfalfa, mediante estimas de rendimiento productivo y calidad nutritiva del forraje. Los resultados presentados contribuyen a entender mejor la importancia real de AMV en las condiciones de cultivo de alfalfa españolas y de su posible dispersión a otros cultivos en los que el virus también causa enfermedad.

P-98

INFLUENCIA DE LA INFECCIÓN DEL VIRUS DE LA TRISTEZA DE LOS CÍTRICOS EN PLANTA SOBRE LA EFICACIA BIOLÓGICA DE SU VECTOR *Aphis gossypii*

Belliure, B.¹, Comellas, M.¹, Broch, A.¹, Orts, J.J.¹ y Albiach-Martí, M.R.^{1,2}

¹Centro de Protección Vegetal y Biotecnología. Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias, ²Fundación Agroalimed-IVIA. Crta. Moncada-Náquera Km. 4.5, 46113-Moncada, Valencia.

El virus de la tristeza de los cítricos (CTV), uno de los virus más devastadores para este cultivo a nivel mundial, es transmitido de forma semipersistente por varias especies de pulgón. La dispersión de CTV en campo depende principalmente de i) la eficacia de la transmisión viral por cada especie de pulgón, y ii) de la producción, por parte de las colonias de pulgones, de formas aladas, principales responsables de la dispersión de CTV en campo, cuya producción se inicia una vez las colonias alcanzan una densidad poblacional suficiente. La infección viral podría originar cambios fisiológicos y bioquímicos en la planta capaces de afectar a la eficacia biológica de los pulgones y consecuentemente de modificar la capacidad real de transmisión viral en campo. En este trabajo se evaluaron parámetros que determinan la densidad poblacional de las colonias de *Aphis gossypii*, el principal vector de CTV en el área citrícola española, en plantas infectadas de una de las variedades cítricas más utilizadas en campo, el naranjo dulce. Las plantas fueron inoculadas con dos aislados de CTV que inducen sintomatología en naranjo dulce, T318A y T388, y otros dos que son asintomáticos en este huésped, T385 y T36. Los parámetros evaluados fueron la supervivencia juvenil, la tasa de desarrollo y la tasa de reproducción de los pulgones sobre hojas, con el mismo estado fenológico, de planta infectada y control sano. Las tasas más elevadas de supervivencia, desarrollo y reproducción de *A. gossypii*, se obtuvieron para los controles sanos y las hojas infectadas por T385 y T388, mientras que para las hojas infectadas por T318 y T36 se obtuvieron tasas significativamente menores. Estos resultados indicaron que: (1) el aislado viral de CTV que infecta la planta influye en la eficacia biológica de *A. gossypii*, (2) el efecto de CTV sobre la eficacia biológica de *A. gossypii* es independiente de la sintomatología generada en la planta infectada, y (3) los árboles infectados por los aislados T385 ó T388 tendrían más probabilidad de albergar colonias de pulgón productoras de formas aladas que los árboles infectados por T318 ó T36. Así, T385 y T388, a igual eficiencia de transmisión viral que T318 y T36, tendrían mayor capacidad real de dispersión en campo.

P-99**IDENTIFICACIÓN DE VIROIDES EN CÍTRICOS DE COLOMBIA**

Murcia, N.^{1,2}, Bernad, L.¹, Caicedo, A.² y Duran-Vila, N.¹

¹Centro de Protección Vegetal y Biotecnología, Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias, Apartado Oficial, 46113-Moncada, Valencia.

²Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (CORPOICA). E-mail: nmurcia@ivia.es

Se inició una prospección para determinar la presencia de viroides en cítricos cultivados en varias plantaciones de distintas regiones citrícolas de Colombia. Para ello se utilizó un método de hibridación Northern que permite detectar viroides a partir de especies y variedades comerciales cultivadas en distintas condiciones medioambientales.

Los resultados obtenidos muestran que el viroide de la exocortis de los cítricos (CEVd, del inglés *Citrus exocortis viroid*), el viroide del enanismo del lúpulo (HSVd, del inglés *Hop stunt viroid*) y el viroide III de los cítricos (CVd-III del inglés *Citrus viroid III*) se hallan presentes en Colombia afectando algunas plantaciones de lima Tahití. El análisis de las secuencias de HSVd y CVd-III ha permitido establecer que: (i) Todos los aislados de HSVd identificados carecen del “motivo de expresión de cachexia”, por lo que se trata de razas no patogénicas; (ii) Los aislados de CVd-III, un viroide muy difundido en plantaciones de lima Tahití, presentan una identidad de secuencia muy elevada con la variante tipo CVd-IIIb.

Se ha identificado CEVd en una de las fuentes de lima Tahití, por lo que dicho viroide puede ser la causa de las rajaduras de la corteza observadas con frecuencia en plantaciones comerciales de esta especie. Sorprendentemente, también se identificó el CEVd en un árbol de cidro Etrog sin síntomas en el banco de germoplasma del municipio de Palmira. La secuenciación de dicha fuente de CEVd ha mostrado que contiene una sola mutación en el motivo P_L responsable de la modulación de la expresión de síntomas. Dado que el cidro Etrog es la especie indicadora por excelencia de dicho viroide, la caracterización de dicha variante puede aportar información de interés respecto a la patogenicidad del CEVd.

P-100

CUANTIFICACIÓN DEL NÚMERO DE DIANAS VIRALES ADQUIRIDAS Y TRANSMITIDAS DE FORMA NO PERSISTENTE POR UN ÚNICO PULGÓN

Moreno, A.¹, Fereres, A.² y Cambra, M.¹

¹Centro de Protección Vegetal y Biotecnología. Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA), Carretera Moncada-Náquera km 5, 46113 Moncada, Valencia. ² Instituto de Ciencias Agrarias- Centro de Ciencias Medioambientales. (ICA-CCMA; CSIC). C/ Serrano, 115 Dpdo. 28006 Madrid. E-mail: azmoreno@ivia.es

Los virus vegetales son parásitos obligados que requieren de un proceso de transmisión de una planta hospedadora a otra. La estrategia más empleada por los virus vegetales para su propagación es la transmisión mediada por vectores, concretamente por pulgones. La mayor parte de los virus transmitidos por pulgones lo hacen de forma no persistente, la cual se caracteriza por cortos periodos de adquisición, retención e inoculación y el no requerimiento de una fase de latencia para que la inoculación tenga lugar. En este tipo de transmisión el virus queda asociado a la cutícula de la parte distal del estilete del insecto y su localización en las plantas infectadas se da tanto en mesófilo como epidermis y floema. Sin embargo, aún quedan algunos aspectos desconocidos del proceso de transmisión no persistente, como son el número de partículas virales inoculadas por un pulgón y cómo estas pueden contribuir en la infección sistémica de la planta. En el presente trabajo, se propone un método para calcular con exactitud la verdadera carga viral adquirida e inoculada/transmitida por un único pulgón usando el virus de la sharka (*Plum pox virus*, PPV) como modelo viral y *Myzus persicae* Sulzer como especie vectora. El comportamiento alimenticio del pulgón también es analizado como factor influyente en la transmisión viral. La combinación de las técnicas de Gráficos de Penetración Eléctrica y la RT-PCR a tiempo real permite estimar que el número medio de dianas amplificables de PPV inoculadas por un único pulgón durante una prueba en la planta receptora (2.675 dianas de RNA) es aproximadamente la mitad de la cantidad de virus adquirida por el insecto. Con esta cantidad de virus inoculada el 20% de las plantas receptoras ensayadas fueron infectadas sistémicamente. No se observaron diferencias significativas en el número de partículas de PPV amplificables adquiridas tras 1 ó 5 pruebas intracelulares (pd) en una planta infectada, aunque el porcentaje de infección de las plantas receptoras fue mayor tras 5 pd. La cantidad de PPV detectada y cuantificada en el material vegetal justo después del proceso de inoculación fue menor tras 1 pd (28%/4,603) que tras 5 pd (45.8%/135.1 x 10⁶). No se observaron diferencias en el porcentaje de pulgones virulíferos ni en la carga viral de éstos entre los dos comportamientos analizados.

La metodología empleada en el estudio podría ser fácilmente adaptada y empleada con otros modelos de interacción virus-vector-hospedador con el fin de mejorar otros modelos empleados en epidemiología de virus vegetales.

P-101**ESTUDIO DE TRANSMISIÓN DEL VIRUS DEL “TORRAO” DEL TOMATE
Tomato torrado virus (ToTV) POR LA MOSCA BLANCA DE LOS
INVERNADEROS *Trialeurodes vaporariorum* (Westwood).**

Juárez, M. y Cámara, U.

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

El Virus del “torrao” del tomate *Tomato torrado virus* (ToTV) es un nuevo virus que viene afectando en los últimos años a los cultivos de tomate del Sureste Peninsular e Islas Canarias en nuestro País. Dado el carácter novedoso de esta virosis, han estado poco claras las posibles vías de transmisión del agente causal de la enfermedad. Con el objetivo de determinar el principal modo de transmisión y difusión de estas epidemias en campo, hemos llevado a cabo un experimento intentando reproducir las condiciones de campo y así poder verificar las sospechas que existían sobre la principal vía de transmisión por la mosca blanca de los invernaderos *Trialeurodes vaporariorum* (Westwood).

Para ello, se desarrolló una experiencia que ha consistido en la inoculación del virus mediante *Trialeurodes vaporariorum*, criada en cautividad y alimentada sobre plantas enfermas de “torrado”, a cinco lotes de 12 plantas de tomate cada uno, distanciando la inoculación entre cada lote 15 días; posteriormente, semanalmente y durante un periodo de hasta dos meses, se estudió la sintomatología mostrada por las plantas, a la vez que se analizaron mediante sondas de hibridación molecular frente a ToTV.

Con el desarrollo de estos trabajos hemos podido demostrar y confirmar que *Trialeurodes vaporariorum* es el principal agente transmisor de la enfermedad, así que, lo que en un principio eran sólo conjeturas acerca de su difusión en campo, ha sido comprobado y confirmado con nuestras experiencia. Además de confirmar la transmisión, dado el diseño de nuestro experimento, hemos podido determinar la influencia de la temperatura en el ritmo de infección y expresión del síndrome de la enfermedad, determinando un comportamiento asintomático de plantas enfermas en determinadas condiciones.

Este trabajo ha sido subvencionado por el Proyecto: AGL2005-06682-C03-03.

P-102**ESTUDIO DE LA INCIDENCIA DE VIROSIS EN LOS CULTIVOS DE CUCURBITÁCEAS EN LA COMUNIDAD VALENCIANA.**

Juárez, M., Martínez, J.A. y Legua, P.

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

En la Comunidad Valenciana existen varias comarcas donde tradicionalmente se han cultivado cucurbitáceas, destacando en la actualidad los cultivos de sandía y melón. Con el objetivo de detectar virus que afectan a cucurbitáceas y determinar su incidencia e importancia relativa, hemos llevado a cabo muestreos en diversas parcelas de estos cultivos en las principales comarcas hortícolas (El Bajo Maestrazgo, La Plana Alta y Baja de Castellón, El Campo de Turia, La Ribera Alta y Baja del Júcar, La Huerta Norte y Sur de Valencia, el Valle del la Albaida, Alto Vinalopó, Campo de Elche, Vega Baja del Segura y Pilar de la Horadada) durante dos campañas, 2005 y 2006.

Las muestras se analizaron empleando sondas de 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 anulares de la papaya (PRSV), el Virus del mosaico de la sandía (WMV), el Virus del mosaico amarillo del calabacín (ZYMV) y el Virus de las manchas necróticas del melón (MNSV). Se recogieron en la campaña 2005 de entre 59 parcelas de cultivo inspeccionadas, 228 muestras de melón, 223 de sandía, 83 de calabacín, 73 de pepino y 28 de calabaza; y en la siguiente campaña 2006, de 63 parcelas, se recogieron 341 muestras de melón, 335 de sandía, 64 de calabacín, 67 de pepino y 28 de calabaza.

El virus que ha prevalecido en este muestreo fue CABYV para las muestras que presentaban síntomas de amarilleos, y se ha estimado que CABYV causa pérdidas con importancia económica considerable en cultivos de melón, sandía, pepino y calabacín en las comarcas de Vega Baja del Segura, Campo de Elche y Pilar de la Horadada, y en calabaza, en la zona de Alto Vinalopó. En todas las comarcas estudiadas y para las muestras con síntomas de mosaicos, WMV fue el virus de mayor incidencia, y se mantuvieron en todas las comarcas estudiadas las frecuencias relativas en orden decreciente: WMV, PRSV, ZYMV y CMV. También se determinó una incidencia elevada de infecciones mixtas, destacando las dobles encontradas en sandía (WMV+PRSV) y en melón (WMV+CABYV); en las infecciones mixtas triples destacó (WMV+CABYV+PRSV).

Este trabajo ha sido subvencionado por la Generalitat Valenciana en el Proyecto: GV05/060

P-103

PRIMERAS DETECCIONES DEL VIRUS DEL MOSAICO DEL ARABIS (ArMV) SOBRE VID EN ESPAÑA

Abelleira, A., Mansilla, J.P.¹, Padilla, V.², Hita, I.², Cabaleiro, C.³ y Legorburu, F.J.⁴

¹Estación Fitopatológica do Areeiro, Deputación de Pontevedra.

²Instituto Murciano de Investigación y Desarrollo Agrario, La Alberca.

³Escola Politécnica Superior, Universidade de Santiago de Compostela, Lugo.

⁴NEIKER-Tecnalia, Apartado 46, E-01080 Vitoria/Gasteiz, jlegorburu@neiker.net

El virus del mosaico del Arabis (*Arabis mosaic virus*, ArMV, género *Nepovirus*, familia *Comoviridae*) es uno de los nepovirus europeos responsables de la degeneración infecciosa de la vid. Su distribución es, fundamentalmente, centroeuropea y nunca se había encontrado antes en el Estado sobre vid. Debido a esta asociación con viticulturas de clima fresco, ya se había buscado anteriormente sin éxito en Galicia. Tampoco se había detectado ningún caso en los ensayos biológicos y serológicos que se han llevado a cabo para la selección clonal de variedades de todas las zonas vitícolas españolas durante más de veinte años. Presentamos los dos primeros casos, detectados mediante la técnica ELISA.

El primero de ellos, en Galicia, durante el verano de 2007, en dos plantaciones establecidas de la variedad Albariño de la comarca del Salnes, pertenecientes a la D.O Rias Baixas.

En primavera de 2008 se ha detectado en Rioja Alavesa, en una viña comercial de Tempranillo sobre 41-B, de unos 25 años. El ArMV aparece en dos cepas contiguas, en infección mixta con otros virus frecuentes en la parcela (GLRaV-3 y GFkV). No se observan síntomas foliares peculiares.

Epidemiológicamente, ArMV está asociado a *Xiphinema diversicaudatum* (*Nematoda: Longidoridae*), mientras que GFLV se asocia a *X. index*. Por otra parte, GFLV sólo infecta vid en la naturaleza, en tanto que ArMV ataca también frutales y plantas herbáceas. Su propagación por material de vivero no debería causar problemas, ya que se trata de un patógeno de análisis obligado en vid. Por el contrario, y como otros patógenos telúricos, su erradicación de un suelo infectado se presenta difícil.

Trabajo financiado en parte por el INIA, proyecto RTA2005-00201-C03.

P-104**DIVERSIDAD FENOTÍPICA, GENOTÍPICA Y PATOGÉNICA DE AISLADOS DE *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* PROCEDENTES DE GUISANTE**

Martín, A., Miguel, R., Barrios, A., Ramos, S., García, C.A. y Caminero, C.

Departamento de Producción Vegetal y Agronomía. Instituto Tecnológico Agrario de Castilla y León (ITACyL). Ctra. Burgos km. 119, 47071, Valladolid. E-mail: marsanal@itacyl.es

Pseudomonas syringae pv. *syringae* (*Pss*) es un patógeno polífago que está originando graves pérdidas en los cultivos de guisante de siembra temprana en los secanos de Castilla y León. Dada la gran diversidad presente en este patovar, el conocimiento de las poblaciones de este patógeno que están afectando al guisante en España es una tarea fundamental. La colección de cepas de trabajo estaba compuesta por 79 aislados de *Pss*, de los que 41 procedieron de guisante, tanto de España como de otros países. El resto de cepas tenían diversos orígenes geográficos y fueron aisladas de 25 especies huésped, incluyendo cultivos herbáceos y especies leñosas. Se evaluó la capacidad de las cepas de trabajo para utilizar 8 carbohidratos, encontrándose variabilidad en 5, aunque la mayoría de las respuestas fueron positivas. El 87,3% de los aislados amplificaron *syrB*. La caracterización genética se realizó mediante rep-PCR con el iniciador BOX, diferenciándose 26 perfiles genéticos. Las cepas aisladas en guisante se distribuyeron en 15 de esos patrones. Con las bandas polimórficas definidas se construyó un dendrograma UPGMA en el que se han establecido tres grupos, apareciendo perfiles que incluyen cepas de guisante a lo largo del mismo. El primer grupo estaba compuesto por 10 perfiles genéticos comprendiendo 27 cepas aisladas en 12 especies huésped, incluyéndose aquí la cepa tipo (NCPBPB 281). El segundo grupo estaba formado por 7 perfiles genéticos, con 42 aislados procedentes de 11 especies huésped. En este grupo se ubica el 66% de las cepas aisladas en guisante, y el 72,5% de las procedentes de este cultivo en España. En las inoculaciones realizadas en vainas de judía y guisante, limones inmaduros y en el tallo de seis cultivares de guisante se observó que la gran mayoría de los aislados incluidos en los grupos 1 y 2 se mostraban patógenos, aunque las respuestas obtenidas con las cepas del grupo 1 eran, en general, menos virulentas que las del 2. En las inoculaciones en tallo de los cultivares de guisante se observó una clara variabilidad patogénica. El tercer grupo del dendrograma estaba formado por 9 perfiles genéticos cuyos patrones de bandas eran muy diferentes tanto entre ellos mismos como con el resto de perfiles. En esta agrupación se incluyen 10 aislados (3 de guisante) de 8 especies huésped. La mayoría de estas cepas no amplificaron *syrB* y no se mostraron patógenas en las ensayos realizados, por lo que su pertenencia a *Pss* sería cuestionable.

P-105

CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA, GENOTÍPICA Y PATOGENICA DE AISLADOS DE *Pseudomonas syringae* pv. *pisi*

Martín, A., Miguel, R., Ramos, S., Barrios, A., García, C.A. y Caminero, C.

Departamento de Producción Vegetal y Agronomía. Instituto Tecnológico Agrario de Castilla y León (ITACyL). Ctra. Burgos km. 119, Finca Zamadueñas, 47071, Valladolid. E-mail: marsanal@itacyl.es

El cultivo del guisante ha cobrado en los últimos años un gran interés en Castilla y León. En esta zona los ataques de bacteriosis originados por *Pseudomonas syringae* pv. *pisi* están ocasionando importantes pérdidas económicas. En este trabajo se pretende tener una primera aproximación sobre la estructura genética de este patógeno y la variabilidad de las poblaciones existentes en España. Se utilizó una colección de 91 cepas (53 aisladas en España y 38 de otros países), incluyendo las razas tipo. Para la caracterización fenotípica se emplearon 56 pruebas bioquímico-nutricionales. El estudio de la diversidad genética se abordó mediante rep-PCR con los cebadores BOX, ERIC y REP. Con los datos de la caracterización bioquímica y genética se construyeron dendrogramas UPGMA. También se determinó si los aislados estudiados amplificaban el marcador de diagnóstico AN3 o el AN7. Por último, todos los aislados fueron inoculados en los 8 testigos que se emplean clásicamente para la diferenciación de razas del patógeno. Se ha encontrado asociación entre la amplificación del marcador AN3 y algunas pruebas bioquímicas, siendo estos aislados positivos para el eritritol y la hidrólisis de la esculina, y negativos para la fluorescencia en medio KB. Por el contrario, las cepas AN7 fueron fluorescentes en KB, negativas para el eritritol y variables para la esculina. Las tres metodologías rep-PCR empleadas produjeron polimorfismos, observándose que con REP-PCR y BOX-PCR había algunas bandas que estaban presentes en todos los aislados AN3 y ausentes en los AN7, y viceversa, sin encontrarse polimorfismos dentro de las cepas AN3. Mediante ERIC-PCR no se obtuvo esta asociación, generando esta metodología bandas polimórficas entre aislados AN3. El análisis UPGMA mostró la existencia de dos grupos filogenéticos, asociado cada uno de ellos a la amplificación de AN3 o AN7, existiendo una mayor variabilidad en el grupo AN7. Las cepas identificadas como razas 1, 5 y 7 pertenecían al grupo AN3, las de raza 2 y 6 al AN7, y las de raza 3 y 4 estaban en los dos. No han aparecido agrupaciones específicas para una raza determinada, aunque parece existir una cierta tendencia. La variabilidad encontrada en las cepas aisladas en España está distribuida a lo largo de todo el árbol filogenético, existiendo una gran diversidad al compararse con aislados de otros orígenes. Esto podría indicar que las cepas presentes en España hubieran sido introducidas en numerosas ocasiones.

P-106

SUPERVIVENCIA EPÍFITA Y EVOLUCIÓN TEMPORAL DE *Brenneria quercina* EN LA COMUNIDAD VALENCIANA

Biosca, E.G.¹, Català-Senent, J.F.¹, Águila, B.¹, González, R.², Pérez-Laorga, E.³ y López, M.M.²

¹Dpto. Microbiología y Ecología, Universidad de Valencia, Burjasot, Valencia.

²Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA), Moncada, Valencia.

³Conselleria de Medio Ambiente, Agua, Urbanismo y Vivienda. Generalitat Valenciana, Valencia.

E-mail: elena.biosca@uv.es

Brenneria quercina, es la bacteria causante de chancros con exudados en tronco y ramas en distintas especies del género *Quercus*, que pueden limitar su desarrollo, pudiendo incluso causarles la muerte. En España, esta bacteria se ha identificado en distintas Comunidades Autónomas, incluida la Valenciana, y en algunos parajes de gran valor medioambiental, siendo considerada como una de las causas del síndrome de la seca de las quercíneas. Sin embargo, todavía se desconoce el ciclo biológico de *B. quercina*, así como su posible evolución temporal y/o afectación de los árboles infectados por este patógeno. Para tratar de aportar información sobre dichos aspectos, se seleccionó una parcela de 100 ejemplares de *Q. ilex* situada en la provincia de Castellón, en la que *B. quercina* había sido detectada. Con el fin de conocer su supervivencia epífita, en 2006 se realizaron 4 muestreos en una selección al azar de 5 encinas sanas y 5 afectadas. En dichos ejemplares también se determinó la superficie foliar media por rama, de muestras tomadas al azar. Para estudiar la evolución del patógeno en la parcela y/o afectación del crecimiento de las encinas sintomáticas con respecto a las sanas, se realizaron prospecciones y mediciones del perímetro del tronco de las 100 encinas, comparándose los resultados con los de una primera evaluación realizada en 2000. Los resultados han demostrado, por primera vez, la presencia epífita de *B. quercina* en hojas y ramillas de quercíneas mediterráneas, tanto en árboles afectados como en los aparentemente sanos. Sin embargo, la superficie foliar media por rama ha sido significativamente menor en las encinas afectadas que en las sanas. Igualmente se ha observado un crecimiento significativamente menor en los árboles afectados que en los sanos a lo largo de 6 años. Con respecto a la evolución del patógeno en la parcela, los resultados han mostrado un número significativamente mayor de árboles afectados en 2006 que en 2000. En conclusión, la diseminación de *B. quercina* se podría producir no sólo a través de tejidos infectados y/o exudados sino también por medio de sus poblaciones epífitas. Además, se han demostrado daños directos en los árboles como consecuencia de la infección por este patógeno y un notable incremento del número de encinas enfermas en la parcela analizada.

P-107

SUPERVIVENCIA Y PATOGENICIDAD DE *Erwinia amylovora* EN AGUA DE LLUVIA

Biosca, E.G.¹, Santander, R.D.¹, Ordax, M.², Marco-Noales, E.², Águila, B.¹, Català-Senent, J.F.¹ y López, M.M.²

¹Dpto. Microbiología y Ecología, Universidad de Valencia, Burjasot, Valencia.

²Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA), Moncada, Valencia.

E-mail: elena.biosca@uv.es

Erwinia amylovora, agente causal del fuego bacteriano de las rosáceas, es una bacteria de cuarentena en la Unión Europea, responsable de serias pérdidas económicas en todo el mundo. El difícil control de esta enfermedad se ha relacionado con la capacidad de supervivencia y diseminación de este patógeno en distintos medios. Sin embargo, la información acerca del ciclo de vida de *E. amylovora* fuera de huéspedes susceptibles es todavía muy escasa. De hecho, su supervivencia en ambientes acuáticos todavía es prácticamente desconocida, así como la importancia real de este posible reservorio en su diseminación. Estudios recientes han demostrado que *E. amylovora* es capaz de sobrevivir y mantener su poder patógeno en condiciones de escasez de nutrientes en agua estéril, siendo su supervivencia favorecida por la presencia de nutrientes traza y bajas temperaturas. Sin embargo, se desconoce su posible persistencia en agua natural en presencia de otros microorganismos. En este trabajo, se ha estudiado la supervivencia y patogenicidad de *E. amylovora* en microcosmos de agua de lluvia no estéril, usando agua estéril como control. Para ello, los microcosmos se inocularon con 3 cepas de esta bacteria (CFBP1430, un transformante marcado con GFP y un mutante deficiente en amilovorano), por separado, a 10^7 ufc/ml y se mantuvieron a 26 y 5°C, al menos durante 45 días. El seguimiento de las poblaciones inoculadas se realizó mediante recuentos periódicos de células totales, viables y cultivables, evaluándose al final del experimento el poder patógeno de dichas poblaciones en frutos inmaduros. Los resultados han demostrado que *E. amylovora* es capaz de sobrevivir en agua natural a temperaturas templadas y frías, manteniendo parte de sus poblaciones en estado cultivable y parte en estado viable no cultivable. Su supervivencia en agua se ve afectada, al menos, por las condiciones de oligotrofia, la temperatura y la presencia de la microbiota del agua de lluvia, siendo su persistencia favorecida a bajas temperaturas. No obstante, los ensayos de patogenicidad han revelado que tanto las células de *E. amylovora* mantenidas en agua no estéril como las de agua estéril fueron capaces de causar necrosis y exudados en peras inmaduras a ambas temperaturas, indicando que el agua natural puede ser una fuente de inóculo de este patógeno. Aunque hasta la fecha la diseminación de *E. amylovora* a través del agua ha sido subestimada, los presentes resultados demuestran que el riesgo existe, planteando nuevos interrogantes sobre el papel del agua en la epidemiología y el control del fuego bacteriano.

P-108

EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD DE *AGROBACTERIUM SPP.* PARA FORMAR BIOPELÍCULAS SOBRE RAÍZ DE TOMATE

Abarca-Grau, A.M., Marco.Noales, E., López, M.M. y Peñalver, R.

Departamento de Protección Vegetal y Biotecnología. Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (I.V.I.A). Ctra Moncada-Náquera Km 4,5. Moncada (Valencia). E-mail: anabarca@ivia.es

Varias especies del género *Agrobacterium* causan tumores en plantas cultivadas. Las células bacterianas colonizan la raíz y, cuando encuentran una herida, se unen a los tejidos vegetales y los transforman. La síntesis de material extracelular por parte de *Agrobacterium* permite la formación de agregados entre las bacterias y los tejidos de la planta. A esos agregados que se estructuran de forma más o menos compleja se les denomina biopelículas ("biofilms"), las cuales pueden conferir ventajas al patógeno en su colonización, supervivencia y patogenicidad en la planta huésped. Por ello, se analizó la capacidad de formar biopelículas sobre raíz de tomate de tres cepas de las especies *A. tumefaciens*, *A. rhizogenes* y *A. vitis*, tanto en ápices cortados, incubados en suspensiones bacterianas, como en raíces de plantas enteras, inoculadas mediante inmersión de las mismas. Se utilizó microscopía electrónica de barrido (SEM) y microscopía de barrido láser confocal (CLSM), empleando en este caso cepas marcadas con proteína verde fluorescente (GFP).

La observación de los ápices cortados tras 6 días de incubación reveló que la cepa 339-26 de *A. vitis* y la cepa C58 de *A. tumefaciens* formaban densos y continuos tapices compuestos por grandes y compactos agregados celulares. Sin embargo, las biopelículas desarrolladas por la cepa K84 de *A. rhizogenes* fueron diferentes, elevándose notablemente los agregados bacterianos sobre la superficie del ápice de raíz y apreciándose estructuras de tipo globular, con cavidades o canales, dispersas a lo largo de la superficie y ancladas mediante fibras de material extracelular.

Sin embargo, en raíces de plantas enteras no se observaron estas estructuras. En las tres cepas, esporádicamente se llegaron a detectar, mediante SEM, microcolonias de células bacterianas en zonas concretas de la raíz. Debido a la baja densidad bacteriana no fue posible su visualización mediante CLSM. Estos resultados, que contrastan con las biopelículas de estructura compleja formadas por estas mismas cepas en ápices cortados, sugieren que, en las condiciones estudiadas y con las cepas ensayadas, *A. vitis*, *A. tumefaciens* y *A. rhizogenes* no fueron capaces de formar biopelículas sobre raíz de planta entera de tomate.

P-109**DESINFECCIÓN DE BISTURÍES CONTAMINADOS CON *Erwinia amylovora***

Palacio-Bielsa, A.¹, Palazón, M.L.², Collados, R.², Berruete, I.M.¹ y Cambra-Álvarez, M.A.²

¹Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria de Aragón (CITA), Av. Montañana, 930, 50080 Zaragoza

²Centro de Protección Vegetal (CPV), Av. Montañana, 930, 50080 Zaragoza

El manejo de herramientas de poda contaminadas con *E. amylovora* supone un riesgo de dispersión del fuego bacteriano. La legislación fitosanitaria vigente incluye la realización de prospecciones en campo y la desinfección obligatoria de almacenes, maquinaria, útiles de trabajo, etc. para el control de organismos nocivos de cuarentena. Sin embargo, actualmente no existen productos desinfectantes autorizados cuya eficacia frente a *E. amylovora* haya sido evaluada.

Se han realizado ensayos en condiciones de laboratorio para evaluar la efectividad frente a *E. amylovora* de tres productos comerciales de distinta composición. Los ensayos se realizaron utilizando bisturíes infectados con una suspensión de la cepa de *E. amylovora* CFBP 1430 y sometidos a tres tiempos de exposición (30, 15 y 5 segundos) a los productos. Se estudió la posibilidad de que *E. amylovora* pudiera entrar en estado viable no cultivable (VNC) y mantener el poder patógeno en los bisturíes sometidos a tratamientos con los productos.

En las condiciones ensayadas, dos de los productos estudiados se mostraron eficaces frente a la bacteria tras un tiempo de exposición de 30 segundos. Los productos tendrían una actividad bactericida y no bacteriostática. En los bisturíes tratados no se recuperan el crecimiento y la cultivabilidad de *E. amylovora* mediante técnicas de enriquecimiento. No se obtienen síntomas mediante cortes realizados en peras inmaduras.

P-110

EVALUACIÓN DE MÉTODOS FENOTÍPICOS Y GENOTÍPICOS PARA LA CARACTERIZACIÓN DE AISLADOS DE *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* DE OLIVO.

Quesada, J.M., Peñalver, R., Bertolini, E. y López M.M.

Centro de Protección Vegetal y Biotecnología. Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA). Ctra. Moncada-Náquera km 5, 46113 Moncada, Valencia. E-mail: jquesada@ivia.es

La variabilidad de cepas de *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* (Psv), agente causal de la tuberculosis del olivo, ha sido recientemente abordada respecto a la virulencia, morfología y tamaño de colonias, movilidad y dificultad de manipulación genética. Sin embargo, la variabilidad a nivel genotípico de Psv ha sido escasamente abordada hasta la fecha. El estudio de las características bioquímicas y fisiológicas de 42 cepas de Psv de distintos orígenes en su mayoría españolas se basó en la utilización de fuentes de carbono mediante el sistema comercial miniaturizado BIOLOG (Biolog Inc., USA) y para la caracterización molecular se empleó PCR de elementos repetitivos (rep-PCR), PCR del minisatélite M13 (MSP-PCR), amplificación aleatoria de los fragmentos polimórficos de ADN (RAPD), PCR con iniciadores del elemento de inserción IS53 (IS53 PCR) e hibridación del ADN total digerido con *EcoRI* con una sonda basada en la secuencia parcial de IS51.

Los datos obtenidos de la caracterización metabólica mostraron perfiles homogéneos en todas las cepas, lo que sugeriría que hay limitaciones para la discriminación entre aislados de Psv españoles mediante caracteres fenotípicos. Esta homogeneidad de las cepas fue confirmada mediante MSP-PCR y con los iniciadores OPR-11, OPX-14 y OPX-7 de RAPDs, que mostraron índices de diversidad de Simpson (*D*) de 0.35, 0.38, 0.57 y 0.61, respectivamente. Sin embargo, con REP-PCR se obtuvo mayor grado de polimorfismo entre cepas de Psv con un valor *D* de 0.68. Lo mismo sucedió con los iniciadores de RAPDs OPR-12 y OPE-7 con unos valores *D* de 0.71 y 0.74, respectivamente. Las técnicas que evidenciaron la mayor diversidad entre cepas de Psv fueron RAPDs con el primer OPX-11, IS53 PCR e IS51 RFLP con valores *D* de 0.90, 0.94 y 0.99, respectivamente. Estas técnicas de elevado poder de discriminación, junto con IS53 RFLP previamente descrita, pueden ser la base de una caracterización de aislados españoles de Psv, de gran utilidad para incrementar el conocimiento de la epidemiología molecular de este patógeno.

P-111

IDENTIFICACIÓN DE DIFERENTES AISLADOS DE STOLBUR EN VIDES, VECTORES Y PLANTAS HUÉSPEDES DE DISTINTAS ÁREAS VITIVINÍCOLAS

Batlle, A., Sabaté, J. y Laviña, A.

IRTA, Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentaries, Ctra Cabrils Km 2, 08348 Cabrils, Barcelona. E-mail: assumpcio.batlle@irta.es

Los fitoplasmas pertenecientes al subgrupo 16SrXII-A o stolbur, están asociados con distintas enfermedades de plantas cultivadas y silvestres, como la enfermedad de la madera negra de la viña o “Bois Noir” (BN). El cixiido *Hyalesthes obsoletus* Signoret es el principal vector del fitoplasma del stolbur en el centro de Europa, sin embargo en los países del sur de Europa como es el caso de España, las poblaciones de este vector suelen ser bajas y se han identificado otras especies de insectos que también pueden estar implicadas en la diseminación de la enfermedad. En estudios previos se identificaron distintas especies de cicadelidos y fulgoridos portadores del stolbur y capaces de transmitir el mismo a un medio artificial. Entre estas especies se encontraban *Agallia laevis*, *Euscelis obsoletus*, *Euscelidius variegatus*, *Hardya tenuis*, *Macrosteles quadripunctulatus*, *Peragallia sinuata* y *Psammotettix striatus*. Por otro lado, diferentes especies silvestres como *Chenopodium album*, *Convolvulus arvensis*, *Lavandula officinalis*, *Polygonum convolvulus* y *Solanum nigrum*, fueron identificadas como huéspedes de stolbur alrededor de las parcelas de viña infectadas. Los análisis de RFLP de fragmentos del gen ribosómico 16SrDNA, no permitieron distinguir entre aislados de stolbur procedentes de distintas plantas huésped y de distintas áreas geográficas, sin embargo, se tiene constancia de que existe diversidad biológica y genómica en este fitoplasma y se han observado distintas sintomatologías en plantas de vinca infectadas con distintos aislados.

Los análisis PCR-RFLP del gen de elongación Tu han permitido distinguir tres aislados, asociados a distintas plantas huésped: *Urtica dioica*, *Convolvulus arvensis* y *Calystegia sepium*. Recientemente se han descrito otros marcadores moleculares que permiten distinguir un mayor número de aislados, como los cebadores diseñados para el gen H10 que codifica para una proteína de membrana (Pacífico et al., 2006). Con la utilización de estos cebadores y posterior RFLP con la enzima RsaI se obtienen 14 perfiles distintos.

Con la finalidad de determinar la implicación de las distintas especies de insectos y plantas silvestres en la diseminación de la enfermedad en viña, se ha realizado la caracterización molecular de los aislados del fitoplasma procedentes de plantas e insectos. Mediante PCR con los cebadores del gen de elongación Tu se han identificado dos de estos aislados, el tipo I en viñas de la Rioja principalmente y el tipo II en viñas e *Hyalesthes* de Cataluña, Navarra y Aragón.

Los análisis realizados con los cebadores diseñados para el gen H10 han mostrado la presencia de distintos aislados de stolbur tanto en vides, como en plantas huésped e insectos, procedentes de Aragón, Álava, Rioja, Navarra y Cataluña.

Trabajo financiado con el proyecto INIA RTA05-156

P-112

DISTRIBUCION DE LAS ESPECIES DE *Monilinia* spp. EN HUERTOS DE MELOTONEROS Y NECTARINAS DEL VALLE DEL EBRO

Villarino, M.¹, Melgarejo, P.¹, Casals, C.², Lamarca, N.², Usall, J.², Segarra, J.³ y De Cal, A.¹

¹INIA. Carretera de La Coruña km 7. 28040 Madrid. ² UdL-IRTA, Avenida Rovira Roure 191. 25198 Lleida, ³Universidad de Lleida. Avenida Rovira Roure 191. 25198 Lleida. E-mail: cal@inia.es

Monilinia laxa (Aderhold y Ruhland) Honey y *M. fructigena* Honey in Whetzel, son los hongos que causan la necrosis y podredumbre de los frutales de hueso y pepita en Europa. Existe una tercera especie, *M. fructicola* (Wint) Honey, que causa podredumbre en Oceanía, América, Asia y África. En Europa por el momento se encuentra incluida en la lista A2 de organismos en cuarentena. *M. fructicola* fue encontrada por primera vez en Europa en 2001, en Francia, habiendo sido declarada posteriormente en Austria, República Checa, y en Hungría y Suiza en frutos importados desde España e Italia. En España, en el último año, se ha localizado de forma puntual en 2006 en el Valle del Ebro por los Servicios de Sanidad Vegetal de la Generalitat de Cataluña y el Gobierno de Aragón. Hasta este momento, la especie más extendida y causante de mayores daños en melocotonero, tanto en flores y brotes como en frutos, era *M. laxa* (85-90% de los aislados de podredumbre en frutos), seguida de *M. fructigena* (15-10%) *M. fructicola* produce apotecios y ascosporas durante el periodo invernal, presenta una mayor esporulación en su forma asexual y un mayor potencial de desarrollo de resistencia a fungicidas. Estas tres características la hacen más peligrosa que las otras dos especies ya existentes en nuestro país, *M. laxa* y *M. fructigena*.

Para determinar la distribución de cada una de las especies de *Monilinia* en el Valle del Ebro, se seleccionaron más de 50 huertos de melocotoneros o nectarinas dentro de cinco zonas marcadas en este Valle durante los años 2006 y 2007. Se recolectaron cada año entre 400 y 500 frutos con síntomas de podredumbre parda. Los aislados se identificaron morfológica y molecularmente mediante PCR utilizando las sondas específicas previamente diseñadas en nuestro laboratorio: IlaxaS e IlaxaAS para *M. laxa*, IGenAS e IGenAS para *M. fructigena* y IColaS e IColaAS para *M. fructicola*.

M. laxa sigue siendo la especie que se aísla con mayor frecuencia, seguida de *M. fructicola* y *M. fructigena*. La distribución de las especies varía en función de las áreas y los años de muestreo.

P-113

ESTUDIO DE LOS NIVELES DE CONIDIOS DE *BOTRYTIS* EN UN VIÑEDO POR MÉTODOS AEROBIOLÓGICOS

Fernández, M.¹, Albelda, Y.¹, Aira, M.J.², Rodríguez-Rajo, F.J.¹ y Jato, V.¹

¹Departamento de Biología Vegetal y Ciencias del Suelo. Facultad de Ciencias de Ourense. Universidad de Vigo.; ²Departamento de Botánica. Universidad de Santiago de Compostela.

Una de las enfermedades criptogámicas más comunes del viñedo es la podredumbre gris provocada por el hongo *Botrytis cinerea* Pers. Este hongo pasa el invierno en forma de *esclerocios* y también como *micelio* en las yemas. A partir de primavera se forman las estructuras de reproducción sexual formadoras de *conidios* responsables de sucesivas infecciones secundarias y que son dispersadas por el viento. El conocimiento de los niveles de estos propágulos fúngicos permite evaluar la intensidad de la infección.

Se ha realizado entre los años 2004 y 2007, un estudio aerobiológico y fenológico en la Comarca del Ribeiro, situada en el borde noroccidental de la provincia de Ourense (Galicia), durante el ciclo vegetativo de la vid. Para la captación de *conidios* se ha utilizado un captador volumétrico tipo Hirst, modelo Lanzoni VPPS-2000 siguiendo el método propuesto por la Red Española de Aerobiología. Para el estudio fenológico se ha seguido la escala BBCH (Lorenz *et al.* 1994), seleccionando 20 cepas de cada una de las tres variedades presentes en el viñedo: Treixadura, Godello y Loureira.

La cantidad total de *conidios* registrados osciló entre 14.945 (año 2007) y 1.700 (año 2005). La concentración media diaria máxima registrada fue 384 *conidios*/m³, también en el año 2007. En general, los periodos de mayor concentración coinciden con los estadios fenológicos de desarrollo de las hojas, floración y las fases finales del estadio de maduración de la uva. Además la humedad relativa elevada y/o presencia de lluvia acompañada de temperaturas medias en torno a 20°C, favorecen el incremento del nivel de *conidios* en el aire.

Los sistemas que permiten conocer el nivel de esporas de hongos fitopatógenos en el aire pueden suponer una gran ayuda para un mejor control de enfermedades fúngicas en los cultivos.

P-114**PRESENCIA DE LOS PATOTIPOS DEFOLIANTE Y NO DEFOLIANTE DE *Verticillium dahliae* EN LAS AGUAS DE RIEGO DE CULTIVOS EN ANDALUCÍA**

Moraño Moreno, R., Bejarano Alcázar, J. y Rodríguez Jurado, D.

IFAPA Centro "Alameda del Obispo", Apdo. 3092, 14080 Córdoba.

La dispersión del patotipo defoliante (D) altamente virulento de *V. dahliae* en el agua de riego explicaría en parte la extensión de dicho patotipo y su detección infectando y causando la muerte de plantas de algodónero y de olivo en las principales áreas de estos cultivos en Andalucía. Para estudiar la dispersión indicada, se eligió el agua de riego del algodónero por la relación entre las Verticilosis de este cultivo y del olivo y el patrón de virulencia similar que muestran los aislados de *V. dahliae* sobre estos huéspedes. Los objetivos planteados fueron determinar la evolución temporal de los niveles de propágulos de *V. dahliae* en las aguas de riego de campos de algodónero en Andalucía, y caracterizar la virulencia de las poblaciones del hongo presentes en el agua. Desde junio a septiembre de los años 2006 y 2007 se prospectaron mensualmente las aguas de riego utilizadas en 30 campos de algodónero infestados por *V. dahliae* en las provincias de Córdoba (12 en 2006 y 11 de ellos en 2007), Jaén (9) y Sevilla (9). Los campos se regaron con aguas procedentes del río Guadalquivir almacenadas en 5 balsas (3 en Córdoba y 2 en Jaén) o con aguas distribuidas por 12 canales desde los ríos Bembézar (1 en Sevilla), Genil (2 en Córdoba), Guadalquivir (7; 6 en Sevilla y 1 en Jaén) y Rumblar (2 en Jaén). Las aguas embalsadas y las distribuidas por 3 canales (1, Genil; 2, Rumblar) se utilizaron también para regar campos de olivar. La virulencia de 115 aislados (42, 47 y 26 de Córdoba, Jaén y Sevilla, respectivamente) monoconídicos de *V. dahliae* obtenidos de las aguas prospectadas en 2006 (57) y 2007 (58), se caracterizó mediante inoculaciones artificiales de algodónero 'Acala SJ-2' en 4 experimentos realizados en condiciones controladas en los que se incluyeron aislados de referencia de los patotipos D y no defoliante (ND) del patógeno. *V. dahliae* infestó las aguas de riego del 70% y 83% de los campos prospectados respectivamente en 2006 y 2007 (92, 100 y 89% del total de los campos en Córdoba, Jaén y Sevilla, respectivamente) sin describir un patrón temporal identificable. En los campos que utilizaron aguas infestadas, el hongo se aisló del 25-100% de las muestras de agua analizadas cada año y en cantidades de 0-98 esclerocios ($\geq 20 \mu\text{m}$) y 0-26250 micropropágulos (< 20 y $\geq 1 \mu\text{m}$)/1000 L de agua. El 81 y 12% de los aislados caracterizados pertenecieron, respectivamente, al patotipo D altamente virulento (diferenciado en dos subgrupos por el progreso de la enfermedad) y ND moderadamente virulento, y el 7% restante no causaron síntomas ni infectaron las plantas. Los aislados D representaron el 74, 94 y 69% de los aislados testados de Córdoba, Jaén y Sevilla, respectivamente. El patotipo D estuvo presente en las aguas procedentes de todas las balsas y canales considerados. Estos resultados demuestran la importancia del agua como vehículo de dispersión del patotipo D en Andalucía, y sugieren la introducción e incremento de dicho patotipo a través de las aguas de riego en cultivos de algodónero y olivo.

Financiado por el proyecto RTA2006-00012

P-115**PROPÁGULOS DE *Verticillium dahliae* DE DIFERENTE TAMAÑO INFESTAN EL AGUA UTILIZADA EN DISTINTAS CAMPAÑAS DE RIEGO DEL OLIVAR EN ANDALUCÍA**

Moraño Moreno, R., Bejarano Alcázar, J. y Rodríguez Jurado, D.

IFAPA Centro "Alameda del Obispo", Apdo. 3092, 14080 Córdoba.

En prospecciones anteriores del agua de riego de olivares localizados en Jaén y Sevilla realizadas en los años 2004 y 2005, se detectó la presencia de propágulos de *V. dahliae* de diferente tamaño sólo en las muestras de agua analizadas en 2005. El aislamiento negativo del hongo del agua de riego en 2004 se atribuyó al reducido volumen de agua analizada respecto al año 2005. En este trabajo se ha abordado constatar si la infestación del agua de riego de olivar por esclerocios ($\geq 20 \mu\text{m}$) y micropropágulos (< 20 y $\geq 1 \mu\text{m}$) de *V. dahliae* en Andalucía ocurre en diferentes campañas de riego, y estudiar si dicha infestación sigue un patrón que se repita con los años. Se muestrearon las aguas de riego de un total de 37 campos de olivo afectados por la Verticilosis, 20 en el año 2006 (7 y 13 en Jaén y Sevilla, respectivamente) y 19 de ellos y 17 nuevos campos en 2007 (10, 12 y 14 campos en Córdoba, Jaén y Sevilla, respectivamente). Los campos se abastecieron para regar con aguas de pozos (3, 5 y 15 en Córdoba, Jaén y Sevilla, respectivamente) o aguas superficiales embalsadas o canalizadas desde los ríos Genil (4 en Córdoba), Guadalimar (1 en Jaén) y Guadalquivir (3 y 6 en Córdoba y Jaén, respectivamente). Muestras de 1000 L del agua utilizada en cada campo se recolectaron para su análisis con periodicidad mensual desde abril o febrero hasta octubre de 2006 ó 2007. *V. dahliae* infestó el agua de riego del 86 y 77% de los campos prospectados en 2006 en Jaén y Sevilla, respectivamente, y de todos ellos en 2007 excepto de un campo en cada provincia. El hongo se aisló del agua del 90, 92 y 93% de los campos prospectados en 2007 en Córdoba, Jaén y Sevilla, respectivamente. Los campos que regaron con agua contaminada por *V. dahliae* representaron el 100 y 93% del total de los campos que se abastecieron con aguas subterráneas y aguas superficiales de origen en los distintos ríos, respectivamente. La presencia de propágulos de *V. dahliae* de diferente tamaño en las aguas de riego se confirmó independientemente de la temporada de riego, la provincia y el origen del agua. Análogamente a las prospecciones de 2005, los micropropágulos fueron en promedio más numerosos (76 y 2682/1000 L según el año) que los esclerocios (8 y 5/1000 L según el año) en las muestras de agua infestadas. La infestación del agua por *V. dahliae* no mostró un patrón repetible, debido a la variabilidad de su presencia en el agua entre campos cada año y entre años en cada campo. Sin embargo, como en investigaciones anteriores, el promedio mensual de micropropágulos en los campos que regaron con aguas infestadas tendió a alcanzar un valor máximo, que ocurrió en alguno de los muestreos realizados durante la primavera en Sevilla (112-5350/1000 L según el año) y Córdoba (27633/1000 L) y principio de verano en Jaén (117-470/1000 L según el año). La presencia reiterada de propágulos de diferente tamaño en el agua de riego debe ser considerada en relación a la epidemiología y el control de la Verticilosis.

Financiado por el proyecto RTA2006-00012

P-116

INTERACCIONES ENTRE *Epichloë festucae* Y OTROS HONGOS ENDOFÍTOS

Martín Rodríguez, P.¹, Bills, G.F.², Collado, J.² y Zabalgogezcoa, I.¹

¹Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología, CSIC. Apartado 257, 37071 Salamanca. Email: izabalgo@usal.es

²Centro de Investigación Básica de España. Merck, Sharp & Dohme. Josefa Valcarcel 38, 28027 Madrid.

Epichloë festucae es un hongo endofítico que infecta sistémicamente el espacio intercelular de las partes aéreas de la gramínea *Festuca rubra*. En las plantas infectadas el hongo produce diversos metabolitos secundarios tóxicos para herbívoros. Las plantas infectadas por *E. festucae* muestran un aumento de la tolerancia a diversas situaciones de estrés abiótico, así como una mayor resistencia al ataque de herbívoros y de algunos hongos patógenos.

El objetivo de este trabajo era comprobar si la presencia de *E. festucae* inhibe la colonización de las plantas por parte de otras especies endofíticas. La hipótesis se comprobó en tres líneas de *F. rubra*, cada una de las cuales se compone de plantas infectadas por *E. festucae* (E+) y libres de infección (E-). En un experimento diseñado para estimar la frecuencia de colonización endofítica en fragmentos de hoja y vaina foliar, se observó que un 13% de los fragmentos de hoja y un 22% de los de vaina estaban infectados por endofitos de especies distintas de *Epichloë*. El porcentaje de colonización fue mayor en plantas E+ que en E-, pero la diferencia entre ambos grupos no fue estadísticamente significativa. En este experimento se identificaron cerca de 47 especies distintas de hongos. En los análisis de hojas se detectaron una media de 2,6 especies fúngicas por planta y en las vainas foliares una media de 4 especies por planta; sin embargo, a pesar de ser mayor el número de especies en plantas E+, no se detectaron diferencias significativas con respecto al número de especies entre plantas E+ y E-. En las plantas infectadas por *E. festucae*, el porcentaje de colonización por este hongo fue del 81% en muestras de hojas y del 69,5% en vainas foliares.

En un segundo experimento se ha utilizado un método de aislamiento de hongos a partir de partículas de planta menores de 1 mm para cuantificar la colonización y diversidad de endofitos.

P-117**MUESTREO NO DESTRUCTIVO MEDIANTE LA BARRENA PRESSLER
DE UN VIÑEDO AFECTADO POR EUTIPIOSIS**

Muruamendiaraz, A. y Legorburu, F.J.

NEIKER-Tecnalia, Instituto Vasco de Investigación y desarrollo Agrario
Granja Modelo de Arkaute, Apdo 46, 01080 Vitoria-Gasteiz

En el marco de un estudio más amplio de seguimiento de síntomas de la eutipiosis en varios viñedos de la Rioja Alavesa, se ha realizado un muestreo preliminar con el fin de determinar correlaciones entre la sintomatología externa (foliar) e interna (madera) de la planta. El trabajo se llevó a cabo en una parcela de Tempranillo de 26 años y un índice medio del 24,4% de vides afectadas por la enfermedad. Los muestreos habituales son destructivos, pero para poder estudiar el desarrollo y la evolución de la enfermedad en el tiempo, se pretende evaluar la eficacia de un metodo no destructivo mediante una barrena Pressler. Esta herramienta es empleada en estudios forestales, para medir el crecimiento diametral de los troncos, y permite extraer cilindros de madera de unos pocos milímetros de diámetro. Contando con información de 3 años sobre el estado sanitario de cada síntomas foliares. Se obtuvieron muestras de madera de cada brazo y se llevaron a laboratorio para su procesamiento. Se realizaron siembras en medio de cultivo y se anotaron datos de presencia o ausencia de colonias de diversas especies de hongos al cabo de una semana. Los datos se trataron mediante análisis de covarianza, previa transformada raíz cuadrada, de la proporción de placas en las que se aislaba cada hongo.

Además de la presencia de especies saprófitas presentes habitualmente en la madera (*Penicillium sp.*, *Alternaria sp.*, *Rhizopus sp.*, *Aspergillus sp.*) se aislaron asiduamente los hongos *Eutypa lata* y *Diplodia seriata*.

El error experimental ha resultado muy alto y el efecto de la covariable síntoma se ha mostrado algo significativo para *E. lata*. Este hongo se aísla con mayor frecuencia según aumentan los síntomas foliares, estabilizándose en el nivel más alto de afección. En el caso de *D. seriata*, su frecuencia de aparición es mayor en plantas asintomáticas o, por el contrario, en plantas muy afectadas.

Puesto que la presencia de este otro hongo no es proporcional a los síntomas foliares, estos resultados apoyarían la teoría de que *D. seriata* es un patógeno secundario u oportunista. A falta de un estudio más exhaustivo, las tendencias no han sido lo suficientemente marcadas para que se consideren consistentes. Una posible causa del alto error experimental es que se muestrea a ciegas, cuando lo ideal es buscar el frente de avance de la necrosis en la madera.

P-118

Tomicus piniperda*: UN POSIBLE VECTOR DE HONGOS PATÓGENOS DE *Pinus radiata

Vázquez-Ruiz de Ocenda, R.A.¹ y Lombardero, M.J.²

¹Departamentos de Botánica y ²Producción Vexetal. Escola Politécnica Superior. Universidade de Santiago de Compostela. Campus Universitario s/n 27002 Lugo. E-mail: bvocenda@lugo.usc.es

Tomicus piniperda L. es un importante perforador de coníferas que puede causar la muerte de la planta al reproducirse en los troncos. Esta especie tiene además una fase de vida en las copas menos conocida. Durante esta fase perfora los brotes terminales para alimentarse y completar así su desarrollo. Los daños producidos por este escolítido durante este proceso pueden permitir la entrada en la planta de hongos patógenos que aceleren el proceso de degradación de estas masas forestales. En Europa, *T. piniperda* ha sido identificado como vector de especies de *Ophiostoma* (causante del azulado de la madera).

En este trabajo se estudia la flora fúngica asociada a *T. piniperda* en *Pinus radiata* D. Don, con el fin de determinar su posible relación con la presencia de hongos patógenos como *Sphaeropsis sapinea* (Fr.) Dycos & Sutton (muy frecuente en nuestra zona). Para ello, se han realizado 11 muestreos durante el año 2006 (1/mes) en 2 plantaciones jóvenes de *P. radiata* situadas en las proximidades de Lugo (NW, España), una de ellas afectada por *T. piniperda* (>70% de brotes atacados) y otra de aspecto más sano (<5% de brotes atacados). En cada muestreo se tomaron 10 brotes por parcela y, en el período de vuelo, 10 insectos adultos. Para el análisis de los brotes, se eliminaron las acículas y se cortaron en fragmentos de 5 cm que fueron superficialmente esterilizados y sembrados en medios de cultivo. En los muestreos de Mayo a Agosto, también se analizó la flora fúngica presente en las acículas tanto sobre medio de cultivo como forzada en cámara húmeda. Para detectar la presencia de conidios sobre los escolítidos, cada insecto fue lavado por agitación en agua estéril con Tween 80 y sembrado sobre medio de cultivo el líquido de lavado. Posteriormente, los insectos, tras secarlos en papel de filtro estéril, fueron presionados sobre el medio.

Se han obtenido más de 900 aislamientos pertenecientes a 38 entidades fúngicas. Los grupos más frecuentes incluyen especies de *Alternaria*, *Aureobasidium*, *Cladosporium*, *Epicoccum*, *Penicillium*, *Pestalotiopsis* y *Trichoderma*. Pese a la fuerte correlación encontrada en campo entre la presencia de *Tomicus* y los síntomas de *Sphaeropsis*, el hongo no ha sido identificado en medio de cultivo aunque sí ha aparecido cámara húmeda. Sin embargo, tanto a partir de insectos como en brotes de las parcelas afectadas se han aislado otros hongos como: *Leptographium*, *Pesotum* y *Phialophora*; los dos primeros anamorfos de algunos miembros de la Fam. Ophiostomataceae y podrían ser causantes de azulado.

P-119**INFLUENCIA DEL ABONADO NITROGENADO SOBRE EL REPILO DEL OLIVO CAUSADO POR *Fusicladium oleagineum***

Roca, L.F., Alcántara, E. y Trapero, A.

Dpto de Agronomía (Patología Agroforestal), Universidad de Córdoba, Campus de Rabanales, Edif C-4, 14071 Córdoba. E-mail: ag3rocal@uco.es

El Repilo del olivo causado por *F. oleagineum*, es una enfermedad presente en todas las zonas olivareras del mundo. La defoliación que produce en los árboles afectados se traduce en debilitamiento y reducción de cosecha. La fertilización de los cultivos influye en el desarrollo de las enfermedades vegetales, siendo el nitrógeno el elemento que con más frecuencia se ha relacionado con las mismas y considerando en general, que el exceso de nitrógeno favorece el ataque de los patógenos. Investigaciones realizadas con plántones de olivo en cultivo hidropónico, han mostrado que el exceso de N y la falta de K parecían favorecer el ataque de *F. oleagineum*. El objetivo del presente trabajo, ha sido evaluar la influencia del abonado nitrogenado sobre la infección de *F. oleagineum* en plántones cultivados en macetas y en olivos adultos en campo. Plántones del cultivar Picual de dos años de edad se sometieron a riego periódico con 150 ml de tres soluciones nutritivas con distinta concentración de N, 1, 7.5 y 20 mM. Se realizaron mediciones de crecimiento en altura, de contenido de nitrógeno y clorofila en hojas, y de SPAD. Posteriormente se inocularon con *F. oleagineum* en condiciones controladas mediante pulverización con una suspensión conidial del patógeno y se mantuvieron en invernadero hasta la aparición de síntomas. La evaluación de la enfermedad se realizó atendiendo a la incidencia y severidad de la misma. Tras la evaluación de la enfermedad, se midió además la cantidad de materia seca. En olivos en campo sometidos a distinto nivel de fertilización nitrogenada, se midió el contenido de N en hoja y se realizaron evaluaciones periódicas de la enfermedad. Los plántones sometidos al tratamiento con la dosis menor de N mostraron significativamente menor crecimiento, menor contenido de N y clorofila en hojas y menores valores de SPAD, así como menor peso seco. Asimismo, dichos plántones mostraron menores valores de incidencia y severidad de la enfermedad, mientras que no se observaron diferencias significativas entre los tratamientos con las dosis media y alta de N para la mayoría de los parámetros indicados. En el ensayo con olivos en campo, aunque las hojas con mayores contenidos de nitrógeno mostraron valores ligeramente más altos de incidencia, no se ha podido demostrar la relación entre el estado nutricional de las hojas y la incidencia y severidad del Repilo para un nivel de infección moderado (12% de hojas infectadas).

P-120

ANÁLISIS DE LA DIVERSIDAD GENÉTICA EN POBLACIONES DE *Verticillium dahliae* QUE INFECTAN OLIVO EN ANDALUCÍA

Olivares, C.¹, Jiménez-Gasco, M.M.², Landa, B.B.³, Navas-Cortés, J.A.³ y Jiménez-Díaz, R.M.^{1,3}

¹ETSIAM, Universidad de Córdoba (UCO), Carr. Madrid Km 396, Campus de Rabanales, 14071 Córdoba; ²Department of Plant Pathology, The Pennsylvania State University, University Park, PA 16802, USA; ³Instituto de Agricultura Sostenible, CSIC, 14080 Córdoba,

La Verticilosis del olivo, causada por *V. dahliae* (*Vd*), es en la actualidad una de las principales amenazas para el cultivo del olivo en Andalucía. La severidad de los ataques de la enfermedad está asociada con la prevalencia y distribución de un patotipo del patógeno altamente virulento y defoliante (D) perteneciente al grupo de compatibilidad vegetativa (VCG) 1A contra el cual no existe resistencia disponible. En este estudio se ha analizado la diversidad genética en 637 aislados de *Vd* obtenidos de 433 árboles muestreados en 64 olivares en cinco provincias olivareras de Andalucía mediante: (i) VCGs; (ii) determinación de los patotipos (D vs ND) mediante PCR específica, y (iii) variabilidad de una secuencia específica de *Vd* de 539 (D)/523-pb (ND). Adicionalmente, se investigó la variabilidad genética en una subpoblación de 36 aislados de *Vd* representativos de la diversidad de VCGs mediante tres marcadores microsatélites. De dichos aislados, 636 se han caracterizado en VCG y pertenecen a los VCG 1A (77,9%), 2A (20,6%) y 4B (1,5%), y un aislado resultó autoincompatible para formar heterocarionte estable. Los aislados del VCG1A amplificaron los fragmentos característicos del patotipo D, y fueron predominantes en cuatro de las cinco provincias muestreadas. Mientras que en la inmensa mayoría de los casos todos los aislados de *Vd* obtenidos de los árboles muestreados en una parcela pertenecen a un solo VCG; en algunas parcelas se identificó más de un grupo de compatibilidad vegetativa. La combinación de VCGs predominante fue 1A/2A, que se identificó en 10 de los olivares muestreados. Una amplia proporción de los aislados del VCG1A se obtuvo de cultivos establecidos con estacas autoenraizadas, regados con agua de pozo y plantadas en suelo virgen o en suelo cultivado previamente con especies no huésped de *Vd*. Entre los aislados estudiados sólo han sido identificadas tres (*seq1*, *seq2*, y *seq4*) de las siete secuencias conocidas del amplicón específico de *Vd*. La distribución de VCGs y de secuencias *seq* en los olivares muestreados sugiere que la diversidad genética dentro de poblaciones de *Vd* es mayor en las provincias donde no prevalece el VCG1A y que el patotipo D domina la población de *Vd* en el área olivarera de Andalucía. Los marcadores microsatélites permitieron diferenciar entre VCGs pero no indicaron variabilidad intra VCG.

P-121

DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* EN CULTIVARES DE GARBANZO QUE DIFIRIEREN EN RESISTENCIA A RAZAS DEL PATÓGENO MEDIANTE ENSAYOS qPCR

Jiménez-Fernández, D.¹, Navas-Cortés, J.A.², Jiménez-Díaz, R.M.^{1,2} y Landa, B.B.²

¹ETSIAM, Universidad de Córdoba, Edificio C4, Campus de Ranales, 14071, Córdoba; ²Departamento de Protección de Cultivos; Instituto de Agricultura Sostenible, CSIC, Apdo. 4084, 14080 Córdoba.

La utilización de cultivares de garbanzo resistentes a razas de *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* (*Foc*) es la estrategia de control de la Fusariosis Vascular (FV) del garbanzo más práctica, eficiente y económica. Aunque existen marcadores moleculares asociados a genes de resistencia contra algunas de las razas de *Foc*, la caracterización de ésta en genotipos de garbanzo depende todavía de ensayos de patogenicidad costosos en tiempo y recursos. Por ello, es necesario disponer de métodos alternativos a los bioensayos para identificar y cuantificar fenotipos de resistencia asociados a la infección temprana y/o asintomática de la planta por el patógeno.

En este trabajo hemos puesto a punto cuatro protocolos de ensayo qPCR, para detectar y cuantificar ADN en tejidos de raíz y tallo de garbanzo de: (i) *Foc* (dos protocolos), (ii) *F. oxysporum* (*Fo*), y (iii) la planta huésped. Los diferentes protocolos de qPCR demostraron elevada sensibilidad y eficiencia (E) en la cuantificación de *Foc* y *Fo* ($R^2 > 0.99$; E: 87%-98%) que no es influida por la matriz de extracción de ADN total (raíz o tallo), siendo 0,01 pg la cantidad mínima detectable de ADN de *Foc* o *Fo* de en un fondo de 10 ng de ADN de la planta. La utilidad de los protocolos se demostró al cuantificar la biomasa de *Foc* o *Fo* por biomasa de tejido vegetal en tejidos de raíz de 13 cultivares de garbanzo que difieren en el nivel de resistencia a las ocho razas del patógeno descritas hasta la fecha, que crecieron en una parcela infestada por las razas 0, 5 y 6 de *Foc* y no presentaban síntomas de FV en el momento del muestreo. La cuantificación de ADN fúngico por qPCR sirvió para diferenciar entre cultivares resistentes, moderadamente resistentes y susceptibles a *Foc*. Además, la cantidad de ADN de *Foc* y *Fo* estuvo directamente correlacionada con la cantidad de FV desarrollada, estimada por la incidencia final de plantas muertas (IFPM) y el área bajo la curva de IFPM, así como con el número de propágulos de *Fusarium* spp. en la raíz. Finalmente, el análisis multivariante factorial del conjunto de variables en el estudio permitió clasificar los diferentes cultivares en función de su reacción a la FV y de los niveles de infección por *Foc* y *Fo* (caracterizados por la cantidad de ADN y propágulos fúngicos, respectivamente).

Investigación subvencionada por proyectos AGL2006-1231, 200740I012-CSIC y AGR00580-CICE Junta Andalucía.

P-122

NATURALEZA Y FUENTES DE INÓCULO DE *Peronospora arborescens* QUE DETERMINAN EPIDEMIAS DE MILDUI EN ADORMIDERA

Montes, M.^{1,2}, Landa, B.B.¹, Navas-Cortés, J.A.¹, Muñoz-Ledesma, F.J.³ y 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.³Alcaliber, S.A. Ctra. Carmona-El Viso del Alcor, km 1,8, Carmona (Sevilla).

El Mildiu (*Peronospora arborescens*; PA) de la adormidera (*Papaver somniferum*) causa importantes pérdidas en España y el mundo. El ciclo de patogénesis de la enfermedad es escasamente conocido lo cual dificulta el desarrollo de estrategias de control eficientes. El objetivo de este trabajo fue determinar la naturaleza de la(s) fuente(s) de inóculo primario y el/los tipo(s) de infección determinantes del desarrollo de epidemias de Mildiu, mediante un abordaje experimental integrador que combina (i) ensayos de patogenicidad en condiciones controladas y campo, (ii) desarrollo de técnicas moleculares (q-PCR y nested-PCR) para la detección y cuantificación del patógeno en tejidos de adormidera sintomáticos y asintomáticos, y (iii) análisis de máxima parsimonia (MP) de la región ITS-ADNr. Los resultados demuestran que: (i) Las semillas de adormidera pueden ser infestadas o infectadas a partir de infecciones primarias sistémicas y secundarias sistémicas o no, que a su vez pueden ser sintomáticas o asintomáticas; (ii) Las semillas infestadas o infectadas son efectivas como fuente de inóculo primario; (iii) Las oosporas contenidas en restos de cosecha infestados o en suelo infestado son eficientes en originar infecciones en los órganos subterráneos de plántulas de adormidera durante el establecimiento del cultivo y originar infecciones sistémicas sintomáticas o asintomáticas; (iv) Los esporangios desarrollados en tejidos infectados son eficientes en originar nuevas infecciones, principalmente como inóculo secundario, y éstas pueden ser de naturaleza sistémica; (v) Los ensayos nested-PCR y q-PCR permiten detectar niveles de PA de 0,5 fg y 10 fg, respectivamente, en cualquier tejido y (vi) El análisis de MP de PA de plantas y especímenes de herbario de papaveráceas silvestres y cultivos comerciales en España, Francia y otros países, indican que las poblaciones de PA de *P. somniferum* son diferentes y más homogéneas entre sí que las procedentes de papaveráceas silvestres, sugiriendo la especialización a partir del huésped y que éstas no actúan necesariamente como fuente de inóculo primario importante. Estos resultados indican que el control eficiente de la enfermedad necesita de estrategias que aseguren la sanidad de la semilla y evitar el uso de suelos con historia de Mildiu o cultivo huésped.

Financiado por: PET2006_0444, MEC y Alcaliber, S.A.

P-123

SITUACIÓN ACTUAL DE LA CENICILLA DEL TAMARINDO EN EL TRÓPICO SECO DE MÉXICO

Orozco-Santos, M.¹ y Yañez-Morales, M.J.²

¹Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Campo Experimental Tecomán. Km. 35 carretera Colima-Manzanillo. Tecomán, Colima, México 28100. ²Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, Fitopatología. Km. 36.5 carretera México-Texcoco. Montecillo, EdoMéx, México 56230. Correspondencia: orozco.mario@inifap.gob.mx

El tamarindo (*Tamarindus indica* L.) se cultiva en la región del trópico seco de México que comprende los estados de Colima, Michoacán, Jalisco y Nayarit. La cenicilla es la enfermedad más importante que afecta este frutal y se presenta como lesiones de aspecto polvoriento en hojas. Sus daños se manifiestan con fuertes defoliaciones de los árboles afectados. En ataques severos la caída de hojas puede llegar a más del 90%. Los estudios de estimación de daños, indican que un 38% de hojas caídas reduce en 33% el rendimiento. Los árboles jóvenes con control químico de cenicilla producen 29.1 Kg, mientras que en árboles sin control se cosechan 19.5 Kg. La cenicilla es causada por el hongo del orden Erysiphales, *Oidium tamarindi* (Yen) U. Braun (anamorfo), cuyas hifas son hialinas y de pared lisa, en las cuales se forman conidióforos cortos y erectos. Los conidios son hialinos, unicelulares, de forma cilíndrica, con puntas ligeramente redondeadas, formados en cadenas o de manera individual y miden en promedio 27 µm de largo y 14 µm de ancho. Hasta el momento se desconoce su estado sexual (teleomorfo). La enfermedad tiene una relación estrecha con la estación lluviosa, la emisión de brotes vegetativos y días secos. La mayor incidencia y severidad ocurre durante los meses de agosto a octubre. Las lluvias en verano estimulan la emisión de brotes vegetativos, favorecen el incremento de la población del hongo y el establecimiento de la enfermedad. Los brotes jóvenes son más susceptibles a la cenicilla y la resistencia se incrementa con la edad. La enfermedad es más severa en huertos con problemas de drenaje, malezas, falta de poda, exceso de sombra, escasa aireación y entrecruzado de ramas. El control químico es la alternativa más común y eficaz para reducir los daños ocasionados por la cenicilla; sin embargo, para obtener mejores resultados, el uso de fungicidas debe ser apoyado con algunas prácticas culturales como: poda, inducción de brotes vegetativos, riego, fertilización, destrucción de residuos y control de malezas. Los fungicidas utilizados para el control de la enfermedad son: azufre, benomyl, carbendazim, bitertanol, myclobutanil, propiconazol, tebuconazol, azoxystrobin y trifloxystrobin.

P-124

EPIDEMIOLOGÍA Y MANEJO INTEGRADO DE LA SIGATOKA NEGRA EN BANANO GRAN ENANO EN EL TROPICO SECO DE MEXICO

Orozco-Santos, M.¹, Vázquez-Jiménez, J.L.¹, Manzo-Sánchez, G.² y Farías-Larios, J.²

¹Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Campo Experimental Tecomán. Km. 35 carretera Colima-Manzanillo. Tecomán, Colima, México 28100. ²Universidad de Colima, Facultad de Ciencias Biológicas y Agropecuarias. Apartado postal 36. Tecomán, Colima, México 28100. Correspondencia: orozco.mario@inifap.gob.mx

La sigatoka negra (*Mycosphaerella fijiensis* Morelet) es la enfermedad más importante que afecta al cultivo de bananos en México. En ataques severos ocasiona la destrucción total de las hojas de la planta. Su control está basado en el uso de prácticas culturales y la aplicación continua de fungicidas durante todo el año. En este trabajo se presentan experiencias sobre el manejo de sigatoka negra en banano Gran Enano en el estado de Colima, México, basadas en estudios epidemiológicos, prácticas culturales y el uso de un sistema de preaviso biológico para la toma de decisiones de control químico. La epidemia de la enfermedad estuvo estrechamente relacionada con la época de lluvias. La mayor descarga de ascosporas ocurrió de Julio a Octubre (950 mm de precipitación) y se prolongó durante los meses de formación de rocío sobre las hojas (Noviembre y Diciembre), registrando un total de 635 a 1,016 ascosporas liberadas/cm² de tejido foliar afectado por cada 30 min. Durante la época seca (Enero a Junio), la descarga de ascosporas fue baja (12 a 57 ascosporas). El período de incubación de la enfermedad fue más corto de Junio a Noviembre: 24 a 39 días para síntomas en estado de pizca y de 33 a 58 días para mancha (grado 2 y 4, escala de Fouré). De Diciembre a Mayo, el tiempo de incubación fue de 48 a 87 días para pizca y de 84 a 141 días para mancha. La longevidad de las hojas de banano se relacionó con su época de emergencia, presencia de lluvias y severidad de la enfermedad. El follaje emergido de Junio a Septiembre registró la menor vida útil de las hojas (82 a 112 días). Contrariamente, las hojas brotadas en Octubre y Noviembre tuvieron un período de vida de 90 a 148 días, mientras que en el follaje emitido de Diciembre a Abril la longevidad fue de 171 a 200 días. Durante todo el año, se debe eliminar la hojarasca (principal fuente de inóculo) y amontonarse en hileras para reducir el área foliar expuesta para liberar ascosporas. El sistema de preaviso biológico mejoró el control de sigatoka negra. De Julio a Diciembre se realizaron 11 aplicaciones de fungicidas sistémicos (triazoles, benzimidazoles, morfolinas y estrobilurinas). Durante la época seca (Enero a Junio), el estado evolutivo de la enfermedad se redujo a niveles tan bajos, que no se requirió de control químico.

P-125

***Phytophthora infestans*, PRINCIPAL PATÓGENO DE LA PATATA
(MODELOS PREDICTIVOS)**

Escuredo, O., Méndez, J. e Iglesias, I.

Departamento de Biología Vegetal y Ciencias del Suelo, Universidad de Vigo, Facultad de Ciencias, "As Lagoas", Ourense 32004, España. e-mail: oescuredo@uvigo.es, misabel@uvigo.es

En este trabajo se lleva a cabo un control de las esporas de *Phytophthora infestans*, principal patógeno de la patata, causante de la enfermedad Mildiu. Para la recogida de las muestras se ha utilizado un captador volumétrico tipo Hirst modelo Lanzoni VPPS ubicado en un cultivo de patata en Damil, Xinzo de Limia, provincia de Ourense. Esta zona está muy ligada al sector de la patata y los tubérculos de la variedad Kennebec, está amparada por la Indicación Geográfica Protegida (IGP) Pataca de Galicia reconocido por la Unión Europea. Hemos testado diferentes modelos de predicción para este patógeno durante los años 2004, 2005 y 2007. Todos ellos basados en condiciones meteorológicas, de temperatura, humedad relativa y precipitación. Los modelos utilizados fueron Periodos de Smith, modelo de NegFRY y modelo de Prognosis Negativa. Con la aplicación de dichos modelos, los cuales hemos adaptado a las condiciones locales, se han obtenido resultados con diferente margen de error.

P-126

DIVERSIDAD Y ESTRUCTURA DE LA MICROBIOTA ENDOFÍTICA DE DOS GRAMÍNEAS SIMPÁTRICAS

Sánchez Márquez, S.¹, Bills, G.F.² y Zabalgogezcoa, I.¹

¹Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología, CSIC. Apartado 257, 37071 Salamanca. Email: izabalgo@usal.es

²Centro de Investigación Básica de España. Merck, Sharp & Dohme. Josefa Valcarcel 38, 28027 Madrid.

Ammophila arenaria y *Elymus farctus* son dos gramíneas que crecen en simpatria en playas de las costas Atlánticas europeas. Hongos endofíticos cultivables, asociados a estas gramíneas en playas de la provincia de La Coruña, fueron aislados de hojas y rizomas de 84 plantas de cada especie. La identificación de los aislados se realizó mediante técnicas morfológicas y moleculares. En total se identificaron 103 especies distintas de endofitos, 75 en *Ammophila* y 54 en *Elymus*, siendo 26 especies comunes a ambos hospedadores. En ninguna de las gramíneas se detectaron diferencias significativas entre hojas y rizomas con respecto al número de especies que se aislaron de estos órganos. En términos de abundancia de aislados, las especies dominantes resultaron ser generalistas, capaces de infectar ambas gramíneas. Las especies generalistas representaron el 25% de las especies identificadas y el 61% de los aislados obtenidos. Se encontró una relación inversa, estadísticamente significativa, entre la similitud de conjuntos de endofitos de distintas localidades y su distancia geográfica. Este efecto espacial, junto con los datos aportados por curvas de acumulación de especies, sugieren que en ambas especies de gramíneas, incrementando el número de plantas o de localidades examinadas, se descubrirían nuevas especies de endofitos, la mayoría de ellas singulares representadas por un único aislado.

P-127

GENERA, UNA APLICACIÓN INFORMÁTICA PARA EL CÁLCULO DEL NÚMERO DE GENERACIONES DE *MELOIDOGYNE* EN CULTIVOS DE TOMATE

Ornat, C.¹, Verdejo-Lucas, S.², Cortada, L.² y Sorribas, F.J.¹

¹Departament d'Enginyeria Agroalimentària i Biotecnologia. UPC. ²IRTA. Protecció Vegetal. E-mail: cesar.ornat@upc.edu

Los nematodos del género *Meloidogyne* son parásitos obligados que desarrollan la mayor parte de su ciclo de vida en las raíces. La duración del ciclo de vida depende de la especie del nematodo, la planta huésped y de la temperatura del suelo. Como la temperatura del suelo fluctúa a lo largo del ciclo de vida del nematodo, debe considerarse el *tiempo fisiológico* calculado en grados-día, en lugar del tiempo cronológico para conocer el estado del nematodo. A partir de registros de temperatura del suelo se puede estimar el tiempo de desarrollo y calcular el número de generaciones.

GENERA es una aplicación informática que calcula el número de generaciones que puede completar *Meloidogyne* en cultivos de tomate a partir de los datos de temperatura media diaria del suelo. El cálculo de los grados-día acumulados se realiza considerando la ontogenia en dos etapas (pre y post eclosión) con temperaturas base y constantes térmicas diferentes. Estas constantes se pueden ajustar de tres formas en la aplicación: 1) eligiendo una de las tres especies más importantes de *Meloidogyne* (*M. javanica*, *M. incognita* o *M. arenaria*), donde las constantes térmicas y temperaturas base provienen de la información generada en el proyecto AGL2004-01207. 2) según temperaturas base y constantes térmicas extraídas de la literatura, considerando únicamente una temperatura base y una constante térmica para todo el ciclo de vida. 3) con temperatura base 0 (en este caso la aplicación no calcula generaciones, únicamente, grados-día acumulados). Seleccionando la fecha inicial y final de hasta tres cultivos de tomate dentro del periodo de temperaturas aportado, se delimita el tiempo en el que el nematodo se ha podido desarrollar debido a la presencia del cultivo. El cálculo de los grados-día acumulados durante un cultivo se realiza mediante la expresión: Σ (temperatura media diaria-temperatura base) a partir de los datos de temperatura de suelo. Estos se incorporan en la aplicación a partir de una hoja de cálculo en que la primera columna corresponde a la fecha y la segunda a la temperatura media diaria. La aplicación muestra como resultado en un nuevo documento, el número de generaciones y la fecha en la que se produce el inicio de una nueva generación, así como el número de grados acumulados en los periodos sin cultivo, que proporciona información sobre la supervivencia del nematodo. Actualmente *GENERA* se utiliza como herramienta de soporte en nuestros ensayos de investigación. En el futuro con la aportación de nueva información, también podrá utilizarse como herramienta de predicción. La aplicación estará disponible con versiones mejoradas periódicamente en el servidor DEAB de la UPC.

PANELES

PATOGÉNESIS Y RESISTENCIA

PANELES VIRUS	267 (P-128)
PANELES BACTERIAS	280 (P-141)
PANELES HONGOS	289 (P-150)
PANELES NEMATODOS	311 (P-172)

P-128**PUESTA A PUNTO DE UN SISTEMA *IN VITRO* DE INOCULACIÓN DEL VIRUS DEL AMARILLAMIENTO NECRÓTICO DEL HABA (FBNYV).**

del Cueto-Ginzo, A., Ortiz, V. y Romero, J.

Departamento de Protección Vegetal, INIA. Carretera de La Coruña Km. 7,5, 28040- Madrid. E-mail: cueto.ana-isabel@inia.es

El *Nanovirus del amarillamiento necrótico del haba* (FBNYV) detectado infectando cultivos de haba en Murcia, constituye un peligro potencial para las leguminosas de grano al ser transmitido por pulgones y producir necrosis y muerte de las plantas infectadas. Su genoma está constituido por ocho componentes circulares de DNA de cadena sencilla de 1 Kb de tamaño y cada componente expresa una sola proteína. Hay indicios de que los ocho componentes son necesarios para la infección. La eficacia de la transmisión por los pulgones *Acyrtosiphum pisum* y *Aphis craccivora* ha sido demostrada, así como la baja o ninguna eficacia de transmisión de los pulgones *Myzus persicae* y *Aphis fabae*. Para poder realizar una mejor caracterización del virus y para disponer de un método sencillo de utilización de forma rutinaria en los análisis de resistencia del germoplasma de haba, es necesario contar con un sistema eficaz de infección de plantas de haba con este virus. En este trabajo presentamos la puesta a punto de un sistema de infección *in vitro* del FBNYV mediante el clonaje de los diversos DNAs genómicos en *Agrobacterium tumefaciens*. Por lo menos dos copias completas de cada uno de los componentes genómicos del aislado Mu29D del FBNYV fueron clonados en tándem en un plásmido binario de *Agrobacterium* y usados en los ensayos de infección. Las inoculaciones se hicieron sobre plántulas de haba mediante biobalística usando una mezcla de DNA de los diversos componentes del FBNYV o por agroinoculación usando *A. tumefaciens*. La infección viral se analizó mediante la observación de síntomas en las plantas inoculadas y por ELISA utilizando anticuerpos poli y monoclonales. La eficacia de la inoculación y la necesidad del uso de los diversos DNAs genómicos será discutida.

P-129**EXPRESIÓN, ESTABILIDAD Y MOVIMIENTO DEL GEN CAT EN HABA USANDO COMO VECTOR UN RNA DEFECTIVO DEL VIRUS MOTEADO DEL HABA (BBMV).**

Ortiz, V., del Cueto-Ginzo, A. y Romero, J.

Departamento de Protección Vegetal, INIA. Carretera de la Coruña Km. 7,5
28040- Madrid. E-mail: vilma@inia.es

El *Bromovirus moteado del haba* (*Broad bean mottle virus*, BBMV) puede acumular RNAs defectivos interferentes (DI-RNAs) formados por una deleción interna en el RNA2, conservando un marco de lectura (ORF) capaz de expresar una proteína 2ª truncada, al infectar huéspedes susceptibles. Utilizando estas propiedades, recientemente hemos demostrado el uso de los DI-RNAs como vectores virales expresando el gen de la proteína verde fluorescente (GFP) al ser inoculados en unión de los RNAs genómicos del virus en plantas de haba. Con la finalidad de seguir la evaluación de este vector viral hemos realizado el análisis de los factores deseables en un buen vector viral, expresando en plantas el gen bacteriano de resistencia a cloranfenicol: CAT (cloranfenicol acetil-transferasa). El gen CAT fue amplificado por PCR a partir del plásmido pACYC184 BL-21 de *E. Coli*, utilizando los cebadores Cat3 y Cat4 que contenían los sitios de restricción Mlu I y Nsi I respectivamente, e insertado en estos mismos sitios de corte del clon pMo D12 para obtener el clon pMo D12-CAT, capaz de generar transcritos RNAs de 2.0 Kb que codifican para expresar una proteína de fusión 2a-CAT de 479 aa. Estos transcritos en unión de los RNAs genómicos del BBMV fueron usados para inocular plántulas de haba en los diversos experimentos. La expresión del gen CAT fue detectado y cuantificado mediante ELISA, utilizando anticuerpos monoclonales comerciales anti-Cat y la cantidad de DI-RNAs expresados y encapsidados fueron analizados mediante purificación del virus y análisis de sus RNAs por Northern blots. Los niveles de expresión, estabilidad y movimiento del gen CAT fueron evaluados en comparación con el sistema de expresión del gen GFP. Se discute las ventajas y desventajas del sistema de expresión de proteínas exógenas en leguminosas.

P-130**VISUALIZACION DEL ESTADO AGREGADO DEL FACTOR HCPro DE PVY EN PLANTA, Y DETERMINACION DE SU CAPACIDAD PARA MEDIAR TRANSMISION VIRAL EN PRESENCIA DE TAGS FLUORESCENTES**

González, I., López-Abella, D. y Canto, T.

Centro de Investigaciones Biológicas, CIB, CSIC. Ramiro de Maeztu 9, 28040 Madrid, ESPAÑA. E-mail: *tomas.canto@cib.csic.es*

El factor HCPro de potyvirus, además de ser un potente supresor del silenciamiento génico es requerido para la transmisión no-persistente de estos virus por pulgones, junto con las partículas virales. Mediante centrifugación analítica y microscopía electrónica, otros grupos purificaron de planta HCPro del potyvirus tobacco etch virus, y observaron en la preparación la presencia de estructuras compatibles con dímeros y multímeros de dicho factor (Ruíz Ferrer et al., 2005. J. Virology 79, 3758).

Mediante la técnica de Complementación Bimolecular Fluorescente (BiFC), hemos visualizado por primera vez en la célula vegetal el estado agregado del factor HCPro del potyvirus potato virus Y, marcado con split yellow fluorescent protein (sYFP). El factor HCPro se marcó también con las proteínas fluorescentes green fluorescent protein (GFP) y monomeric red fluorescent protein (mRFP1), en sus extremos amino o carboxilo. Los patrones de fluorescencia mostraron en todos los casos una acumulación citoplásmica, que en los casos de las fusiones al extremo amino del HCPro, excluían el núcleo celular y abundaban en inclusiones citoplásmicas. En cambio, en las fusiones al extremo carboxilo la fluorescencia se acumulaba también en el núcleo. Se analizó la capacidad de estas construcciones con tags fluorescentes para suprimir el silenciamiento en planta de un gen marcador, así como su capacidad para mediar la transmisión por pulgones. Esto último se hizo mediante la expresión transitoria de estos HCPros marcados a partir de T-DNAs agroinfiltrados, y el uso de un aislado de PVY no transmisible debido a una mutación en la región HCPro, en experimentos de transmisión. Los resultados obtenidos se analizan y discuten.

P-131**CAMBIOS TRANSCRIPTOMICOS ASOCIADOS CON LA INFECCION DE
Arabidopsis thaliana POR UN VIRUS DE RNA**

del Toro, F.J.¹, Martínez-Priego, L.¹, Donaire, L.¹, Yu, A.² y Llave, C.¹

¹Departamento de Biología de Plantas, Centro de Investigaciones Biológicas-CSIC, Ramiro de Maeztu 9, 28040 Madrid, Spain E-mail: fjdts@cib.csic.es

² Unité Mixte de Recherche en Génomique Végétale. Institut National de la Recherche Agronomique 1165. Centre National de la Recherche Scientifique 8114. UEVE, 91057 Evry Cedex. France.

Durante las interacciones virus-planta ocurren cambios en la expresión génica del hospedador. Llegar a comprender estos cambios transcriptómicos asociados a la infección viral podrían revelar detalles de cómo las plantas responden a la infección por virus. En este trabajo, fue llevado a cabo un estudio transcriptómico en plantas de *Arabidopsis* infectadas con el virus del cascabeleo del tabaco (TRV), un tobnavirus, mediante microarrays CATMA (Complete *Arabidopsis* Transcriptome Microarray); siendo analizados los cambios de expresión génica en tres tejidos infectados: raíces, hojas de la roseta e inflorescencias. Los resultados muestran que la mayoría de los genes (dependiendo del tejido analizado) no muestran diferencias en los niveles de sus transcritos (p valor de Bonferroni ≥ 0.01), aunque se han podido identificar genes en común inducidos o reprimidos por la infección de TRV. El número de genes de *Arabidopsis* desregulados es notablemente mayor en tejido foliar, comparado con raíces e inflorescencias de plantas infectadas. Cada gen se ha clasificado de acuerdo con su función usando FatiGO. La mayoría de genes con expresión diferencial se encuentran asociados a diferentes procesos metabólicos y celulares de la planta. También se han encontrado representados genes relacionados con respuesta a patógenos y estrés. No obstante, el análisis estadístico de los datos revela que genes de la planta involucrados en la respuesta a diferentes estímulos se encuentran sobrerrepresentados. Muy interesante también es la existencia de un número de genes que se ven inducidos o reprimidos por la infección viral en los tres tejidos, mientras que otros cambios en la expresión son claramente específicos del tejido. El efecto de estos cambios en la expresión génica del hospedador, tanto los generales como los específicos, y el resultado de estos en el proceso de la infección viral sigue siendo discutido e investigado.

P-132

ORIGEN Y DISTRIBUCIÓN DE PEQUEÑOS ARNs EN VIRUS DE PLANTAS

Donaire, L.¹, Gonzalez-Ibeas, D.², Wang, Y.³, Aranda, M.A.², Bejarano, E.R.⁴ y Llave, C.¹

¹Departamento de Biología de Plantas. Centro de Investigaciones Biológicas. CSIC. Ramiro de Maeztu, 9. 28040. Madrid (Spain). ldonaire@cib.csic.es

²Departamento de Biología del Estrés y Patología Vegetal. Centro de Edafología y Biología Aplicada del Segura. CSIC. Apdo. correos 164. 30100. Espinardo, Murcia (Spain).

³Institute for Bioinformatics Building 56. German Research Center for Environment and Health Ingolstaedter Landstr. 1 D-85764. Neuherberg (Germany).

⁴Departamento de Biología Celular, Genética, y Fisiología. Unidad de Genética. Universidad de Málaga. Avda. Cervantes, 2. 29071. Málaga (Spain).

El silenciamiento génico en plantas representa un mecanismo de defensa antiviral. Los virus de plantas son inductores, dianas y además son supresores de silenciamiento génico ya que codifican proteínas capaces de bloquear el silenciamiento antiviral y de interferir con procesos de regulación génica.

La infección por virus esta asociada con la formación de pequeños ARNs de origen viral (svRNAs) gracias a la acción combinada de proteínas dicer-like (DCLs) y ARN polimerasas dependientes de ARN (RDRs). Se han propuesto diversos modelos no excluyentes acerca del mecanismo/s de formación de svRNAs que tratan de explicar cómo se generan RNAs de doble cadena (inductores de silenciamiento génico) durante la infección. Estos incluyen los posibles (aunque nunca demostrados) intermediarios replicativos virales, RNAs virales complementarios que aparean en la célula infectada, RNAs bicatenarios formados por la actividad de RDR endógenas, y RNAs virales altamente estructurados. Estos modelos están parcialmente sustentados por evidencias experimentales si bien su contribución relativa en la biogénesis de svRNAs no está clara para la mayoría de los grupos de virus de plantas.

Con objeto de disponer de información global sobre el origen y distribución de svRNAs en virus de plantas y su potencial como reguladores antivirales hemos llevado a cabo una secuenciación masiva por técnicas de pirosecuenciación de poblaciones de sRNAs derivados de plantas de *Lycopersicon esculentum*, *Nicotiana benthamiana* o *Arabidopsis thaliana* infectadas con diversos virus de RNA y DNA: *Potato X potexvirus* (PVX), *Pepper mild mottle tobamovirus* (PMMoV), *Cymbidium ringspot tombusvirus* (CymRSV), *Tomato yellow leaf curl bigemovirus* (TYLCV), *Tobacco rattle tobravirus* (TRV), *Cucumber mosaic cucumovirus* (CMV), *Cauliflower mosaic caulimovirus* (CaMV), *Turnip mosaic potyvirus* (TuMV), *Turnip crinkle carmovirus* (TCV), *Melon necrotic spot carmovirus* (MNSV) y *Watermelon mosaic potyvirus* (WMV). En este trabajo se analizan los resultados de secuenciación obtenidos.

P-133

***Arabidopsis thaliana* COMO MODELO DE LA ECOLOGÍA DE LA INTERACCIÓN PLANTA-VIRUS: ANÁLISIS DE LA INCIDENCIA Y ESTRUCTURA GENÉTICA DE VIRUS EN SUS POBLACIONES NATURALES**

Fernández, E.¹, Pagán, I.¹, Alonso-Blanco, C.² y García-Arenal, F.¹

¹Centro de Biotecnología y Genómica de Plantas y Departamento de Biotecnología, Universidad Politécnica Madrid, ETSI Agrónomos, 28040, Madrid

²Departamento de Genética Molecular de Plantas, Centro Nacional de Biotecnología, Campus Universidad Autónoma, Cantoblanco, 28049 Madrid.

En los últimos 25 años se ha generalizado el uso de *Arabidopsis thaliana* L. Heynh. (*Brassicaceae*) como organismo modelo para el estudio de la genética molecular de las plantas, inclusive las respuestas de resistencia frente a los parásitos. Sin embargo, el uso de *Arabidopsis* como especie modelo en estudios de ecología evolutiva está sólo empezando. La mayoría de los parásitos usados en el análisis molecular de las respuestas de resistencia proceden de otros huéspedes y no se sabe si infectan poblaciones naturales de *Arabidopsis*, lo que supone una limitación para su uso en estudios de coevolución huésped-parásito. Una línea prioritaria de nuestro grupo es desarrollar *Arabidopsis* como un sistema modelo para estudiar la ecología de las interacciones planta-virus, y su evolución.

Para ello es necesario determinar que virus infectan poblaciones naturales de *Arabidopsis*, realizar una caracterización genética de sus poblaciones, y estimar su impacto en las poblaciones del huésped. Entre los años 2005 y 2008 se llevaron a cabo dos muestreos anuales en 6 poblaciones naturales de *Arabidopsis* localizadas en distintos ecosistemas en la Meseta Central. En cada muestreo se analizó la incidencia de 5 virus [*Cucumber Mosaic Virus* (CMV), *Cauliflower Mosaic Virus* (CaMV), *Turnip Mosaic Virus*, *Turnip Crinkle Virus* y *Turnip Yellow Mosaic Virus*], descritos previamente como patógenos de especies de la familia *Brassicaceae*. En los cuatro años de muestreo, todos los virus analizados se detectaron en al menos una de las poblaciones, con incidencias variables. CMV presentó la máxima incidencia media anual (14%), seguido de CaMV (9%). Para caracterizar los aislados virales se secuenció el gen de la proteína de la cápsida de al menos cinco aislados de cada uno de los virus, obtenidos de plantas de *Arabidopsis* infectadas de diferentes poblaciones. Estos datos han permitido comparar los aislados de *Arabidopsis* con los descritos en otros huéspedes. Además, han permitido describir la estructura espacial de las poblaciones virales en este huésped.

Por tanto, los cinco virus analizados son parásitos naturales de *Arabidopsis* que pueden alcanzar incidencias considerables, lo que unido al impacto de la infección estimado experimentalmente, sugiere que tengan un papel en la ecología de su huésped actuando como un factor de selección. Por ello los proponemos como posibles sistemas modelo para el estudio de la ecología de las interacciones planta-virus.

P-134**CONSTRUCCIÓN DE CLONES INFECTIVOS DEL CRINIVIRUS *Tomato chlorosis virus***

Fortes, I.M. y Navas-Castillo, J.

Estación Experimental “La Mayora”, CSIC, 29760 Algarrobo-Costa (Málaga).

E-mail: jnavas@eelm.csic.es

Tomato chlorosis virus (ToCV) se detectó por primera vez en cultivos de tomate de Florida en 1989, produciendo una enfermedad denominada “desorden de la hoja amarilla”. Desde entonces se ha detectado en regiones de clima tropical, subtropical y templado de todo el mundo. En cultivos de tomate en invernadero del sur peninsular se han observado incidencias de hasta el 100%. ToCV se transmite de forma natural por las especies de mosca blanca *Bemisia tabaci*, *Trialeurodes vaporariorum* y *T. abutilonea*, de manera semipersistente. Los síntomas producidos por ToCV en tomate consisten en una clorosis internervial que aparece inicialmente en las hojas inferiores y que posteriormente se extiende hacia la parte superior de la planta. ToCV pertenece al género *Crinivirus* de la familia *Closteroviridae* de virus de plantas, que comprende virus filamentosos de RNA, cuyo movimiento está limitado fundamentalmente al floema del hospedador. ToCV posee un genoma constituido por dos moléculas de RNA, lineales y de sentido positivo. El RNA1 (8594-8595 nucleótidos) codifica proteínas relacionadas con la replicación viral, mientras que el RNA 2 (8244-8247 nucleótidos) codifica proteínas implicadas en la protección del genoma, el movimiento del virus y la interacción con el vector. Existen asimismo algunas proteínas cuya función es desconocida.

Con el fin de desarrollar un sistema genético manipulable que permita determinar la función de los genes de ToCV, se ha iniciado la construcción de clones infectivos de su genoma. Se ha obtenido un clon de cDNA del RNA1 completo del aislado español AT80/99 de ToCV fusionado al promotor de la SP6 RNA polimerasa en el vector pUC18. Los transcritos generados *in vitro* a partir de la construcción resultante se han inoculado en protoplastos de *Nicotiana benthamiana* mediante polietilenglicol y han resultado infectivos, como ha mostrado el análisis mediante northern blot a diferentes tiempos tras la inoculación. La disponibilidad de este clon junto al que se obtenga a partir del RNA2 permitirá llevar a cabo experimentos con el objetivo de aumentar nuestro conocimiento sobre la función de genes de este complejo grupo de virus.

P-135

**INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA EN EL SILENCIAMIENTO GÉNICO
POSTRANSCRIPCIONAL DEL VIRUS DE LA PSORIASIS DE LOS
CÍTRICOS**

Velázquez, K.², Renovell, A.¹, Comellas, M.¹, Garcia, M.L.², Navarro, L.¹, Pina, J.A.¹, Moreno, P.¹ y Guerri, J.¹

¹Centro de Protección Vegetal y Biotecnología Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias. Ctra Moncada-Náquera Km 4.5, 46113 Moncada, Valencia. ²IBBM Facultad de Ciencias Exactas 49 y 115 UNLP 1900 La Plata, Argentina

El virus de la psoriasis de los cítricos (*Citrus psorosis virus*, CPsV), miembro tipo del género *Ophiovirus*, familia *Ophiridae*, causa daños en plantaciones comerciales de cítricos de distintos países. Su genoma esta formado por tres moléculas de RNA de cadena sencilla y polaridad negativa, encapsidadas por una proteína de aproximadamente 48kDa. Las plantas de semilla de naranjo dulce inoculadas con CPsV e incubadas a 24°C muestran normalmente una reacción de shock con defoliación y necrosis de los nuevos brotes, así como manchas y flecos cloróticos en las hojas jóvenes. de las brotaciones sucesivas. En cambio, la incubación a 32 °C suele inhibir la reacción de shock y enmascarar los síntomas foliares. Los mecanismos moleculares subyacentes a este efecto de la temperatura sobre la manifestación de síntomas son desconocidos.

En este trabajo se inocularon por injerto grupos de 16 plantas de naranjo dulce Pineapple con los aislados de psoriasis P121, PSA-A2 y PSB-B1 y se mantuvieron a 24 °C durante 15 días para que prendiese bien el inoculo. A continuación, la mitad de las plantas (8) inoculadas con cada aislado se trasladaron a un invernadero a 32°C y la otra mitad se dejó a 24°C. Cuando las plantas mantenidas a 24°C comenzaban a mostrar el curvamiento de los brotes que precede a la reacción de shock, se recolectaron estos y brotes en estado de desarrollo vegetativo equivalentes de las plantas mantenidas a 32°C y se analizó en ellos i) la acumulación de viriones mediante ELISA semicuantitativo y ii) la acumulación de RNA genómico y de siRNAs virales mediante hibridación en formato Northem con ribosondas específicas para cada uno de los tres RNAs. La acumulación del virus fue significativamente mayor en la plantas mantenidas a 24°C que en las mantenidas a 32°C, mientras que la acumulación de los siRNAs fue ligeramente superior en las plantas mantenidas a 32°C. Estos resultados sugieren: i) que la infección con CPsV induce en la planta una reacción de silenciamiento, ii) que la intensidad de los síntomas va asociada con la acumulación del virus, y iii) que la temperatura más alta activa el silenciamiento génico postranscripcional y limita la acumulación del virus.

P-136**LA PROTEINA DE MOVIMIENTO DEL VIRUS DEL MANCHADO FOLIAR DE LOS CÍTRICOS ES UN SUPRESOR DEL SILENCIAMIENTO**

Renovell, A., Vives, M.C., Ruiz-Ruiz, S., Peña, L., Navarro, L., Moreno, P. y Guerri, J.

Centro de Protección Vegetal y Biotecnología. Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias. Ctra Moncada-Náquera Km 4.5, .46113 Moncada, Valencia

Las plantas han desarrollado un mecanismo de defensa frente a la infección por virus, basado en el silenciamiento génico postranscripcional, que degrada el RNA viral impidiendo o limitando su acumulación o invasión sistémica. Por su parte, como una estrategia de defensa, muchos virus de plantas, expresan proteínas que inhiben este silenciamiento a distintos niveles. El virus de manchado foliar de los cítricos (*Citrus leaf blotch virus*, CLB), familia *Flexiviridae*, posee un genoma de RNA monocatenario de polaridad positiva. El RNA genómico contiene 8.747 nt y está organizado en tres marcos de lectura abierta (ORFs). El ORF 1 codifica una poliproteína de 227 kD que contiene los dominios metil-transferasa, proteasa, helicasa y polimerasa; el ORF 2 codifica una proteína de 40 kD que presenta similitud con las proteínas de movimiento célula-célula de la familia 30 K y el ORF 3 codifica la proteína capsídica. En este trabajo se pretende identificar los supresores del silenciamiento del virus y comparar su eficiencia con la de otros supresores conocidos. Para ello, se clonaron en el vector binario pBIN 19 los distintos genes del virus bajo el control del promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor, seguido de la señal de terminación del gen de la nopalina sintasa. En cada ensayo plantas transgénicas de *Nicotiana benthamiana* portadoras del gen de la proteína GFP (Green fluorescent protein) se agroinocularon simultáneamente con dos construcciones: una que llevaba el gen candidato de la proteína viral supresora del silenciamiento y otra que contenía el gen que codifica la proteína GPP. En ausencia de supresor del silenciamiento, la sobre-expresión de GFP por agroinoculación del gen, desencadena en la planta el silenciamiento de GFP mediante degradación de su mRNA y por tanto no se observa fluorescencia. Sin embargo, la agroinoculación simultánea de la proteína de movimiento y no de las otras proteínas de CLB indujo una reactivación de la fluorescencia característica de GFP, una mayor expresión de mRNA de GFP y una disminución en la acumulación de siRNAs específicos de GFP, en comparación con las plantas agroinoculadas sólo con GFP.

P-137**RELACIONES ENTRE LA EXPRESION DE SINTOMAS Y EL
SILENCIAMIENTO DE RNA EN EL MODELO *Nicotiana benthamiana*-
VIROIDE.**

Martínez, G., Gómez, G. y Pallás, V.

Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas (CSIC - UPV). CPI Ed. 8E,
Av. de los Naranjos s/n, 46022 Valencia.

Los viroides son patógenos de plantas constituidos por un RNA circular de simple cadena con una alta estructura secundaria. Su genoma no posee capacidad codificante, por lo que dependen estrictamente de la maquinaria metabólica de su huésped para completar sus procesos biológicos. De qué manera estos patógenos interactúan con el huésped para inducir la producción de síntomas, es una cuestión que actualmente carece de respuesta. Para tratar de profundizar en el estudio de las bases moleculares de la patogénesis inducida por viroides, abordamos en primera instancia la caracterización de los síntomas producidos por el viroide del enanismo del lúpulo (*Hop stunt viroid*, HSVd) cuando se expresa como transgen en plantas de *Nicotiana benthamiana* (HSVd-Nb), un no huésped convencional que sin embargo es capaz de procesar y translocar el HSVd. Las plantas HSVd-Nb exhibieron un fenotipo sintomático caracterizado por un severo enanismo, disminución de la superficie foliar y una fuerte alteración en el desarrollo floral acompañada de reducida fertilidad. Estos síntomas fueron semejantes a los causados por HSVd en huéspedes naturales, indicando que en NB, la expresión de HSVd mimetiza los desórdenes metabólicos inducidos en un proceso infeccioso convencional. Estos resultados ponen de manifiesto que este sistema es una herramienta útil para caracterizar los mecanismos moleculares implicados en la patogénesis viroidal. Recientemente se ha propuesto un modelo que explicaría el proceso patogénico asociado a infecciones viroidales basado en la interferencia en el mecanismo silenciamiento de RNA de la planta. Sin embargo, no existen actualmente evidencias experimentales que validen esta idea. Con este propósito, se analizó la expresión de síntomas en plantas HSVd-Nb mantenidas a temperaturas óptimas (28°C), sub-óptimas (20°C) y desfavorables (14°C) para el silenciamiento en NB. Además, las plantas HSVd-Nb se utilizaron como patrón en injertos con plantas *rdr6i-Nb* (en las que la expresión del gen de la Nb-RDR6 está silenciada). Estos experimentos demostraron que la expresión de síntomas en NB es independiente de los niveles de acumulación de HSVd pero dependiente del silenciamiento de RNA específico de viroides. Tanto los injertos de la línea *rdr6i-Nb* como las plantas mantenidas a temperaturas desfavorables para el silenciamiento resultaron asintomáticas, a pesar de acumular altos niveles de formas maduras de HSVd. En síntesis estos resultados proveen una robusta evidencia biológica de la relación entre el proceso patogénico asociado a infecciones con HSVd y la ruta de silenciamiento de RNA específica de viroides.

P-138**DESARROLLO DE UN SISTEMA EXPERIMENTAL PARA ESTUDIAR CAMBIOS EN LA EXPRESIÓN GÉNICA DE *Nicotiana benthamiana* COMO RESPUESTA A LA INDUCCIÓN DE SILENCIAMIENTO GÉNICO**

Pacheco, R., Barajas, D., González-Jara, P., Díaz-Ruíz, J.R. y Tenllado, F.

Departamento de Biología de Plantas, Centro de Investigaciones Biológicas, CSIC. Ramiro de Maeztu, 9. 28040 Madrid

El silenciamiento génico post-transcripcional (PTGS) constituye un mecanismo de defensa antiviral en plantas del que se desconoce en gran medida su efecto sobre el transcriptoma del huésped. En este trabajo se ha establecido un sistema experimental dirigido a estudiar cambios en la expresión génica específicamente relacionados con el establecimiento de PTGS. Para ello, se han transformado plantas de *Nicotiana benthamiana* y de *Arabidopsis thaliana* que expresan la proteína de fluorescencia verde (GFP) con una construcción que codifica un RNA bicatenario (dsRNA) correspondiente a la GFP, bajo el control de un sistema de recombinación Cre/lox inducible por estrógeno. Fenotípicamente, en condiciones de crecimiento normales, estas plantas doblemente transgénicas presentan una tonalidad verde pálida a la luz ultravioleta debida a la expresión de la GFP. Sin embargo, cuando crecen en presencia del agente inductor (17 β -estradiol) las plantas muestran un tono rojo (fluorescencia clorofila). A través de análisis por PCR con cebadores específicos, se ha verificado la recombinación parcial del transgén en los pisos foliares inferiores en los que difundió el agente químico. Esto trae como consecuencia la inducción local de GFP dsRNA y la consiguiente degradación del GFP mRNA en todo el porte de la planta. La inoculación de estas plantas con un vector viral que porta secuencias GFP (PVX-GFP) sobre hojas superiores en donde no se ha producido recombinación del transgén resultó en una inmunidad basada en PTGS, ya que se detectaron siRNAs correspondientes a la GFP. Además, la inoculación de estas plantas con el virus de la sharka, portador de un supresor de silenciamiento génico, resultó en una reversión del estado silenciado. La resistencia a PVX-GFP es dependiente de la presencia en las plantas del transgén GFP sin estructura bicatenaria (GFP mRNA), ya que plantas transformadas tan sólo con la construcción GFP dsRNA resultaron susceptibles a la infección viral. Este resultado indica que se precisa de una molécula intermediaria que amplifique la señal de PTGS para que se produzca una resistencia antiviral efectiva. En una primera aproximación genómica, se ha utilizado un microchip de cDNA de *Solanum tuberosum* para determinar cambios en la expresión génica inducidos en *N. benthamiana* por el establecimiento del estado de silenciamiento génico frente a GFP. El objetivo es la identificación de genes del huésped inducidos o reprimidos por PTGS, y su análisis funcional a través de VIGS en un sistema transgénico con resistencia inducible a virus en presencia o ausencia de diversos supresores de silenciamiento génico. Se presentarán resultados preliminares en este sistema y su implicación en la señalización sistémica de PTGS y la respuesta antiviral.

P-139**EFFECTO DE LA INFECCIÓN CON VIROIDES EN HUÉSPEDES ATÍPICOS**

Bani Hashemian, S.M., Murcia, N. y Duran-Vila, N.

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

Dos especies de géneros afines a los cítricos, *Eremocitrus glauca* y *Microcitrus australis* se comportan de forma atípica frente a la infección con viroides. Se evaluó la respuesta de tanto de plantas sobre sus propias raíces como de plantas propagadas por injerto. El análisis de estas plantas mostró que los viroides inoculados eran capaces de moverse desde la copa de *E. glauca* y de *M. australis* donde se realizó la inoculación hasta el patrón en el que todos los viroides inoculados alcanzaron títulos detectables. Sin embargo los viroides no se detectaron en la copa, y solo de forma errática en la indicadora cidro Etrog, que se sobreinjertó en la copa. Los resultados disponibles sugieren que estas dos especies se comportan como genotipos resistentes pero permiten el movimiento a larga distancia de los viroides inoculados.

La especie *Citrus karna* había sido identificada como un huésped en el que los viroides alcanzaban títulos elevados y comparables a la indicadora cidro Etrog. Sin embargo los resultados de ensayos en curso indican que los viroides se presentan en títulos elevados en la corteza del tallo y en el nervio de la hoja pero en títulos comparativamente muy bajos en los tejidos de la lámina foliar. Estos resultados sugieren que en dicho huésped existen limitaciones para el movimiento desde el floema a las células del mesófilo o que en el propio movimiento célula a célula.

Estos estudios, aunque preliminares pueden darnos la clave acerca de la tolerancia y/o resistencia de determinados genotipos a la infección con viroides.

P-140**ACUMULACIÓN DIFERENCIAL DEL VIRUS DE LA TRISTEZA DE LOS CÍTRICOS EN DISTINTAS ESPECIES**

Comellas, M.¹, Ambrós, S.^{1,2}, Guerri, J.¹, Moreno, P.¹ y Albiach-Marti, M.R.^{1,2}

¹Centro de Protección Vegetal y Biotecnología. Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias, ²Fundación Agroalimed-IVIA. Cra. Moncada-Náquera Km. 4.5, 46113-Moncada, Valencia.

El virus de la tristeza de los cítricos (CTV) genera enormes pérdidas a nivel mundial. Las interacciones moleculares CTV-cítricos son esencialmente desconocidas y las diferencias de síntomas entre aislados en distintos huéspedes podrían ser debidas a distintos niveles de acumulación viral, de expresión de alguno de sus tres supresores del silenciamiento o a otros factores. Como primer paso para explorar esta interacción se inocularon los aislados T318A y T388 (agresivos), T36 (moderado) y T385 (asintomático) en plantas francas de *Citrus macrophylla* (CM) y lima Mexicana (LM) (sensibles), naranjo dulce (ND) (tolerante) y naranjo amargo (NA) (sensible a algunas cepas). En cada caso se analizó la acumulación en corteza de RNA genómico (gRNA) mediante RT-PCR cuantitativa en tiempo real y de pequeños RNAs (siRNAs) específicos de CTV mediante hibridación molecular en formato Northern blot. Todos los aislados mostraron alta acumulación viral en ND, intermedia en LM y CM, y muy reducida en NA. En ND, LM y CM, los aislados T388 y T318A mostraron una acumulación de gRNA similar a T385 y mayor que la de T36. En NA, la acumulación de T385 fue menor que la de T388 y T318A pero mayor que la de T36. Los resultados obtenidos indican algún tipo de resistencia del naranjo amargo a CTV. Para analizar la naturaleza de esta resistencia se evaluó la acumulación de gRNA y siRNAs de CTV en brote tierno y raíz de naranjo amargo, así como la distribución viral en planta mediante inmunoimpresión-ELISA de hojas, brotes y corteza. Para cada aislado, la acumulación en brote y corteza fue similar, y mayor que en raíz, a excepción de T385 que mostró la pauta contraria. Al igual que en los demás huéspedes, la mayor concentración de gRNA se correlacionó con una menor acumulación relativa de siRNAs. El análisis de improntas mostró una distribución generalizada de T388 y T318A en la planta, mientras que la de T385 y T36 era muy irregular, en concordancia con los datos de acumulación de gRNA obtenidos mediante RT-PCR cuantitativa. Estos resultados indican: (1) que la acumulación de CTV varía con la especie huésped, el aislado inoculado y el tejido infectado, (2) que la expresión de síntomas no va necesariamente asociada con la acumulación viral, y (3) que el NA limita la acumulación de CTV y la distribución sistémica de algunos aislados. El hecho de que el virus infecte los brotes nuevos indica que estas restricciones no afectan el movimiento viral a larga distancia.

P-141**POSIBLE IMPLICACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE SIDERÓFOROS EN LA PATOGENESIS DE *Erwinia persicina***

Martínez, S., Diáñez, F., Santos, M., Sáez, M., Marín, F., Carretero, F., de Cara M. y Tello, J.C.

Departamento de Producción Vegetal. Universidad de Almería. Carretera Sacramento s/n. La Cañada de San Urbano, Almería, 04120.

msantos@ual.es

Recientes estudios han puesto de manifiesto la posibilidad de que el agente causal de enfermedad en las principales zonas productoras de judía de enrame en España sea *Erwinia persicina*. Dado que los principales síntomas desarrollados son amarilleamientos así como necrosis en hojas, se consideró interesante estudiar la posible relación existente entre la deficiencia de hierro en las mismas con la captación de dicho elemento por parte de los sideróforos liberados al medio producidos por la propia bacteria.

Feistner y colaboradores (1996) confirmaron la producción de proferrosaminas (sustancia quelatante de hierro) por *Erwinia persicina*, pudiendo indicar que esta bacteria puede ser patógena de plantas, hipótesis que pareció confirmarse con las primeras pruebas de patogeneidad. Además, comprobaron como la menor presencia de hierro en el medio, inducía la formación de estos compuestos, provocando mayores daños en la plántula de trigo.

Para determinar quien era el agente causal de la enfermedad, si la propia bacteria o si por el contrario, el daño lo causaba únicamente sus metabolitos, se llevó a cabo la técnica de la hoja separada de Anderson o "Detached Leaf". Este método de inoculación consistía en el depósito de una gota tanto de suspensión bacteriana como de su extracto, obtenido tras la filtración de la bacteria crecida en medio king B líquido, sobre discos de hoja de judía así como de tabaco. Para comprobar que los mayores daños se producían en ausencia de hierro, el aislado se hizo crecer en medio desferrado con 8 – hidroxiquinolina y se realizaron las oportunas inoculaciones. Una vez transcurrido el tiempo, se observaron los síntomas.

Los resultados obtenidos fueron los siguientes: las inoculaciones realizadas con los aislados identificados como *Erwinia persicina* en las hojas de judía con el medio ausente de hierro, así como con su microfiltrado, dieron lugar a una mayor sintomatología, debido probablemente a la producción de sideróforos por parte de la bacteria.

P-142**GENERACIÓN DE MUTANTES SIMPLES Y MÚLTIPLES EN EL GÉNERO
*PSEUDOMONAS***

Zumaquero, A., Macho, A.P. y Beuzón, C.R.

Departamento de Genética, Facultad de ciencias, Universidad de Málaga

Las bacterias patógenas han desarrollado numerosas estrategias para colonizar y multiplicarse en sus hospedadores eucariotas. Una de las más importantes en la patogénesis tanto de plantas como de animales es la capacidad de secretar proteínas (efectores) en el citosol de la célula hospedadora mediante complejos sistemas de secreción conocidos como sistemas de secreción tipo III. Una vez en el interior de la célula hospedadora estos efectores son capaces de modificar procesos del hospedador de muy diversas maneras, con un fin común: permitir la supervivencia y multiplicación de la bacteria. La identificación y posterior caracterización funcional de dichos efectores es por tanto de gran interés en la caracterización de los procesos de infección, y la identificación de los procesos implicados en el hospedador. La reciente finalización de la secuenciación de los genomas de varias bacterias fitopatógenas ha supuesto un notable incremento en el número de efectores identificados, que en el caso de *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000 supera los 50 y para *Pseudomonas syringae* pv. phaseolicola 1448a son 27. Estos efectores han sido identificados mediante análisis masivo en base a que reúnan una serie de requisitos (análisis bioinformáticos, avirulencia, etc.), pero muy pocos de ellos han sido caracterizados funcionalmente. Para ello el análisis de mutantes en los distintos efectores es fundamental.

Con objeto de analizar el papel de los distintos efectores en la virulencia de *P. syringae* pv phaseolicola y *P. syringae* pv tomato, hemos diseñado una estrategia para la generación rápida de mutantes en estas bacterias. Esta estrategia nos ha permitido generar mutantes para una gran parte de los efectores que componen los secretomas de estos dos patógenos. El análisis del papel en virulencia de los mutantes generados ha sido llevado a cabo mediante índices de competitividad, permitiendo así la identificación de defectos en la virulencia en la mayoría de ellos..

P-143

ESTRUCTURA Y BIOSINTESIS DE UN POLISACÁRIDO SEMEJANTE A UN XANTANO, PRODUCIDO POR *Xanthomonas albilineans*

Vicente, C., Blanch, M. y Legaz, M.E.

Departamento de Biología Vegetal I (Fisiología Vegetal), Facultad de Biología, Universidad Complutense, 28040 Madrid, España. E-mail: cvicente@bio.ucm.es y mblanchr@bio.ucm.es

La escaldadura foliar es una enfermedad vascular de plantas de caña de azúcar, producida *Xanthomonas albilineans*. Las hojas enfermas muestran líneas blanco-amarillentas alternado con franjas verdes en paralelo a las venas principales. Las líneas decoloradas tienen el floema y xilema completamente ocluidos por una especie de goma y el mesófilo en general aparece lleno de esta secreción bacteriana, como ha sido observado por microscopía electrónica de barrido. La goma en los tejidos conductores ha sido purificada a partir de jugos obtenidos de cañas enfermas, precipitación con isopropil alcohol y cromatografía de exclusión molecular. Ha sido identificada como un polisacárido tipo xantano, compuesto por glucosa, manosa y ácido glucurónico, análisis llevado a cabo tras hidrólisis ácida y separación por electroforesis capilar. La razón de glucosa libre a manosa y ácido glucurónico ha sido calculada como 2.1 y 2.04, respectivamente. La goma de *X. albilineans* está entonces compuesta por unidades tetraméricas de dos restos glucosa, un resto manosa y un resto de ácido glucurónico. La hidrólisis selectiva del xantano con manosidasas and β -1,4-glucanasas revela que la macromolécula consiste de un esqueleto lineal principal β -1,4-glucopiranosido al cual se unen moléculas de manosa en uniones β -1,3.

Ya que los xantanos contienen ácido glucurónico, la capacidad de *Xanthomonas* para producir una UDP glucosa deshidrogenasa activa ha sido tomada a veces como actor de virulencia. *X. albilineans* produce una UDP-glucosa deshidrogenasa cuando crece sobre sacarosa. Su actividad requiere un cocktail de inhibidores de proteasas para poder ser medida. La enzima oxida UDP-glucosa a UDP-glucuronato usando oxígeno molecular y NADPH como coenzima. La cinética de oxidación del NADPH es linealmente dependiente de la cantidad de oxígeno suplementado. El valor del pI de la enzima purificada es 8.98 y su masa molecular de 14 kDa. La enzima muestra una conducta micaeliana para concentraciones variables de UDP-glucosa. El valor de la K_m para UDP-glucosa es 0.87mM y 0.26mM para NADPH. La secuencia N-terminal ha sido determinada IQPYNH.

X. albilineans axénicamente cultivada no segrega xantanos al medio líquido. Por ello, la producción y caracterización de la goma ha requerido el uso de cañas experimentalmente infectadas. Esta dependencia del huésped ha sido explicada sobre la base de la acción de proteasas bacterianas que hidrolizan la UDPG deshidrogenasa. La adición de bajas concentraciones de 8-azaguanina y cloranfenicol al medio de cultivo no impide la producción de la deshidrogenasa, lo que requiere concentraciones de antimetabolitos superiores a 0.3 mM para inhibir su síntesis. Las glicoproteínas producidas por la caña tras la infección también aseguran la producción de la enzima activa al inhibir a las proteasas bacterianas.

P-144 **AISLAMIENTO DE RECEPTORES ESPECÍFICOS DE PARED CELULAR DEL PATÓGENO *Herbaspirillum rubrisubalbicans* EN PLANTAS DE *Saccharum officinarum*.**

Sacristán, M., Blanco, Y., Legaz M.E. y Vicente, C.

Departamento de Biología Vegetal I (Fisiología Vegetal), Facultad de Biología, Universidad Complutense, 28040 Madrid, España.

E-mail: marasacristan@bio.ucm.es

Herbaspirillum rubrisubalbicans es una bacteria fijadora de nitrógeno atmosférico, en caña de azúcar sobre la que actúa como patógeno. Las infecciones experimentales de plantas jóvenes inducen la producción por parte del huésped de dos fracciones de glicoproteínas, de diferente masa molecular, cuya fracción glicídica está compuesta por fructosa en uniones β -1,2 y galactitol enlazado mediante uniones éter. Ambas clases de glicoproteínas pueden ser aisladas y purificadas de jugos extraídos de tallos de cañas enfermas por cromatografía de penetrabilidad.

Ambas clases de glicoproteínas son capaces de unirse a receptores de pared celular de la bacteria mediante una reacción de afinidad en la que dominios específicos β -1,2-fructofuranósido de la glicoproteína vegetal forman puentes de hidrógeno con dominios aminoacídicos específicos del receptor bacteriano. Por ello, las glicoproteínas de mediano peso molecular (7kDa – 50 kDa) de caña de azúcar pueden ser separadas de su receptor glicoproteico bacteriano mediante desorción con sacarosa. Sin embargo, el grupo de glicoproteínas de caña, de alto peso molecular (~ 800 kDa) son desorbidas con manosa o glucosa, lo que indica que utilizan su fracción peptídica para unirse a un dominio glicídico de la glicoproteína receptora bacteriana.

Los receptores de pared celular de *H. rubrisubalbicans* para ambas clases de glicoproteínas de caña de azúcar han sido aislados por cromatografía de afinidad y analizados por electroforesis capilar para obtener un mejor conocimiento de la naturaleza y papel de los receptores para glicoproteínas de caña de azúcar como determinantes de los procesos de reconocimiento celular de patógenos y endófitos diazotróficos.

P-145

MatE, UN TRANSPORTADOR MDR PUTATIVO ASOCIADO AL GEN *IAAL* EN *Pseudomonas syringae* Y *Pseudomonas savastanoi*

Aragón, I.M., Matas, I.M. y Ramos, C.

Área de Genética, Universidad de Málaga, 29071-Málaga, E-mail: crr@uma.es

Las bacterias fitopatógenas se encuentran expuestas a metabolitos secundarios implicados en la respuesta de defensa de las plantas frente a patógenos. El mecanismo más efectivo y extendido de resistencia microbiana a la acción de estos compuestos es la extrusión de los mismos mediante transportadores de amplio espectro, conocidos como transportadores MDR (*multidrug resistance*). En bacterias fitopatógenas, se ha descrito que algunos transportadores MDR tienen un papel importante en virulencia, colonización de tejidos vegetales y supervivencia in planta. Dentro de este grupo de transportadores, la familia MATE (*multi antimicrobial extrusion protein*) incluye proteínas implicadas en multirresistencia que funcionan mediante un mecanismo de antiporte droga/Na⁺. Este tipo de transportadores, de aproximadamente 450 aminoácidos, contiene 12 segmentos transmembrana. Recientemente, se ha identificado en el genoma de *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (Pto) DC3000, un marco abierto de lectura que codifica una proteína MatE de 458 aminoácidos, precedido por una secuencia reguladora *hrp-box*. El gen codificador de este transportador MDR putativo (*matE*), precede al gen *iaaL* (indolacético lisina sintetasa), cuya actividad es necesaria para la formación del conjugado del ácido indol-3-acético IAA-Lys. En este trabajo, hemos comprobado que *matE* también se localiza corriente arriba de *iaaL* en *P. savastanoi* pvs. *savastanoi* (Psv) y *nerii*. Pto DC3000 presenta una copia única de ambos genes de localización cromosómica, sin embargo, Psv contiene dos copias de ambos genes, siendo la localización de una de ellas plasmídica en algunos aislados. La secuencia de aminoácidos deducida de las proteínas MatE de Pto y Psv son 87,1% idénticas, y muy similares a las de otros transportadores de la familia MATE presentes en diferentes especies de los géneros *Pseudomonas* y *Vibrio*. Utilizando RT-PCR, hemos comprobado que tanto en Psv como en Pto, *matE* se transcribe conjuntamente con *iaaL*. Para analizar el papel de este operón en la patogenicidad y virulencia de Psv y Pto, estamos procediendo a la construcción de mutantes de pérdida función tanto en *matE* como en *iaaL*. Posteriormente, se estudiará el fenotipo derivado de las respectivas mutaciones en relación con diferentes aspectos de la interacción planta-patógeno, tanto en el hospedador natural como en plantas no hospedadoras.

P-146

ESTRUCTURA TUMORAL Y LOCALIZACIÓN BACTERIANA EN TUMORES DE OLIVO INDUCIDOS POR CEPAS DE *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* CURADAS DE PLÁSMIDOS

Rodríguez-Moreno, L.¹, Jiménez, A.J.¹, Pérez-Martínez, I.¹, Murillo, J.², Ramos, C.¹

¹Departamento de Biología Celular, Genética y Fisiología, Facultad de Ciencias, Universidad de Málaga. Campus de Teatinos s/n, 29071-Málaga. e-mail: crr@uma.es

²Departamento de Producción Agraria, Universidad Pública de Navarra, 31006 Pamplona, España.

Pseudomonas savastanoi pv. *savastanoi* (Psv) es el agente causal de la tuberculosis del olivo, enfermedad caracterizada por la aparición de tumores en los troncos y ramas de las plantas infectadas. Tanto la biosíntesis bacteriana de fitohormonas, ácido indolacético (AIA) y citoquininas (Ck), como la funcionalidad del sistema de secreción tipo III (TTSS), son necesarias para la formación de tumores en olivo por Psv. Dado que en los plásmidos de algunas cepas de Psv se localizan tanto genes codificadores de efectores putativos del TTSS, como genes que codifican enzimas implicadas en la biosíntesis de Cks, se procedió a la construcción de derivados curados de plásmidos de la cepa NCPPB 3335, que contiene 3 plásmidos nativos de aproximadamente 73 Kb (pPsv48A), 45 Kb (pPsv48B), y 44 Kb (pPsv48C). Se construyeron dos cepas mutantes: una curada de pPsv48A, y otra curada de pPsv48A y pPsv48B. Tanto la cepa silvestre, como los derivados curados de plásmidos, se marcaron con la GFP utilizando un derivado del plásmido pBBR1-MCS5-Gm (pBBR1-MCS5-*gfp*-Gm). Aunque ninguna de las cepas curadas vio reducida su capacidad de crecimiento en los tejidos vegetales, los tumores inducidos por las mismas fueron en apariencia de menor tamaño y presentaron zonas necróticas superficiales. Al igual que en los tumores inducidos por la cepa parental, la emisión de fluorescencia verde detectada en tumores inducidos por las cepas curadas se extendió a lo largo de todo el tejido hipertrófico. Adicionalmente, se analizaron mediante microscopia de epifluorescencia y láser confocal secciones transversales de los tumores producidos por cada una de las cepas. Ambas técnicas mostraron que la invasión del tejido vegetal por las células de las cepas curadas fue similar a la realizada por la cepa parental, si bien, los tumores inducidos por las cepas curadas mostraron menos haces vasculares de nueva formación. Finalmente, secciones transversales de tumores desarrollados en plantas de olivo *in vitro*, se analizaron mediante microscopia electrónica de barrido, sin observarse diferencias morfológicas o estructurales significativas entre los tumores inducidos por cada una de las tres cepas analizadas.

P-147

CARACTERIZACIÓN DE LA FUNCIÓN EN VIRULENCIA DE LOS SISTEMAS MDR DE *Dickeya dadantii*

Larenas Keymer, J., Del Rio Alvarez, I., Abascal, F., Rodríguez-Palenzuela, P. y López-Solanilla, E.

Centro de Biotecnología y Genómica de Plantas. E.T.S.Ingenieros Agrónomos. Universidad Politécnica de Madrid. Av. Complutense s/n 28040 Madrid. E-mail: emilia.lopez@upm.es

La podredumbre blanda bacteriana se produce en todo el mundo y causa más pérdida total de producción vegetal que cualquier otra enfermedad bacteriana. Esta enfermedad es causada, entre otras, por la bacteria *Dickeya dadantii* presentándose comúnmente en postcosecha. Los principales factores de virulencia descritos en esta bacteria son las enzimas hidrolíticas que degradan la pared celular. Además se conocen otros factores de virulencia como los sideróforos, el sistema de secreción de tipo III y distintos factores relacionados con la resistencia a sustancias tóxicas provenientes del huésped, como péptidos antimicrobianos.

Los patógenos bacterianos han desarrollado distintos mecanismos para contrarrestar la presencia de sustancias tóxicas, como los sistemas de resistencia a múltiples drogas ("Multidrug Resistance Systems" MDR). Los genes que codifican los sistemas MDR son abundantes y ubicuos en bacterias Gram negativas, constituyendo en promedio, más del 10% de los transportadores de estas bacterias. Los sistemas MDR están bien conservados evolutivamente y tienen una considerable importancia en diferentes contextos microbiológicos (ambiental, agronómico, clínico).

En nuestro grupo hemos llevado a cabo el análisis de la relación entre los sistemas MDR y la virulencia de *D. dadantii* mediante la identificación y mutación de algunos sistemas MDR (Maggiorani Valecillos y col., 2006). La conclusión más notable de este trabajo es que a pesar de haber un gran número de sistemas MDR en *D. dadantii*, la mutación en un sistema dado, tiene un drástico efecto en la virulencia. Actualmente estamos interesados en el estudio sistemático de los sistemas MDR de *D. dadantii* con el fin de determinar su papel en virulencia, así como su regulación durante el proceso de patogénesis. Hemos abordado la búsqueda de todos los sistemas MDR en el genoma de *D. dadantii* basándonos en los datos existentes sobre éstos en otras bacterias y diseñando los algoritmos necesarios para sistematizar su identificación. De esta forma se han predicho nueve genes para la familia RND, sesenta y tres genes para la familia MFS, un gen para la familia SMR, cinco genes para la familia MatE, dieciséis genes para la familia HlyD y ocho genes para la familia OEP.

Para abordar el estudio de la función de estos sistemas en el contexto de la virulencia de *D. dadantii* hemos construido una mutateca de aproximadamente seis mil mutantes, mediante la conjugación de *D. dadantii* 3937 y S17 λ pir-PCAM 140. El plásmido PCAM 140 contiene el gen de resistencia a espectinomicina y el gen beta-D-glucuronidasa (GUS) sin promotor flanqueados por secuencias Tn, que permiten la transposición al genoma de *D. dadantii*. A partir de esta mutateca estamos identificando los mutantes en cada uno de los genes seleccionados, así como en posibles reguladores de los mismos. El fenotipo de estos mutantes está siendo caracterizado en la actualidad.

P-148

ANÁLISIS CUANTITATIVO DE LA EXPRESIÓN DEL SISTEMA DE SECRECIÓN TIPO III HRP EN *Pseudomonas syringae* pv *phaseolicola*

Ortiz-Martín, I.¹, Thwaites, R.², Mansfield, J.W.² y Beuzón, C.R.¹

¹Departamento de Biología Celular, Genética y Fisiología, Facultad de Ciencias, Universidad de Málaga, Málaga 29071, España. ²Department of Agricultural Sciences, Imperial College London, Wye, Kent TN25 5AH, UK.

Pseudomonas syringae es una bacteria fitopatógena gram-negativa que posee el sistema de secreción tipo III (TTSS) Hrp, capaz de secretar y translocar proteínas al citoplasma de la célula vegetal y de este modo colonizar un amplio rango de hospedadores. Los genes que codifican el TTSS Hrp están agrupados en el locus *hrp/hrc*. La expresión de estos genes se induce en la planta y puede ser reproducida *in vitro* usando medio mínimo que refleja las condiciones que se dan durante la infección. En este proceso participan cuatro activadores transcripcionales: HrpR y HrpS, que activan la expresión de HrpL, un factor σ alternativo que, junto con el factor σ^{54} , activa la expresión de los genes *hrp*. Adicionalmente, a HrpA, la unidad estructural del pilus Hrp, se le ha atribuido un papel regulador de la expresión de estos genes, aunque aún se desconoce su mecanismo de acción. Se han identificado, además, dos reguladores negativos de este sistema: la proteasa Lon, que degrada HrpR en condiciones de no inducción, y HrpV que regula negativamente la expresión de los genes *hrp* en condiciones de inducción; sin embargo, el mecanismo por el cual este efecto tiene lugar se desconoce. No obstante, se ha demostrado que HrpG, controla la acción de HrpV mediante interacción directa de ambas proteínas.

La gran complejidad de los mecanismos de regulación de la expresión de los genes *hrp* pone de manifiesto la necesidad de analizar de una forma cuantitativa los niveles de expresión de dichos genes en distintas estirpes mutantes. Por ello, hemos obtenido mutantes por delección de los componentes reguladores del sistema: HrpL, HrpA, HrpV, HrpG y Lon en *Pseudomonas syringae* pv *phaseolicola*. Así como de HrcC, un componente estructural esencial para la secreción, con el fin de conocer si este proceso juega un papel importante en la regulación de la expresión de los genes *hrp*. Por último, hemos construido plásmidos de expresión intermedia y alta en *Pseudomonas* con los genes *hrpL*, *hrpA*, *hrpV* y *lon*. En las estirpes generadas hemos cuantificado la expresión de los genes *hrp* mediante PCR a tiempo real Taqman, *in vitro* e *in planta*, a distintos tiempos tras la inducción de la expresión. Adicionalmente, hemos analizado el efecto que estas mutaciones causan en el crecimiento y establecimiento de la infección en judía.

P-149

CARACTERIZACIÓN DEL CLUSTER DE PRODUCCIÓN DE FASEOLOTOXINA EN LA CEPA CFBP3388 DE *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*

Navarro de la Fuente, L., Führer, M.E. y Murillo, J.

Laboratorio de Patología Vegetal, Departamento de Producción Agraria, ETS Ingenieros Agrónomos, Universidad Pública de Navarra, 31006 Pamplona, Navarra. Email: jesus.murillo@unavarra.es

Diversos patovares de *Pseudomonas syringae* producen toxinas extracelulares que incrementan la virulencia del patógeno o aumentan su capacidad de competir frente a otros microorganismos. La producción de faseolotoxina se ha descrito en los patovares phaseolicola (Pph), actinidiae (Pac) y en la cepa CFBP3388 del pv. *syringae*. La faseolotoxina es un tripéptido de ornitina, alanina y homoarginina unido a un grupo inorgánico que inhibe de forma irreversible a la ornitina transcarbamilasa, enzima que cataliza la conversión de ornitina a citrulina en la ruta de biosíntesis de arginina. Los genes involucrados en la síntesis de faseolotoxina se encuentran en una putativa isla de patogenicidad de aproximadamente 38 kb denominada Pht-PAI, que esta altamente conservada en las cepas de Pph y Pac. Sin embargo, la cepa CFBP3388 del pv. *syringae* no ha sido estudiada hasta el momento. En experimentos de PCR utilizando parejas de cebadores que, en conjunto, abarcan la totalidad del cluster de faseolotoxina, sólo se logró amplificar una zona de aproximadamente 6,5 kb, correspondiente a los genes *phtL*, *phtM*, *phtN*, *phtO*, *phtP* y *amtA*, que muestran la misma organización que en la cepa NPS3121 de Pph. Del mismo modo, se logró amplificar y secuenciar regiones parciales de los genes *phtC*, *phtD-E-F*, *phtF-G-H*, *desI* y *phtJ-K*, cuyos porcentajes de identidad con Pph oscilan entre un 80 y 90%. Mediante hibridación por Southern blot hemos determinado que el cluster se localiza en el cromosoma de CFBP3388 y que no incluye ninguna de las cuatro integrasas que bordean la Pht-PAI en Pph y Pac. Además, el cluster está integrado en una región genómica distinta en comparación con los pvs. phaseolicola y actinidiae. La conservación parcial del cluster de producción de faseolotoxina en CFBP3388 contrasta con la conservación de la isla Pht-PAI en Pph y Pac, y demuestra que estos genes se han movilizad repetidamente entre patovares de *P. syringae*. Los bioensayos de inhibición de crecimiento de *E. coli* indican que la cepa CFBP3388 produce faseolotoxina a 18 °C y 28 °C, lo cual sugiere que su producción no esta regulada por temperatura, como ocurre en los pvs. phaseolicola y actinidiae.

P-150

IMPLICACIÓN DE ISOENZIMAS EN LA RESISTENCIA DE PLANTAS DE PIMIENTO (*Capsicum annuum* L.), TRATADAS CON ANTAGONISTAS DE *Phytophthora capsici*.

Ezziyyani, M.¹, Requena, M.E.¹, Egea-Gilabert, C.² Requena, A.² y Candela, M.E.¹

¹Departamento de Biología Vegetal (Fisiología Vegetal), Facultad de Biología, Universidad de Murcia. Campus de Espinardo. 30100 Espinardo (Murcia). e-mail: mcandela@um.es

²Departamento de Ciencia y Tecnología Agraria, ETSIA, Universidad Politécnica de Cartagena, Paseo Alfonso XIII, 48; 30203. Cartagena (Murcia).

En este trabajo se evalúa la reacción defensiva inducida *in situ* y la sistémica, que desarrollan las plántulas de pimiento, cuando se inoculan los tallos con el patógeno *Phytophthora capsici* y se adiciona a las raíces el combinado de tres antagonistas, el hongo *Trichoderma harzianum* y las bacterias *Burkholderia cepacia* y *Streptomyces rochei* Ziyani.

En los tallos la infección con el patógeno produce una reacción de hipersensibilidad con una necrosis progresiva, pero la adición de los tres antagonistas a las raíces ralentiza la necrosis. La reacción defensiva se analizó en raíces y tallos midiendo la producción de proteínas-PR con actividad peroxidasa y β -1,3-glucanasa a los 3 y 9 días de la inoculación. La separación mediante Isoelectroenfoque y posterior Native-PAGE para proteínas ácidas y básicas reveló un incremento de producción de las enzimas constitutivas y de las que se sintetizan “de novo” con los tratamientos, e inicialmente también en las plantas control; pero aquí, el incremento de actividad detectado es debido al efecto de la herida y no al tratamiento, pues no progresa a lo largo del tiempo. El dato mas significativo es la producción de una peroxidasa ácida de Rf 0.96 en las raíces, a los 9 días del tratamiento con los antagonistas y el incremento significativo de la actividad glucanasa tanto en tallos como en raíces.

La producción de proteínas-PR con actividad peroxidasa y glucanasa forma parte del mecanismo de defensa adicional a la hipersensibilidad. Se puede relacionar con la resistencia al patógeno *Phytophthora capsici* pues este oomiceto tiene glucano en sus paredes y los enzimas con actividad glucanasa desarman las cadenas del glucano e inhiben el crecimiento de la hifa. Las enzimas peroxidasas intervienen en la lignificación de las paredes de las células vegetales lo que las hace más resistentes a la penetración del patógeno. Ambas enzimas se producen después de los tratamientos de las plantas con la combinación de los antagonistas y se detectan *in situ* en el sitio de inoculación del patógeno en los tallos, y de manera sistémica en las raíces, alejadas del sitio de infección.

Agradecimientos: Proyecto BFU2004-4707-CO2-01, CICYT, MEC, España.

P-151**PATOGENICIDAD DE LAS ESPECIES DE *PHAEOACREMONIUM* EN VID.**

Aroca, A. y Raposo, R.

Instituto de Investigaciones Agrarias (INIA). CIFOR. Ctra. Coruña Km 7.5, 28040 Madrid.

En los últimos años se han descrito nuevas especies de *Phaeoacremonium* asociadas a las enfermedades de madera en vid. Existen actualmente 13 especies descritas en este huésped, pero se desconoce el carácter patogénico de algunas de ellas. En este trabajo se han incluido las especies: *Phaeoacremonium aleophilum*, *P. angustius*, *P. inflatipes*, *P. krajdennii*, *P. mortoniae*, *P. parasiticum*, *P. scolyti*, *P. venezuelense* y *P. viticola*. *Phaeomoniella chlamydospora* se ha incluido como control positivo. Se inocularon plántulas de 2 meses de edad de *Vitis vinifera* cv. Malvar y cv. Airen, así como estacas de *Vitis vinifera* cv. Monastrell. Las plántulas crecieron en macetas individuales y se inocularon mediante el riego con una suspensión de esporas de concentración 10^7 esporas/ml. Dos meses después de la inoculación se evaluaron los síntomas que incluían defoliación, epinastia, necrosis internervial en las hojas, necrosis en tallo y muerte. Todas las especies de *Phaeoacremonium* testadas causaron síntomas de enfermedad en las plántulas inoculadas, mientras que las plantas inoculadas con agua estéril no desarrollaron síntomas de enfermedad. Las estacas de vid se inocularon con una suspensión de esporas de 10^8 esporas/ml mediante la aplicación de vacío y se plantaron individualmente en macetas mantenidas en el invernadero. Se midió el retraso de la brotación ocho semanas después de la inoculación y al finalizar el ensayo, después de cinco meses desde la inoculación, se midieron el peso fresco de las raíces, el peso fresco de los brotes, la longitud del brote más largo de cada planta y se estimaron visualmente el oscurecimiento vascular y el porcentaje de la sección afectada por el oscurecimiento vascular. Todas las especies de *Phaeoacremonium* y *Phaeomoniella chlamydospora* causaron un oscurecimiento vascular significativamente distinto del testigo, mientras que sólo *P. chlamydospora*, *Phaeoacremonium mortoniae* y *P. aleophilum* causaron una reducción significativa del peso de las raíces en comparación con las estacas control inoculadas con agua estéril. Además, *P. parasiticum*, *P. angustius*, *P. inflatipes* y *P. venezuelense* causaron síntomas foliares significativos incluyendo defoliación, epinastia, necrosis en los tallos o muerte.

P-152

CARACTERIZACIÓN PATOGENICA DE AISLADOS DE *Phytophthora parasitica* DE PIMIENTO PARA PIMENTÓN

Morales Rodríguez, M.C.¹, Rodríguez-Molina, M.C.¹, Palo Osorio, C.¹, Palo Núñez, E.J.¹, García Barrado, J.A.² y Verdejo Alonso, M.E.³

¹Centro de Investigación de la Finca La Orden-Valdesequera. Consejería de Economía, Comercio e Innovación. 06187 Guadajira (Badajoz). E-mail: carmen.mrodriguez@juntaextremadura.net

²Centro Tecnológico Agroalimentario de Extremadura (CTAEX). 06195 Villafranco del Gadiana (Badajoz).

³Servicio de Sanidad Vegetal. Consejería de Agricultura y Desarrollo Rural. Avda. de Portugal s/n. 06800 Mérida (Badajoz).

El pimiento para pimentón es uno de los cultivos más característicos de Extremadura, localizándose su producción en los valles de los ríos Tiétar y Alagón, con una superficie acogida a la Denominación de Origen Pimentón de la Vera en torno a las 1000 ha. Prospecciones realizadas en la zona en 2006 y 2007 permitieron evaluar la gravedad de la *Tristeza* del pimiento e identificar a *Phytophthora parasitica* como el agente causal de la enfermedad. Se han caracterizado patogénicamente 15 aislados de *P. parasitica* procedentes de plantas de pimiento enfermas mediante inoculaciones en pimiento (variedades Jaranda y Jariza), tomate (variedad Marmande) y tabaco tipo burley (variedad Baldío Vera) y virginia (variedad K-326). Se realizaron dos tipos de inoculación: 1) por riego al sustrato con una suspensión de propágulos del hongo en plantas con 3-4 hojas verdaderas y 2) por decapitación en plantas de pimiento y tomate con 10-12 hojas verdaderas.

En las inoculaciones por riego todos los aislados fueron patógenos en las dos variedades de pimiento, con índices de enfermedad entre 42 y 100% en Jaranda y entre 20 y 100% en Jariza. También todos los aislados fueron patógenos en tomate, con índices de enfermedad entre 10 y 100%. Sin embargo, ninguno de los aislados resultó patógeno en tabaco, ni en el tipo burley ni en virginia. Además, no en todos los aislados hubo correspondencia entre la patogenicidad en pimiento y en tomate, lo que puede sugerir cierto grado de especialización parasitaria.

En las inoculaciones por decapitación todos los aislados produjeron necrosis en los tallos de pimiento, tanto en Jaranda como en Jariza. El frente de avance de la necrosis era a menudo irregular y fue frecuente la formación de estrías laterales y en ocasiones discontinuas a lo largo del tallo. También en tomate todos los aislados produjeron necrosis en los tallos. A diferencia de los síntomas observados en pimiento, fue rara la formación de estrías, de manera que el frente de avance de la necrosis era relativamente regular.

P-153

DIFERENCIAS MOLECULARES DE GENES IMPLICADOS EN LA RESISTENCIA A FUNGICIDAS EN AISLADOS DE *Penicillium digitatum*Sánchez-Torres, P., y Tuset, J.J.

Centro de Protección Vegetal y Biotecnología. Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias. Ctra. Moncada-Náquera km 4,5. 46113 Moncada-Valencia. E-mail: sanchez_paltor@ivia.gva.es

Uno de los mecanismos más habituales de adquisición de resistencia radica en la mutación de ciertos genes implicados en eliminar de la célula los compuestos tóxicos o relacionados con la adquisición de la resistencia. Se ha llevado a cabo la caracterización molecular de diferentes aislados de *P. digitatum* con fenotipos diversos atendiendo a su sensibilidad o resistencia a distintos fungicidas. Los resultados obtenidos a partir del análisis de 6 diferentes genes implicados en la adquisición de resistencias a tóxicos en dichos aislados de *Penicillium digitatum* han confirmado distintos mecanismos de adquisición de resistencias. Los genes seleccionados fueron el gen del la β -tubulina, el gen CYP51 implicado en la ruta de síntesis del ergosterol y cuatro genes pertenecientes a la familia de los transportadores ABC (ATP Binding Cassette) cuyo espectro de actuación puede ser muy amplio a la hora de eliminar de la célula los compuestos tóxicos.

Las resistencias a fungicidas de tipo tiabendazol presentaron una única mutación en el codón 200 del gen de la β -tubulina que supone el cambio de una Phe por una Tyr independientemente del modo en que se haya adquirido dicha resistencia pues aparece tanto en aislados de campo como en aquellos expuestos a tratamientos fungicidas. El gen CYP51 ha revelado la presencia de una repetición en tándem de 127 pb cuya aparición en más de una copia confirma en carácter de resistencia a fungicidas de tipo DMI, pero su ausencia no garantiza la sensibilidad a los mismos. Por otro lado, se han detectado diferencias en genes pertenecientes a la familia de transportadores de tipo ABC, de entre los 4 genes analizados, dos de ellos, PMR1 y PMR5 han presentado mutaciones que se corresponden claramente con uno de los fenotipos implicados en resistencias al imazalil lo que abre la posibilidad de una la detección rápida y eficaz de aislados resistentes a dichos fungicidas de uso habitual en post-cosecha.

P-154**IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE GENES IMPLICADOS EN LA INTERACCIÓN *Verticillium dahliae*-OLIVO**

Navarro-Raya, M.C.¹, Moyano-Cañete, E.², Benítez-Alfonso, J.², Dobinson, K.F.³, Schilirò, E.¹, Muñoz-Blanco, J.² y Mercado-Blanco, J.¹

¹Departamento Protección de Cultivos, Instituto de Agricultura Sostenible, CSIC, Apdo. 4084, 14080 Córdoba; ²Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Universidad de Córdoba, Campus Universitario de Rabanales, 14071 Córdoba; y ³Southern Crop Protection and Food Research Centre, AAFC, London, ON, N5V 4T3 Canadá. E-mail: jesus.mercado@ias.csic.es

Las Verticilosis, causadas por *Verticillium dahliae* Kleb., constituyen uno de los problemas fitopatológicos más importante en cultivos de indudable interés económico y social como es el caso del olivar, tanto en el ámbito agrícola español como en aquellos lugares del mundo donde su cultivo es relevante. La estrategia de control más efectiva en el caso de la Verticilosis del olivo (VO) reside en la aplicación de medidas preventivas (detección del patógeno en suelos y/o material de propagación, correctas medidas culturales, búsqueda de resistencia, etc.), careciéndose por el momento de medidas de lucha química eficaces. Es necesario, por tanto, profundizar en el conocimiento de las características patogénicas y/o virulentas del patógeno y en la elucidación de los eventos que a nivel genético y molecular tienen lugar en la interacción con la planta huésped. Ello ofrecerá una valiosa información para el desarrollo e implementación de medidas de control más efectivas.

El presente trabajo persigue como objetivo fundamental determinar las bases moleculares de la interacción *V. dahliae*-olivo (*Olea europea* L.) mediante la identificación de ESTs ("expression sequence tags") y posterior análisis de los perfiles de expresión de genes del patógeno y/o planta identificados. Para ello se han construido dos genotecas substractivas de expresión que potencialmente están enriquecidas en genes de la planta y del patógeno, y cuya expresión se induce (genoteca 'up') o se reprime (genoteca 'down') en dicha interacción.

Hasta el momento se han conseguido aislar y secuenciar 1.000 ESTs de los posibles clones positivos de ambas genotecas, lo que nos ha permitido seleccionar cuatro ESTs cuyas secuencias muestran una elevada similitud con secuencias de genes de otras especies de hongos depositadas en las bases de datos del GenBank del NCBI. En este trabajo se presenta la identificación y caracterización de dos de estas ESTs correspondientes a posibles genes de *V. dahliae* involucrados en su interacción con olivo. Asimismo, se está realizando la inactivación de los genes en estudio mediante mutagénesis por inserción de un transposón (Tn-mutagénesis "in vitro"), utilizando el sistema EZ::TN (Epicentre Biotechnology, Madison, WI), lo que permitirá estudiar el efecto de la mutación en el proceso infectivo y/o patogénico del hongo en la planta del olivo.

P-155

TRANSFORMACIÓN DE *Verticillium dahliae* CON EL GEN DE LA PROTEÍNA FLUORESCENTE YFP Y SEGUIMIENTO DEL PROCESO DE INFECCIÓN DEL PATOTIPO DEFOLIANTE EN OLIVO

Navarro-Raya, M.C.¹, Prieto, P.², Dobinson, K.F.³ y Mercado-Blanco, J.¹

¹Departamentos de Protección de Cultivos y ²Mejora Genética Vegetal, Instituto de Agricultura Sostenible, CSIC, Apdo. 4084, 14080 Córdoba, y

³Southern Crop Protection and Food Research Centre, AAFC, London, ON N5V 4T3 Canada. E-mail: jesus.mercado@ias.csic.es

Las Verticilosis, causadas por el hongo fitopatógeno del suelo *Verticillium dahliae* Kleb., constituyen una de las amenazas bióticas más importante para numerosas especies vegetales de importancia agrícola. La Verticilosis del olivo es una enfermedad vascular de difícil manejo, debido a factores tales como la prolongada supervivencia de sus propágulos infectivos (microsclerocios) en el suelo y/o residuos vegetales, la amplia gama de plantas huéspedes susceptibles a resultar infectadas, la diversidad genética y patogénica en las poblaciones de *V. dahliae*, o la ineficacia de sustancias fungicidas dada la ubicación xilemática del patógeno durante su fase parasítica.

El objetivo de este trabajo es generar un aislado representativo del patotipo mas virulento y letal de *V. dahliae* en olivo (patotipo defoliante [D]), transformado mediante la introducción del gen que codifica para la proteína fluorescente YFP ("yellow fluorescent protein"). Disponer de dicho transformante permitiría efectuar un seguimiento del proceso de colonización e infección de la planta mediante microscopía confocal aplicada a secciones tridimensionales de tejidos vivos de olivo.

Para la introducción de ADN en un aislado D de *V. dahliae* se ha empleado la transformación mediada por *Agrobacterium tumefaciens* ("ATMT") y el uso del vector binario pSK1055 portador de resistencia a geneticina y del gen *yfp*. Se procedió a la selección de colonias transformantes mediante cultivo sobre membrana de nitrocelulosa en presencia de acetosiringona. Tras 48 h de co-cultivo las membranas se transfirieron a un medio selectivo apropiado para su selección. Se obtuvieron cultivos monoconídicos de los transformantes, seleccionando finalmente uno al que se comprobó la emisión de autofluorescencia amarilla, caracterizándolo también a nivel molecular (una única inserción del gen *yfp*), morfológico (tipología de colonias en diferentes medios), fisiológico (crecimiento a diferentes temperaturas) y patogénico (inoculación de plántones de olivo). En todos los parámetros evaluados no se observaron diferencias significativas entre el transformante y su parental. Asimismo, se ha efectuado un seguimiento de la colonización en plántones 'Arbequina' durante un intervalo de 80 días, pudiéndose determinar la secuencia de eventos en el proceso de infección de una planta de olivo.

P-156

**EFFECTOS DEL ESTRÉS HÍDRICO Y LA INOCULACIÓN CON
Neofusicoccum parvum EN VID**

Martos, S. y Luque, J.

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

Se tiene un conocimiento escaso de los hongos patógenos de madera de la vid y de su interacción con el estrés hídrico a lo largo de la enfermedad. Para estudiar este fenómeno se planteó un ensayo con cuatro grupos de vides (Tempranillo injertado sobre R110 de un año de edad; n=8), en los que se combinó el estrés hídrico con la inoculación con *Neofusicoccum parvum*. Durante el experimento se estudiaron dos variables fisiológicas de las plantas (conductancia estomática y potencial hídrico foliar) y dos de su crecimiento (el incremento en diámetro del sarmiento y sus contracciones diarias).

En conjunto, la infección fúngica y el estrés hídrico afectaron de forma independiente y significativa la fisiología y el crecimiento de la vid. Tanto el estrés hídrico como el patógeno redujeron significativamente la conductancia estomática y el potencial hídrico foliar. El valor medio de la conductancia estomática en las plantas no estresadas y no inoculadas fue de 242 mmol H₂O m⁻² s⁻¹, seguido de las plantas no estresadas e inoculadas (187), las estresadas no inoculadas (47) y, por último, las estresadas e inoculadas (24). Los valores equivalentes del potencial hídrico foliar en los respectivos grupos fueron de -0,78 MPa, -0,91 MPa, -1,14 MPa y -1,27 MPa, con diferencias significativas entre todos ellos (p<0,01). El incremento medio del diámetro del sarmiento se redujo significativamente por efecto del estrés hídrico (p=0,02), pero no por efecto del patógeno (p=0,99). Los valores medios acumulados para los distintos grupos estuvieron entre 241 µm (plantas estresadas e inoculadas) y 323 µm (plantas no estresadas e inoculadas). En general, las contracciones diarias del sarmiento aumentaron por efecto del estrés hídrico (p<0,01) y se redujeron por efecto del patógeno (p<0,01), observándose una interacción significativa entre ambos factores (p<0,01).

La longitud de las necrosis causadas por *N. parvum* no aumentaron significativamente con el déficit hídrico, aunque las plantas estresadas mostraron unas necrosis mayores (5,5 cm) que las no estresadas (4,2 cm).

P-157

DESPLAZAMIENTO QUIMIOTÁCTICO DE TELIOSPORAS DE CARBÓN INDUCIDO POR GLICOPROTEÍNAS DE JUGO DE CAÑA DE AZÚCAR (HMMG Y MMMG)

Vicente, C.¹, Legaz, M.E.¹, de Armas, R.² y Quintana, J.¹

¹Departamento de Biología Vegetal I (Fisiología Vegetal), Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Complutense de Madrid (España).

²Departamento de Biología Vegetal. Facultad de Biología. Universidad de la Habana (Cuba).

E-mail: cvicente@bio.ucm.es y jqggbp@hotmail.com

Sporisorium scitamineum (Syd.). Piepenbr. & Oberw. 2002 (= *Ustilago scitaminea* Sydow & P. Sydow) es un hongo patógeno oportunista causante del carbón en *Saccharum officinarum* L. La germinación de las teliosporas del basidiomiceto origina un promicelio haploide que se divide por gemación originando esporidios. Éstos se fusionan y forman un micelio dicariótico que penetra en el meristemo de la yema vegetativa en un periodo de tiempo comprendido entre 6 y 36 horas después de que las teliosporas se hayan depositado sobre las escamas de las yemas. La germinación de las teliosporas puede ser inhibida por glicoproteínas de alto (HMMG) y mediano peso molecular (MMMG) presentes en jugo de caña. Estas glicoproteínas son capaces de producir citoaglutinación. La agregación celular supone un desplazamiento de las teliosporas en medio líquido hacia el agente aglutinante.

La hipótesis planteada está dirigida a demostrar la existencia de dicho fenómeno de desplazamiento. Éste ha de ser explicado en términos de motilidad celular en ausencia de órganos específicos tales como cilios o flagelos. La existencia de movimiento estaría basada entonces en un sistema de contracción-relajación del citoesqueleto. Mediante inserción capilar de diferentes fracciones glicoproteicas de jugo de caña procedente de Barbados 42231, cultivar sensible a la infección, y Mayarí 5514, variedad resistente, se verificó la aproximación quimiotáctica de teliosporas y se visualizó citoaglutinación. Se estudió el papel de la miosina en el desplazamiento mediante inhibidores de la proteína contráctil, como blebistatina ML7 o butanoidina.

P-158

EFFECTO DE LA INOCULACIÓN DE PLANTAS DE CAÑA DE AZÚCAR CON ESPORIDIOS DE *Ustilago scitaminea* SOBRE LA ACUMULACIÓN DE DIFERENTES FRACCIONES DE FENOLES.

Legaz, M.E.¹, Santiago, R.¹, Fontaniella, B.¹, de Armas, R.² y Vicente, C.¹

¹Departamento de Biología Vegetal I (Fisiología Vegetal), Facultad de Biología, Universidad Complutense, 28040 Madrid, España. ²Departamento de Biología Vegetal, Facultad de Biología, Universidad de la Habana, Cuba.
E-mail: melegaz@bio.ucm.es

El carbón es una de las principales enfermedades de la caña de azúcar ocasionada por el hongo *Ustilago scitaminea*. La germinación de las esporas ocurre en la superficie del internodo y la formación de apresorios en las escamas mas internas de las yemas y la base de las hojas emergentes. La entrada al meristemo de las yemas se produce entre las 6 y las 36 horas después de la deposición de las teliosporas en la superficie. La resistencia a la enfermedad es un proceso multifactorial. Las fases de la respuesta incluyen, entre otras, acumulación de diferentes factores como fitoalexinas, enzimas sistémicas que generan compuestos antimicrobianos y biopolímeros protectores, reguladores de inducción y/o actividad de compuestos de defensa, etc. En muchas plantas, una de las reacciones de defensa consiste en la liberación temprana de fenoles preformados y una posterior inducción masiva, debida a la estimulación del metabolismo de los fenilpropanoides. El objetivo del presente trabajo fue definir el posible cambio en el patrón de acumulación de diferentes fracciones de fenoles y lignina, ocasionado como consecuencia de la inoculación de plantas de caña de azúcar con esporidios de *U. scitaminea*, utilizando dos tipos de cultivares de caña de azúcar, My 5514, resistente y B 42231, susceptible a la enfermedad del carbón.

En el cultivar resistente (My 5514), a las 72 horas de la inoculación se produce un incremento en la síntesis de ácidos hidroxicinámicos (HCA) unidos a la pared celular, en paralelo al descenso en el nivel de ácidos hidroxibenzóicos (HBA) en la misma fracción. La inoculación del cultivar susceptible ocasiona, tanto un incremento en la fracción éster HCA soluble y ligada a pared celular, como un mantenimiento de bajos niveles de HBA. Parece estar ocurriendo que la acumulación de HBA no comienza hasta que se satisface el nivel de ligninas necesario para el reforzamiento de la pared celular. La acumulación de lignina es del orden de un 30% superior en plantas inoculadas del cultivar resistente que en las mismas del cultivar susceptible.

P-159

**CAMBIOS EN LOS ÁCIDOS HIDROXICINÁMICOS E
HIDROXIBENZOICOS, LIBRES Y UNIDOS A PARED CELULAR, EN
CULTIVARES DE CAÑA DE AZÚCAR INOCULADOS CON ESPORIDIOS
DE *Ustilago scitaminea***

Santiago, R.¹, de Armas, R.², Fontaniella, B.¹, Vicente, C.¹ y Legaz, M.E.¹

¹ Departamento de Biología Vegetal I (Fisiología Vegetal), Facultad de Biología, Universidad Complutense, 28040 Madrid, España. ² Departamento de Biología Vegetal, Facultad de Biología, Universidad de la Habana, Cuba.
E-mail: melegaz@bio.ucm.es

Se ha estudiado la acumulación de fenoles libres y unidos a pared celular en tallos de plantas jóvenes de caña de azúcar, cv. My 5514 (altamente resistente al carbón) y B 42231 (un cultivar susceptible), inoculados o no con esporidios de *U. scitaminea*. La gran abundancia de los ácidos *p*-cumárico y ferúlico, la considerable cantidad de ácido caféico y las significativas cantidades de los ácidos hidroxibenzoico y sirínico en la fracción ligada a pared celular en ambos cultivares, con valores más altos para el cultivar resistente que para el susceptible, provee a My 5514 de una mejor capacidad para incrementar la frecuencia de puentes entre fragmentos de lignina a través de enlaces éster-éster para reforzar la pared celular y dotar a las plantas de un mayor nivel de resistencia frente a la enfermedad. Este reforzamiento de la pared celular puede representar una barrera efectiva a la entrada y distribución del patógeno. Las subfracciones solubles de todos los fenoles detectados muestran variaciones diferentes. Las fracciones libres y glicosiladas de los ácidos hidroxibenzoicos detectados (*p*-hidroxibenzoico y sirínico) aumentan sus niveles desde las 72 h a las 120 h después de la inoculación del cultivar resistente. Una conducta similar fue observada para la acumulación del ácido *p*-cumárico. El ácido caféico, que regula la actividad fenilalanina amonioliasa en caña de azúcar, mostró un descenso significativo de su título a las 24 h en el cultivar resistente, principalmente en su fracción libre mientras que aumentaba en el cultivar susceptible. Esto permite pensar que la ruta de los ácidos hidroxibenzoicos se activa solamente cuando el nivel de ácido *p*-cumárico justifica la acumulación de ácidos hidroxicinámicos en la cantidad requerida para el reforzamiento de la pared celular después de la inoculación.

P-160

VARIACIÓN ESTRUCTURAL ELEMENTOS XILEMÁTICOS COMO RESPUESTA A LA INFECCIÓN POR *Sporisorium scitamineum* (Syd.)Piepenbr. & Oberw EN *Saccharum officinarum* L.

Díaz, E.M., Sacristán, M., Quintana, J., Santiago, R., Rodríguez, S., Legaz, M.E., y Carlos, V.

Departamento de Biología Vegetal I (Fisiología Vegetal), Facultad de Biología, Universidad Complutense, 28040 Madrid, España.

E-mail: evasilvestre7@gmail.com

La caña de azúcar, *Saccharum officinarum* L., es una gramínea cuyas hojas muestran una típica anatomía Kranz. Esta organización se ve a menudo alterada por la acción de patógenos. El carbón es una importante enfermedad de la caña de azúcar causada por *Sporisorium scitamineum* (Syd.)Piepenbr. & Oberw. Esta enfermedad afecta al crecimiento vegetativo y a la calidad del jugo, produciendo importantes pérdidas económicas. La infección fúngica activa mecanismos de resistencia tales como la liberación de compuestos fenólicos preformados (respuesta preexistente) o la estimulación del metabolismo de los fenilpropanoides (respuesta inducida). Estos ácidos fenólicos forman una familia de compuestos de amplia distribución en las plantas vasculares; gran parte de ellos se encuentran unidos a la celulosa y hemicelulosa de las paredes celulares formando ligninas. En la pared celular las microfibrillas de celulosa son continuas a lo largo el eje principal de la célula adquiriendo estructura helicoidal, mientras que hemicelulosas y pectinas tienen una clara orientación horizontal con muy poca interconectividad.

Se ha estimado el engrosamiento de las paredes de los vasos xilemáticos usando segmentos de hoja de caña de azúcar, cv. Barbados 42231 infiltrados o no con un elicitor purificado de teliosporas de *U. scitaminea* que previamente se había revelado como inductor de actividad fenilalanina amonio liasa. Se han empleado dos protocolos para la detección citoquímica de lignina, tinción con safranina-azul alcian y tinción con floroglucinol, en cortes transversales de hoja, tratándose las preparaciones mediante un programa de análisis de imagen. Mientras la pared celular adelgaza en los grandes vasos con el elicitor incrementa en los medianos y pequeños.

P-161

**ESTUDIO COMPARADO DE LA SENSIBILIDAD A DISTINTOS
COMPUESTOS ANTIMICROBIANOS EN HONGOS DEL GÉNERO
PENICILLIUM. IMPLICACIÓN DE LA QUITINA.**

Muñoz, A., Gandía, M., López-García, B. y Marcos J.F.

Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos (IATA) Apdo Correos 73.
Burjassot 46100 Valencia

Nuestro grupo trabaja en la utilización de péptidos antimicrobianos (AMP) como alternativas de aplicación en protección vegetal. En anteriores trabajos se había encontrado que el perfil de sensibilidad al péptido antifúngico PAF26 (diseñado *de novo* mediante química combinatorial) se correlaciona con la virulencia/patogenicidad sobre frutos cítricos en cuatro especies distintas de hongos del género *Penicillium*: *P. digitatum* y *P. italicum* (patógenos postcosecha naturales de cítricos, los más sensibles); *P. expansum* (patógeno de frutos de pepita); y *P. brevicompactum* (no patógeno de frutos, el menos sensible al péptido). Con el fin de explorar los determinantes de esta correlación, se ha comparado la susceptibilidad a PAF26 en las cuatro especies de *Penicillium* con la de distintos compuestos antimicrobianos y condiciones de estrés, como son: el crecimiento en presencia de blanco de Calcofluor (CFW), que interacciona con la quitina de las paredes celulares, el detergente lipofílico SDS, que altera la estabilidad de las membranas lipídicas, el agente oxidante peróxido de hidrógeno (H₂O₂), y el crecimiento a temperatura restrictiva (30°C). Se encontró correlación únicamente entre el efecto del PAF26 y el del CFW. La visualización por tinción de la quitina con CFW y microscopia de fluorescencia en las cuatro especies extendió dicha correlación al contenido/accesibilidad de la quitina.

Por ello, se ha iniciado la caracterización de la implicación de la biosíntesis de quitina en la sensibilidad a PAF26/virulencia sobre frutos cítricos en *P. digitatum*. Se diseñaron oligonucleótidos degenerados a partir de regiones altamente conservadas de diferentes familias de genes estructurales de quitin sintasas (CHS). La amplificación por PCR a partir de DNA genómico permitió obtener un producto del tamaño esperado, que será confirmado por secuenciación. Esta herramienta permitirá el estudio de los cambios de expresión de los genes aislados durante la exposición a AMP, CFW, e infección de frutos cítricos.

P-162**IDENTIFICACIÓN DE GENES DE *Penicillium digitatum* IMPLICADOS EN LA PATOGENICIDAD/VIRULENCIA SOBRE FRUTOS CÍTRICOS**

López-Pérez, M. y González-Candelas, L.

Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos (IATA-CSIC). Ap. De Correos 73, Burjassot. 46100-Valencia. E-mail: mlopez@iata.csic.es

Penicillium digitatum es el principal patógeno post-cosecha de frutos cítricos, siendo responsable de hasta el 80% de las pérdidas debidas a podredumbres. Este hongo necrotrofo posee un rango de huésped muy restringido, infectando únicamente frutos cítricos. A pesar de la importancia económica de las pérdidas ocasionadas por este patógeno nuestro conocimiento de los factores involucrados en la patogenicidad son muy escasos.

Para estudiar a nivel molecular los mecanismos involucrados en la patogenicidad y virulencia de este hongo hemos aplicado la técnica de SSH (Suppressive Subtractive Hybridization) para obtener una biblioteca de cDNA enriquecida en genes de *P. digitatum* que se expresan diferencialmente durante la infección. Para ello hemos empleado una mezcla de RNAs de fruto no infectado y hongo crecido *in vitro* como “driver” y RNA de tejido de fruto infectado a las 72 h después de la inoculación como “tester”. Tras dos rondas de amplificación por PCR los fragmentos de cDNA sustraídos fueron ligados en el plásmido pCRII y clonados en células competentes de *E. coli*. La secuenciación aleatoria de más de 300 clones ha puesto de manifiesto que un grupo destacado de genes que se expresan diferencialmente codifican distintas proteasas ácidas. Además, se encuentran otros genes que codifican enzimas degradadoras de pared celular, como pectinasas y celulasas, proteínas relacionadas con el estrés oxidativo y diversas implicadas en regulación de la expresión génica.

Además, se construyó una macromatriz a partir de los insertos de 1440 clones junto con diversos controles positivos y negativos. Esta macromatriz se ha empleado para comparar la expresión de los genes aislados durante el proceso de infección con respecto a la que presentan durante el crecimiento del hongo en un medio de cultivo rico. Un análisis más detallado mediante hibridación Northern de un conjunto de genes seleccionados nos han permitido comprobar que la mayoría de los mismos se expresan diferencialmente durante el proceso de infección en comparación con el crecimiento en condiciones *in vitro*, aunque presentando distintos perfiles de expresión, y por lo tanto constituyen genes hipotéticamente involucrados en patogenicidad.

P-163**EFFECTO DE LA TEMPERATURA Y DE LA ACTIVIDAD DE AGUA EN LA GERMINACIÓN DE *MONILINIA* SPP.**

Casal, C.¹, Grier, C.¹, Viñas, I.² y Usall, J.¹

¹IRTA. Àrea de Postcollita, XaRTA, Centre UdL-IRTA, Rovira Roure, 191, Lleida-Catalunya

²Universitat de Lleida. Àrea de Postcollita, XaRTA, Centre UdL-IRTA, Rovira Roure, 191, Lleida-Catalunya
Email: josep.usall@irta.cat

Monilinia spp. es el causante de enfermedad más importante en postcosecha de melocotones y nectarinas en todo el mundo. Cuando la humedad relativa y la temperatura son favorables para el desarrollo de la enfermedad, las pérdidas en postcosecha son especialmente más severas. Las principales especies de *Monilinia* spp. que afectan en la postcosecha de fruta de hueso en todo el mundo son *M. laxa*, *M. fructigena* y *M. fructicola*. En el presente estudio se evalúa el efecto de la temperatura (0-38°C), la actividad de agua (a_w : 0.87-0.99) y sus interacciones en el período de latencia y en el porcentaje de germinación a lo largo del tiempo de las 3 especies de *Monilinia* spp. (*M. laxa*, *M. fructigena* y *M. fructicola*). Las conidias germinaron rápidamente, a 25°C y 0.99 a_w más del 80% de las conidias viables germinaron en un tiempo de 2 h para las especies *M. fructicola* and *M. fructigena* y en 4 h para la especie *M. laxa*. A 38°C ninguna especie fue capaz de germinar pero en cambio las 3 germinaron a 0°C. Al estudiar la condición más seca (0.87 a_w), ninguna especie fue capaz de germinar para ninguna de las temperaturas de incubación. Además a 0.90 a_w , las esporas solo fueron capaces de germinar a 15, 25 y 30 dependiendo de la especie estudiada. En cambio, a 0.95, 0.97 y 0.99 a_w la germinación tuvo lugar para todas las temperaturas estudiadas. Generalmente, el período de latencia fue más largo y la magnitud del porcentaje de germinación menor cuando la condiciones de temperatura y a_w estaban mas alejadas del óptimo. El conocimiento de los requerimientos para la germinación de este hongo es importante para entender su comportamiento en situaciones naturales.

P-164**EVALUACIÓN DE LA RESISTENCIA DE TRES TIPOS DE PIMIENTO A
*Botrytis cinerea***

Porca, E., Carballeira, R., Alvedro, C., Veloso, J. y Díaz, J.

Departamento de Biología Animal, Biología Vegetal e Ecología. Universidade da Coruña. Campus da Zapateira s/n 15071 A Coruña, Spain. Email: josefv@udc.es

El pimiento (*Capsicum annuum*) es una solanácea ampliamente cultivada en Galicia. En el presente estudio se han caracterizado tres tipos de pimiento en cuanto a su resistencia frente a *Botrytis cinerea*. Se han ensayado los cultivares Padrón y Couto, que producen respectivamente frutos picantes y dulces, de gran consumo en nuestra comunidad, así como PI201234, una línea de pimiento introducida originalmente por el USDA en los Estados Unidos, y que es parcialmente resistente o tolerante a otros patógenos como *Phytophthora capsici*¹. Las inoculaciones se realizaron con plantas de 7 semanas, depositando gotas de inóculo (10^6 conidios/ml) sobre las hojas². Se determinó el porcentaje de lesiones en expansión y el diámetro de las lesiones a las 48 y 72 horas tras la inoculación. En nuestros ensayos PI201234 resultó ser parcialmente resistente frente a *Botrytis cinerea*, mientras que Padrón y Couto fueron más susceptibles. Se recogieron muestras de hojas en el momento de la inoculación y 24 horas más tarde, y se determinaron los niveles de las enzimas quitinasa, peroxidasa y β -1,3-glucanasa con objeto de comprobar si están relacionadas con el fenómeno de resistencia parcial observado en PI201234.

Referencias

¹Silvar C, Díaz J, Merino F. 2005. Real-time PCR quantification of *Phytophthora capsici* in different pepper genotypes. *Phytopathology* 95: 1423-1429.

²Díaz, J., ten Have, A. & van Kan, J.A.L. 2002. The role of ethylene and wound signaling in resistance of tomato to *Botrytis cinerea*. *Plant Physiol.* 129: 1341-1351.

P-165

VALORACIÓN *IN VITRO* DE LA PATOGENICIDAD DE AISLADOS DE *Cryphonectria parasitica* CON DIFERENTE TIPO DE APAREAMIENTO

Aguín, O.¹, Montenegro, D.¹, Sainz, M.J.² y Mansilla, J.P.¹

¹Estación Fitopatológica de Areeiro. Deputación de Pontevedra. Subida a la Robleda s/n. 36153 Pontevedra. E-mail: oaguin@efa-dip.org

²Departamento de Producción Vegetal. Universidad de Santiago de Compostela. Campus Universitario s/n. 27002 Lugo.

Cryphonectria parasitica, que causa el cancro del castaño, es un ascomiceto filamentoso heterotálico que, en laboratorio, se comporta como un hongo sexualmente autoincompatible. La incompatibilidad sexual en los ascomicetos está controlada por un único locus, denominado *MAT* (*mating type*), que presenta dos alelos o idiomorfos: *MAT-1* y *MAT-2*. En *C. parasitica*, la reproducción sexual solo ocurre entre individuos que poseen alelos *MAT* diferentes. Estudios anteriores de las poblaciones de *C. parasitica* del noroeste de España han demostrado la presencia de los dos tipos *MAT*, si bien *MAT-1* es el más abundante. En otros ascomicetos, se han encontrado diferencias en la virulencia entre cepas con *MAT* distinto, pero este aspecto no ha sido investigado en *C. parasitica*. En este trabajo, se estudió la patogenicidad *in vitro* de idiomorfos *MAT-1* y *MAT-2* de *C. parasitica*. Se seleccionaron 8 aislados monospóricos de cepas virulentas de *C. parasitica*, 4 del tipo *MAT-1* y 4 de tipo *MAT-2*, obtenidos sobre medio PDA a partir de muestras de corteza de castaños (*Castanea sativa*) afectados por cancro en Galicia. Se cortaron fragmentos de madera sana de castaño de aproximadamente 10 cm de longitud y 6 cm de diámetro. En el centro de cada fragmento se hizo un agujero de unos 7 mm de diámetro donde se introdujo una porción de PDA con micelio del aislado correspondiente de *C. parasitica*. Como control, se utilizó para la inoculación medio PDA. Los fragmentos se mantuvieron en una cámara de cultivo bajo condiciones controladas de luz y temperatura. Se midió periódicamente el crecimiento del hongo sobre los fragmentos, estableciéndose un código de severidad que permitió calcular el índice de enfermedad causado por cada tipo de aislado. A los cinco días de la inoculación de *C. parasitica* en madera de castaño, ya se observaron síntomas de la infección, tanto en los fragmentos inoculados con aislados de tipo *MAT-1* como con los de tipo *MAT-2*. A los 13 días, se observaron fragmentos en los que, tanto aislados *MAT-1* como *MAT-2*, ya habían alcanzado el máximo de severidad, indicando la alta virulencia de los aislados utilizados en el estudio.

P-166

DETECCIÓN MOLECULAR DE *Verticillium dahliae* EN PECÍOLOS DE HOJAS DE CULTIVARES DE OLIVO CON DIFERENTES NIVELES DE RESISTENCIA

Estrada, P.¹, López-Escudero, F.J.¹, Mercado-Blanco, J.², Valverde-Corredor, A.² y Blanco-López, M.A.¹

¹Departamento de Agronomía, Universidad de Córdoba, Campus Universitario de Rabanales, Edificio Celestino Mutis, 14071, Córdoba, Spain.

²Departamento de Protección de Cultivos, Instituto de Agricultura Sostenible, CSIC, Alameda del Obispo s/n, Apdo. 4084, 14080 Córdoba. E-mail: ag2loesj@uco.es

En este trabajo se ha evaluado mediante detección molecular la presencia de *V. dahliae* en pecíolos de diversos cultivares de olivo con diferentes niveles de resistencia a la Verticilosis del olivo (VO), tras efectuar infecciones en condiciones controladas. Experimentos preliminares usando hojas caídas y adheridas recolectadas a las 10 semanas después de inocular plantas mediante inyección en el tronco, mostraron diferencias de colonización de pecíolos entre 'Cañivano Negro' y 'Córdobés Arroyo de la Luz' (susceptibles) y 'Pajarero' y 'Frantoio' (moderadamente resistente y resistente, respectivamente). En nuevos experimentos se han incluido plantas de 'Picual' y 'Arbequina' (susceptibles) y 'Frantoio' y 'Empeltre' (resistentes). Las plantas de 9 meses de edad se inocularon con una suspensión de conidias de un aislado de *V. dahliae* representativo del patotipo defoliante (D), y se incubaron en una cámara de crecimiento a 22±2°C. El progreso de la enfermedad se evaluó semanalmente durante 12 semanas, de acuerdo a una escala de síntomas (0= sana a 4= muerta) basada en el porcentaje de planta afectada por clorosis foliar, necrosis de brotes y/o defoliación. A lo largo del experimento se recogieron las hojas caídas en el intervalo entre dos lecturas y también se muestrearon hojas adheridas de las plantas, que se conservaron a -80°C para su posterior procesamiento. Los pecíolos liofilizados de ambos grupos de hojas se pulverizaron y de ellos se extrajo ADN total, según procedimientos previamente descritos. Todas las muestras de ADN se utilizaron como molde en ensayos de "fast-nested"-PCR para detectar cualitativamente la presencia de ADN del patógeno. Los resultados hasta ahora recopilados indican que la detección molecular del patógeno es posible antes de la aparición de los primeros síntomas (detección temprana), y que en hojas adheridas no sigue un patrón determinado ni en cuanto al tiempo de muestreo ni a la variedad. Por su parte, en hojas caídas, el hongo se detecta con frecuencia en plantas de 'Picual' que mostraron fuerte defoliación y, en menor medida, en 'Frantoio' y 'Empeltre', en las que las plantas resultaron mayoritariamente asintomáticas. En 'Arbequina', el patógeno se detectó en menor número de muestras y sobre todo a tiempos finales, de acuerdo a la escasa incidencia y severidad de la VO observada. Los pecíolos han resultado ser tejidos muy adecuados para una detección eficaz del patógeno mediante técnicas moleculares.

P-167

CARACTERIZACIÓN PATOGENICA DE POBLACIONES DEL HONGO *Stemphylium vesicarium* PROCEDENTES DE PLANTACIONES DE PERAL

Ruz, L.¹, Santamaría, G.¹, Moragrega, C.¹, Vilardell, P.², Vilardell, A.¹, Montesinos, E.¹ y Llorente, I.¹

¹Institut de Tecnologia Agroalimentària- CeRTA-CIDSAV. Universitat de Girona. Av. Lluís Santaló s/n 17071 (Girona). concepció.moragrega@udg.edu

²IRTA-Mas Badia. Mas Badia. 17134 La Tallada d'Empordà (Girona)

La estemfiliosis del peral, causada por el hongo deuteromiceto *Stemphylium vesicarium* (teleomorfo *Pleospora allii*), es una de las enfermedades fúngicas con mayor incidencia económica en este cultivo en determinadas regiones del Mediterráneo. El nivel de daños puede variar pero en ataques muy graves las pérdidas pueden ser superiores al 80% en fruta.

S. vesicarium está descrito como saprofita estricto y como patógeno de distintas especies vegetales (ajo, cebolla, espárrago) además de peral. El conocimiento de la estructura poblacional del hongo en plantaciones de peral en base a su capacidad patogénica y la determinación de la frecuencia de aislados patogénicos/no patogénicos en una población es clave para un mayor entendimiento de la fuente de inóculo y desarrollo de la enfermedad y para ayudar a diseñar y planificar medidas de control.

En este trabajo se realizó la caracterización patogénica de una colección de más de 100 aislados de *Stemphylium vesicarium* procedentes de plantaciones de peral naturalmente afectadas por la enfermedad, obtenidos a partir de aspiración del inóculo del aire, hojas y frutos infectados y material vegetal con pseudotecas del hongo. La capacidad patogénica de los aislados se determinó mediante bioensayo en hojas separadas de la planta y en frutos inmaduros de variedades de peral sensibles a la enfermedad (Conference, Passe Crassane, Abate Fetel). Además se analizó la virulencia de los aislados en función del progreso de las lesiones, formación de micelio y producción de conidias en el material vegetal inoculado. Por otra parte, para cada uno de los aislados (tanto patogénicos como no patogénicos) se evaluó su capacidad de producción de las toxinas huésped-específicas SV-toxina I y II mediante un ensayo *ex vivo* en hojas jóvenes de variedades susceptibles de peral.

Financiado por el proyecto MEC AGL2006-04987/AGR

P-168

EVALUACIÓN EN CAMPO DE LA RESISTENCIA DE VARIEDADES DE MANZANO AUTÓCTONAS DE ESPAÑA A *Venturia inaequalis*

Martínez-Bilbao, A.¹, Esparza, M.² y Murillo, J.¹

¹Dpto. Producción Agraria, Universidad Pública de Navarra, 31006 Pamplona; ²Instituto Técnico de Gestión Agrícola, Avda. Serapio Huici 20-22, 31610 Villava. e-mail: jesus.murillo@unavarra.es

El moteado (*V. inaequalis*), el fuego bacteriano (*Erwinia amylovora*) y el oídio (*Podosphaera leucotricha*) son las enfermedades más importantes del manzano, y su control integrado se aborda con más efectividad utilizando variedades de manzano resistentes o poco susceptibles a estos patógenos. En trabajos previos, hemos evaluado la susceptibilidad de una colección de manzanos autóctonos del norte de España a fuego bacteriano y a moteado, y hemos seleccionado 12 variedades que fueron poco susceptibles a fuego bacteriano y totalmente resistentes a un inóculo mixto de *V. inaequalis* (UPNA99) obtenido a partir de lesiones recolectadas en el norte español. En este trabajo hemos profundizado en la evaluación de la resistencia de estas variedades a moteado y su comportamiento en campo. Las 12 variedades mostraron diferentes niveles de resistencia a las razas 1, 6 y 7 de *V. inaequalis*: cuatro de ellas presentaron resistencia total o parcial a las tres razas; del resto, otras cuatro mostraron resistencia total o parcial a la raza 7, aunque todas las variedades fueron resistentes al menos a una de las razas. Estos resultados son relevantes porque la raza 7 supera las resistencias utilizadas hasta el momento en el cultivo del manzano. A su vez se ha realizado un seguimiento desde el año 2001 de la ocurrencia de moteado en campo (Santesteban, norte de Navarra) en 72 variedades, que incluyen diez de las doce variedades anteriormente mencionadas; igualmente, se recogieron datos de humectación y temperatura a lo largo de seis años. Hasta el momento, las observaciones de incidencia y severidad de moteado para cada variedad son, en la mayoría de los casos, coherentes con los obtenidos en los ensayos *in vitro*. Mediante la inoculación de las variedades diferenciales de manzano para *V. inaequalis* (h2 a h7), hemos determinado la presencia de las razas 1, 2, 3, 5, 6 y 7 en el noreste español, estando presentes las razas 1, 2 y 6 en el inóculo UPNA99 y las razas 3, 5 y 7 en Santesteban, lo que podría justificar la ocurrencia de moteado en campo en algunas de las 12 variedades identificadas como resistentes. Igualmente, se discutirá la relación entre la ocurrencia de moteado y los periodos de Mills.

P-169

ESTUDIOS DE COMPATIBILIDAD DE FLUAZINAM CON AISLADOS DE *TRICHODERMA* ANTAGONISTAS DE *Rosellinia necatrix*

Ruano Rosa, D. y López Herrera, C.J.

Instituto de Agricultura Sostenible, CSIC. Finca Alameda del Obispo, 14080-Córdoba

La Podredumbre blanca (PB) causada por *Rosellinia necatrix* continúa actualmente siendo una de las enfermedades más importantes del cultivo del aguacate (*Persea americana* Mill.) en el litoral andaluz. Los estudios de control biológico con hongos antagonistas como *Trichoderma* spp., nos han permitido obtener aislados de este hongo, procedentes de la rizosfera de árboles de aguacate que se presentan como potenciales agentes de biocontrol (ABC) de la PB de este cultivo.

Para valorar su efecto de biocontrol, comparado con el efecto del fungicida de contacto Fluazinam, se inocularon previamente plantas clonales de aguacate Duke-7/Hass de 2 años de edad con 3 aislados de *Trichoderma* potenciales ABC, aplicados de forma individual o en combinaciones binarias y terciarias de los mismos. Posteriormente estas plantas se inocularon con un aislado muy virulento de *R. necatrix*. Fluazinam se aplicó al suelo, a la dosis del 0.1% en 7 tratamientos sucesivos cada 10 días. Se utilizaron 10 repeticiones por tratamiento. Durante el desarrollo del experimento, se evaluaron los síntomas aéreos de las plantas según una escala de severidad de 1= planta sana a 5= planta muerta y se calculó el área del progreso epidémico de la enfermedad estandarizada de cada uno de los tratamientos y sus medias fueron estadísticamente comparadas entre sí. Se confirmó que Fluazinam al 0.1%, es totalmente efectivo en el control de la enfermedad, no diferenciándose estadísticamente del control sin inocular y que los aislados de *Trichoderma* aplicados aisladamente o en sus combinaciones controlaron parcialmente el desarrollo de la enfermedad.

Para potenciar el efecto de biocontrol de estos aislados de *Trichoderma*, se planteó su aplicación en combinación con el fungicida citado. Para ello se realizó previamente un estudio de compatibilidad *in vitro* de estos 3 aislados de *Trichoderma*, con Fluazinam evaluándose en placas de Petri que contenían PDA estéril con el fungicida a las concentraciones de 0, 0.01, 0.05, 0.1 ppm, en las que sembraron cada uno de los tres aislados de *Trichoderma* o el aislado de *R. necatrix*. Las placas se incubaron a 22-24 °C en oscuridad y se midió el crecimiento radial de las colonias (mm), diariamente, utilizándose cinco repeticiones por tratamiento. La concentración de 0.05 ppm fue la dosis más baja del fungicida para controlar el crecimiento del patógeno y a esta dosis los tres aislados de *Trichoderma* también crecieron, lo que sugiere en principio una utilización combinada de aislados del antagonista y del fungicida para el control del patógeno.

Paralelamente se está finalizando experimentos, en plantas de aguacate de 1 año de edad procedentes de germinación directa de semillas y sobre plantas clonales Duke-7/Hass, previamente inoculadas con el aislado de *R. necatrix*, para valorar *in vivo* el efecto de las combinaciones de aislados de *Trichoderma* con el fungicida a dosis más bajas de la recomendada, en el control de la PB del aguacate.

P-170

**ESTUDIO DE LA RESISTENCIA DE DOS LÍNEAS DE PIMIENTO A
Phytophthora capsici Y *Verticillium dahliae***

Silvar, C.¹, Gayoso, C.¹, Novo Uzal, E.¹, Díaz, J.¹, Martínez de Ilárduya, O.², Pomar, F.¹ y Merino, F.¹

¹Departamento de Biología Animal, Biología Vegetal e Ecología. Universidade da Coruña. Campus da Zapateira s/n 15071 A Coruña. Email: fuenme@udc.es

²Centro de Investigaciones Agrarias de Mabegondo, Xunta de Galicia, 15318 A Coruña,

Las enfermedades causadas por *Phytophthora capsici* Leon. y *Verticillium dahliae* Kleb. en el pimiento son un importante problema en Galicia¹. En el caso de *Verticillium dahliae* no hay ningún método de lucha eficaz, pero en el de *Phytophthora capsici* se conocen líneas de pimiento que presentan resistencia, al menos a nivel de síntomas. En el presente trabajo se han comparado dos líneas resistentes a *P. capsici* (SCM331 y PI201234) con el cultivar local Padrón, caracterizando su grado de resistencia a este patógeno a nivel molecular y ensayándolas también frente a *V. dahliae*. Para ello se han inoculado plantas de cada línea de pimiento bien con *P. capsici*, bien con *V. dahliae*, y posteriormente se ha determinado el grado de colonización de cada patógeno mediante PCR en tiempo real. Se confirmó que SCM331 y PI201234 son parcialmente resistentes a *P. capsici*, dado que este patógeno las colonizó en menor medida que al cultivar Padrón. En cambio, las tres líneas de pimiento fueron colonizadas en igual medida por *V. dahliae* en la raíz, pero PI201234 fue más colonizada en el tallo. A continuación se estudió la expresión de cuatro genes relacionados con la defensa de la planta por RT-PCR en tiempo real en las plantas de PI201234 y SCM331 inoculadas con *P. capsici*, comparándolas con Yolo Wonder, un cultivar que presenta un grado de susceptibilidad equivalente a Padrón. Los genes estudiados codifican para una proteína PR-1 básica (*CABPR1*), una sesquiterpeno ciclasa (*CASC1*), una β -1,3-glucanasa básica (*CABGLU*) y una peroxidasa (*CAPO1*). Todos los genes, excepto *CABGLU*, se expresaron más en PI201234 y SCM331 que en Yolo Wonder tras la infección.

Referencias

¹Pomar, F., Bernal, M.A., Collar, J., Díaz, J., Caramelo, C., Gayoso, C., Novo, M., Prego, C., Saavedra, A., Silvar, C. y Merino, F. 2001. A survey of "tristeza" of pepper in Galicia and the fungal pathogens causing the disease. *Capsicum & Eggplant Newsletter* 20: 90-93.

P-171

SENSIBILIDAD DEL FRUTO DE LA MANDARINA FORTUNE A *Alternaria alternata* pv. *citri* SEGÚN EL ESTADO DE DESARROLLO

Nemsa, I.¹, Hernández, M.A.², Álvarez, N.², Martínez, M.C.², Guerrero, M.M.², Porras, I.³, Ortuño, A.⁴, del Río, J.A.⁴ y Lacasa, A.²

¹Facultad de Ciencias de Túnez. El Manar

²Biotecnología y Protección de Cultivos y ³Citricultura, IMIDA, c/ Mayor s/n, 30150 La Alberca (Murcia). E-mail: alfredo.lacasa@carm.es

⁴Fisiología Vegetal, Facultad de Biológicas, Universidad de Murcia, Campus de Espinardo

En la comarca del Campo de Cartagena (Murcia), *Alternaria alternata* pv. *citri* se presenta, en las campañas húmedas, como el principal problema fitosanitario del cultivo de la mandarina Fortune. Produce manchas marrones o negras en las hojas, ocasionando defoliaciones cuando las condiciones son favorables. Manchas similares se presentan en los frutos, que pierden el valor comercial. Con el fin de orientar las estrategias de control, mayoritariamente basado en la aplicación de fungicidas, se ha estudiado la evolución de la sensibilidad de los frutos a la infección por el hongo a lo largo de todo el periodo de desarrollo de los mismos. Para ello se recolectaron frutos sanos cada dos semanas, desde que alcanzaron 1,9 cm de diámetro (principios de junio, 2007) hasta el momento de la recolección (principios de abril, 2008), en una parcela sin tratamientos fitosanitarios de una plantación comercial. En cada muestreo los frutos, una vez desinfectados, se inocularon con dos aislados de *Alternaria alternata* pv. *citri*, previamente caracterizados. Durante la incubación en estufa refrigerada a 25°C se midió el tamaño de la lesión producida cada 3-4 días durante 3 semanas. La sensibilidad de los frutos disminuye a medida que avanza el desarrollo y la maduración, produciéndose un cambio brusco en la sensibilidad al iniciarse el cambio de color, a finales del mes de noviembre, cuando los frutos tienen un diámetro medio próximo a 6 cm.

P-172

CONTROL DE NEMATODOS FITOPARÁSITOS MEDIANTE LA INCORPORACIÓN DE COMPOST DE RESIDUOS URBANOS EN UN SUELO DE USO AGRÍCOLA

Olalla, C.¹, López Robles, D.J.¹, Fernández Peña, M.¹, González Caicedo, S.¹, Sacristán, G.² y Reguera, J.I.²

Áreas de Edafología y Química Agrícola¹ y Microbiología². Facultad de Ciencias. Universidad de Burgos. Plaza Misael Bañuelos s/n. 09001. Burgos
E-mail: djlopez@ubu.es

La adición de materia orgánica residual puede ejercer un efecto controlador de las poblaciones de nematodos fitoparásitos pudiendo ser al mismo tiempo una fuente importante de nutrientes y contribuir al incremento de la materia orgánica en el suelo.

El objetivo de este trabajo es estudiar el efecto del uso de un residuo urbano compostado en el manejo de las poblaciones de nematodos fitoparásitos presentes en un suelo agrícola.

La finca experimental se localizó en el municipio de Melgar de Fernamental (Burgos); se aplicó compost de residuo urbano y se siguió una rotación de cultivos de remolacha (*Beta vulgaris* L.) y trigo (*Triticum aestivum* L.).

El diseño de la experiencia fue en bloques con cinco réplicas por tratamiento. Se realizaron 5 tratamientos diferentes: tres en los que se aplicaron dosis de compost de residuo urbano equivalentes a 5 (U1), 10 (U2) y 15 (U3) t.ha⁻¹; fertilización mineral (I); y como control (C) se utilizaron parcelas sin tratar.

En el transcurso de la experiencia se realizaron tres muestreos (inicial, medio y final), determinándose la abundancia de las diferentes especies de nematodos fitoparásitos presentes en el suelo así como la evolución de las mismas.

Heterodera schachtii y *Heterodera avenae* fueron las especies fitoparásitas formadoras de quistes presentes en la finca experimental.

Para *H. schachtii* se obtuvieron reducciones de población estadísticamente significativas únicamente para la época de muestreo pero no para los distintos tratamientos aplicados, mientras que para *H. avenae* se obtuvo significación estadística para ambos factores. Para este último, los tratamientos I y U3 resultaron los más eficaces en la reducción de las poblaciones.

Se observa claramente la influencia de la presencia/ausencia de cultivos hospedadores en el incremento/reducción de las poblaciones de este tipo de nematodos.

Como conclusión, se puede afirmar que la adición de materia orgánica exógena contribuye eficazmente en el manejo de las poblaciones de este tipo de nematodos y puede ser tenida en cuenta como una herramienta complementaria a la rotación de cultivos.

P-173

RESPUESTA DE VARIOS PROMOTORES A DIVERSAS POBLACIONES DE *MELOIDOGYNE* SPP. VIRULENTAS Y AVIRULENTAS PARA EL GEN *Mi*.

Yuste, A.B., Portillo, M., Barcala, M., García, A., Fenoll, C. y Escobar, C.

Ftad. de Ciencias del Medio Ambiente, Universidad de Castilla-La Mancha, Avd. Carlos III s/n - 45071 Toledo. E-mail: carolina.escobar@uclm.es

Los nematodos fitopatógenos endoparásitos, producen grandes pérdidas agrícolas a nivel mundial. Su incremento está favorecido por las prácticas de agricultura intensiva, y su facilidad de transmisión. Uno de los grupos más extendidos son las especies del género *Meloidogyne* spp.. El método habitual para el control de nematodos es la aplicación de nematicidas, que además de su alto precio económico impone un grave coste ambiental, por tener un alto poder biocida (Gheysen y Fenoll, 2002). Por ello, la UE ha financiado proyectos de investigación encaminados al desarrollo de alternativas eficaces y respetuosas con el medio ambiente (Gheysen y Fenoll, 2002), como por ejemplo, el empleo de plantas resistentes obtenidas mediante biotecnología y/o selección artificial. Los tomates (*Lycopersicon esculentum*) portadores del gen *Mi* de resistencia a *Meloidogyne* spp. confieren resistencia a *M. incognita*, *M. javanica* y *M. arenaria*, las tres especies más comúnmente encontradas en España, reduciendo considerablemente la tasa de reproducción del nematodo (Omat y Verdejo-Lucas, 1999; Sorribas y Verdejo-Lucas, 1999). Dado que se han encontrado poblaciones virulentas para *Mi*, y que esta virulencia puede ser seleccionable por exposición continuada del nematodo al gen *Mi* en condiciones de laboratorio o en situaciones de campo (Castagnone-Sereno y col., 1993; Roberts, 1995). La elección de herramientas biotecnológicas de control, puede ser clave dentro de un marco de control integrado de estas plagas. Por ello, nuestro grupo de trabajo ha testado varios promotores (*Hahsp17.7* y *pG208.14*), promotor de un gen que codifica una proteína de bajo peso molecular y promotor del Virus estriado del maíz respectivamente, ambos inducibles por nematodos con una población de referencia (*M. javanica* Kiel). (Escobar y col., 2003; Barcala y col., 2008; Escobar y col., inédito). Plantas transgénicas de *Arabidopsis* y tabaco con las fusiones de estos promotores a GUS han sido infectadas con dos poblaciones de nematodos P27 y PG3. La población P27 es "estable para la virulencia", es decir que aún reproducida varias generaciones en plantas susceptibles, cuando infecta plantas portadoras del gen *Mi* no pierde su carácter virulento. Esta población fue aislada en Cataluña por el grupo de la Dr. Soledad Verdejo (Ornat y col., 2001). La población PG3 después de ser sometida durante 3 años a la presión de selección del gen *Mi* (Verdejo y col., inédito) resultó tener un claro carácter virulento. Se han evaluado las diferencias en la activación de estos promotores al ser infectados con estas dos poblaciones que han superado la virulencia a *Mi*, frente a una población avirulenta control para *Mi*. Se discutirá la posible utilidad de estos promotores para diseñar herramientas de control aplicables a la mayor diversidad de poblaciones de *Meloidogyne* spp. posibles.

P-174

PATOGENICIDAD DE POBLACIONES DE *MELOIDOGYNE JAVANICA* VIRULENTAS Y AVIRULENTAS PARA EL GEN *Mi* Y SU RELACIÓN CON LA EXPRESIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA PEROXIDASA EN TOMATE RESISTENTE Y SUSCEPTIBLE

Andres, M.F.¹ y Verdejo-Lucas, S.²

¹Instituto de Ciencias Agrarias. CCMA. CSIC. Serrano 115, 28006-Madrid.

²IRTA. Protecció Vegetal. Ctra de Cabrils Km 2. 08348 Cabrils (Barcelona).

Las poblaciones de *Meloidogyne* virulentas para el gen *Mi* de resistencia en tomate se caracterizan por reproducirse de forma similar en tomate resistente que susceptible. Sin embargo, las primeras fases de la interacción nematodo-planta no se han caracterizado y su estudio tiene interés para conocer los mecanismos de virulencia. Se compararon poblaciones virulentas de *M. javanica* de distinto origen en genotipos de tomate resistente y susceptible para determinar si diferían en la capacidad infectiva de los juveniles (J2), la expresión de la actividad peroxidasa en la planta (asociada a la respuesta de incompatibilidad), y en su tasa de multiplicación (Pf/Pi). Se seleccionaron 4 poblaciones; i) avirulenta (AVi); ii) una con virulencia adquirida, generada a partir de la avirulenta mediante el cultivo de un patrón de tomate resistente durante 3 ciclos consecutivos (PVi) iii) similar a la anterior pero adquirida mediante el cultivo de un cultivar resistente (CVi) y iv) virulenta natural (NVi). El nº de J2 que invadieron las raíces difería dependiendo de la población, genotipo de tomate y días tras la inoculación del nematodo (DPI). Así, en tomate susceptible, los J2 invadieron las raíces progresivamente con independencia de la a/virulencia de la población. En contraste, en tomate resistente, sólo un reducido nº de J2 de AVi, PVi y CVi invadieron las raíces en los primeros 4 DPI, pero los J2 de PVi y CVi lo hacían en mayor nº ($P < 0,05$) 7 DPI que los de la población AVi. El nº de J2 de NVi que invadieron las raíces y la dinámica del proceso no difería entre genotipos. Por tanto, es posible inferir que el incremento de la capacidad infectiva es uno de los mecanismos implicados en la adquisición de la virulencia. Respecto a la actividad enzimática, plantas de tomate susceptible inoculadas con las 4 poblaciones mostraron patrones de bandas similares 4 y 7 DPI tanto en presencia como ausencia del nematodo. Sin embargo, en el resistente, PVi y CVi (virulencia adquirida) diferían de AVi (avirulenta) en una banda detectaba 4 DPI (inducción temprana) pero no 7 DPI, lo que sugiere un efecto transitorio en la respuesta de incompatibilidad. La población NVi proporcionaba patrones de bandas similares en ambos genotipos a los 4 y 7 DPI ya fuera en presencia o ausencia del nematodo (reacción compatible). La Pf/Pi de las poblaciones virulentas no difería entre genotipos, mientras que AVi mostraba una Pf/Pi inferior ($P < 0,05$) en el tomate resistente que en el susceptible.

PANELES

CONTROL

PANELES VIRUS	317 (P-175)
PANELES BACTERIAS	323 (P-181)
PANELES HONGOS	327 (P-185)
PANELES NEMATODOS	375 (P-233)

P-175**PROTECCIÓN PARCIAL FRENTE A PLUM POX VIRUS (PPV) INDUCIDO POR TRATAMIENTOS CON BENZOTIODIAZOL Y ÁCIDO L-2-OXOTIAZOLIDINA-4-CARBOXILICO EN PLANTAS DE GUISANTE**

Clemente-Moreno, M.J., Díaz-Vivancos, P., Barba-Espín, G., Rodríguez, J.R. y Hernández, J.A.

Departamento de Mejora Vegetal. CEBAS-CSIC. P.O. Box 164, 30100 Espinardo-Murcia, Spain. E-mail: jahernan@cebas.csic.es

Se ha estudiado el efecto de los tratamientos con benzotiodiazol (BTH) y ácido L-2-oxotiazolidina-4-carboxílico (OTC) sobre la infección por PPV y sobre el metabolismo antioxidativo de plantas de guisante a nivel subcelular. La infección por PPV producía un 20 % de reducción en el peso fresco de la parte aérea. El pre-tratamiento de las plantas con OTC o BTH producía una protección parcial frente a la infección por PPV, medido como el porcentaje de hojas que presentaban síntomas. Sin embargo, estos tratamientos no reducían significativamente el contenido viral. La infección por PPV producía un estrés oxidativo, tal y como se deducía de los aumentos de peroxidación lipídica y oxidación de proteínas en las fracciones solubles y en cloroplastos. En hojas de plantas no infectadas el tratamiento con OTC incrementó los niveles de glutatión reducido (GSH) y el glutatión total, así como el estado redox del mismo. En hojas sintomáticas de plantas infectadas se producía un acumulo de glutatión oxidado (GSSG), y un aumento similar se observó en hojas asintomáticas de plantas infectadas no tratadas. Sin embargo, no se observaron cambios en los niveles de GSSG en hojas asintomáticas de plantas infectadas tratadas con OTC o BTH, y, por lo tanto, estas hojas presentaron un mayor estado redox de glutatión que las hojas sintomáticas. Los niveles de enzimas antioxidantes de fracción soluble y cloroplastos de hojas de guisante presentaron cambios por efecto de los tratamientos. Se observó un aumento en los mecanismos antioxidantes, tales como las enzimas relacionadas con GSH (DHAR, GR y G6PDH), así como en SOD, APX y POX, que podría tener una función reduciendo la severidad de los síntomas de Sharka en hojas de guisante.

Este trabajo ha sido financiado con los proyectos 05571/PI/07 (Fundación Séneca, Agencia de Ciencia y Tecnología de la Región de Murcia) y AGL 2006-01743/AGR (CICYT).

P-176

ESTUDIO DEL METABOLISMO ANTIOXIDATIVO EN PLANTAS IN VITRO DE MELOCOTONERO GF305 EN RESPUESTA AL PLUM POX VIRUS (PPV): EFECTO DE LOS TRATAMIENTOS CON BTH Y OTC

Clemente-Moreno, M.J., Piqueras, A., Martínez-Gómez, P. y Hernández, J.A.

Departamento de Mejora Vegetal, CEBAS-CSIC. P.O. Box 164, 30100 Espinardo-Murcia, Spain. ¹E-mail: mjcmoreno@cebas.csic.es

En este estudio se han establecido en primer lugar cultivos micropropagados a partir de plantas de melocotonero GF305 controles e infectados con Plum pox virus (PPV, Sharka), patrón muy susceptible a este virus y ampliamente utilizado como indicador del mismo. Las plantas infectadas se enraizaron y aclimataron a condiciones *ex vitro* y en todos los pasos se comprobó mediante la técnica ELISA la presencia del virus. Por otro lado, se ha estudiado el efecto de los compuestos benzotiodiazol (BTH) y ácido L-2-oxotiazolidina-4-carboxílico (OTC) sobre el metabolismo antioxidativo y sobre la infección por PPV en estas plantas de melocotonero GF305 cultivadas *in vitro*.

Los resultados indicaron como los niveles de PPV se incrementaron de forma progresiva durante el proceso de aclimatación del GF305, alcanzando al final del mismo unos valores de Densidad Óptica del ELISA casi cuatro veces mayores a los de partida en plantas *in vitro* infectadas. Además, tanto BTH (5 y 10 μ M) como OTC (10, 20 y 50 μ M) estimularon el crecimiento de las plántulas de GF305, siendo el efecto más patente con el primer compuesto. En ausencia de tratamientos, las plantas infectadas presentaron unos niveles de glutatión reducido (GSH) casi tres veces menor que el de las plantas sanas. En plantas infectadas, los tratamientos con 10 y 20 μ M de OTC incrementaron los niveles de GSH, observándose una correlación negativa entre los niveles de GSH y los niveles de partículas virales. El efecto de los tratamientos con BTH y OTC sobre las enzimas antioxidantes y sobre la infección por PPV en plantas *in vitro* de melocotonero GF305 será discutido.

A título de conclusión podemos indicar como estos resultados preliminares indicaron: 1) que el material *in vitro* infectado con PPV puede ser usado como fuente de inóculo en invernadero de forma continuada, 2) que parece existir una correlación negativa entre niveles de GSH y contenido de partículas virales, 3) y que tanto OTC como BTH no producían protección frente a PPV si el virus ya está presente antes de aplicar los tratamientos.

Trabajo financiado por el proyecto AGL 2006-01743/AGR (CICYT, MEC).

P-177

CARACTERIZACIÓN DE LA RESISTENCIA A LA ENFERMEDAD DEL RIZADO AMARILLO DEL TOMATE (TYLCD) ENCONTRADA EN DOS ENTRADAS DE *Solanum habrochaites*

Tomás, D.M.¹, Fernández-Muñoz, R.², Abad, J.³ y Moriones, E.¹

¹Laboratorio de Virología, ²Departamento de Mejora Vegetal, Estación Experimental "La Mayora", CSIC, 29750 Algarrobo-Costa, Málaga.

³Zeta-Seeds S.L., 04710 Sta. María del Águila, Almería.

En este estudio se ha realizado un escrutinio para resistencia a la enfermedad del rizado amarillo del tomate (tomato yellow leaf curl disease, TYLCD) en una colección de 111 entradas del banco de germoplasma de la Estación Experimental La Mayora pertenecientes a varias especies silvestres emparentadas con el tomate cultivado. Se observó su comportamiento en condiciones de muy alta presión de infección natural y se seleccionaron 10 entradas que mostraron resistencia (sin observarse síntomas ni acumulación viral mediante hibridación molecular) para ser evaluadas en condiciones experimentales mediante agroinoculación con la cepa IL de *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV-IL). Las entradas EELM-388 y EELM-889 de la especie *S. habrochaites* mostraron un comportamiento homogéneamente resistente que se repitió al ser sometidas a inoculación de TYLCV-IL por medio de *B. tabaci* tanto en baja (30 moscas virulíferas por planta, 48 horas) o alta (1000 moscas virulíferas por planta, 7 días) presión de inóculo, así a condiciones de infección natural en época de máximo riesgo de infección viral. En ningún caso se observaron síntomas de TYLCD ni presencia de virus en las plantas sometidas a infección. Mediante inoculación por injerto sobre patrones susceptibles de *S. lycopersicum* infectados con TYLCV-IL no se observaron síntomas asociados a TYLCD en ninguna de las plantas, sin embargo se detectó acumulación viral en todas las plantas injertadas, por lo que ambas entradas son resistentes pero no inmunes a la enfermedad. Se evaluó el rango de la resistencia frente a las diferentes variantes virales asociadas con TYLCD descritas en España mediante agroinoculación, observándose resistencia frente a TYLCV-IL y *Tomato yellow leaf curl Axarquía virus* (TYLCAxV) y observándose tolerancia (no síntomas pero acumulación viral como la de un tomate susceptible) frente a *Tomato yellow leaf curl Sardinia virus* (TYLCSV), la cepa Mld de TYLCV y *Tomato yellow leaf curl Málaga virus* (TYLCMaIV). Se obtuvo una familia de generaciones del cruce de EELM-889 con el cultivar susceptible 'Moneymaker' que se agroinocularon con TYLCV-IL. La resistencia era dominante pues todas las plantas del F₁ se comportaron como las del parental resistente. Las segregaciones observadas se ajustaron a las 13:3 (F₂) y 1:1 (retrocruce hacia el parental susceptible) esperables para un gen dominante y un gen recesivo independientes.

P-178

CARACTERIZACIÓN DE LA RESISTENCIA A *VERTICILLIUM* SPP. DE VARIETADES DE FRESA Y DESARROLLO DE UN MÉTODO SENCILLO Y FIABLE DE DETECCIÓN DE *VERTICILLIUM* SPP. EN FRESA

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

Departamento de Protección Vegetal, CIT-INIA, Carretera de La Coruña 7,500, 28040 Madrid. E-mail: ilarena@inia.es

España es el principal productor de fresa-fresón (*Fragaria ananassa* Duch.) en Europa y el tercero del mundo tras China y Estados Unidos. La marchitez causada por *Verticillium* spp en plantas de fresa es una de la enfermedades que mayores pérdidas provoca en la producción de planta. El control de esta enfermedad se ha realizado mediante la aplicación de bromuro de metilo, prohibido en la UE el 1 de enero de 2005. Esto nos lleva a la urgente necesidad de encontrar otras alternativas como el uso de variedades resistentes y desarrollo de métodos de detección rápidos, sensibles y específicos, que nos permitan trabajar con material vegetal libre de patógenos.

Debido a ello nos planteamos realizar un estudio de caracterización de variedades comerciales e históricas de fresa frente a la infección por *Verticillium* spp. en cámara de cultivo. Las variedades suministradas por el grupo del IFAPA-CIFA (Churriana) fueron: Camarosa, Candonga, Aguedilla y Ventana (comerciales), Sieger, Deutsch Evern y Africa (históricas), Carisma (control susceptible) y Pandora (control resistente). Estas variedades una vez aclimatadas se inocularon con el patógeno (*V. dahliae* y/o *V. albo-atrum* de distinto origen y virulencia) y se evaluaron durante 8 semanas (10 plantas/selección e inóculo). Al finalizar el ensayo se confirma la presencia/ausencia de *Verticillium* spp. en todas las plantas. Las variedades históricas resultaron ser más resistentes a la infección del patógeno que las comerciales.

Para detectar y cuantificar *Verticillium* spp. en plantas de fresa se utilizó la PCR en tiempo real, diseñándose tres parejas de cebadores. En una primera aproximación la detección de los amplificados se hizo utilizando como marcador de fluorescencia SYBR Green. Estas amplificaciones nos permitieron seleccionar una única pareja de cebadores como la más específica y sensible en la detección del patógeno: ILV132-380F/ILV132-454R. Se mejoró la técnica empleando una sonda TaqMan®. A partir de las suspensiones de conidias de *V. dahliae* se alcanzaron sensibilidades de detección de 10 conidias por ml. La eficiencia de la reacción de PCR en tiempo real fue siempre superior al 80 % con coeficientes de regresión (R^2) cercanos al 0.99. Actualmente se está procediendo a la cuantificación del patógeno en material vegetal sintomático.

P-179

USO DE CULTIVOS BORDE O ASOCIADOS PARA EL CONTROL DE VIRUS NO PERSISTENTES EN PATATA (PVY) Y ALUBIAS (BCMV)

Cabaleiro, C.¹, Marnotes, S.¹, Couceiro, C., Martínez, M.A.¹, Lastra, B., Martín, B.¹, García, L. y Alvarez, S.²

¹Escola Politécnica Superior, Campus Universitario s/n 27002 Lugo.

²Instituto do Campo – INORDE, Xinzo de Limia, Ourense.

La producción de material de propagación libre de virus de algunos cultivos presenta problemas que se resuelven de diferente modo en función del cultivo y la transmisión de los virus implicados. Los virus de transmisión no persistente son los que presentan, en general, mayores dificultades, sobre todo si además se transmiten por semilla. Los cultivos borde y cultivos asociados pueden contribuir a limitar la transmisión de esos virus.

El PVY (*Potato Virus Y*) es el virus con mayor presencia en los cultivos de patata y el que mayores problemas presenta en la producción de patata certificada, reiniciada recientemente en algunas zonas de Galicia. Se plantearon ensayos con la variedad Kennebec, en 2002 y en 2004, en la finca experimental del “Instituto do Campo” en Xinzo de Limia (Ourense). En 2002 se utilizaron como bordes soja y maíz y en 2004 exclusivamente maíz. En 2002, con siembra muy tardía y un pico de pulgón en Agosto, el efecto borde no fue significativo ni para maíz ni para soja frente al suelo labrado y en torno a un 40% de tubérculos resultaron infectados con PVY; sin embargo, en 2004, el borde de maíz permitió conseguir tubérculos con menos del 10% de PVY frente a cerca de un 30% en la parcela con el borde labrado.

El virus del mosaico común de la judía (BCMV) está presente en al menos la mitad de los lotes analizados de toda la zona de producción de “Fabes de Lourenzá” (Lugo); en 2005 se detectó en el 21% de las semillas analizadas, con lotes con BCMV en más del 50% de las semillas. A finales de 2006 se hizo un muestreo en la zona de Monfero (A Coruña) para evaluar la hipótesis de que el cultivo tradicional asociado de “fabes” y maíz podría tener un efecto similar a los bordes de maíz para el PVY y de ese modo conseguir semilla con menores niveles de BCMV. El muestreo parecía apoyar esa hipótesis por lo que se diseñó un ensayo para confirmar la efectividad de la medida, sembrando plántulas libres de virus dentro y fuera de una parcela de maíz. A pesar de la climatología adversa y de la presencia de poblaciones anormalmente altas de pulgón en 2007, el cultivo asociado dio lugar a plantas con presencia significativamente menor de BCMV por lo que se estudiará el uso de esta práctica para la obtención de semilla de calidad.

P-180**EVOLUCIÓN DEL VIRUS DEL MOSAICO ENANIZANTE DEL MAÍZ (MDMV) EN CONDICIONES DE ALTA Y BAJA PRESIÓN SELECTIVA**

Alonso-Dueñas, N., Ardanuy, A y Achón, M.A.

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

El virus del mosaico enanizante del maíz (*Maize dwarf mosaic virus*, MDMV) es el virus de maíz más difundido, y endémico en el Valle del Ebro. Las estrategias de control de este virus se centran en el uso de genotipos resistentes, pero las fuentes de resistencia en maíz y otras especies relacionadas son escasas. El uso de estas fuentes de resistencia u otras derivadas del propio virus requieren una caracterización y estimación de la durabilidad de la resistencia frente a la evolución temporal del virus. La presión selectiva del hospedador juega un papel significativo en la estructura y evolución de MDMV en España. Este estudio analiza la evolución de cuatro haplotipos de MDMV después de transmisiones seriadas en dos líneas puras de maíz (susceptible y tolerante). Los haplotipos de MDMV se obtuvieron de maíz, y de su reservorio perenne (*Sorghum halepense*), y se encuentran en la población en frecuencias altas e intermedias. La evolución de estos haplotipos se ha analizado biológica y molecularmente. Nuestros resultados indican que la multiplicación en la línea tolerante favorece la emergencia de haplotipos más virulentos, y que los haplotipos obtenidos de *S.halepense* son más estables que los obtenidos de maíz. También se ha observado una mayor estabilidad en el gen del factor de transmisión que en el gen de la proteína de cubierta.

P-181

ESTUDIO Y CARACTERIZACIÓN DE *Burkholderia gladioli* COMO POSIBLE RIZOBACTERIA PROMOTORA DEL CRECIMIENTO VEGETAL (PLANT GROWTH PROMOTING RHIZOBACTERIA, PGPR)

Sacristán, G.¹, Reguera, J.I.¹, López-Robles, J.² y Olalla, C.²

¹Áreas de Microbiología y ²Edafología y Química Agrícola. Facultad de Ciencias. Universidad de Burgos. Plaza de Misael Bañuelos s/n 09001 Burgos. E-mail: djlopez@ubu.es

El empleo de rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (Plant Growth Promoting Rhizobacteria, PGPR) surge de la necesidad de buscar técnicas agrícolas viables alternativas a las tradicionales, ya que éstas, en ocasiones, resultan incompatibles con un modelo de agricultura sostenible. Entre otras aplicaciones, se han empleado en el control biológico de numerosos fitopatógenos.

En el presente trabajo de investigación se han estudiado, caracterizado y valorado bacterias rizosféricas en tres cultivos vegetales. La cepa objeto de estudio había demostrado presentar capacidad de biocontrol frente a varios patógenos vegetales. Se ha estudiado la interacción existente microorganismo-planta, valorándose la capacidad bioestimuladora que inducían estas PGPR cuando se inoculaban en remolacha, calabaza y tomate. También se realizaron pruebas de caracterización enzimáticas (Api Zym, Biomérieux), así como tests de identificación, como BBL CristalTM Identification Systems (Becton Dickinson), Kliger y S.I.M.

Los tres cultivos vegetales mejoraron con la inoculación bacteriana, incrementándose los valores de biomasa y longitud totales, aéreas y radicales, respecto a los ensayos testigo. Los resultados de las pruebas realizadas de caracterización microbiana confirmaron que la bacteria empleada en los ensayos era *Burkholderia gladioli*.

Por tanto, *Burkholderia gladioli* puede considerarse como una PGPR en los cultivos vegetales ensayados. Se ha de continuar investigando en los mecanismos internos que intervienen en los procesos de interacción PGPR-planta.

P-182

**EFFECTIVIDAD DEL CONTROL QUÍMICO EN EL TRATAMIENTO DEL
CHANCRO BACTERIANO DEL TOMATE**

De León, L.¹, Siverio, F.², López, M.M.³ y Rodríguez, A.^{1,4}

¹Departamento de Protección Vegetal. Instituto Canario de Investigaciones Agrarias (ICIA). Apdo. 60, 38200 La Laguna, Tenerife, Islas Canarias

²Laboratorio de Sanidad Vegetal de la Consejería de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentación del Gobierno de Canarias. Tenerife, Islas Canarias

³Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA). Carretera de Moncada a Náquera Km 4.5, 46113 Moncada, Valencia

⁴Departamento de Microbiología y Biología Celular. Facultad de Farmacia. Universidad de La Laguna, 38207 La Laguna, Tenerife, Islas Canarias

La información disponible sobre el uso de sustancias antibacterianas para el control del chancro bacteriano del tomate producido por *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* es escasa. El objetivo de este trabajo ha sido valorar la efectividad de varias sustancias antimicrobianas, previamente ensayadas *in vitro*, para el control de esta enfermedad en plantas de tomate inoculadas por pinchazo y pulverización. Se evaluaron los tratamientos con Caldo Bordelés (sulfato de cobre), Beltanol-L (8-hydroxy-quinolina, Probelte S.A.), Kasumin (kasugamicina, Lainco S.A.), estreptomycin, Antibak RZ (combinación de cobre-zinc, Stoller Iberica S.L.), Param (menadiona sodio bisulfito, Implá S.A.) y Orthopol (oleato potásico, PBCF S.L.). Además se ensayaron las combinaciones de Beltanol-L + Caldo Bordelés, Beltanol-L + Antibak RZ, estreptomycin + Antibak RZ y estreptomycin + Orthopol a mitad de concentración.

En dos ensayos independientes realizados sobre plantas de tomate inoculadas por pulverización, los tratamientos más efectivos respecto al control no tratado (75,1% y 59,6% de hojas sintomáticas) fueron 8-hydroxy-quinolina + sulfato de cobre (2,4% y 11,9%) y sulfato de cobre (7,3 % y 18,1%). Estos tratamientos también redujeron significativamente los daños superficiales en los tallos. En las plantas inoculadas por pinchazo se desarrollaron rápidamente los síntomas característicos de una infección sistémica y ninguno de los tratamientos controló de forma efectiva la enfermedad.

La combinación 8-hidroxiquinolina + sulfato de cobre produjo un efecto sinérgico que podría ayudar a prevenir la dispersión de la bacteria y reducir el riesgo de infección en los cultivos disminuyendo la cantidad de cobre aplicado.

P-183**DISPERSIÓN Y APLICACIÓN A NIVEL DE MESOESCALA DE UN AGENTE DE BIOCONTROL DEL FUEGO BACTERIANO**

Cabrefiga, J.¹, Badosa, E.¹, Bonaterra, A.¹, Francés, J.¹, Cambra, M.², Sola, D.³ y Montesinos, E.¹

¹Instituto de Tecnología Agroalimentaria-CIDSAV-CeRTA, Universidad de Girona, Campus Montilivi, 17071, Girona, España; ²Centro de Protección Vegetal, Diputación General de Aragón; ³Sanidad Vegetal, Gobierno de Navarra.

La autorización de agentes de control biológico para uso agrícola en la Unión Europea como productos fitosanitarios a base de microorganismos requiere estudios de trazabilidad y dispersión del producto microbiano. En muchos casos se requieren datos sobre la colonización, supervivencia y dispersión de los agentes de biocontrol, así como su efecto en la microbiota autóctona en condiciones reales de cultivo.

Para llevar a cabo este estudio utilizamos un agente de biocontrol del fuego bacteriano, la *Pseudomonas fluorescens* EPS62e, que presenta la capacidad de colonizar y sobrevivir en frutos inmaduros, hojas y flores de manzano y peral, y de controlar las infecciones producidas por *E. amylovora* en estos órganos cuando es aplicada en tratamientos preventivos. Los niveles de control observados son similares a los del control químico usando derivados de cobre o antibióticos. Además, se dispone de un método cuantitativo específico de análisis de la cepa EPS62e mediante PCR en tiempo real que permite realizar estudios de trazabilidad, colonización e impacto ambiental, y de métodos para su preparación mediante deshidratación (liofilización) que tras reconstitución del preparado permiten alargar la vida útil del producto formulado.

Se realizaron diferentes ensayos de supervivencia de la cepa EPS62e y su impacto sobre la microbiota autóctona, tras aplicaciones en varias parcelas experimentales en fincas comerciales situadas en distintas zonas agroclimáticas de Navarra y Aragón afectadas por fuego bacteriano, así como en una finca experimental en Catalunya.

Finalmente, se realizó una aplicación de la cepa EPS62e a nivel de mesoescala (media hectárea) para determinar su supervivencia y dispersión, así como el impacto sobre la microbiota autóctona en condiciones reales de cultivo. En este ensayo también se evaluó el impacto de los tratamientos con derivados de cobre sobre la supervivencia y la dispersión de la cepa.

P-184

ESTRATEGIAS PARA LA PRODUCCIÓN DE PÉPTIDOS ANTIBACTERIANOS PARA EL CONTROL DE BACTERIOSIS MEDIANTE LA UTILIZACIÓN DE PLANTAS COMO BIOFACTORÍAS

Montero, M.¹, Montesinos, L.^{1,2}, Moiset, G.¹, Nadal, A.¹, Pla, M.¹, Campo, S.², Coca, M.², San Segundo, B.², Badosa, E.¹ y Montesinos, E.¹

¹CIDSAV, Tecnología de Alimentos, Universitat de Girona, LIPPSO;

²Laboratorio de Genética Molecular de Plantas, Consorcio CSIC-IRTA.

Los péptidos antimicrobianos (PAM) producidos por las plantas y animales, son componentes del mecanismo de defensa contra un gran número patógenos. Los PAM tienen un amplio espectro antimicrobiano siendo de gran interés en el campo de la agricultura. Sin embargo su utilización como bactericidas requiere la producción en grandes cantidades. El uso de plantas como biofactorias representa una alternativa a la síntesis química, debido a su potencial para producir grandes cantidades de biomasa, la capacidad de acumulación de proteínas y producción a bajo coste. En trabajos iniciales se expresó la Cecropina A (CecA) en planta de arroz demostrando que el retículo endoplasmático (RE) es capaz de acumular más cantidad de proteína que el apoplasto; y de protegerla frente a proteasas intracelulares. La CecA ha servido como modelo para estudiar el modo de acción de los PAM. En un estudio exhaustivo de una gran variedad de péptidos derivados de CecA-Melitina, se obtuvieron péptidos mejorados mediante química combinatoria. Se identificó BP100 con una actividad antibacteriana contra tres bacterias fitopatógenas (*E. amylovora*, *X. vesicatoria* y *P. syringae*) que hasta el momento sólo se pueden combatir mediante antibióticos y derivados cúpricos. BP100 presenta ventajas como menor actividad hemolítica, mayor estabilidad frente proteasas activas *in planta* y muy baja toxicidad en ratón. Estas características hacen dicho péptido interesante desde el punto de vista fitosanitario posibilitando su expresión heteróloga para la producción masiva en arroz. La síntesis de PAMs como el BP100 en plantas presenta retos importantes a superar como bajos niveles de expresión, pérdidas de estabilidad y actividad debido a proteasas, necesidad de un tamaño mínimo expresable (>20aa) y posible toxicidad para la planta. Para superar estos retos se han diseñado estrategias para expresar trímeros y dímeros de BP100 (>20aa) separando los monómeros con una secuencia puente neutra presente en la CecA que permite el correcto ensamblamiento y funcionamiento del péptido. Una aproximación se basa en la expresión constitutiva y direccionada del péptido para su retención y acumulación en el RE. Asimismo se contempla la acumulación y retención del péptido en el endospermo de la semilla. Para disminuir el tiempo y el coste del procesamiento del péptido se ha diseñado una construcción quimérica oleosina-péptido para su expresión en los cuerpos oleicos de la semilla.

P-185**DIFERENCIAS EN LA SUSCEPTIBILIDAD DE MELOCOTONES
MADUROS E INMADUROS A *Monilinia laxa* spp.**

Villarino, M., Melgarejo, P. y De Cal, A.

INIA. Carretera de La Coruña km 7. 28040 Madrid. E-mail: cal@inia.es

Monilinia laxa (Aderhold y Ruhland) Honey es el principal agente causal en España de la podredumbre parda del melocotonero, que es especialmente grave en su aparición en poscosecha y sobre todo en los puntos de venta. El grado de susceptibilidad y resistencia del melocotón a la infección con *M. laxa* varía con el grado de madurez del fruto, el ciclo de cultivo o el tipo de cultivar, ya que el patógeno se desarrolla sobre los frutos a lo largo del cultivo. No hay cultivares que sean inmunes a la infección, sólo existen algunos parcialmente tolerantes, siendo la mayoría de cultivares comerciales susceptibles o muy susceptibles a la podredumbre parda. Los frutos inmaduros son más resistentes a la podredumbre que los maduros. Entre las posibles causas que se barajan como responsables de esta mayor resistencia se encuentran la resistencia mecánica a la penetración, o la presencia en los frutos inmaduros de sustancias inhibitorias frente al patógeno.

El objetivo de este trabajo es identificar la diferente susceptibilidad a lo largo del cultivo de tres cultivares de melocotón y su relación con la presencia de sustancias inhibitorias. Para ello se recogieron mensualmente 30 frutos de un cultivar desde el mes de Mayo a Septiembre en 2006 y 30 frutos de cada cultivar cada quince días durante los meses de Julio, Agosto y Septiembre de 2007. De las 30 muestras de cada fecha y cultivar, 10 se pulverizaron con una suspensión de *M. laxa* 10^6 conidias/ml y se incubaron 7 días a 22°C y 100% humedad y otras 10 se pulverizaron con agua estéril antes de la incubación. Las otras 10 muestras no se pulverizaron con nada y no se incubaron. Se evaluó la podredumbre tras la incubación y de cada muestra se obtuvo la piel y la pulpa, que se congeló individualmente a -80°C hasta su análisis. La cuantificación e identificación de las sustancias inhibitorias del patógeno se analizó mediante HPLC (1100 Quaternary Pump 1) a 510, 340 y 280nm.

Sólo se produjo infección en las muestras recogidas a finales de Julio, y durante Agosto y Septiembre que habían sido pulverizadas con una suspensión de *M. laxa*. No se produjo infección en las muestras pulverizadas con agua o sin pulverizar. Se ha identificado una mayor presencia ($p=0.05$) de una sustancia relacionada con el ácido p-cumárico en los frutos inmaduros. Se está procediendo a la purificación y caracterización de esta sustancia y el estudio de sus efectos sobre el patógeno.

P-186

EVALUACIÓN DEL USO COMBINADO DE AISLADOS BACTERIANOS Y *TRICHODERMA* PARA SU APLICACIÓN AL CONTROL DE LA PODREDUMBRE BLANCA RADICULAR

Martín-Pérez, R.¹, Ruano, D.², Barceló, A.³, Cazorla, F.M.¹, López-Herrera, C.² y de Vicente, A.¹

¹Departamento de Microbiología, Facultad de Ciencias, Campus de Teatinos s/n, 29071-Málaga; E-mail: cazorla@uma.es; ²Instituto de Agricultura Sostenible (C.S.I.C.), Finca Alameda del Obispo, 14080-Córdoba; ³ IFAPA Churriana, Cortijo de la Cruz 29140-Málaga

Estudios recientes sugieren que la utilización conjunta de agentes de control biológico con distinto modo de acción, como bacterias y hongos como *Trichoderma*, puede incrementar su efecto de biocontrol en el control de enfermedades de plantas. En el estudio del control biológico de la podredumbre blanca (PB) radicular del aguacate, se están ensayando distintos microorganismos con efecto protector frente a su agente causal *Rosellinia necatrix*.

En este trabajo se evalúa la compatibilidad de distintos aislados de *Trichoderma* sp. y de bacterias cuya actividad de biocontrol frente a *R. necatrix* ha sido previamente demostrada individualmente. Se realizaron cuatro ensayos *in vitro*, para seleccionar combinaciones de interés para posteriores ensayos de biocontrol en plantas de aguacate. En estos ensayos se evaluó, mediante cultivos duales, la compatibilidad de 21 aislados bacterianos frente a 22 filtrados de cultivos de *Trichoderma* y viceversa.

Tras una selección inicial de los microorganismos incluidos en estos ensayos, se pasó a un análisis más detallado de la compatibilidad entre 3 aislados de *Trichoderma* (*T. atroviride* y *T. virens*) y 4 bacterianos de los géneros *Pseudomonas* y *Bacillus*, todos ellos aislados de la rizosfera de aguacate y que individualmente presentaron actividad de biocontrol en ensayos de invernadero frente a patógenos fúngicos radiculares.

De esta manera se han seleccionado seis combinaciones *Trichoderma*/bacteria, que no mostraron elevada actividad antagonista entre ellos *in vitro* y se han considerado inicialmente compatibles. Estas combinaciones se están ensayando en plantas adultas de aguacate inoculadas artificialmente con *R. necatrix*, donde se evaluará la actividad de estas combinaciones en el control de la PB con relación a aplicaciones individuales de estos mismos microorganismos. Además se está ensayando *in vitro* la actividad antagonista de mezclas de filtrados bacterianos y de *Trichoderma* frente a *R. necatrix*, en comparación con la actividad de filtrados individuales.

P-187

EVALUACIÓN DE FUNGICIDAS PARA EL CONTROL DE LA MOLE HÚMEDA (*Mycogone perniciosa*) DEL CHAMPIÑÓN

Gea, F.J.¹, Lainez, C.² y Navarro, M.J.¹

¹Centro de Investigación, Experimentación y Servicios del Champiñón (CIES), 16220 Quintanar del Rey (Cuenca); ²I.E.S. Amparo Sanz. 02001 Albacete. E-mail: fjgea.cies@dipucuenca.es

La masiva utilización del fungicida procloraz en los cultivos de champiñón desde finales de los años ochenta para luchar contra la enfermedad de la mole seca, ocasionada por *Verticillium fungicola*, supuso la práctica desaparición de otras enfermedades de origen fúngico, como la mole húmeda. No obstante, desde hace varios años se viene observando una mayor presencia de mole húmeda en los cultivos de champiñón españoles, aunque no de manera generalizada sino más bien puntual. Esta enfermedad no llega a causar daños económicos tan elevados como los ocasionados por la mole seca, pero en algunas situaciones puede arruinar la producción del ciclo de cultivo.

La infección del champiñón con *Mycogone perniciosa* en una etapa muy temprana de su desarrollo da lugar al síntoma más característico de la mole húmeda, como es la formación de masas deformes de tejido del carpóforo, de aspecto esclerodermoide, que pueden llegar a alcanzar los 10 cm de diámetro. De forma general, esta enfermedad se manifiesta sobre todo en la primera y segunda floradas

Se ha evaluado la eficacia *in vitro* y en cultivo *in vivo* de cinco fungicidas frente a varios aislados de *Mycogone perniciosa*. Dos fungicidas están autorizados en España para cultivo de champiñón (iprodiona, procloraz) y los otros tres están incluidos en el Anexo I del Registro Único Europeo (carbendazima, metil-tiofanato, tiabendazol).

La sensibilidad de cada aislado a los fungicidas ensayados se estimó mediante el cálculo de la ED₅₀ (mg l⁻¹ de materia activa que inhiben el 50% del crecimiento del micelio). En este sentido, el procloraz obtuvo el mejor resultado (ED₅₀ = 0,002-0,022 mg l⁻¹), mientras que la iprodiona se situó en el extremo contrario, con valores más elevados (ED₅₀ = 1,212-3,805 mg l⁻¹).

La eficacia de los fungicidas, en condiciones de cultivo controladas, se valoró realizando una inoculación con *M. perniciosa* (10⁶ clamidosporas m⁻²), y aplicando los fungicidas en riego, antes o después de la inoculación. Tanto el metil-tiofanato como el tiabendazol, en ambos riegos, y el procloraz, en el riego posterior a la inoculación, presentaron una eficacia más elevada frente al patógeno.

P-188

**CONTROL DE *Verticillium fungicola* CON TÉ DE COMPOST
ELABORADO CON SUSTRATOS DEL CULTIVO DE CHAMPIÑÓN**

Gea, F.J.¹, Navarro, M.J.¹ y Tello, J.C.²

¹Centro de Investigación, Experimentación y Servicios del Champiñón (CIES), 16220 Quintanar del Rey (Cuenca); ²Departamento de Producción Vegetal, Universidad de Almería, Cañada de San Urbano s/n, 04120 Almería. E-mail: fjgea.cies@dipucuenca.es

Verticillium fungicola es el agente causal de la enfermedad de la mole seca, la más grave de los cultivos de champiñón españoles. Este hongo micoparásito ocasiona elevadas pérdidas de cosecha, ya que deforma y mancha los cuerpos fructíferos. Los métodos de control habitualmente utilizados consisten en la aplicación de fungicidas (procloraz) y de estrictas medidas de higiene. Sin embargo, algunos datos confirman que la sensibilidad de *V. fungicola* al procloraz disminuye gradualmente. Las estrategias de control de la enfermedad pasan por reforzar las prácticas de higiene y por buscar nuevos métodos de control. En este sentido, la utilización de té de compost de residuos agrícolas se sitúa entre los métodos de biocontrol sugeridos como alternativa a los fungicidas en el control de hongos fitopatógenos foliares.

Se han realizado ensayos *in vitro* para valorar la eficacia de los té de compost de tres sustratos de cultivo de champiñón en el control de *V. fungicola*. Se ha utilizado una mezcla compost:agua en relación 1:4 (p/v), con un periodo de extracción de 1 día. Los té de compost obtenidos (aireados y no aireados) se han ensayado sin tratamiento previo, añadiendo el 10 o 20% al medio agarizado. Se usaron dos aislados de *V. fungicola* y dos controles, uno con agua estéril y otro con procloraz. Los resultados mostraron una inhibición total del crecimiento del micelio de *V. fungicola* cuando se añadió té de compost al medio agarizado, mientras que sí se registró crecimiento en el medio con procloraz.

La eficacia de los té de compost, en condiciones de cultivo controladas, se ha valorado inoculando con *V. fungicola* (10^6 conidios ml⁻¹, 120 ml m⁻²), y aplicando estos té de compost en riego. Se han realizado 6 repeticiones y tres controles: uno puro, otro inoculado, y otro inoculado y con procloraz.

Los resultados obtenidos en primera flor con algunos de los tratamientos con té de compost se sitúan próximos a los valores registrados con procloraz, que han sido algo mejores. En cambio, en la segunda flor, donde los daños ocasionados por la enfermedad fueron más graves, la mayoría de los tratamientos con té de compost obtuvieron mejores datos que con procloraz. Estos resultados permiten pensar en la posibilidad de elaborar una estrategia de control biológico de la mole seca en los cultivos de champiñón.

P-189

EVALUACION DE LA EFICACIA DE DIFERENTES TRATAMIENTOS FUMIGANTES DEL SUELO PARA EL CONTROL DE HONGOS DE SUELO EN EL CULTIVO DE FRESA EN VIVEROS DE ALTURA.

Redondo, C.¹, Martínez-Treceño, A.², De Cal, A.¹ y Melgarejo, P.¹

¹Departamento de Protección Vegetal. INIA. Ctra. De La Coruña, km 7.500, 28040 Madrid. ²Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, Madrid, E-mail: melgar@inia.es

España es el principal productor europeo de plantones de fresa (*Fragaria ananassa* Duch.). Los hongos patógenos del suelo que suelen atacar a las plantas de viveros de fresa son *Verticillium* spp y *Phytophthora cactorum*. El control de estos patógenos se viene realizando mediante la aplicación de bromuro de metilo (BM). Sin embargo, este fumigante ha sido prohibido en 2005 (Reglamento CE nº 2037/2000) y se espera que en breve concluya la prórroga de uso (Usos críticos) a los viveros de fresa. El objetivo de este trabajo es evaluar varios fumigantes de suelo como posibles alternativas al bromuro de metilo en el control de patógenos de suelo en viveros de planta de fresa.

Desde 2003 a 2008 se ha estudiado el efecto de 18 fumigantes del suelo ensayados a diferentes concentraciones y métodos de aplicación en parcelas situadas en las provincias de Ávila, Segovia y Valladolid. Para ello, se han realizado dos experimentos por año situados en diferentes localidades y parcelas. Con un diseño en bloques al azar con cuatro repeticiones, se evaluó la eficacia de los tratamientos sobre las poblaciones fúngicas del suelo y sobre restos vegetales infectados artificialmente con los hongos patógenos.

Se comprobó la reducción cualitativa y cuantitativamente de las poblaciones fúngicas, tanto de los principales patógenos como del resto de microflora del suelo. Para ello, se determinaron las unidades formadoras de colonia por gramo de suelo seco, antes y después de los tratamientos, en medios generales y selectivos. Para comprobar la efectividad de los tratamientos sobre los agentes patógenos, se prepararon bolsas microporosas en las que se introdujeron cuellos de fresa artificialmente infectados con aislados de *P. cactorum* y *Verticillium dahliae*. Las bolsas se sellaban y se enterraban en cada una de las parcelas antes de la aplicación del tratamiento. Se evaluó la persistencia de los patógenos tras la aplicación de los fumigantes.

De los 17 fumigantes alternativos al BM aplicados durante los seis años de ensayos, al menos 10 reducen ($p < 0.05$) la población fúngica del suelo y la presencia de *P. cactorum* y *V. dahliae* en restos vegetales en igual medida que el BM, excepto en el caso de yoduro de metilo que no controla a *P. cactorum* sobre restos vegetales.

P-190**ESTABILIDAD Y PERSISTENCIA EN SUELO DEL AGENTE DE BIOCONTROL *Penicillium oxalicum***

Larena, I. y Melgarejo, P.

Departamento de Protección Vegetal, CIT-INIA, Carretera de La Coruña 7,500, 28040 Madrid. E-mail: melgar@inia.es

Para evaluar el impacto de aplicación de los agentes de biocontrol sobre cada ecosistema y los riesgos con él relacionados se requiere el conocimiento de su capacidad de supervivencia y colonización, así como su estabilidad genética. La cepa 212 de *P. oxalicum* (PO212) ha demostrado ser un prometedor agente de control biológico frente a diferentes enfermedades de plantas hortícolas.

El mantenimiento de la cepa antagonista es necesaria para tener una fuente segura de cepas fúngicas autenticadas. Por esto es importante evaluar la estabilidad genética de la cepa antagonista durante su producción en masa y mantenimiento de cultivos a largo plazo. La amplificación por PCR de las secuencias repetidas BOX y REP nos permitió comprobar que el PO212 se mantenía estable genéticamente tras 2 años de mantenimiento en glicerol a -20°C o en tubos de Agar patata dextrosa (APD) a 4°C, así como tras sucesivos repicados en placas de APD durante 2 años.

El efecto protector de muchos ACB está relacionado estrechamente con su capacidad de colonización de tal modo que la evaluación de su idoneidad tras su aplicación es crítico para la interpretación y predicción de su eficacia en el biocontrol. Se ha estudiado la colonización y supervivencia durante 6 meses de PO212 en 4 tipos de suelo no esterilizados de distinta procedencia en cámara de cultivo. En todos ellos se ha evaluado la densidad y viabilidad del agente de biocontrol en el suelo donde ha sido aplicado mediante el crecimiento en medio semiselectivo (PoIM) y se ha chequeado su identidad mediante PCR con los cebadores específicos para PO212 diseñados en nuestro laboratorio tanto desde colonias crecidas en el medio semiselectivo como desde el suelo. Este estudio muestra hasta el momento que el agente de biocontrol persiste hasta 60 días tras su aplicación en suelo siendo variable su supervivencia dependiendo del tipo del suelo.

Se discutirá la relación entre persistencia y supervivencia en los distintos tipos de suelo.

P-191**ESTUDIO DEL MODO DE ACCIÓN DEL AGENTE DE BIOCONTROL
*Penicillium oxalicum***

Sabuquillo, P., Cubero, J. y Melgarejo, P.

Dept. Protección Vegetal, INIA, Crtra. de la coruña km. 7, 28040 Madrid, E-mail: melgar@inia.es

Penicillium oxalicum (PO) es un hongo filamentoso utilizado como agente de biocontrol para el control de la fusariosis vascular de tomate causada por *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. Se sabe además que la respuesta de la planta al tratamiento es de forma sistémica pero el mecanismo de acción del agente de biocontrol aún no se conoce.

En este trabajo se ha evaluado la transcripción diferencial de proteínas de respuesta a patogénesis (PRs) en plantas tratadas con distintos formulados de PO. Estos análisis se realizaron mediante RT-PCR en tiempo real de los ARN totales extraídos de las plantas de tomate y utilizando cebadores diseñados para los genes correspondientes de proteínas PR y para la subunidad 18S del ARN ribosomal, este último usado como gen endógeno de referencia en los estudios de cuantificación relativa. Por un lado, se analizaron los ARN de las plantas de forma individual y en paralelo se realizó el mismo análisis de RT-PCR en tiempo real utilizando mezclas o "pools" de ARN de plantas sometidas al mismo tratamiento. Los resultados mostraron que a los siete días después del tratamiento con PO se producían diferencias significativas entre plantas tratadas y no tratadas con los diferentes formulados de PO tanto en el análisis de plantas individuales como en las mezclas de ARN.

Además de los estudios sobre transcripción diferencial de genes correspondientes a proteínas PR se mostrarán resultados obtenidos después de analizar las plantas tratadas con los distintos formulados de PO en relación a su capacidad para producir especies reactivas de oxígeno.

Los estudios realizados muestran que en el modo de acción de PO parece jugar un papel la resistencia sistémica adquirida (SAR) aunque no es descartable que existan otros fenómenos involucrados.

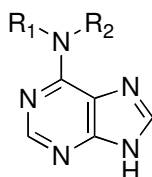
P-192

EFECTO FUNGICIDA DE ANÁLOGOS DE CITOQUININAS EN HONGOS PATÓGENOS FOLIARES

García-Raso, A.¹, Fiol, J.J.¹, Alberti, F.M.¹, Tasada, A.¹, Sibole, J.V.³, Cabot, C.³, Olmo, D.³, Reus, A.³ y Nieto, A.³

Departamentos de Química¹ y Biología². Universitat de les Illes Balears. Ctra Valldemossa km 7,5, 07122 Palma de Mallorca. Laboratorio de Sanidad Vegetal³. Conselleria d'Agricultura i Pesca, Govern Balear, Eusebi Estada, 145, 07009 Palma de Mallorca.

Se han preparado distintas series de N⁶-aminopurinas monosustituidas, disustituidas (análogos de citoquininas) y complejos citoquinina-Cu y se ha estudiado su efecto fungicida en dos hongos patógenos foliares: *Alternaria solani* y *Phytophthora infestans*. El crecimiento de las hifas se midió en función de las diferencias en densidad óptica de cultivos llevados a cabo en microplacas a 20 °C. En cada pocillo además de distintas concentraciones de citoquinina se añadieron 50 µl de PDB (x2) i 3.000 esporas hasta obtener un volumen final de 100 µl. La absorbancia se determinó a 600 nm con un lector de microplacas al comienzo del ensayo y a intervalos de 24 h durante 15 días. En el caso de *P. infestans* también se realizaron cultivos en placa suministrando las citoquininas en el Rye A.



Los análogos que presentaron una actividad fungicida más elevada fueron las aminopurinas monosustituidas (R_1 = cadena carbonada; R_2 =H) con una cadena lineal, aumentando su actividad a medida que lo hizo el número de carbonos de la cadena sustituyente.

De esta forma, las DL₅₀ y DL₁₀₀ correspondientes a la aminopurina (R_1 = n-propil; R_2 = H) fueron de 0,25 y >2 mM respectivamente, mientras que cuando se alargó hasta 9 carbonos (R_1 = n-nonil; R_2 = H), las DL₅₀ y DL₁₀₀ disminuyeron a 0,016 y 0,125 mM. La actividad de los análogos se mantuvo tanto si la cadena sustituyente es cíclica como cuando presenta ramificaciones. Por otra parte, las citoquininas monosustituidas que presentan un anillo aromático no poseen actividad fungicida a las concentraciones ensayadas, pero sí lo hicieron aquellas disustituidas que tienen un sustituyente lineal.

La formación de complejos con Cu también aumentó la actividad fungicida de los análogos, incremento que coincidió con el que se obtuvo al añadir la misma concentración de Cu (entre 0,07 y $1,7 \times 10^{-5}\%$) en forma de CuCl₂ a la correspondiente citoquinina.

Estos resultados forman parte de un estudio para seleccionar análogos de citoquininas como tratamiento preventivo frente a infecciones fúngicas.

P-193**UTILIDAD DE LA TERAPIA QUÍMICA EN EL CONTROL DE *Cryphonectria parasitica*.**

González-Varela, G. y González, A. J.

Laboratorio de Fitopatología. Servicio Regional de Investigación y Desarrollo Agroalimentario (SERIDA). Carretera de Oviedo s/n, 33300 Villaviciosa, Asturias. E-mail: ggonzalez@serida.org

El método de control más estudiado en el chancro del castaño es la lucha biológica, utilizando cepas hipovirulentas del hongo. En este trabajo se evalúa la posibilidad de contar con una alternativa química eficaz. El primer paso es el ensayo *in vitro* de fungicidas, que da una idea indirecta de la eficacia de un producto, posteriormente se estudia *in vivo* pues su valor en campo dependerá de otros muchos factores.

En trabajos previos se ensayaron *in vitro* diferentes productos fitosanitarios, con las siguientes materias activas (m.a.): captan 85%, carbendazima 50%, epoxiconazol 12,5%, azoxistrobin 25%, y las mezclas de folpet 32% + cimoxamilo 3% + ofurace 6%, carbendazima 20% + flutriafol 9,4% y flusilazol 0,5% + carbendazima 1%. Estos productos se añadieron al medio de cultivo agar de patata dextrosa (APD) siguiendo una progresión geométrica de 1 a 1.024 µg/ml. Se utilizaron aislamientos del hongo de distintas procedencias. La m.a. que mejor se comportó *in vitro* fue el epoxiconazol 12,5%, que consiguió inhibir el crecimiento del hongo a la más baja concentración ensayada mostrando además un efecto fungicida. La siguiente en eficacia fue la mezcla de carbendazima 20% + flutriafol 9,4%.

Se realizó un ensayo *in vivo*, sobre 126 plantas de castaño en maceta, utilizando las dos m.a. arriba mencionadas y la carbendazima 50% para ver su efecto respecto de la mezcla. Como inóculo se utilizó la cepa LPPAF-187 de la colección del SERIDA. Se aplicaron tres tipos de tratamientos, uno preventivo, por pulverización, nueve días antes de la inoculación; dos curativos, 19 días después de la inoculación, de los que uno fue por pulverización y otro por aplicación directa en la lesión utilizando un rodillo. Las dosis utilizadas fueron las máximas recomendadas por el fabricante. Para cada uno de los tratamientos se diseñaron bloques de catorce plantas (dos testigos sin inocular ni tratar, dos testigos inoculados pero no tratados, y diez plantas inoculadas y tratadas). Utilizando un bisturí se practicó una herida en la corteza, se inoculó con un cuarto de pastilla de APD extraída de una placa con el hongo en crecimiento activo, y se cerró la herida para evitar la desecación. Se han observado diferencias de actuación tanto entre los tratamientos como entre los productos. Este ensayo se va a repetir durante dos años consecutivos, lo que permitirá corroborar los resultados obtenidos y detectar posibles efectos negativos sobre las plantas. Por tanto, podemos concluir que existen productos eficaces contra *C. parasitica in vitro*, que también han mostrado cierta actividad frente al hongo *in vivo*.

P-194

RESPUESTA DE *Fusarium oxysporum*, *F. solani*, *F. anthophilum*, Y *F. moniliforme* (*sensu lato*) A INCREMENTOS EN LA TEMPERATURA DEL AGUA.

Pérez-Carrasco, F.J.¹, de Cara, M.¹, Sichel, C.², Santos, M.¹, Fernández-Ibáñez, P.² y Tello Marquina, J.C.¹

¹Dpto. Producción vegetal. Universidad de Almería. España; ²Plataforma Solar de Almería. CIEMAT. España.

Se ha evaluado la capacidad de multiplicación y supervivencia de 4 especies del género *Fusarium* de conocido interés fitopatológico y agronómico: *Fusarium oxysporum*, *F. solani*, *F. anthophilum* y *F. moniliforme* (*sensu lato*), expuestas a agua calentada a diferentes temperaturas durante periodos prolongados de tiempo. Las temperaturas ensayadas fueron: 25, 35, 45 y 55 °C. Se evaluó la supervivencia tras exposiciones continuas de: 1 minuto, 3 horas, 6 horas, 24 horas, 3 días, 7 días. Los experimentos se desarrollaron empleando tres botellas de vidrio de 250 mL (Schott, Alemania) por hongo y temperatura, que se enrasaban a 200 mL con agua destilada estéril y se introducían en una estufa microbiológica a la temperatura de ensayo 24 h antes de añadir el inóculo. Éste consistió en 10³ CFU/mL que contenían una mezcla de conidios, clamidosporas y fragmentos miceliares, dependiendo de la especie en cuestión. Transcurrido el tiempo de exposición, se tomaron tres muestras de 50 y 500 µL de cada una de las botellas, y se sembraron sobre medio de cultivo (agar malta acidificado) para proceder al conteo de las colonias tras un periodo de incubación en el laboratorio de 10 días. Ninguna de las especies estudiadas se vió afectada tras su permanencia en agua a 25 y 35 °C. A la temperatura de 45 °C se apreció un comportamiento idéntico para las 4 especies, consistente en una disminución progresiva de la supervivencia. Así, tras un minuto las densidades inoculadas se mantuvieron, tras 3 horas el control fue casi total, y a partir de 6 h de exposición murió la totalidad inoculada. Para 55 °C, sólo fue necesario poner en contacto el inóculo con el agua caliente. Ya en la primera medida (1 minuto de exposición) se observó una eliminación total de las poblaciones de *Fusarium*. Estos resultados nos aproximan al fundamento de técnicas de control de patógenos telúricos como la solarización o la desinfección de agua mediante fotocátalisis, en las que el agua sufre elevaciones cíclicas de temperatura, pudiéndose dar situaciones similares a las estudiadas en este trabajo.

P-195

CARACTERIZACIÓN DE LA MICROBIOTA PRESENTE EN SUELOS MODIFICADOS POR ENMIENDAS ORGÁNICAS EN EL CULTIVO DEL AGUACATE

Bonilla, N.¹, Torés, J.A.², Hermoso, J.M.², González, J.², Cazorla, F.M.¹ y de Vicente, A.¹

¹Departamento de Microbiología, Facultad de Ciencias, Universidad de Málaga. Campus de Teatinos s/n, 29071 Málaga. E-mail: fitomicro@uma.es

²Estación Experimental "La Mayora" (CSIC) 29750 Algarrobo Costa, Málaga.

Las podredumbres radicales por hongos de suelo constituyen uno de los mayores problemas fitosanitarios en el cultivo del aguacate (*Persea americana* Mill.) En Andalucía, están causadas principalmente por el hongo *Rosellinia necatrix* y por el oomycete *Phytophthora cinnamomi*. Se están desarrollando diversas estrategias para su control, aunque sólo algunas son compatibles con el cultivo ecológico. El uso de enmiendas orgánicas es cada vez mas frecuente en la agricultura ecológica, y entre otras propiedades, han mostrado efectos supresivos frente a hongos fitopatógenos. Estas enmiendas parecen prevenir la enfermedad mediante su influencia en el equilibrio entre las poblaciones microbianas del suelo y mediante la estimulación de distintas actividades con efecto antifúngico. En este sentido, se está desarrollando un estudio sobre la aplicación de distintos tipos de enmiendas orgánicas en parcelas de aguacate, con el objetivo de conocer cómo dichas enmiendas afectan a la microbiota bacteriana y fúngica del suelo y elucidar los posibles modos de acción de su potencial capacidad supresora. El abordaje dependiente de cultivo se realiza mediante el aislamiento y recuento en placa de distintos grupos microbianos como *Pseudomonas*, bacilos esporulados, actinomicetes, bacterias heterotróficas y hongos y levaduras. Los recuentos muestran diferencias entre algunos de los suelos modificados con respecto a los suelos sin enmendar, registrándose los recuentos microbianos más altos en las fincas de aguacate con cultivo ecológico, con aplicaciones de compost comercial o estiércol. El análisis cualitativo de las poblaciones microbianas se está realizando mediante PCR-DGGE para lo que se han desarrollado una serie de protocolos de PCR, tanto anidada como normal, para el estudio específico de los grupos bacterianos mencionados. Los resultados preliminares muestran diferencias en los patrones de bandas entre los suelos con enmiendas y los suelos no modificados. Estos cambios podrían estar relacionados con el potencial efecto supresivo de los suelos, que está siendo estudiado de forma paralela, mediante ensayos de inoculación experimental con *R. necatrix* en plantas de aguacate crecidas en suelos con las distintas enmiendas ensayadas.

P-196

CONTROL BIOLÓGICO DE OÍDIO DE CUCURBITÁCEAS MEDIANTE RIZOBACTERIAS INDUCTORAS DE RESISTENCIA SISTÉMICA

García-Gutiérrez, L., Romero, D., Zeriouh, H., Vela, D., de Vicente, A. y Pérez-García, A.

Grupo de Microbiología y Patología Vegetal, Dpto. Microbiología, Facultad de Ciencias, Universidad de Málaga. 29071 Málaga. E-mail: aperez@uma.es

El oídio es una de las principales enfermedades que afectan a los cultivos de cucurbitáceas. El control biológico ha demostrado ser una medida de control que puede contribuir a paliar algunas de las deficiencias asociadas al empleo de fungicidas o variedades resistentes y en consecuencia, a mejorar el control de la enfermedad. Sin embargo, las constantes variaciones ambientales representan una seria limitación para muchos de los agentes de biocontrol actualmente diseñados frente al oídio. Para evitar estos inconvenientes, en este trabajo nos planteamos como objetivo la selección de bacterias que aplicadas a las raíces de plantas de melón fueran capaces de promover su crecimiento (PGPR) y proporcionar un control eficiente del oídio mediante los mecanismos de defensa de la planta asociados a la resistencia sistémica inducida (ISR).

Para realizar este estudio utilizamos una colección de cepas de *Pseudomonas* spp. y *Bacillus* spp. Con el objetivo de evaluar su potencial como PGPR se analizaron características como la presencia de actividad antifúngica, producción de sideróforos, producción de auxinas, formación de biopelículas y promoción del crecimiento de la raíz en semillas de melón y pepino. El tratamiento estadístico de los resultados obtenidos mediante el test de Kendall nos permitió seleccionar dos cepas de *Pseudomonas fluorescens* UMAF6031 y UMAF8402 y tres cepas de *Bacillus subtilis* UMAF6639, UMAF6614 y UMAF8564. Estas cepas fueron evaluadas como potenciales bacterias promotoras del crecimiento en melón e inductoras de la resistencia sistémica frente a oídio de cucurbitáceas. Los resultados obtenidos mostraron que todas las cepas ensayadas promovían un incremento del peso fresco de un 30% con respecto a las plantas control sin bacterizar y proporcionaban reducciones de la severidad de la enfermedad entre el 50% y el 80%, similares a las observadas en plantas tratadas con silicato potásico o las cepas *Pseudomonas putida* WCS358r y *P. fluorescens* WCS374r. La aplicación conjunta de algunas de las cepas seleccionadas proporcionó reducciones de la enfermedad incluso mayores a las obtenidas previamente por cada cepa de forma separada. Estos resultados apoyan el potencial de estas cepas como posibles agentes de biocontrol frente al oídio de las cucurbitáceas y promueven la necesidad de profundizar en las bases moleculares que subyacen a su acción protectora.

P-197

LOCALIZACIÓN DEL OPERON *dar* Y SU PARTICIPACIÓN EN LA PRODUCCIÓN DEL ANTIBIÓTICO 2-HEXIL, 5-PROPIl RESORCINOL POR *Pseudomonas fluorescens* PCL1606

Martín-Pérez, R., Bonilla, N., de Vicente, A. y Cazorla, F.M.

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

Pseudomonas fluorescens PCL1606 es una rizobacteria con actividad de biocontrol frente a hongos patógenos de suelo, y en especial contra *R. necatrix*, hongo causante de la podredumbre blanca del aguacate, y que posee una marcada actividad antagonista, asociada a la producción de antibióticos antifúngicos, principalmente 2-hexil, 5-propil resorcinol (HPR).

En este trabajo se ha profundizado en las bases genéticas de la producción de HPR. Previamente, se habían construido mutantes defectivos en la actividad antagonista mediante mutagénesis al azar sobre el genoma de *P. fluorescens* PCL1606, empleando para ello el plásmido pRL1063a que contiene un transposón *Tn5*. Los resultados de la mutagénesis al azar muestran la implicación de genes que codifican para putativas metiltransferasas, aril sulfatasas o genes reguladores homólogos a *gacA* y *gacS*.

Actualmente, una segunda estrategia ha consistido en detectar genes homólogos al operón *dar* en *P. fluorescens* PCL1606 y realizar mutagénesis dirigida sobre dichos genes. Mediante amplificación por PCR, se detectó la presencia del gen *darB*, y empleando esta secuencia, se procedió a la construcción de mutantes dirigidos en *P. fluorescens* PCL1606 mediante transformación e inserción del plásmido resultante de la clonación de dicho amplicón homólogo a *darB* en el plásmido pCR2.1. Los mutantes en *darB* mostraron una reducción parcial de la actividad antagonista, además de no producir HPR.

Empleando esta secuencia del gen *darB* obtenida por PCR, también se ha llevado a cabo el rastreo de una genoteca de ADN genómico de *P. fluorescens* PCL1606, seleccionando un clon genómico que presentaba homología a *darB*. Este clon ha sido secuenciado, revelando que *P. fluorescens* presenta ORFs homólogos a los genes del operón *dar* y que se organizan de manera similar que en *Pseudomonas aurantiaca* BL915; los putativos genes *dar* detectados en *P. fluorescens* PCL1606 presentan homologías que oscilan entre el 83 y el 88% con aquellos de *P. aurantiaca* BL915.

P-198

POTENCIAL BIOFUMIGANTE DE ESPECIES DE CRUCÍFERAS PARA LA SUPRESIÓN DE *Verticillium dahliae* EN EL SUELO

Bejarano Alcázar, J.¹, Obregón Cano, S.², Rodríguez Jurado, D.¹, de Haro Bravo, M.I.¹, del Río Celestino, M.¹ y de Haro Bailón, A.²

¹ IFAPA Centro "Alameda del Obispo". Apdo. 3092. 14080 Córdoba.

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

La biofumigación representa una de las alternativas de mayor interés a la utilización de fumigantes del suelo para el control de los patógenos de las plantas. Las crucíferas han sido consideradas de gran potencial como biofumigantes por su contenido en glucosinolatos (GSLs). Investigaciones previas en este sentido han permitido seleccionar a *Brassica carinata*, *Eruca vesicaria* y *Sinapis alba*, por presentar características agronómicas adecuadas como cubiertas vegetales en olivar y una elevada capacidad para reducir las poblaciones de *Verticillium dahliae* cuando son incorporadas como enmiendas en el suelo. La determinación de los GSLs predominantes en una especie es esencial para mejorar su eficacia biofumigante incrementando la concentración de los compuestos de interés. Por ello, se han planteado investigaciones preliminares con los objetivos de identificar y cuantificar los GSLs presentes en *B. carinata*, *E. vesicaria* y *S. alba*, y estudiar su relación con la capacidad supresiva de estas especies sobre el inóculo de *V. dahliae*. La raíz y parte aérea de plantas en floración de cada especie fueron analizadas mediante HPLC para determinar el perfil y concentración de GSLs en dichos tejidos. Asimismo, se evaluó el efecto de la aplicación de tejidos frescos de estas especies (1% para *B. carinata* y *S. alba*, y 0,5% para *E. vesicaria* del peso del suelo) a un suelo natural de olivar estéril sobre la viabilidad de los esclerocios de un aislado defoliante de *V. dahliae*, altamente virulento sobre olivo. Como control se utilizó suelo infestado por el patógeno sin enmienda. La densidad de inóculo (DI) de *V. dahliae* en cada tratamiento se determinó al inicio del experimento y a los 30 días de la incorporación de las enmiendas. La aplicación al suelo de las diferentes especies redujo la DI del hongo a valores nulos o no detectables a los 30 días de la incorporación. Sin embargo, los perfiles y concentraciones de GSLs variaron con la especie de crucífera considerada. Sinalbina fue el principal GSL (2,8 y 10,7 $\mu\text{mol g}^{-1}$ de tejido seco de raíz y parte aérea, respectivamente) detectado en *S. alba*; mientras que sinigrina fue el GSL predominante (8,8 y 7,2 $\mu\text{mol g}^{-1}$ de tejido seco de raíz y parte aérea, respectivamente) en *B. carinata*; y glucorafanina (14,5 y 10,8 $\mu\text{mol g}^{-1}$ de tejido seco de raíz y parte aérea, respectivamente) y glucoerucina (11,1 $\mu\text{mol g}^{-1}$ de tejido seco de raíz) fueron los compuestos más abundantes en *E. vesicaria*. La concentración total de GSLs varió entre 6 (*S. alba*) y 30,3 (*E. vesicaria*) $\mu\text{mol g}^{-1}$ de tejido seco en la raíz, y entre 8,7 (*B. carinata*) y 28,5 (*E. vesicaria*) $\mu\text{mol g}^{-1}$ de tejido seco en la parte aérea.

Financiado por los proyectos RTA2005-00024-C03-01 y RTA2005-00024-C03-02

P-199

CONTROL DE *Verticillium dahliae* EN EL SUELO MEDIANTE LA APLICACIÓN DE ENMIENDAS DE CRUCÍFERAS

Cabeza Fernández, E. y Bejarano Alcázar, J.

IFAPA Centro "Alameda del Obispo". Apdo. 3092. 14080 Córdoba.

La Verticilosis del olivo, inducida por *Verticillium dahliae* Kleb., está considerada la enfermedad más importante de este cultivo en España por la gravedad de sus ataques y las dificultades de su control. La incorporación de enmiendas de crucíferas se ha mostrado eficaz para el control de numerosos patógenos de suelo. En estudios previos con especies de interés potencial como cubiertas vegetales en olivar, las crucíferas *Brassica carinata* (Bc), *B. rapa* subsp. *rapa* (Br), *Eruca vesicaria* (Ev), *Moricandia moricandioides* (Mm), *Raphanus sativus* (Rs) y *Sinapis alba* (Sa), fueron clasificadas como resistentes o altamente resistentes a la Verticilosis. En este trabajo se ha investigado el efecto de la aplicación de enmiendas de estas crucíferas sobre la densidad de inóculo (DI) de *V. dahliae* en el suelo, y la influencia del cubrimiento con plástico sobre su eficacia erradicativa. Se han realizado dos experimentos en condiciones controladas, en los que se evaluaron Ev, Mm, Rs, Sa (experimentos I y II), Bc y Br (experimento II), y un experimento en campo (experimento III) en el que se estudiaron Bc, Ev, Mm y Sa. Una mezcla de suelo (arena:limo:turba, 2:1:2, v:v:v) no estéril enmendada con plantas en floración de cada especie (0,5% para Br, Ev y Mm, y 1% para Bc, Rs y Sa del peso del suelo) o sin enmendar (control) fue infestada con esclerocios de un aislado defoliante de *V. dahliae* altamente virulento sobre olivo, y se mantuvo durante 60 días en bandejas a 24°C (experimentos I y II) o 90 días en parcelas de un campo de olivar enmendadas con la especie correspondiente (experimento III), que se cubrieron con polietileno transparente (50 µm) o se dejaron sin cubrir. Periódicamente se analizaron muestras de cada tratamiento para determinar la DI de *V. dahliae*, y se calculó el Área Bajo la Curva de Progreso de la DI (ABCPDI) estandarizada. La adición de Ev, Mm, Rs y Sa en el experimento I y de Bc, Br, Rs y Sa en el experimento II, redujo de forma significativa el ABCPDI, con independencia de la aplicación o no de cobertura plástica; y en ambos experimentos la DI fue similar o significativamente inferior en los tratamientos sin plástico que en aquellos con plástico en todos los muestreos realizados. En el experimento III, el ABCPDI disminuyó significativamente en las parcelas tratadas con Bc y Sa, con y sin cobertura plástica; y las diferencias entre parcelas con y sin plástico sólo fueron significativas en los muestreos efectuados a partir de junio, en los que se observó una drástica reducción en la DI en todas las parcelas con plástico, incluido el control sin enmienda, que fue atribuida principalmente al incremento de temperatura inducido por la cobertura plástica. Estos resultados, unidos a las excelentes características agronómicas que han mostrado Bc, Ev y Sa, sugieren que la utilización de estas especies como cubiertas vegetales en el olivar podría contribuir a reducir significativamente la DI de *V. dahliae* en el suelo cuando son incorporadas como enmiendas al final de su ciclo de cultivo.

Financiado por los proyectos CAO00-019-C5-5 y RTA2005-00024-C03-01

P-200

**CONTROL BIOLÓGICO DE LA FUSARIOSIS VASCULAR DE LA JUDÍA
(*Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli*) MEDIANTE EL USO DE AISLADOS
NO PATOGENICOS**

Alves Santos, F.M., Martínez Bermejo, D y Díez, J.

Dpto. Producción Vegetal y Rec. Forestales. ETSIIAA de Palencia (Univ. de Valladolid). Avda. Madrid 57, 34007 Palencia. E-mail: fmalvess@pvs.uva.es

Fusarium oxysporum Schlechtend.:Fr es un hongo del suelo que incluye tanto estirpes no patogénicas como patogénicas de importancia económica. Todas ellas pueden vivir en el suelo de forma saprofítica alimentándose de materia orgánica muerta. Las estirpes no patogénicas colonizan el córtex de la raíz de las plantas sin causar síntomas de enfermedad ni producir daño alguno a la planta mientras que las estirpes patogénicas provocan marchitez (wilt) por la invasión y taponamiento de los haces vasculares de las plantas. El agente causante de la fusariosis vascular de la judía es la *forma specialis phaseoli* de *F. oxysporum*.

La eficacia de *Fusarium* como colonizador de las raíces de las plantas así como su resistencia y permanencia en el suelo convierten las especies no patogénicas en organismos muy adecuados para el control biológico.

Se han realizado diferentes ensayos *in vitro* para evaluar la capacidad competitiva de 16 aislados no patogénicos de *Fusarium oxysporum* provenientes de campos de judía (El Barco de Avila, Avila) y pertenecientes a diferentes grupos de compatibilidad vegetativa. Se ha evaluado su capacidad esporuladora, su crecimiento en placa tanto en forma individual como en competencia con 4 aislados patogénicos de *F. oxysporum* f.sp. *phaseoli* y la capacidad de inhibir la germinación esporal de los patógenos.

En función de los resultados de los ensayos *in vitro*, se han seleccionado cuatro aislados no patogénicos para ser enfrentados *in vivo* a dos aislados patogénicos (FOP-SP1, FOP-SP8) en dos ensayos diferentes. El primero consistente en una preinoculación del sustrato con el aislado no patogénico y el segundo mediante coinoculación del patógeno y el no patógeno. Las diferencias observadas en este ensayo indican que alguno de estos aislados podría ser útil en el control biológico de la enfermedad.

P-201**EFFECTO DEL APORTE DE ENMIENDAS ORGÁNICAS AL SUELO SOBRE LAS POBLACIONES DE *FUSARIUM* SPP. Y SOBRE LA PODREDUMBRE DE RIZOMAS Y RAÍCES DE ESPÁRRAGO**

Prados-Ligero, A.M.¹, González-Torres, R.², Melero-Vara, J.M.³, Rubio-Pérez, E.¹, Molinero-Ruiz, M.L.¹ y Basallote-Ureba, M.J.¹

¹Área de Protección de Cultivos, IFAPA, CAP Junta de Andalucía, Córdoba-Sevilla; ²Departamento Sanidad Vegetal, SIA-DGA, Zaragoza; ³Departamento de Protección de Cultivos, IAS-CSIC, Córdoba.

E-mail: mariaj.basallote@juntadeandalucia.es

La podredumbre de rizomas y raíces de espárrago causada por *Fusarium* spp. es una de las enfermedades más importantes del cultivo. Las especies más frecuentemente asociadas con este síndrome son *F. oxysporum*, *F. proliferatum* y *F. solani*. La naturaleza perenne del cultivo; la larga supervivencia del patógeno en el suelo y en los restos de plantas infectadas; y su transmisión con las garras de vivero dificultan el control de la enfermedad. En este trabajo se han estudiado las posibilidades del aporte de enmiendas orgánicas como medida de lucha respetuosa con el medio ambiente y compatible con el sistema tradicional de producción de garras.

Para determinar el efecto del aporte de compost de orujo de vid, gallinaza y pellet de gallinaza se evaluó el efecto de las enmiendas sobre los propágulos de *F. oxysporum*, *F. proliferatum* y *F. solani* (dos aislados por especie). Para ello, se aportó sustrato infestado con el inóculo correspondiente a tubos conteniendo suelo estéril mezclado con las enmiendas. Los tubos se incubaron a 25°C en oscuridad. El inóculo se cuantificó al inicio del experimento y tras 15, 30 y 45 días de incubación. El diseño fue completamente al azar con cuatro repeticiones (tubos) para cada combinación enmienda / fecha de muestreo / aislado de *Fusarium*. Posteriormente, se estudió el efecto de los tratamientos sobre el desarrollo de la enfermedad aportándose el contenido de cada tubo a un alveolo con sustrato estéril y sembrando una plántula de espárrago susceptible. Las plantas se dispusieron en invernadero y se evaluaron los síntomas durante tres meses.

La gallinaza redujo la viabilidad de las poblaciones de los aislados de *F. oxysporum*, *F. proliferatum* y de uno de los aislados de *F. solani* (62-77%), pero no disminuyó la severidad de síntomas. Tras 30 días de incubación el tratamiento con pellet, independientemente del aislado de *Fusarium* considerado, se asoció con un incremento significativo (50%) del peso fresco de las plantas, respecto al testigo no enmendado. Un aislado de *F. solani* fue el más virulento, causando severidades de síntomas en raíz significativamente mayores que los restantes aislados, y en consecuencia una mayor reducción del peso de las plantas.

P-202

IDENTIFICACIÓN DE GENES IMPLICADOS EN LA INTERACCIÓN DEL AGENTE DE BIOCONTROL *Pseudomonas pseudoalcaligenes* AVO110 CON *Rosellinia necatrix*

Pliego, C.¹, Matas, I.¹, de Vicente, A.², Cazorla, F.M.² y Ramos, C.¹

¹Área de Genética, Facultad de Ciencias, Universidad de Málaga, 29071-Málaga. E-mail: crr@uma.es. ²Departamento de Microbiología, Universidad de Málaga, 29071-Málaga.

Con el objetivo último de desarrollar métodos más eficaces de control biológico de la podredumbre blanca del aguacate causada por *Rosellinia necatrix*, en este trabajo se planteó la identificación de genes del agente de biocontrol bacteriano *Pseudomonas pseudoalcaligenes* AVO110 implicados en la interacción establecida con este patógeno. Estudios previos han relacionado la capacidad de biocontrol de AVO110 con una eficiente colonización tanto de la rizosfera de aguacate, como de las hifas de *R. necatrix*. Aprovechando la capacidad de AVO110 de utilizar eficientemente compuestos liberados por *R. necatrix*, estamos llevando a cabo una estrategia de genómica funcional, *Signature-Tagged-Mutagenesis* (STM), para la identificación de genes de AVO110 necesarios para su multiplicación y supervivencia en medio mínimo BM suplementado con exudados de *R. necatrix* (medio BM-RE). Utilizando una colección de transposones etiquetados (región central variable de 40 pb), se construyeron 5754 inserciones diferentes, de entre las cuales, hemos analizado hasta la fecha 1104. El análisis en masa de estas inserciones, se está llevando a cabo mediante inoculación simultánea de una mezcla homogénea de 48 mutantes diferentes (en total 10^3 - 10^4 UFC) inoculados en medio BM-RE. Dos días después de la inoculación, la densidad celular aumenta a 10^6 - 10^7 UFC/ml; la proporción de células portadoras de cada una de las etiquetas dependerá de la capacidad del mutante correspondiente de multiplicarse y sobrevivir en presencia de exudados del hongo. Hemos identificado hasta la fecha 7 mutantes cuyo crecimiento en BM-RE se encuentra reducido con respecto a la cepa parental. La identificación del punto de inserción del transposón y el análisis de las secuencias flanqueantes al mismo, han revelado la identidad del gen interrumpido en cada uno de estos mutantes. Los mutantes AM1 y AM2 se encuentran afectados en genes implicados en el metabolismo central; AM3, contiene el transposón en un gen relacionado con la regulación de procesos implicados en biocontrol, tales como la colonización y formación de biofilm. Las secuencias flanqueantes al transposón en AM4 y AM5 son similares a las codificantes de una peptidasa y una enterotoxina, respectivamente. Los mutantes restantes se encuentran afectados en proteínas hipotéticas.

P-203

SUPRESIVIDAD DE DIFERENTES SUSTRATOS HORTÍCOLAS A LA CAÍDA DE PLÁNTULA DE PEPINO INDUCIDA POR *Pythium aphanidermatum*.

Castillo, S.¹, Borrero, C.², Benítez, E. y Avilés, M.¹

¹Dpto. Ciencias Agroforestales, Escuela de Ingeniería Técnica Agrícola, Universidad de Sevilla. Ctra. Utrera km 1, 41013, Sevilla.

E-mail: aviles@us.es

²Biocontrol Technologies S. L. Parc Científic de Barcelona, C/ Baldiri Reixac, 15-21, 08028, Barcelona.

En los semilleros profesionales es muy frecuente aplicar preventivamente productos anti-oomicetes al sustrato dado el riesgo de caída de plántulas por *Pythium aphanidermatum*. En estos semilleros los sustratos más empleados son las mezclas de turbas *Sphagnum*. En diferentes estudios se ha demostrado la capacidad conductiva de dichas turbas a enfermedades de suelo. El objetivo de este trabajo es evaluar la supresividad frente a la caída de plántulas inducida por *P. aphanidermatum* en plantas de pepino en distintos sustratos hortícolas. Se repitió el ensayo dos veces. Se evaluaron trece sustratos hortícolas, incluyendo composts de distintas campañas y sustratos comerciales. El diseño fue de bloques al azar con cinco repeticiones, en condiciones controladas (27 °C, día neutro). Cada repetición consistió en una maceta de 300 cm³ en la que se sembraron 10 semillas de pepino cv. '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 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: 1 = plántula sin síntomas, 2 = plántula con síntomas, 3 = muerte de postemergencia y 4 = muerte de preemergencia. Tanto en las semillas no emergidas como en las plántulas afectadas fue confirmada la infección 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 sustrato en los testigos (no inoculado). De las semillas no germinadas de los testigos no se aisló el hongo. Las dos fibras de coco ensayadas y el sustrato de turba se mostraron claramente conductivos a la enfermedad, con severidades entre el 46,7 y el 72,7%. Mientras que los composts: alperujo más cascarilla de arroz, corcho, corcho más cascarilla de arroz, residuo agotado del cultivo del champiñón más turba rubia, residuos sólidos urbanos (Metrocompost) y orujo de vid se mostraron supresivos, con severidades entre el 1,3 y el 24,4 %. La turba rubia y el compost de residuos sólidos urbanos (Canal) tuvieron un comportamiento intermedio. Los datos también revelan, que la supresividad a esta enfermedad en composts de diferentes campañas no varía significativamente.

P-204

EFFECTO DE *Trichoderma asperellum* (T34) Y LA RELACIÓN AMONIO/NITRATO SOBRE LA FUSARIOSIS VASCULAR DEL TOMATE Y LOS CONTENIDOS DE HIERRO EN PLANTA.

Borrero, C.¹, Ibáñez, I.², Trillas, M.I.³, Delgado, A.², Castillo, S.² y Avilés, M.²

¹Biocontrol Technologies S. L. Parc Científic de Barcelona, C/ Baldri Reixac, 15-21, 08028 Barcelona. E-mail: cborrero@biocontroltech.com

²Dpto. Ciencias Agroforestales, Escuela de Ingeniería Técnica Agrícola, Universidad de Sevilla. Ctra. Utrera km 1, 41013, Sevilla.

³Dpto. Biología Vegetal, Universidad de Barcelona. Avda Diagonal 645, 08028, Barcelona.

Varios autores han constatado que las fusariosis vasculares se ven favorecidas cuando la fuente de nitrógeno para el abonado es amoniacal frente al uso de nitratos, que por el contrario reducen la severidad de estas enfermedades. Por otra parte, el hierro es un microelemento que a bajas concentraciones reduce el crecimiento y la esporulación de *Fusarium oxysporum*.

El objetivo principal de este trabajo es evaluar la acción del agente de control biológico T34 (*Trichoderma asperellum*) frente a la fusariosis vascular en tomateras con distinta relación amonio/nitrato en el fertirriego. Por otra parte, también se pretende estudiar el efecto de T34 sobre la concentración de hierro en plantas inoculadas y no inoculadas por *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Fol).

Se realizaron dos ensayos en los que se comparó el desarrollo de la enfermedad en tomateras en perlita inoculada con Fol y perlita inoculada con Fol y T34. También se plantaron controles sin inóculo y con perlita sólo inoculada con T34. El aislado de Fol utilizado pertenecía a la raza 2 y las tomateras al cultivar 'Roma'. Por cada tratamiento se rellenaron 5 macetas de 330 ml con 4 plántulas de tomateras cada una y fueron fertirrigadas con cinco soluciones nutritivas con distinta relación amonio/nitrato, pero igual concentración de nitrógeno total. El desarrollo de la enfermedad se siguió durante 35 días en cámara de cultivo. La severidad se midió con una escala basada en el porcentaje de hojas afectadas, a partir de aquí se calculó el área bajo la curva de progreso de la enfermedad relativa. Al final del ensayo se midió la concentración de hierro en planta por espectroscopía de absorción atómica tras la incineración y disolución en HCl 1M del material.

En estos ensayos la severidad se vio reducida cuando estaba presente T34. Al subir la relación amonio/nitrato incrementó la severidad más intensamente cuando T34 no está inoculado que cuando sí estaba. La concentración de hierro en planta, en perlita inoculada con Fol se redujo con la presencia de T34. Al subir la relación amonio/nitrato subió la concentración de hierro en planta, pero más marcadamente cuando no se inocula con T34. De lo que se podría deducir que T34 compite por el hierro en la rizosfera lo que perjudica al patógeno. Este efecto no descarta otros posibles mecanismos asociados al biocontrol de este agente.

P-205

EFICACIA DE UN AISLAMIENTO DE *FUSARIUM* SPP. EN EL CONTROL DE LA FUSARIOSIS VASCULAR DEL CLAVEL EN DOS SUSTRATOS HORTÍCOLAS.

Castaño, R.¹, Borrero, C.², Trillas, M.I.³, Castillo, S.¹, Castillo, M.L.¹ y Avilés, M.¹

¹Dpto. Ciencias Agroforestales, Escuela de Ingeniería Técnica Agrícola, Universidad de Sevilla. Ctra. Utrera km 1, 41013, Sevilla. E-mail: aviles@us.es ²Biocontrol Technologies S. L. Parc Científic de Barcelona, C/ Baldri Reixac, 15-21, 08028, Barcelona. ³Dpto. Biología Vegetal, Universidad de Barcelona. Avda Diagonal 645, 08028, Barcelona.

La integración de supresividad natural de los sustratos junto a la introducción de agentes de control biológico (ACB) puede cooperar en el control de las fusariosis vasculares. El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de un agente de control biológico (un aislamiento de *Fusarium* spp.) sobre un sustrato con supresividad natural (compost de corcho) y otro conductivo (fibra de coco) a la Fusariosis vascular del clavel en condiciones comerciales. Este ACB fue obtenido de situaciones de supresividad natural a la Fusariosis vascular del clavel. Posteriormente fue seleccionado por su eficacia en el control de las Fusariosis vasculares del clavel y del tomate en bioensayos en condiciones controladas, por la empresa Biocontrol Technologies S. L.

El ensayo se llevó a cabo en un invernadero del CIFA de Chipiona durante la campaña 2007/08. El diseño fue de bloques al azar con cuatro repeticiones, cada repetición consistió en dos bolsas de cultivo de 30 L con 24 plantas cv. "Rose Candle". Los tratamientos fueron: 2 sustratos x 2 [inoculado o no con *Fusarium oxysporum* f.sp. *dianthi* (Fod)] x 2 (inoculado o no con *Fusarium* spp.), lo que hace un total de 8 tratamientos. Se realizaron las prácticas y manejos del cultivo habituales de la zona. La aplicación del ACB fue mediante baño de raíces de los esquejes en una suspensión de 10^3 conidias/ml solución y aplicación al sustrato a 10^5 conidias/ml de sustrato, ambas aplicaciones previas a la plantación. Posteriormente se realizaron reintroducciones del ACB a $5 \cdot 10^3$ conidias/ml de sustrato a los 25 días y a las diez semanas después de la plantación. La inoculación del patógeno se realizó a la dosis de $2 \cdot 10^3$ conidias/ml de sustrato, aplicado una semana después de la plantación. Los sacos sin aplicación de Fod o ACB se consideraron controles. Se hicieron medidas de severidad cada 4 semanas y posteriormente se calculó el área bajo la curva de progreso de la enfermedad relativa al tiempo epidémico. La duración del experimento fue de 6 meses.

La comparación de las severidades registradas en los tratamientos inoculados con el fitopatógeno constató el carácter supresivo del compost de corcho respecto a la fibra de coco. Además, se observó una reducción de la severidad en la fibra de coco inoculada con el ACB, registrando una severidad equivalente a la del compost de corcho natural. También se redujo significativamente la severidad en el compost de corcho con la introducción del aislamiento de *Fusarium* spp. respecto al compost natural. En definitiva, en ambos sustratos la introducción del ACB redujo entre el 20 y el 25% la severidad respecto a los sustratos no inoculados con el agente.

P-206

EFFECTO DE LA NUTRICIÓN SUPRAÓPTIMA CON METALES SOBRE LA VERTICILOSIS DEL PIMIENTO

Beade, F.J., Rodríguez, M.J., Bernal, M.A. y Díaz, J.

Departamento de Biología Animal, Biología Vegetal e Ecología. Universidade da Coruña. Campus da Zapateira s/n 15071 A Coruña, Spain. Email: josefv@udc.es

La verticilosis del pimiento (*Capsicum annuum*) es una enfermedad causada por el hongo patógeno *Verticillium dahliae*. Se trata de una enfermedad que afecta a las explotaciones de este cultivo en Galicia¹. Actualmente no hay ningún método eficaz de control de *Verticillium dahliae*, y la búsqueda de resistencia a este hongo dentro de diferentes líneas y cultivares de *Capsicum annuum* ha resultado infructuosa. Un factor que puede contribuir a reducir la severidad de los síntomas de las enfermedades es el control de la nutrición mineral². En el presente trabajo mostramos el efecto de la aplicación de cuatro metales (Fe, Mo, B y Cu), a concentraciones supraóptimas, sobre el desarrollo de la verticilosis en plántulas de pimiento (*Capsicum annuum* cv. Padrón). Las plantas se cultivaron durante todo el estudio (desde la germinación hasta el desarrollo de síntomas) en perlita humedecida en soluciones nutritivas bien óptimas para el crecimiento de la planta (tratamiento control), bien con uno de los metales a concentración supraóptima. Las plantas se inocularon por inmersión de las raíces en una suspensión de 10⁶ conidios/ml durante 90 minutos. Durante las tres semanas siguientes se determinó la longitud de epicótilo, y al final de ese periodo el peso fresco, el peso seco y el porcentaje de hojas marchitas.

Referencias

¹Pomar, F., Bernal, M.A., Collar, J., Díaz, J., Caramelo, C., Gayoso, C., Novo, M., Prego, C., Saavedra, A., Silvar, C. y Merino, F. 2001. A survey of "tristeza" of pepper in Galicia and the fungal pathogens causing the disease. *Capsicum & Eggplant Newsletter* 20: 90-93.

²Datnoff, L.E., Elmer, W.H. y Huber, D.M. (eds.). 2007. Mineral nutrition and plant disease. APS Press, St. Paul, Minnesota, USA.

P-207**LA ELICITACIÓN CON COBRE INDUCE RESISTENCIA EN JUDÍA
(*Phaseolus vulgaris*) FRENTE A *Botrytis cinerea***

Gromnicka, M. y Díaz, J.

Departamento de Biología Animal, Biología Vegetal e Ecología. Universidade da Coruña. Campus da Zapateira s/n 15071 A Coruña, Spain. Email: josefv@udc.es

Botrytis cinerea es un hongo necrotrófico que causa la podredumbre gris en más de 200 especies de plantas¹. En la naturaleza es habitual que las plantas tengan que responder a varias señales bióticas y abióticas mediante la adaptación de su desarrollo de una manera plástica. Por ejemplo, la exposición de las plantas a los metales pesados puede tener como consecuencia una protección frente a patógenos, de modo que aquellos actúen como elicitores de los mecanismos defensivos de la planta². En el presente estudio hemos ensayado el sulfato de cobre como un elicitador abiótico de la resistencia frente a *Botrytis cinerea*. Los experimentos se han llevado a cabo utilizando dos cultivares de judía (*Phaseolus vulgaris*) diferentes: el cultivar de mata baja Roma2 y el cultivar de mata alta Helda. La elicitación se realizó mediante la inmersión de las raíces de las plantas en una solución de sulfato de cobre. La inoculación se llevó a cabo 24 horas tras la elicitación, mediante la aplicación de gotas de una suspensión de conidios (10^6 conidios/ml) sobre las hojas. Se determinaron la incidencia (porcentaje de lesiones en expansión) y la severidad (área enferma por planta) de la enfermedad 48 y 72 horas tras la inoculación. Tanto en Roma2 como en Helda, la incidencia y severidad fueron menores tras la elicitación de las plantas con cobre. Se recogieron muestras a diferentes tiempos para realizar determinaciones enzimáticas. La actividad peroxidasa fue fuertemente inducida por la elicitación, pero sólo ligeramente por la infección con *Botrytis*. También se determinó la actividad de otras enzimas relacionadas con la defensa de la planta.

Referencias

¹Van Kan, J.A.L. 2006. Licensed to kill: the lifestyle of a necrotrophic plant pathogen. *Trends Plant Sci.* 11:247-253.

²Poschenrieder C, Tolrá R, Barceló J. 2006. Can metals defend plants against biotic stress?. *Trends in Plant Science* 11: 288-295.

P-208

EVALUACIÓN DE LA INCIDENCIA EN PARÁMETROS DE RENDIMIENTO DE LA APLICACIÓN DE DOS FUNGICIDAS PARA EL CONTROL DEL “mal del pie” EN VARIEDADES LOCALES DE ALUBIA (*Phaseolus vulgaris* L.) EN LA BAÑEZA (LEÓN)

Campelo, M.P.^{1,2}, Marcos, M.F.¹, Lorenzana, A.^{1,2}, Boto, J.A.² y Casquero, P.A.²

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

²Departamento de Ingeniería y Ciencias Agrarias. Universidad de León. Avda. de Portugal, 41. 24071 León. Correo-e: piedad.campelo@gmail.com

El “mal del pie” está asociado a podredumbres localizadas en la raíz, el cuello y la base del tallo de las plantas de alubias, y a la muerte de las mismas en diferentes estados fenológicos; su incidencia, así como las dificultades que plantea su control en las comarcas productoras de León ya ha sido descrita. Está producido por el denominado “complejo parasitario del pie de la judía”, integrado fundamentalmente por especies de los géneros *Fusarium*, *Rhizoctonia* y *Pythium*, si bien hasta la fecha no ha sido caracterizado en esta región. En este trabajo se presentan los resultados obtenidos en la comparación de parámetros de rendimiento tras la aplicación en prefloración de las materias activas Carbendazima (C) e Himexazol (H) en campos de alubia afectados por esta patología. Los ensayos se realizaron en parcelas, con antecedentes de la enfermedad y en las que se había aislado *Fusarium solani*, del municipio de Riego de la Vega con las variedades locales Pinta (año 2005), y Canela y Riñón (año 2007). El diseño constó de tres tratamientos (C, H y testigo) por bloques al azar y de cinco repeticiones. El número de plantas por unidad experimental fue de 210. Al final del cultivo se recogieron 90 plantas de cada repetición y se procedió al recuento del número de vainas por planta, del número de semilla por vaina y del rendimiento por planta. El análisis estadístico de los datos permite observar diferencias al menos significativamente mayores ($P < 0,05$) entre las plantas que recibieron tratamiento frente a las testigo para los parámetros de número de vainas por planta y rendimiento por planta en las variedades Pinta y Canela, manteniéndose esta tendencia también en la variedad Riñón. Igual comportamiento se observa para el parámetro número de semillas por vaina en las variedades Riñón y Canela. Cabe destacar que, de forma general, en las plantas cosechadas de las parcelas tratadas con Carbendazima se obtiene un mayor número de vainas y un mayor rendimiento.

P-209**CARACTERIZACIÓN DE LA INCIDENCIA DE *Deightoniella torulosa* (Syd.) M.B. Ellis EN *Musa acuminata* Colla. Subgrupo *Cavendish* cv. *Pequeña Enana* AL AIRE LIBRE Y cv. *Gran Enana* EN INVERNADERO Y ENSAYO DE SU CONTROL.**

Lorenzo-Fernández, J.M.

Excmo. Cabildo Insular de La Palma. Agencia de Extensión Agraria. C/Ramón y Cajal, 5. 38760 Los Llanos de Aridane. La Palma. Canarias. E-mail: lorenzfernandez@terra.es

La percepción actual acerca del incremento de valor añadido que generan en el comercio del plátano los controles de calidad y la trazabilidad, ha creado la necesidad de conocimiento de la importancia de esta enfermedad, bajo las condiciones climáticas del cultivo del plátano en Canarias, su incidencia y la eficiencia en el control de la misma. Por ello, se procedió a la determinación del diámetro medio de 50 lesiones tomadas al azar sobre una mano aleatoria de un racimo recolectado. Se realizaron conteos de lesiones producidas en cada una de las aristas de un dedo aleatorio de cada uno de los 60 racimos elegidos al azar, determinando las correlaciones y regresiones correspondientes. Mensualmente, durante dos años (de julio de 2002 a junio de 2004), en las tres zonas climáticas del cultivo del plátano del Suroeste de La Isla de La Palma-Canarias, se determinó la tasa de incidencia en racimos recién desflorillados y próximos a la recolección, en la solana, umbría al aire libre y la correspondiente al invernadero, calculando posibles regresiones con los datos climáticos de dichas zonas (Temperatura y Humedad relativa máxima, mínima y media) y por último se realizó un ensayo de eficacia de control preventivo con metil-tiofanato tratando racimos 15 racimos de tres meses en invernadero a la dosis de 1 ml/l con agua a pH neutralizado:

- El diámetro medio de las lesiones es de 1,09 mm y se distribuyen al azar con correlaciones entre las de las aristas.
- Las lesiones producidas en racimos recién desflorillados cicatrizan y no desmerecen la calidad en la recolección, no ocurriendo lo mismo en caso de aquellas extraordinarias, de distribución irregular, que aparecen en la umbría al aire libre y en los invernaderos, y que, con una incidencia respectiva del 1% y del 2%, representan unas pérdidas económicas de hasta 0,12 €/kg (144 €/ha y año).
- Metil-tiofanato se muestra eficaz para el control preventivo de esta enfermedad aplicado en pulverización al racimo a la dosis indicada.

P-210

**CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE AISLADOS ESPAÑOLES DE
Gremmeniella abietina.**

Botella L.¹, Diez, J.J.¹ y Hantula, J.²

¹ Universidad de Valladolid. Dpto. Producción Vegetal y Recursos Forestales. ETSIIAA de Palencia. Campus "La Yutera", Avda. Madrid 57. 34071 Palencia. E-mail: lbotella@pvs.uva.es

² Instituto de Investigación Forestal Finlandés, Metla, Unidad de investigación de Vanta, PO18, FI-01301, Vantaa, Finlandia. Email: jarkko.hantula@metla.fi

Gremmeniella abietina (lagerb.) Morelet, causante de una de las enfermedades más graves e importantes en las coníferas del Centro-Norte de Europa, en Norte-América y este de Asia. Su fase asexual o anamórfica, *Brunchorstia pinea* (Karsten) Höhn, se detectó por primera vez sobre planta para reforestación de *Pinus halepensis* Mill. en 1999 en las comarcas del Cerrato y Tierra de campos ha sido estudiada en el presente trabajo a nivel molecular mediante técnicas de secuenciación con el objetivo de conocer a qué biotipo de la raza europea pertenece.

El trabajo consistió en analizar un total de 100 aislados españoles de *Gremmeniella abietina* procedentes de las zonas de Tierras de Campos y el Cerrato de las provincias de Palencia y Valladolid, provincias en las que, hasta ahora, se ha localizado la enfermedad.

La extracción del ADN fúngico fue realizada directamente de picnidios o de micelio obtenido a través del cultivo de ramillos de *Pinus halepensis* que presentaban sintomatología típica de *Gremmeniella abietina* siguiendo el protocolo descrito por Vainio et al. en 1998.

A continuación, se realizó una primera reacción de PCR utilizando los Microsatélites Amplificados al Azar o RAMs CGA o CCA para comprobar el patrón genético de los aislamientos y la calidad del ADN. Posteriormente, se llevó a cabo la amplificación del ADN con los primers GAAA 1000-s y el GAAA 1000-as. Los productos de PCR se amplificaron directamente y en ambas direcciones utilizando los iniciadores GAAA-1000-Au58-S700 Y GAAA-Au58-as800. La secuenciación se desarrolló utilizando el sistema automático LiCor Global Edition IR² y el Kit-LC de secuenciación de ADN Therm EXCELTM II facilitado por el Instituto de Investigación Forestal Finlandés, Metla.

A continuación se procedió a la comparación de las secuencias en la base de datos del Gene Bank.

P-211

EFFECTO DE LOS SUSTRATOS DE CULTIVO Y DEL AGENTE DE CONTROL BIOLÓGICO *Trichoderma asperellum* CEPA T34 EN LA REDUCCIÓN DE ENFERMEDAD CAUSADA POR *Fusarium oxysporum* f.sp. *dianthi* EN PLANTAS DE CLAVEL.

Casanova, E.¹, Segarra, G.¹, Avilés, M.² y Trillas, M.I.³

¹Biocontrol Technologies, SL. Parc Científic de Barcelona. C/Baldiri Reixac, 15-21, 08028 Barcelona. ²Departamento Ciencias Agroforestales, E.U.I.T.A. Universidad de Sevilla, Ctra. Utrera, Km 1, s/n, 41013 Sevilla. ³Departament de Fisiologia Vegetal, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona, Avgda. Diagonal, 645, 08028 Barcelona. E-mail: ecasanova@biocontroltech.com

La utilización de composts como sustrato de cultivo para el control de las enfermedades de las plantas fue sugerida por Hoitink en el año 1975. Desde entonces se han descrito una cierta cantidad de residuos orgánicos que debidamente compostados reducen la incidencia de un número importante de enfermedades. *Trichoderma asperellum* cepa T34 incorporado en el sustrato de cultivo reduce de forma significativa las enfermedades producidas por *Rhizoctonia solani* y *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* activando en la planta respuestas de resistencia (ISR). En el cultivo del clavel, la enfermedad que ocasiona mayores pérdidas económicas es la producida por *F. oxysporum* f.sp. *dianthi* (Prill. & Delacr.) W.C. Synder & H.N. Hans (FOD). En este estudio, se seleccionaron dos composts (recogida selectiva de residuos orgánicos y compost de orujo). La eficacia de estos sustratos en la reducción de la fusariosis vascular (severidad de la enfermedad), se comparó respecto la enfermedad en turba. También se evaluó la capacidad supresiva de la fibra de coco (sustitutivo de la turba) y la perlita (cultivo hidropónico). El patógeno se inoculó a 10^4 y 10^5 ufc/ml, mientras que el agente de control biológico T34 se inoculó en los sustratos a una concentración de 10^4 ufc/ml, previamente a la aplicación de FOD, y, además, se sumergió en el cepellón de los esquejes durante 2 horas (10^7 ufc/ml). Se utilizó una variedad de clavel (*Dianthus caryophyllus*, cv. Annelies) altamente sensible. La severidad de la enfermedad, en todos los sustratos fue mayor con la dosis más alta del patógeno. Cuando el patógeno se inoculó a 10^5 ufc/ml, el compost de recogida de residuos orgánicos redujo un 75% la fusariosis del clavel y el compost de orujo, la redujo un 23% o un 84% (según el lote estudiado). También con la dosis más elevada de patógeno y T34 inoculando se consiguió una reducción importante de la enfermedad: turba (91 y 100%), fibra de coco (89%), perlita (88%), compost de orujo 87% y 88 %. En conclusión, la utilización del agente de control biológico (*T. asperellum* cepa T34) y sustratos supresivos son una alternativa eficaz, a la vez que respetuosa con la salud y el medio ambiente que reducen significativamente el grado de fusariosis vascular en plantas de clavel, pudiendo llegar a la protección total.

P-212

EFFECTO DE *Trichoderma asperellum* (T-34[®]) SOBRE LA CONCENTRACIÓN DE PROPÁGULOS DE *Phytophthora cactorum* EN SISTEMA DE CULTIVO SIN SUELO DE FRESAS

Martínez, F., Flores, F., Vázquez, E., Palencia, P. y López-Medina, J.

Dpto. Ciencias Agroforestales. Universidad de Huelva. Campus Universitario de la Rábida. 21819 Palos de la Frontera (Huelva). E-mail: fatima.martinez@dcaf.uhu.es

El cultivo sin suelo (CSS) de fresón en sistemas cerrados utilizando filtración lenta en lecho de arena (FLA) es un sistema respetuoso con el medio ambiente. La FLA es el único sistema biológico que existe para la desinfestación de los lixiviados. Varios autores han demostrado que los propágulos de *Pythium* spp., y *Phytophthora* spp., no son detectados después del sistema de FLA (Wohanka et al, 1999). Otros autores muestran que *Trichoderma asperellum* (T-34[®]) inoculado en diversos sustratos reduce de manera consistente las enfermedades producidas por *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* raza 1 en plantas de tomate y *Rhizoctonia solani* en plantel de pepino (Trillas, 2003). En este trabajo se estudió el efecto de *Trichoderma asperellum* sobre la concentración de propágulos de *Phytophthora cactorum* en la solución recirculante de sistemas de CSS de fresas. El ensayo se llevó a cabo en invernadero con un diseño totalmente al azar y dos repeticiones. Cada repetición consistió en una línea de cultivo colgante de 6 m de longitud con 65 plantas de las variedades: 'Camarosa', 'Ventana' y 'Festival'. La densidad de plantación fue de 11 pl/m² y el sustrato utilizado fue perlita. Los sistemas de CSS ensayados fueron: I) Cerrado con FLA e inoculado con *P. cactorum* (CCFP), II) Cerrado sin FLA e inoculado con *P. cactorum* (CSFP), III) Cerrado con FLA e inoculado con *P. cactorum* y *T. asperellum* (CCFTP), (IV) Cerrado sin FLA e inoculado con *P. cactorum* y *T. asperellum* (CSFTP). La inoculación del patógeno se realizó por baño de raíces de las 12 últimas plantas de la línea de cultivo, ajustando el inóculo a una concentración de $3,07 \times 10^5$ zoosporas/ml y el sustrato fue inoculado con *T. asperellum* diluido en agua hasta conseguir una concentración final de 5×10^6 UFC/ml aplicando 250 ml/planta. En ambos casos las inoculaciones fueron previas a la plantación. La detección y cuantificación de los propágulos de *P. cactorum* se realizó en la solución drenada (antes del filtro) y en el sustrato. La severidad de la enfermedad fue medida en plantas inoculadas y no inoculadas. En la solución drenada de los tratamientos CCFTP se detectó una menor concentración de propágulos de *P. cactorum* con respecto al CSFP. Por otro lado, la presencia en el sustrato de *T. asperellum* podría contribuir a disminuir la presencia de *P. cactorum* en el mismo, debido al menor % de propágulos de *P. cactorum* registrado en el sustrato en los tratamientos CSFTP y CCFTP. Todo esto indicaría la idoneidad del uso de agentes de control biológico en sistemas de CSS cerrados con FLA. Las variedades 'Ventana' y 'Festival' en plantas inoculadas fueron las que presentaron mayor y menor afección de *P. cactorum* en corona, respectivamente. Por otro lado, la variedad 'Ventana' en plantas no inoculadas fue la que presentó mayor índice de severidad foliar.

P-213**EVALUACIÓN *IN VITRO* DE FUNGICIDAS PARA EL CONTROL DE *Cylindrocarpon liriodendri* Y *C. macrodidymum*, AGENTES CAUSALES DEL PIE NEGRO DE LA VID**

Alaniz, S., Abad-Campos P., García-Jiménez, J. y Armengol, J.

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

Para valorar el efecto *in vitro* de fungicidas en el control de los hongos *Cylindrocarpon liriodendri* y *C. macrodidymum*, agentes causales del pie negro de la vid, se utilizaron las técnicas de germinación de conidios en medio líquido y crecimiento micelial en medio sólido. Se evaluaron 14 fungicidas (azoxystrobin, captan, carbendazima, cubiet, didecildimetil cloruro amónico, flusilazol, imazalil, iprodiona, metiltiofanato, quinosol, oxiclورو de cobre, procloraz, tebuconazol, y tiram) a las siguientes concentraciones: 0,1, 1, 10 y 100 mg de materia activa L⁻¹. Para la técnica de germinación de conidios se prepararon suspensiones de conidios (5×10^5 conidios mL⁻¹) de dos aislados de cada especie, y se expusieron a cada una de las concentraciones de las diferentes materias activas seleccionadas. Al cabo de 24 horas se registró el número de conidios germinados, que se expresó como porcentaje de germinación respecto al control. El efecto de los fungicidas sobre el crecimiento micelial se evaluó en medio PDA. Para ello las diferentes dosis de las materias activas se incorporaron al medio de cultivo en el momento de su preparación. Posteriormente, en el centro de las placas se sembraron discos de micelio de cada uno de los dos aislados de ambas especies. Al cabo de 10 días se registró el diámetro de crecimiento de las colonias y se estimó el porcentaje del ratio de crecimiento diario respecto al control. Para comparar la efectividad de los diferentes fungicidas se calculó la concentración efectiva 50 (CE 50) construyendo rectas de regresión con los datos obtenidos aplicando la transformación Probit a los porcentajes de control, y el logaritmo decimal a las concentraciones evaluadas. Los fungicidas que manifestaron un buen comportamiento en la inhibición de germinación de conidios, en general, no lograron reducir el crecimiento micelial y viceversa. Los fungicidas captan, didecildimetil cloruro amónico, cubiet, oxiclورو de cobre y tiram inhibieron la germinación de los conidios de ambas especies a niveles muy satisfactorios, mientras que los que mostraron un buen efecto en la reducción del crecimiento micelial fueron carbendazima, procloraz, imazalil y quinosol.

P-214**CONTROL DE LA MANCHA MARRÓN DE LAS MANDARINAS MEDIANTE APLICACIONES DE COBRE A BAJA DOSIS**

Vicent, A., Armengol, J. y García-Jiménez, J.

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

Tras su detección en 1998, la mancha marrón de las mandarinas causada por un patotipo de *Alternaria alternata* ha causado graves daños en algunas variedades de maduración tardía como Fortune y Nova. El control económico de la mancha marrón está basado en la aplicación preventiva de fungicidas durante los períodos críticos de infección. En España, los únicos fungicidas autorizados para el control de esta enfermedad son mancozeb y cobre. En estudios previos los compuestos cúpricos mostraron una mayor persistencia y resistencia al lavado por lluvia. Sin embargo, su aplicación repetida puede ocasionar a largo plazo problemas ambientales debido a la acumulación de cobre en el suelo. Es por ello que el Reglamento 473/2002/CE limita a un máximo de 6 kg/ha anuales la cantidad de cobre aplicable en agricultura ecológica. Debido al número de aplicaciones necesarias y a los elevados volúmenes de caldo, las cantidades de cobre que se emplean habitualmente para el control de la mancha marrón superan ampliamente este límite. Durante dos años se evaluó el efecto protector sobre frutos de Fortune de diferentes formulaciones de oxiclورو de cobre, caldo bordelés y óxido cuproso. Se realizaron ensayos de persistencia en campo y de resistencia al lavado con un simulador de lluvia, comparando la dosis recomendada de 1 g ma/L con una dosis reducida de 0,5 g ma/L. En los ensayos de persistencia, todos los fungicidas ensayados mantuvieron un control adecuado de la enfermedad en inoculaciones artificiales incluso hasta 28 días tras la aplicación. No se detectaron diferencias significativas entre las dosis de 0,5 y 1 g ma/L. Ninguno de los productos y dosis incluidos en los ensayos de lluvia simulada se vieron afectados por el lavado, a pesar de que se evaluaron pluviometrías de hasta 90 mm. No obstante, ensayos previos con dosis altas de cobre demostraron el mayor poder de lavado de la lluvia en condiciones de campo. Con el uso de la dosis de 0,5 g ma/L es posible reducir a la mitad la cantidad de cobre aplicada en campo, lo que permitirá a los citricultores cumplir con los requisitos establecidos en la normativa de producción ecológica.

P-215**SENSIBILIDAD *IN VITRO* DE ESPECIES FÚNGICAS QUE CAUSAN LA ENFERMEDAD DE PETRI Y EL PIE NEGRO EN VID A LOS TRATAMIENTOS POR TERMOTERAPIA CON AGUA CALIENTE**

Gramaje, D., Alaniz, S., Abad-Campos, P., García-Jiménez, J. y Armengol, J.
Instituto Agroforestal Mediterráneo, Universidad Politécnica de Valencia,
Camino de Vera s/n, 46022 Valencia

Los tratamientos por termoterapia con agua caliente han sido citados como un método potencialmente efectivo para el control de las enfermedades de la madera en material de propagación de vid. No obstante, existe poca información sobre la sensibilidad de las especies fúngicas que causan estas enfermedades a diferentes temperaturas y tiempos de tratamiento. En este trabajo se evaluó la tolerancia a los tratamientos con agua caliente *in vitro* de: *Phaeomoniella chlamydospora*, *Phaeoacremonium aleophilum* y *Pm. parasiticum* (agentes causales de la enfermedad de Petri) y *Cylindrocarpon liriodendri* y *C. macrodidymum* (agentes causales del Pie negro). Para ello, se evaluó la sensibilidad de suspensiones de conidios y de discos de agar con micelio de dos aislados de cada patógeno a tratamientos con agua caliente a temperatura controlada de 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47 y 48°C para *Cylindrocarpon* spp., y a 49, 50, 51, 52, 53 y 54°C para *Pa. chlamydospora* y *Phaeoacremonium* spp. durante tres intervalos de tiempo: 30, 45 ó 60 minutos. Los tratamientos consistieron en ocho repeticiones para cada combinación de temperatura y tiempo. En general, la germinación de conidios y el crecimiento micelial fueron disminuyendo a medida que fue incrementándose la temperatura y el tiempo de tratamiento. Para *Cylindrocarpon* spp, la germinación de conidios fue totalmente inhibida a partir de 46°C, mientras que fueron necesarios tratamientos de hasta 48°C durante 60 minutos para detener el crecimiento micelial. Para *Pa. chlamydospora*, la germinación de conidios fue totalmente inhibida a partir de 53°C, mientras que para detener el crecimiento micelial fueron necesarios tratamientos de 53°C durante 45 minutos. Para *Phaeoacremonium* spp., se necesitaron tratamientos de hasta 53°C-54°C para inhibir completamente la germinación de conidios y el crecimiento micelial. Estos resultados demuestran que los protocolos habituales de tratamientos con agua caliente en viveros a 50°C durante 30 minutos pueden resultar suficientes para controlar *Cylindrocarpon* spp. Sin embargo, para el control de los hongos que provocan la enfermedad de Petri sería necesario desarrollar tratamientos con temperaturas más elevadas si se pretende asegurar la sanidad del material vegetal de propagación.

P-216

MECANISMOS INVOLUCRADOS EN LA SUPRESIÓN DE *Verticillium dahliae* EN EL SUELO MEDIANTE LA APLICACIÓN DE ENMIENDAS DE CRUCÍFERAS

Avilés Guerrero, M.¹, Rodríguez Jurado, D.², Castillo Jurado, S.¹, Castillo Fernández, M.L.¹, Borrero Vega, C.¹ y Bejarano Alcázar, J.²

¹Departamento de Ciencias Agroforestales, EUITA, Universidad de Sevilla. Ctra. Utrera Km. 1. 41013 Sevilla.

²IFAPA Centro "Alameda del Obispo". Apdo. 3092. 14080 Córdoba.

En anteriores investigaciones se ha demostrado la capacidad de enmiendas de *Brassica carinata*, *Eruca vesicaria* y *Sinapis alba*, que son especies de crucíferas de elevado interés como cubiertas vegetales en olivar, para reducir la densidad de inóculo (DI) de *Verticillium dahliae* en el suelo. El conocimiento de los mecanismos asociados a dicha supresión en diferentes tipos de suelos es necesario para mejorar la implementación de esta medida de control. En este trabajo se ha estudiado el efecto de la aplicación de enmiendas de *B. carinata*, *E. vesicaria* y *S. alba* sobre las propiedades químicas y las poblaciones microbianas presentes en dos suelos de diferente composición, y su relación con la reducción de la DI de *V. dahliae*. Se han realizado dos experimentos, cada uno de ellos con un suelo de un campo de olivar localizado en Córdoba y Osuna (Sevilla), respectivamente. En cada experimento, el suelo sin enmienda o enmendado con *B. carinata*, *E. vesicaria* o *S. alba* en maduración a las dosis respectivas de 2,5, 2,0 y 2,5% del peso del suelo, se infestó con esclerocios de un aislado defoliante altamente virulento de *V. dahliae* y se incubó en bandejas a 24°C durante 60 días. Periódicamente, se extrajeron muestras de cada tratamiento en las que se determinaron: la DI de *V. dahliae*, pH, CE, potencial redox, relación C/N, biomasa y actividad microbiana, perfiles del metabolismo de carbono, y las comunidades microbianas. En ambos experimentos, la aplicación de las diferentes enmiendas redujo significativamente el inóculo de *V. dahliae* en el suelo, y los valores finales de DI estuvieron comprendidos entre el 0-2,4% de los niveles iniciales. Sin embargo, la disminución del inóculo tuvo lugar con mayor rapidez en los suelos enmendados con *S. alba* que en los que se aplicó *B. carinata* y en éstos que en los tratados con *E. vesicaria*; y fue más rápida e intensa en el suelo de Córdoba que en el de Osuna. La reducción de la DI en el suelo de Córdoba coincidió con un incremento significativo de la actividad microbiana y de las poblaciones de Copiotrofos, *Bacillus* spp. y hongos en los suelos enmendados. En el suelo de Osuna *S. alba* fue la única especie que elevó significativamente la actividad microbiana en correspondencia con una reducción más rápida del inóculo por esta enmienda. En este suelo las enmiendas produjeron un incremento significativo, pero transitorio, de las poblaciones de Bacterias celulolíticas y *Trichoderma* spp. Estos resultados sugieren que la relación entre actividad y poblaciones microbianas y la reducción de la DI de *V. dahliae* en los suelos enmendados varía con el tipo de suelo y la especie de crucífera considerada.

Financiado por los proyectos RTA2005-00024-C03-01 y RTA2005-00024-C03-03

P-217

INOCULACIÓN DE HONGOS MICORRÍDICOS COMO MÉTODO DE BIOCONTROL DE *Armillaria mellea* EN PATRONES DE VID

Aguín, O.¹, Sáinz, M.J.², Otero, L.¹, Escofet, P.¹ y Mansilla, J.P.¹

¹Estación Fitopatológica de Areeiro. Deputación de Pontevedra. Subida a la Robleda s/n. 36153 Pontevedra. E-mail: oaguin@efa-dip.org

²Departamento de Producción Vegetal. Universidad de Santiago de Compostela. Campus Universitario s/n. 27002 Lugo.

Armillaria mellea es responsable de la enfermedad conocida como podredumbre blanca radicular, que afecta, de forma muy importante, a la vid. Las recomendaciones para su control se basan en medidas preventivas o en aplicar algún tratamiento químico, aunque en la práctica ninguno de estos métodos es totalmente eficaz. Las micorrizas arbusculares (MA) son simbiosis mutualistas entre las raíces y ciertos hongos del suelo que pueden desempeñar una función importante en la protección de las plantas frente a patógenos fúngicos de raíz. En este trabajo se estudió el efecto de la inoculación de los hongos MA *Glomus mosseae* y *G. intradices* en la fase de enraizamiento sobre la protección de dos patrones de vid frente a diferentes dosis de inóculo de *A. mellea*. Se insertaron estaquillas de los patrones 110 Richter y SO4 en tres camas de enraizamiento: una en la que se incorporó al sustrato inóculo de *G. mosseae*, otra con *G. intraradices* y una tercera no inoculada. Las estaquillas bien enraizadas se trasplantaron a macetas de 1,5 L utilizando suelo como sustrato. Para cada tipo de material vegetal (inoculado y no inoculado con hongos MA), se establecieron cuatro tratamientos: un control sin patógeno y tres en que se aplicaron dosis crecientes de inóculo de *A. mellea*. Las plantas de todos los tratamientos mostraron colonización de sus raíces por hongos micorrícicos; en las procedentes de estaquilladas no micorrizadas durante el enraizamiento, la micorrización fue debida exclusivamente a los hongos MA nativos del suelo. La inoculación con *G. mosseae* durante el enraizamiento determinó un mayor crecimiento de parte aérea y raíz respecto a su control en plantas del patrón 110R no inoculadas con *A. mellea*; a este efecto promotor del crecimiento de *G. mosseae*, se sumó una mayor tolerancia a la enfermedad a todas las dosis de inoculación del patógeno. Sin embargo, la inoculación de *G. intraradices* no determinó diferencias en el crecimiento de la planta respecto a los controles, y apenas en su tolerancia a la infección por *A. mellea*. En el patrón SO4, no hubo diferencias en el crecimiento de las plantas ni en la tolerancia al patógeno entre plantas control micorrizadas por hongos MA nativos y las plantas preinoculadas con *G. mosseae* o *G. intraradices*.

P-218

EVALUACIÓN *IN VITRO* DE FUNGICIDAS FRENTE A *Teratosphaeria nubilosa* CAUSANTE DE DAÑOS FOLIARES EN *EUCALYPTUS*

Otero, L., Aguín, O. y Mansilla, J.P.

Estación Fitopatológica do Areeiro. Deputación de Pontevedra. Subida a la Robleda s/n 36153 Pontevedra. E-mail: oaguin@efa-dip.org

En los últimos cinco años, en Galicia, se ha detectado un aumento importante en el número de plantaciones de eucaliptos afectadas por la enfermedad foliar, causada principalmente por *Teratosphaeria nubilosa* (Cooke) Crous & U. Braun, antes conocida como *Mycosphaerella nubilosa* (Cooke) Hansf. Aunque el tratamiento químico en árboles afectados en plantaciones forestales es complicado, sí es una opción adecuada para el control de la enfermedad en plantas de vivero. El objetivo de este estudio fue evaluar la eficacia *in vitro* de 4 fungicidas comerciales, cuyas materias activas son carbendazima (50%), clortalonil (75%), procimidona (50%) y mancozeb (80%), en la inhibición del crecimiento micelial y de la germinación de esporas de *T. nubilosa*. Se prepararon diluciones seriadas de cada producto para disponer de las siguientes concentraciones de materia activa: 10000, 1000, 100 y 10 mg/L. Para cada solución, se establecieron diluciones en el medio AM, obteniendo placas con 1000, 100, 10 y 1 mg/L de materia activa. Se establecieron placas control con agua estéril. Para estudiar la inhibición del crecimiento del micelio, se sembró un fragmento de un aislado monospórico de *T. nubilosa* que se colocó en cada una de las placas. Una vez que el hongo alcanzó su máximo de crecimiento en las placas testigo, se midió el diámetro de las colonias en el resto. En las placas donde no se produjo crecimiento, se comprobó si la acción de la sustancia activa había sido fungistática o fungicida. Para el análisis de la germinación de esporas, se cortaron lesiones de hojas de eucalipto infectadas por *T. nubilosa*, con presencia de cuerpos de fructificación, y se colocaron sobre la tapa de las placas con las diferentes diluciones de los productos en el medio AM. A las 24 y 48 horas se observó al microscopio la superficie de todas las placas para determinar si las esporas habían germinado. Tras ocho semanas de cultivo, todas las concentraciones de carbendazima inhibieron al 100% el crecimiento de *T. nubilosa* y su acción fue fungicida, observándose necrosis del micelio. El mancozeb mostró un fuerte efecto inhibidor del crecimiento de *T. nubilosa* a la concentración de 10 mg/L, inhibiéndolo completamente a partir de 100 mg/L. La acción inhibidora más débil la mostró la procimidona, con porcentajes de inhibición inferiores al 20% incluso a las concentraciones más altas. El clortalonil y la carbendazima inhibieron al 100% la germinación de esporas a todas las concentraciones. La carbendazima demostró ser la materia activa más eficaz.

P-219**EFFECTO DE LA BIOFUMIGACIÓN CON *Brassica carinata* Y DE LA SOLARIZACIÓN SOBRE *Phytophthora cactorum* EN EL CULTIVO DE LA FRESA.**

Porras, M., Romero, E., Zurera, C., Barrau, C. y Romero, F.

IFAPA Centro Las Torres-Tomejil. Apdo. Correos 41.200. Alcalá del Río (Sevilla). E-mail: maria.porras.ext@juntadeandalucia.es

La biofumigación y la solarización son técnicas de desinfestación del suelo, alternativas al uso convencional de productos químicos para el control de fitopatógenos. La biofumigación con especies de la familia *Brassicaceae* se basa en el efecto biocida de los compuestos volátiles activos producidos en la hidrólisis de los glucosinolatos, que están presentes en altos niveles en algunas especies de Crucíferas.

El objetivo de este trabajo ha sido evaluar la eficacia de ambas técnicas para el control de *Phytophthora cactorum* en suelo, así como la influencia sobre la producción.

Los ensayos de campo se realizaron en la finca experimental El Cebollar, en Moguer (Huelva), durante las campañas 2005-2006 y 2006-2007, en parcelas con suelo infestado naturalmente, y que nunca habían sido tratadas con desinfestantes químicos. Los tratamientos consistieron en parcelas biofumigadas+solarizadas, solarizadas, y testigos no tratadas, con diseño en bloques completos al azar, con ocho repeticiones. La biofumigación con *Brassica carinata*, a razón de 10 Kg/m² y 10 cm de profundidad, se realizó en julio y las parcelas fueron solarizadas desde julio hasta septiembre, usando polietileno transparente de 50 µm de grosor.

La biofumigación+solarización fue el tratamiento que produjo mayor incremento sobre el crecimiento de la planta (superficie foliar), el peso medio del fruto y la producción de fresas; observándose diferencias significativas respecto a la solarización y al control no tratado. La solarización sola incrementó significativamente el crecimiento de la planta y la producción respecto al testigo. Asimismo, ambos tratamientos redujeron la población edáfica de *Phytophthora cactorum* respecto al control; siendo especialmente efectiva la biofumigación al principio de campaña, momento clave para el establecimiento de la planta.

Este trabajo, financiado por el Proyecto ANDALGHORT Iniciativa Comunitaria Interreg III A España-Portugal, contribuye al desarrollo y a la optimización de la biofumigación con *Brassica* y la solarización como alternativas al uso tradicional de químicos en el cultivo de la fresa.

P-220

EFFECTO FUNGICIDA DE ACEITES ESENCIALES Y EXTRACTOS DE *Bupleurum gibraltarium* SOBRE *Plasmopara halstedii* MEDIANTE CITOMETRÍA DE FLUJO

Fernández-Ocaña, A.M.¹, García Reyes, J.F.², Guerra-Dug, T.¹, Alcántara-Gámez, J.¹, Oya-Aponte, R., Molina-Díaz, A.² y Gómez-Rodríguez, M.V.¹

¹Departamentos de Biología Animal, Biología Vegetal y Ecología,

²Departamento de Química Física y Analítica. Universidad de Jaén. Campus Las Lagunillas.s/n 23071 Jaén. E-mail: mvgomez@ujaen.es

En los últimos 18 meses, y ligado a un Proyecto de Excelencia concedido por la Junta de Andalucía, investigadores de los dos departamentos mencionados colaboramos en el estudio del efecto antifúngico que algunos aceites esenciales y extractos procedentes del fraccionamiento mediante disolventes, tienen sobre hongos patógenos de plantas. Estos extractos se han obtenido de algunas plantas silvestres de la provincia de Jaén.

Plasmopara halstedii (Ph) es un oomicete parásito obligado del girasol, al que causa el mildiu. En anteriores trabajos hemos comprobado el efecto protector que, sobre semillas recién germinadas de girasol, tiene el pretratamiento con aceite esencial de *Bupleurum gibraltarium* (Bg), lo que se pone de manifiesto en una reducción de la esporulación del hongo de hasta un 95% con respecto a las plantas controles infectadas y no pretratadas con esencia.

El empleo de la citometría de flujo nos ha permitido analizar de modo simple y rápido el efecto fungicida que algunos de los componentes principales de este aceite esencial y también de algunas fracciones de extractos acuosos de BG tienen sobre las zoosporas del oomicete. Si bien el carácter fungicida explica el efecto protector que su aplicación tiene sobre las semillas, no excluye la posibilidad de que desempeñe otro posible papel en la activación de los mecanismos de defensa de la planta.

Para el test se utiliza una solución de 90.000 esporangios/ml de Ph mantenida en agitación suave, oscuridad y a una temperatura de entre 18 y 20 °C, durante 2 horas para permitir la salida de las zoosporas. Para el recuento de zoosporas vivas se utiliza diacetato de fluoresceína. El citómetro de flujo empleado ha sido un Coulter modelo EPICS ELITE ESP con un láser azul, argón-ion de 488nm (15mW).

Agradecemos a Maria Isabel Rodríguez Ojeda de Koipesol semillas (Carmona, Sevilla) la cesión desinteresada de las semillas de girasol y el hongo.

P-221

EFFECTO *IN VITRO* DE SALES DE CALCIO Y POTASIO EN EL CRECIMIENTO MICELIAL DE *Phytophthora cinnamomi*

Serrano, M.S.¹, Sánchez, M.E.², Trapero, A.² y Fernández-Rebollo, P.¹

¹Dpto. Ingeniería Forestal ²Dpto. Agronomía (Patología Agroforestal), Universidad de Córdoba. E-mail: mariazerrano@yahoo.es

Se ha estudiado el efecto *in vitro* de varias sales de calcio y potasio sobre el crecimiento micelial de *Phytophthora cinnamomi*, principal agente biológico causante de la podredumbre radical que afecta a las encinas y alcornoques de las dehesas del sur de la Península Ibérica. Para ello, se transfirieron discos de agar de 5 mm de diámetro con micelio del aislado PA25 o PE90 a placas de CMA (Corn Meal Agar) y la correspondiente sal de calcio o de potasio (CaO, CaCO₃, CaCl₂, Ca(NO₃)₂, CaSO₄, KIO₃, KNO₃, KSO₄, KCl y KOH) a cuatro concentraciones diferentes (50, 150, 300 y 600 ppm de Ca²⁺ o K⁺) y se midió el pH de cada medio. Se realizaron tres repeticiones por sal ensayada y concentración con sus correspondientes testigos. Las placas se incubaron en oscuridad durante 4 días a 25°C. Diariamente se midió el crecimiento radial de las colonias. Los valores medidos se compararon entre sí y con los testigos mediante el test de Tukey HSD para P<0,05.

Los dos aislados de *Phytophthora* mostraron diferencias significativas en el crecimiento, pero la interacción entre aislado y medio no resultó significativa, por lo que el efecto de los medios evaluados fue similar para los dos aislados. Los medios con CaO, KOH, KIO₃, KNO₃, CaCO₃ y KCl redujeron el crecimiento micelial, mostrando diferencias significativas respecto del testigo. En general, se observó un gradiente de inhibición del crecimiento micelial con el aumento de la concentración. Las sales más efectivas fueron el CaO y KOH, que produjeron un incremento del pH del medio de más de dos puntos respecto del pH del testigo.

P-222

EFICACIA *IN VITRO* DE BIOFUMIGANTES VEGETALES Y ENMIENDAS ORGÁNICAS EN EL CONTROL DE *Phytophthora cinnamomi*

Vicente, M.¹, Fernández-Rebollo, P.², Trapero, A.¹ y Sánchez, M.E.¹

¹ Dpto. Agronomía (Patología Agroforestal), ² Dpto. Ingeniería Forestal
Universidad de Córdoba. E-mail: ag1sahem@uco.es

La biofumigación es un método de control de patógenos de suelo respetuoso con el medio ambiente y económicamente viable, por lo que puede resultar una alternativa válida al uso de sustancias químicas en sistemas agroforestales como las dehesas. En este trabajo se han evaluado distintas especies vegetales y estiércoles como biofumigantes para el control de *Phytophthora cinnamomi*, principal responsable del decaimiento de los *Quercus* en Andalucía. Como material vegetal se ensayaron cuatro especies arbustivas y de matorral mediterráneas: *Cistus albus*, *Cistus ladanifer*, *Diplotaxis* sp. y *Phlomis purpurea*, que comparten hábitat con los *Quercus*, dos especies de *Brassica* cultivadas (*B. carinata*, *B. juncea*), y estiércoles de gallina, porcino (purín), ovino y vacuno, estos dos últimos en fresco y maduros. Las plantas y los estiércoles sólidos (gallinaza, ovino, vacuno) se trituraron para favorecer la liberación de compuestos volátiles responsables de la inhibición del crecimiento micelial del patógeno, y se colocaron en bolsitas de tela en el interior de vasos de plástico de 60 cc de capacidad. A modo de tapadera se colocaron placas de agar-zanahoria invertidas que contenían un aislado de *P. cinnamomi* (PE-90) sembrado en el centro de la placa. Se ensayaron cuatro dosis (5, 10, 20 y 30 g) de cada biofumigante vegetal o estiércol, junto con los correspondientes testigos, con tres repeticiones por combinación experimental. Los recipientes se incubaron durante 3-4 días a 25° C en oscuridad. Diariamente se midió el crecimiento radial de las colonias y cuando el crecimiento del patógeno fue completo en las placas testigo (3-4 días) se retiraron las placas de los recipientes y se incubaron a 25° C durante 2 semanas. Los datos de crecimiento radial se relacionaron con el crecimiento de las placas testigo para obtener el porcentaje de inhibición en cada placa. A los resultados obtenidos se les aplicó el análisis de varianza y los valores medios se compararon entre sí mediante el test HSD de Tukey para P<0,05.

Aunque todos los biofumigantes vegetales y estiércoles, excepto el de oveja fresco, inhibieron el crecimiento del patógeno, *B. carinata* y gallinaza dieron lugar a un 100% de inhibición, mientras que *Diplotaxis*, purín y estiércol de oveja maduro superaron el 50%. Estos biofumigantes son los candidatos a ensayar en condiciones de campo en dehesas afectadas por la Seca de los *Quercus*. En las placas sometidas a los estiércoles e incubadas posteriormente en su ausencia, no se registró crecimiento adicional, mostrando así el carácter fungicida de los volátiles desprendidos.

P-223**EVALUACIÓN DEL POTENCIAL BIOFUMIGANTE DE *BRASSICA* SPP. PARA EL CONTROL DE *Phytophthora cactorum* Y *Verticillium dahliae***

Romero, E., Zurera, C., Porras, M., Barrau, C. y Romero, F.

IFAPA Centro Las Torres-Tomejil. Junta de Andalucía. Apdo. Correos 41.200. Alcalá del Río (Sevilla). e-mail: eva.romero.ext@juntadeandalucia.es

Biofumigación se define como “la acción de las sustancias volátiles producidas en los procesos de degradación de la materia orgánica, en el control de los patógenos de las plantas”. Numerosos estudios demuestran que, la incorporación de Brassicas al suelo como biofumigantes reduce significativamente la supervivencia de un amplio rango de patógenos, atribuyendo su efecto supresivo a los glucosinolatos, metabolitos secundarios presentes en la familia Cruciferae y cuya hidrólisis, por acción de la enzima mirosinasa libera, entre otros productos, compuestos volátiles activos como isotiocianatos, nitrilos y tiocianatos.

Los objetivos de este trabajo fueron: 1) determinar el efecto biofumigante de *Brassica* spp. en el crecimiento *in vitro* de *Phytophthora cactorum* y *Verticillium dahliae*, así como el momento del ciclo biológico del cultivo con mayor efecto supresivo; 2) evaluar el potencial biofumigante de *Brassica* spp. mediante la determinación del perfil de glucosinolatos. Las especies biofumigantes seleccionadas fueron: *Brassica juncea*, *B. nigra*, *B. carinata* y *B. napus*. La siembra se llevó a cabo en noviembre del 2006 en la Finca Experimental Las Torres. Se consideraron tres estadios del ciclo biológico del cultivo: vegetativo en encañado, floración y fruto. Se probaron cuatro concentraciones del biofumigante: 5, 10, 20 y 30 gramos, en tres aislados de *Phytophthora cactorum* (P4M, P10M y PCECT), procedentes de plantas de fresa y dos de *Verticillium dahliae* (V2694 y V2884), procedentes de plantas de tomate y melón respectivamente. La determinación del perfil de glucosinolatos de *Brassica* spp. se realizó mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), siguiendo el método ISO 9167-1 (1992) relativo a los métodos de análisis de las semillas oleaginosas. Los resultados mostraron que *B. nigra* y *B. juncea* fueron las especies con mayor efecto supresivo y el estadio fruto el más efectivo en la inhibición del crecimiento de los patógenos. Los análisis de HPLC manifiestan que la sinigrina (2-propenil-glucosinolato) es el glucosinolato que se encuentra en mayor proporción en todas las especies consideradas.

P-224**COMPORTAMIENTO DE MATERIAL HÍBRIDO Y MEJORADO DE *Pinus radiata* FRENTE A *Fusarium circinatum* Y *Diplodia pinea*.**

García-Serna, I., Heppe, E. y Iturrutxa, E.

Neiker-Tecnalia. Departamento de Producción y Protección Vegetal-Sanidad Forestal. Granja Modelo de Arkaute. Apartado 46 CP01080 Vitoria-Gasteiz.

Fusarium circinatum y *Diplodia pinea*, son los hongos de chancro que están causando las pérdidas económicas más importantes en el sector forestal del País Vasco: *Pinus radiata* es la especie forestal más sensible al ataque por parte de dichos patógenos.

La larga tradición de cultivo de *Pinus radiata* en el sector forestal vasco, unido a la problemática generada por ambos patógenos, nos ha llevado a una situación de cuestionamiento de la sostenibilidad de esta especie en áreas con un alto nivel de daños causado por el desarrollo de estas especies. En este estudio se lleva a cabo un ensayo de inoculaciones con aislados representativos de ambas especies fúngicas en material híbrido y mejorado del género *Pinus* que ha sido integrado en el programa de mejora de *Pinus radiata* en el País Vasco.

Los aislados utilizados en las inoculaciones fueron:

Diplodia pinea M1 (15-2-08), con un comportamiento agresivo en los ensayos previos de patogenicidad.

Fusarium circinatum 37, aislado representativo de la población del País Vasco

El material testado se corresponde con individuos procedentes de:

Rad x Ced: Cruce de *Pinus radiata* con *Pinus radiata* de la isla Cedros. Proseed.

Rad x Att: Cruce de *Pinus radiata* con *Pinus attenuata*. Proseed.

Rad x Gud: Cruce de *Pinus radiata* con *Pinus radiata* de la isla Guadalupe. Proseed.

CSIRO Aust 13566: Semilla australiana del CSIRO.

CSIRO Aust 19004: Semilla australiana del CSIRO.

P. rad. GF17: Semilla de *Pinus radiata* neozelandés de GF 17. CSIRO.

Se analizan los niveles de infección teniendo en cuenta las lesiones generadas por dichas inoculaciones sobre el material y se realiza a su vez, en dos orígenes de material, Nueva Zelanda y País Vasco, una estimación de la resistencia inducida por ambos patógenos.

Los resultados dejan patente la alta susceptibilidad de esta especie forestal independientemente de su origen y el fenómeno de la resistencia inducida en las poblaciones de *Pinus radiata* analizadas.

P-225

QUIMIRRIGACIÓN: CONTROL DE *Armillaria mellea* EN CEPAS DE VARIEDAD ALBARIÑO GALICIA

Fandiño, M.¹, Cancela, J.J.¹, Pérez, G.J.² y Rey, B.J.¹

¹Departamento Ingeniería Agroforestal. Universidade de Santiago de Compostela. Campus Universitario s/n 27002 Lugo. E-mail: mariafb@lugo.usc.es. ²LAINCO, SA. Polígono Industrial Can Jardí. Avda. Bizet, 8-12. 08191 Rubí. Barcelona.

La dificultad en el control de *Armillaria mellea*, su presencia en viñedo y las consecuencias finales que acarrea, nos han llevado a plantear un ensayo de tratamiento sobre la misma en la subzona del “Condado” (DO Rías Baixas - Galicia), para la variedad Albariño.

En el ensayo se han planteado dos sistemas de riego, con la finalidad de emplear el agua como vehículo transmisor de las sustancias activas, en concreto se han instalado dos parcelas con riego aéreo y subterráneo, donde además de emplearse para la quimirrigración, se usa el sistema para la introducción de nutrientes en el suelo (fertirrigación). La evaluación de resultados se ha realizado de forma cualitativa, valorando el estado de la vegetación a inicios del mes de abril del 2007 y de igual manera en abril de 2008, así como con un análisis de la producción final obtenida.

El tratamiento planteado consiste en la introducción de dos materias activas: Tiram 50% p/v (500 g/l)(Deepest) y Folpet 50% p/p (Chelai), a bajas concentraciones, en períodos quincenales desde abril a julio. En total durante la campaña 2007 se han aplicado seis tratamientos con el siguiente orden: Tiram, Tiram, Folpet, Folpet, Tiram, Folpet.

Dada la dificultad de extrapolar resultados en una única campaña, y en base a criterios visuales, podemos concluir que no se ha observado una gran mejoría en el estado de las vides estudiadas, si bien se mantienen los niveles de vegetación y producción con respecto a las campañas anteriores. Entre los dos sistemas de riego implantados no se han detectado diferencias significativas.

P-226

EFFECTO DE LOS APORTES DE GALLINAZA AL SUELO Y DE LAS TEMPERATURAS DE INCUBACIÓN EN EL CONTROL DE *Fusarium oxysporum* f.sp. *dianthi*

Villamar, L.P.¹, Melero, J.M.², Basallote, M.J.³ y Prados, A.M.¹

Centros IFAPA Alameda del Obispo¹ (Córdoba) y Las Torres-Tomejil³ (Alcalá del Río, Sevilla); Instituto de Agricultura Sostenible, CSIC, Córdoba².

E-mail: lorena_villamar@hotmail.com

Fusarium oxysporum f.sp. *dianthi* (Fod) es una de las enfermedades más devastadoras para el cultivo de clavel, causando mermas importantes de la producción del cultivo, por lo que se ha buscado, mediante la solarización del suelo y/o la utilización de enmiendas orgánicas, un control alternativo al BM.

Se ha evaluado el efecto de temperaturas constantes (24, 29, 34 y 39°C) en baños termostáticos sobre la viabilidad de Fod (aislados G1 y A7, de razas 1 y 2 respectivamente) en suelos infestados a los que se añadía gallinaza fresca de pollos de engorde o pellet comercial de gallinaza, a dosis equivalente a 5 kg/m². Se realizaron cuatro experimentos, que se repitieron, para comparar estos tratamientos combinados con las temperaturas y los dos aislados de Fod; por cada experimento se realizaron muestreos tras 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 15, 20 y 30 días de incubación, con 4 repeticiones para cada tratamiento combinado (tubos estériles de propileno de 50 ml con 45 g de sustrato infestado a los que se aportaron posteriormente: 1) Gallinaza fresca de menos de tres meses de maduración; 2) Pellet comercial; 3) Testigo sin enmienda orgánica.

En el experimento 1, a 24°C, los propágulos de Fod A7 aumentaron en el testigo mientras que con la gallinaza y con el pellet disminuyó la densidad de inóculo con respecto al inicial; en la repetición de este experimento sólo hubo variación en el testigo a 24°C, en el que los propágulos disminuyeron. A 39°C el patógeno llegó a anularse al final del experimento en todos los casos.

En el experimento 2, realizado con el aislado G1 la densidad de inóculo disminuyó en el testigo, con la gallinaza fresca sólo disminuyó o se anuló a partir de los 20 días de incubación, según la repetición del experimento, pero con el pellet comercial sucedió al revés (anulación o disminución del inóculo). A 39°C se anularon los propágulos de Fod en los tubos con pellet desde el día 4 mientras que en el testigo y la gallinaza, la densidad de inóculo se anuló al final del experimento.

En los experimentos 3 y 4 (aislados A7 y G1, respectivamente) los propágulos de Fod, no llegaron a eliminarse en ninguno de los tratamientos cuando la incubación fue a 29°C. A 34°C la densidad de inóculo llegó a reducirse enormemente, pero no se anuló ni en testigo ni en la gallinaza. Sin embargo, con el pellet comercial, las densidades de los propágulos de ambos Fod disminuyeron drásticamente para alcanzar viabilidades inferiores al 20% desde los 15 días de incubación a 29°C, mientras que a 34°C bastaron 8 días para una disminución similar de inóculo.

P-227**RESISTENCIA DE *Botrytis cinerea* A FUNGICIDAS EN CULTIVOS DE TOMATE DE TENERIFE**

Rodríguez Pérez, A.^{1,2}, De León Guerra, L.¹ y Gallo Llobet, L.¹

¹Dpto. Protección Vegetal, Instituto Canario de Investigaciones Agrarias (ICIA). Apdo. 60, 38200 La Laguna. Tenerife.

²Dpto. Microbiología y Biología Celular, Facultad de Farmacia, Universidad de La Laguna. 38207 La Laguna, Tenerife.

Botrytis cinerea es un hongo polífago con una alta incidencia en los cultivos del tomate del suroeste de Tenerife, principal área productora de la Isla. En esta zona, los tratamientos con fungicidas antibottríticos de uso habitual no controlan el patógeno de forma efectiva cuando las condiciones ambientales son favorables para el desarrollo de la enfermedad. La aparición de resistencias a fungicidas es un hecho habitual en este hongo y está bien documentada en otras zonas dedicadas al cultivo del tomate. Sin embargo, no existen trabajos en este sentido realizados en Canarias.

En este trabajo se ha analizado una colección de 66 cepas de *B. cinerea*, aisladas de plantas de tomate en la campaña 2006-2007 de 27 invernaderos malla de la isla de Tenerife, para determinar su resistencia a bencimidazoles (carbendazima), dicarboximidas (iprodiona), anilinopirimidinas (pirimetanil) y N-fenilcarbamatatos (dietofencarb). Los estudios fueron realizados cuantificando la proporción de inhibición del crecimiento fúngico en medio sólido suplementado con concentraciones crecientes de fungicida respecto a un control sin producto, con el fin de determinar los valores de concentración efectiva 50 (CE50, concentración de producto que inhibe el crecimiento micelial en un 50%). Los resultados indican que un 74% de las cepas mostraron un alto nivel de resistencia a la carbendazima (CE50 > 100 mg/l); un 32% fueron resistentes a dietofencarb, poniéndose de manifiesto la existencia de resistencia cruzada negativa con la carbendazima; un 86% exhibieron una resistencia moderada a iprodiona (CE50 < 5 mg/l) y por último, un 31% fueron resistentes a pirimetanil (CE50 > 10 mg/l).

P-228

CONTROL BIOLÓGICO DE *Phytophthora cinnamomi* EN AGUACATE MEDIANTE PRODUCTOS COMERCIALES FORMULADOS CON *TRICHODERMA* SPP.

Gallo Llobet, L.¹, Roque Marrero, A.¹, Domínguez Correa, P.¹ y Rodríguez Pérez, A.^{1,2}

¹Dpto. Protección Vegetal, Instituto Canario de Investigaciones Agrarias (ICIA). Apdo. 60, 38200 La Laguna. Tenerife.

²Dpto. Microbiología y Biología Celular, Facultad de Farmacia, Universidad de La Laguna. 38207 La Laguna, Tenerife.

Se estudiaron los productos de biocontrol formulados con aislados fúngicos del género *Trichoderma*: Trichogrow (*Trichoderma* sp., Bio-care Technology Pty Ltd, Australia); Tricho Bris (*T. harzianum* T-22, Bioworks Inc, USA) y Trich-A-Soil (*T. harzianum* + *T. viride*, Agrimm Technologies Ltd, Nueva Zelanda), en un ensayo *in vivo* con el fin de evaluar su efectividad frente a *Phytophthora cinnamomi* en plantas de aguacate inoculadas con el patógeno en condiciones controladas. Los parámetros evaluados al finalizar el ensayo fueron: altura, diámetro de tallo, peso fresco y seco aéreo y de raíz, y porcentaje de recuperación de *P. cinnamomi* de raíz. Además, se realizaron evaluaciones mensuales del índice de intensidad de la enfermedad.

Todas las cepas comerciales de *Trichoderma* redujeron significativamente el crecimiento en enfrentamientos *in vitro* de una colección de 35 cepas de *P. cinnamomi*, 31 de ellas aisladas de aguacate, con porcentajes de inhibición por encima de 66%. Sin embargo, ninguno de los productos controló el patógeno *in vivo* de forma efectiva. De todos los parámetros evaluados, únicamente Tricho Bris causó un efecto positivo sobre la altura de las plantas, con incrementos estadísticamente significativos respecto al control inoculado. Así mismo, el peso seco de raíz en el tratamiento con Trichogrow fue significativamente superior al control inoculado. En la evolución del índice de enfermedad en los distintos tratamientos, las plantas tratadas con Trich-A-Soil y Tricho Bris mostraron en todas las evaluaciones mensuales menos síntomas que el control inoculado, pero las diferencias en el índice de enfermedad final no fueron estadísticamente significativas.

P-229

SELECCIÓN Y EVALUACIÓN DE PORTAINJERTOS DE AGUACATE TOLERANTE-RESISTENTES A *Phytophthora cinnamomi* RANDS EN LAS ISLAS CANARIAS

Gallo Llobet, L.¹, Baños Atance, A.¹, Domínguez Correa, P.¹ y Rodríguez Pérez, A.^{1,2}

¹Dpto. Protección Vegetal, Instituto Canario de Investigaciones Agrarias (ICIA). Apdo. 60, 38200 La Laguna. Tenerife.

²Dpto. Microbiología y Biología Celular, Facultad de Farmacia, Universidad de La Laguna. 38207 La Laguna, Tenerife.

Una de las limitaciones principales del cultivo del aguacate es la incidencia de la podredumbre de raíz cuyo agente causal es *Phytophthora cinnamomi* Rands. En Canarias existe una considerable población de aguacates de raza antillana, fruto de los intercambios y movimientos migratorios establecidos entre las Islas y América a partir del siglo XV. Es conocido que la raza antillana es la más tolerante-resistente a la enfermedad de las tres razas de aguacate existentes: mexicana, guatemalteca y antillana.

En el ICIA se está llevando a cabo una selección de portainjertos antillanos locales por su tolerancia-resistencia a *P. cinnamomi* hace más de 30 años en dos parcelas de experimentación altamente infestadas con el patógeno. En un primer ensayo se evalúan en campo infestado plantas madre procedentes de semilla y seleccionadas previamente mediante distintos procesos: tanque con solución nutritiva inoculada con el patógeno y tierra infestada de forma natural en terrinas y en campo. En un segundo ensayo se reevalúa en campo infestado el material vegetal seleccionado en el primer ensayo y clonado, eligiendo ejemplares que presentan un mayor crecimiento y un bajo o nulo índice de intensidad de la enfermedad. Se han evaluado 11 patrones antillanos comparándose con los patrones "Duke 7" y "Thomas" como referentes de resistencia a *P. cinnamomi* a nivel mundial. Después de 9 años de reevaluación, los patrones "Canarias 1"; "Canarias 2" y "Canarias 3" presentan un 100% de supervivencia y "Canarias 4" un 89%, frente a un 50 y 40% de supervivencia de los patrones mexicanos "Duke 7" y "Thomas", respectivamente.

P-230

ANÁLISIS DE LA CONVERSIÓN DE AISLADOS DE *Cryphonectria parasitica* PARA SU EMPLEO EN EL CONTROL BIOLÓGICO.

Zamora, P.¹, Martínez, P., Arrate, J.² y Diez, J.J.²

¹Centro de Sanidad Forestal de Calabazanos. Consejería de Medio Ambiente. JCyL. Polígono de Villamuriel 34190 Villamuriel de Cerrato. Palencia. España. zambrapa@jcyl.es

²Departamento de Producción Vegetal y Recursos Forestales. ETSIIAA Palencia. U. De Valladolid. Avda. Madrid, 57. 34004 Palencia. España. jdcasero@pvs.uva.es

Cryphonectria parasitica es el hongo causante de la enfermedad del chancro del castaño. Este patógeno presenta aislados en los que su virulencia está atenuada por la presencia de un virus de la familia *Hypoviridae*. Este virus de doble cadena, se encuentra disperso en el citoplasma de las células del hongo y puede transmitirse a otros aislados de *Cryphonectria parasitica* mediante la anastomosis hifal así como a través de conidios. La transmisión del hipovirus a las cepas agresivas, conlleva la atenuación de su virulencia. La frecuencia y estabilidad de las anastomosis hifales entre aislados pertenecientes a distintos grupos compatibles están reguladas por diversos genes de incompatibilidad vegetativa. Esto hace que la transmisión de hipovirulencia entre aislados de distintos grupos vegetativos sea más difícil por lo que hay que evitar el aumento de diversidad vegetativa en las poblaciones de chancro existentes.

A través del método de conversión se han obtenido aislados hipovirulentos de distintas poblaciones de *Cryphonectria parasitica* de las provincias de León, Zamora y Salamanca para su empleo en el control biológico del chancro. Los aislados hipovirulentos obtenidos mediante este método fueron analizados morfológicamente y molecularmente para confirmar la transmisión del hipovirus. También se analizó su comportamiento frente a aislados virulentos correspondientes a las mismas poblaciones de origen.

Los aislados hipovirulentos obtenidos fueron evaluados *in vitro* sobre ramas de castaño recogidas en campo para determinar el efecto de los mismos en el control de aislados virulentos de *C. parasitica*.

P-231

CONTROL BIOLÓGICO DE *Cryphonectria parasitica* MEDIANTE EL EMPLEO DE CEPAS HIPOVIRULENTAS

Zamora, P.¹, Martín, A.B.¹ y Díez, J.J.²

¹Centro de Sanidad Forestal de Calabazanos. Consejería de Medio Ambiente. JCyL. Polígono de Villamuriel 34190 Villamuriel de Cerrato. Palencia. España. zambrapa@jcyl.es

²Departamento de Producción Vegetal y Recursos Forestales. ETSIIAA Palencia. U. De Valladolid. Avda. Madrid, 57. 34004 Palencia. España. jdcasero@pvs.uva.es

Cryphonectria parasitica, el patógeno que provoca la enfermedad del chancro del castaño, se observó por primera vez en España en 1947 (Elorrieta, 1949). Actualmente el chancro se encuentra en diversas masas de las provincias de León y Zamora así como en Salamanca y Ávila donde la presencia de *Cryphonectria parasitica* es más reciente.

La infección de *Cryphonectria parasitica* con virus del género *Hypoviridae* produce una atenuación de la virulencia de este hongo (Anagnostakis et al., 1997). El empleo de cepas hipovirulentas de *C. parasitica* para el control biológico del chancro se ha mostrado como el método más eficaz para minimizar los daños que ocasiona este patógeno.

Tras los análisis de conversión, y una vez establecido el comportamiento *in vitro* de una serie de aislados hipovirulentos se seleccionaron los más eficaces en el control del chancro del castaño para su empleo en un ensayo en el monte. El inóculo para dicho ensayo se obtuvo mediante la producción de un gel con micelio de los aislados hipovirulentos a utilizar. Dicho gel se sintetizó mediante el batido de placas Petri con medio de cultivo PDA, sobre las que se habían desarrollado las colonias hipovirulentas de *C. parasitica*.

Para el ensayo de campo se seleccionaron dos poblaciones pertenecientes a la provincia de León en las que se implantaron dos tratamientos diferentes. El primer tratamiento se llevó a cabo con aislados hipovirulentos pertenecientes al grupo compatible EU1 y el segundo con aislados del grupo EU11. Ambos ensayos han sido revisados cada 2 meses, desde su implantación, para observar la evolución de las inoculaciones. Los chancros de los árboles inoculados han reducido su crecimiento o han sido compartimentalizados.

P-232

EVALUACIÓN DEL EFECTO DE DOS FORMAS DE CONTROL SOBRE LOS CAUSANTES DE LA ENFERMEDAD DE PETRI DE LA VID

Tercero Ruiz, Z.¹, Sánchez Durán, S.², Barriuso Vargas, J.¹ y Perdiquer, A.³

¹Departamento de Agricultura y Economía Agraria. Escuela Politécnica Superior, Huesca, Universidad de Zaragoza. E-mail: barriuso@unizar.es

²Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria, Gobierno de Aragón

³Departamento de Agricultura y Alimentación, Gobierno de Aragón.

Las enfermedades de degradación de madera en vid (*Vitis vinifera* L.) son conocidas desde la antigüedad con los nombres de yesca, apoplejía, etc. Recientemente, se ha descubierto una nueva enfermedad dentro de este grupo a la que se ha denominado Enfermedad de Petri que parece estar producida por varios hongos que actúan conjuntamente como son los ascomicetos *Phaeomoniella chlamydospora* y *Phaeoacremonium aleophilum* que inician la infección en plantas jóvenes y posteriormente se produce el ataque del basidiomiceto *Fomitiporia punctata*.

Tradicionalmente se ha utilizado como único método de control eficaz el producto químico arsenito sódico pero desde el año 2003 se ha prohibido su uso debido a su toxicidad.

Ante esta nueva situación, ya se han realizado diversos estudios intentando encontrar algún tratamiento eficaz contra esta enfermedad, sin obtener ningún resultado satisfactorio. Por el momento sólo se recomiendan el uso de material vegetal sano certificado, medidas profilácticas y tratamientos preventivos.

En este trabajo se estudia un método de control biológico como es el uso del género *Trichoderma*, concretamente dos cepas de la especie *T. harzianum*, y el uso de un producto bioestimulador (Tronver Eco®) con el fin de potenciar las defensas de la planta frente a los ataques de los mencionados hongos.

Para ambos tratamientos se han realizado experiencias tanto "in vitro" como "in vivo", encontrándose que ambas cepas de *T. harzianum* son antagonistas de los hongos patógenos mencionados anteriormente porque inhibieron el desarrollo de las correspondientes colonias a distancia y en contacto. Los resultados de campo no se han llegado a observar debido al lento desarrollo de la enfermedad.

Paralelamente, se probó la influencia del Tronver Eco® sobre el crecimiento de los hongos patógenos y las dos cepas de *T. harzianum*, resultando que dicho bioestimulador afecta en mayor o menor medida al crecimiento pero estadísticamente sin obtener diferencias significativas.

P-233

LUCHA INTEGRADA CONTRA NEMATODOS: USO DE UN BIOFORMULADO DE MICROORGANISMOS ANTAGONISTAS Y EXTRACTOS VEGETALES UTIL EN AGROALIMENTACION.

Ezziyyani, M.¹, Rubio, L.¹, Requena, M.E.¹, Requena, A.M.² y Candela, M.E.¹

¹Departamento de Biología Vegetal (Fisiología Vegetal), Facultad de Biología, Universidad de Murcia. Campus de Espinardo. 30100 Espinardo (Murcia). e-mail: mcandela@um.es

²Departamento de Sanidad Vegetal. Instituto Murciano de Investigación y Desarrollo Agroalimentario (IMIDA), La Alberca, Murcia

El nematodo *Meloidogyne incognita* es un parásito que infecta las raíces y ataca a un gran número de plantas cultivadas causando importantes daños económicos en todo el mundo, especialmente en los cultivos de agricultura intensiva realizada en invernaderos. Hasta ahora, la desinfección de plagas y enfermedades que se habían asentado en los suelos de cultivo intensivo, ha sido eficiente con el uso de pesticidas químicos pero con la prohibición del principal nematicida el bromuro de metilo los compuestos alternativos no dan los resultados requeridos y ha sido necesario idear otras estrategias de lucha que sean eficaces contra los patógenos del suelo pero que no dañen el medio ambiente ni sean nocivos para la salud humana.

En este trabajo se recogen los resultados obtenidos al aplicar un nuevo formulado para la desinfección de suelos de invernaderos, contaminados por el nematodo agallador *M. incognita*, en cultivos de tomates y pimientos analizando variedades con resistencia y sensibilidad al nematodo. En el formulado se ha integrado el control biológico con el uso de hongos antagonistas de *Meloidogyne* spp escogidos por su capacidad para parasitar los huevecillos del nematodo o causar la destrucción de los ovarios de las hembras y por tanto reducir la eclosión, junto con el uso de carbohidratos, aminoácidos y flavonoides de extractos de determinadas plantas, que actúan como activadores de las defensas de la planta e incrementan la actividad antinematodos. Antes de la aplicación del formulado se ha probado también la acidificación del suelo mediante la adición de fosfitos que en dosis tan bajas como 0,63 mg por planta es capaz de reducir la masa de huevos que exista en la zona de plantación, incrementando así la capacidad de lucha. El formulado está en proceso de patentización y las esporas de los hongos se han optimizado para concentraciones activas de 10^8 por ml. La dosis es idónea para los tratamiento de semillas y para el suelo se deben añadir 4 l/ha al inicio del cultivo y luego una aplicación cada 21 días. Con estas dosis se ha obtenido la reducción de la infección hasta en un 80 %. Se ha comprobado la inconveniencia del uso conjunto del formulado con productos químicos como los nematicidas: organofosfatos, isotiocianatos y carbamatos así como los genéricos: Captan (heterocíclico), Thiram (ditiocarbamato) o Maneb o los sistémicos: Metalaxyl (acilalanina) o Benomyl (benzimidazole) ya que reducen las poblaciones de los hongos antagonistas por lo que, para usar pesticidas en la lucha integrada el mejor es metam sodio pero hay que esperar 10 a 15 días antes de utilizar el formulado.

P-234

CARACTERIZACIÓN DE PEROXIDASAS RELACIONADAS CON LA EXPRESIÓN DE LA RESISTENCIA A *Heterodera avenae* EN UNA LÍNEA DE INTROGRESIÓN TRIGO/*Aegilops ventricosa*.

Simonetti, E.¹, López-Braña, I.¹, Andrés, M.F.² y Delibes, A.¹

¹Dpto de Biotecnología, ETS Ingenieros Agrónomos, Universidad Politécnica de Madrid, 28040-Madrid. ²Instituto de Ciencias Agrarias. CCMA. CSIC. Serrano 115, 28006-Madrid.

Los nematodos formadores de quistes de los cereales, cuya especie más importante es *Heterodera avenae* Woll., se caracterizan por tener en su ciclo una fase de resistencia (quiste) de la que emergen juveniles infectivos. Una vez liberados al suelo penetran en la raíz de la planta por la parte subapical, se establecen en ella e inducen la formación de una estructura celular compleja y multinucleada (sincitio) a partir de la cual extraen los nutrientes necesarios para completar las restantes fases de su ciclo vital. Hasta ahora, se han descrito en trigo once genes (*Cre1-Cre8*, *CreX*, *CreY* y *CreR*) que confieren resistencia frente a este nematodo patógeno, muchos de ellos transferidos desde especies de *Aegilops*.

En el curso de la interacción entre los juveniles y la planta hospedadora se forman especies activas de oxígeno (AOS), algunas de ellas son radicales libres que, entre otros mecanismos, se pueden generar por la acción de peroxidasas (PRX). Estas enzimas también participan en la polimerización de compuestos de la pared celular y en la regulación de los niveles de H₂O₂. Se ha descrito que algunas PRXs son inducidas o aumentan su concentración en plantas infectadas por diferentes patógenos.

En el presente trabajo, se estudian los cambios en la expresión de PRXs en las raíces de la línea de introgresión trigo/*Aegilops ventricosa* (H-93-8), portadora del gen ***Cre2*** como consecuencia de la infección por el nematodo. A partir de 211 ESTs se han identificado 20 genes de PRXs que se expresan en las raíces y el alineamiento de sus secuencias ha permitido establecer siete grupos diferentes. Algunos de estos genes muestran un incremento en su expresión como consecuencia de la infección por el nematodo y poseen una alta similitud de secuencia con otras PRXs inducidas por el ataque de diferentes patógenos en una amplia variedad de plantas hospedadoras. Se ha analizado, asimismo, la organización estructural de los genes de PRXs expresados en la raíz de H-93-8, observándose patrones semejantes a los previamente descritos en arroz.

P-235

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD NEMATICIDA DE EXTRACTOS BOTÁNICOS

Jiménez, M.J.¹, Vallejo, V.¹, González Coloma, A.¹, Urieta, J.² y Andrés, M.F.¹

¹Instituto Ciencias Agrarias. CCMA. CSIC, Serrano 115, 28006-Madrid

²Departamento de Química, Universidad de Zaragoza.

La aplicación de productos químicos es el método de control más utilizado frente al ataque de los nematodos patógenos de plantas, especialmente cuando las técnicas agronómicas no reducen o suprimen el problema nematológico lo suficiente como para permitir al productor seguir cultivando la planta huésped con una frecuencia económicamente rentable. Las especies del género *Meloidogyne* son los patógenos-dianas económicamente más importantes y para conseguir su control se aplican a nivel mundial prácticamente la mitad de todos los nematicidas químicos. Sin embargo está demostrado que la aplicación sistemática de estos productos tiene un riesgo potencial de contaminación medioambiental elevado y pueden llegar a ser muy tóxicos. Es evidente por tanto, la necesidad de búsqueda y desarrollo de productos menos tóxicos y más específicos y para ello una alternativa son los bioplaguicidas basados en productos naturales. Diversos estudios han demostrado la actividad nematicida de alcaloides, fenoles, sesquiterpenos, diterpenos etc. Por otro lado la extracción de fluidos supercríticos es una alternativa verde a la extracción con disolventes para la producción de extractos estandarizados de aplicación bioplaguicida.

En este estudio se ensaya la actividad nematicida "in vitro" de extractos etanólicos y supercríticos (CO₂) de composición conocida de *Artemisia granatensis*, *A. Absinthium*, *Persea indica* y *Lavandula luisieri*. Para ello los extractos se disolvieron en DMSO (concentración final de 1%) a tres concentraciones (800, 400 y 200 µg/ml) de cada uno, utilizando el producto Avamectrina (Syngenta) como estándar. A partir de la eclosión de masas de huevos de *Meloidogyne javanica*, aisladas manualmente a partir de plantas de tomate infectadas, se obtuvieron juveniles infectivos. Los ensayos se realizaron en placas de 96 pocillos con un inóculo de 100 juveniles infectivos/pocillo. A partir del análisis de la inmovilidad y/o mortalidad de los juveniles de *M. javanica* a las 24 y 48 h de exposición a cada tratamiento se evalúa y determina la posible acción nemostática y/o nematicida de los extractos ensayados.

P-236**CONTROL QUÍMICO Y FÍSICO DE *MELOIDOGYNE* SPP. EN CULTIVOS DE CLAVEL EN EL SUROESTE DE ANDALUCÍA**

Vela, M.D.¹, Macías, F.J.¹, Prados, A.M.², Melero, J.M.³, López, C.³, Basallote, M.J.⁴, Salmerón, T. y Talavera, M.⁵

¹IFAPA Centro de Chipiona. ²IFAPA Centro Alameda del Obispo. ³Instituto de Agricultura Sostenible, CSIC. ⁴IFAPA Centro Las Torres-Tomejil. ⁵IFAPA Centro Camino de Purchil. E-mail: miguelf.talavera@juntadeandalucia.es

El objetivo de este trabajo fue evaluar varias alternativas al uso del Bromuro de Metilo en el control de nematodos agalladores de raíz del género *Meloidogyne* en cultivos de clavel en la comarca de Chipiona (Cádiz).

Durante dos ciclos de cultivo consecutivos se ensayaron seis tratamientos con nematicidas químicos (Azida sódica; 1-3 Dicloropropeno + Cloropicrina; Dimetildisulfuro; Dimetildisulfuro + Cloropicrina; Furfural; Oxido de propileno + Cloropicrina) y uno físico, la solarización del suelo, en combinación o no con el aporte de gallinaza.

Los tratamientos se aplicaron al suelo de microparcels de 24 m² distribuidas en un diseño por bloques con los tratamientos al azar en un invernadero infestado por *Meloidogyne arenaria* + *M. incognita* (P_i: 55 J₂ por 100 cm³ de suelo). Posteriormente se sembraron dos variedades de clavel por microparcels, una bancada con un cultivar de clavel resistente a los nematodos (cv. Master) y otra bancada con un cultivar susceptible (cv. Pícaro).

En el caso del cv. Pícaro, la variedad susceptible a nematodos, los tratamientos que incluían 1-3 Dicloropropeno o Dimetildisulfuro redujeron la incidencia de la enfermedad causada por nematodos entre un 75% y un 87% (proporción de plantas con agallas e índice de agallamiento) y las densidades iniciales y finales de nematodos en suelo entre un 81% y un 98%, e incrementaron la producción vegetal en niveles similares a la fumigación con Bromuro de metilo. La solarización por si misma o combinada con el aporte de gallinaza al suelo, redujo inicialmente las densidades de nematodos en suelo entre un 61 y un 80%, pero no se observaron reducciones en los síntomas causados por los nematodos durante y al final del cultivo en comparación con los testigos no tratados.

En el cultivar resistente Master no se observaron los síntomas de enfermedad causados por *Meloidogyne* spp. y las densidades de nematodos en suelo se redujeron a niveles por debajo de 5 J₂ por 100 cc de suelo en todos los tratamientos tras 6 meses de cultivo.

P-237**ENSAYO DE EFICACIA CON NEMATODOS ENTOMOPATÓGENOS PARA EL CONTROL DE CARPÓFAGOS DEL CASTAÑO**

Picoaga, A., Abelleira, A. y Mansilla, J.P.

Estación Fitopatológica do Areeiro. Deputación de Pontevedra. Subida a la Robleda s/n. 36153 Pontevedra. España. E-mail: efa@efa-dip.org.

En Galicia, la producción de castañas se ve disminuida, en más de un 25%, por el daño provocado por plagas de insectos como *Cydia fagiglandana* Zel., *Cydia splendana* Hb. y *Curculio elephas* Gyll., que se alimentan del fruto tanto en formación, como maduro, haciéndolo inservible para su comercialización.

En este estudio se evalúa la capacidad de diferentes cepas de nematodos entomopatógenos para infectar larvas de *Curculio elephas*, *Cydia splendana* y *Galleria mellonella* L.

Para comprobar su eficacia se diseñaron 4 ensayos en laboratorio. En cada uno de ellos se utilizaron 100 larvas de cada insecto, incubando a 24 y 12 °C, con dosis de 500 nematodos juveniles infectivos por larva (IJ/larva) y 250 IJ/larva, con el fin de evaluar la temperatura y dosis óptimas para su aplicación en campo.

Las larvas de los insectos se dispusieron aisladas en recipientes de PVC con 15 g. de tierra estéril de suelo de castaño. Se inocularon 4 cepas de las especies de nematodos *Heterorhabditis bacteriophora* y *Steinernema feltiae*, 2 de ellas aisladas de suelos gallegos (H1, S1) y dos comerciales (H2, S2).

Los resultados obtenidos muestran diferencias en la efectividad de los juveniles infectivos dependiendo de las condiciones de temperatura y dosis aplicadas.

A 24 °C y 500 IJ/larva, la cepa de *H. bacteriophora* H1 resultó ser la más eficaz, causando el 95% de mortalidad en *G. mellonella*, el 80% en *Cydia splendana*, y el 50 % en *C. elephas*. En las mismas condiciones, *S. feltiae* S1 controló el 80% de las larvas de *G. mellonella* y el 55 % de *Cydia splendana*, mientras que solamente consiguió un 10% de mortalidad en *C. elephas*.

A 12 °C, la cepa S1 fue más efectiva con la menor concentración de nematodos, alcanzando porcentajes de 100% en el control de *Cydia splendana*, de 75% para *G. mellonella* y de 20% para *C. elephas*.

Los heterorhabdítidos, a esta temperatura, no superaron el 50% de mortalidad en ninguno de los casos.

Los resultados obtenidos nos muestran que las cepas gallegas son tan eficaces como las comerciales para el control de los carpófagos del castaño y podrían ser utilizadas en futuros programas de lucha biológica en los sotos de esta Comunidad.

P-238

EVALUACIÓN DE DISTINTOS TIPOS DE ACOLCHADO SOBRE LAS DENSIDADES DE POBLACIÓN DE *Tylenchulus semipenetrans* Y LA PRODUCCIÓN DE MANDARINA

Verdejo-Lucas, S.¹, Sorribas, F.J.², Ornat, C.², Cortada, L.¹ y Pastor, J.³

¹IRTA Protecció Vegetal, ²Departament d'Enginyeria Agroalimentària i Biotecnologia. UPC, ³IRTA Amposta. E-mail: soledad.verdejo@irta.es

El acolchado del suelo con materiales inertes o materia orgánica puede evitar que las malas hierbas invadan la línea de plantación de los árboles y preservar la humedad del suelo. Asimismo, el acolchado puede modificar la composición de la nematofauna del suelo y sus niveles poblacionales. Para evaluar el efecto de distintos tipos de acolchado sobre *T. semipenetrans* se realizó un ensayo en una parcela comercial de mandarina Clemenules sobre Citrange Carrizo plantada en 1999 y ubicada en Alcanar, Tarragona. El diseño experimental fue de bloques estratificados con 4 tratamientos x 6 repeticiones (5 árboles por repetición). Los tratamientos fueron: i) malla anti-hierba, ii) cáscara de almendra, iii) paja de arroz y iv) parcelas control de referencia sin acolchado y tratadas con herbicida para controlar las malas hierbas. Los acolchados se instalaron en febrero 2003 y cubrían una superficie de 40 m² (20 x 2 m) por parcela elemental. El espesor del acolchado con la cáscara de almendra y paja de arroz era de 10 cm aproximadamente. Los niveles poblacionales de *T. semipenetrans* en el suelo y las raíces se determinaron antes de instalar los acolchados, y posteriormente, una vez al año (primavera) durante 5 años (2003-2007). El efecto del acolchado sobre la producción se determinó recolectando los frutos en su madurez. El nivel poblacional promedio del nematodo pre-instalación de los acolchados era 610 hembras /g raíz en 2003. En general, el tipo de acolchado no afectó los niveles poblacionales de *T. semipenetrans* que fluctuaban anualmente de forma similar entre tratamientos con tendencia a incrementar con el transcurso de los años conforme los árboles alcanzaban su pleno desarrollo. La producción acumulada durante los 5 años del estudio en las parcelas control tratadas con herbicida fue 150 kg/ árbol, mientras que, en las acolchadas con malla anti-hierba fue un 5% superior (159 Kg/ árbol) y en las acolchadas con paja de arroz y cáscara de almendra fue un 6 (141 kg/árbol) y 7% (139 kg/árbol) menor que en las control, respectivamente. La malla anti-hierba y cáscara de almendra conservaron su integridad hasta el final del estudio, pero no así la paja de arroz, que se degradó y fue invadida por las malas hierbas que crecieron a través de la superficie acolchada.

P-239

CONTROL DE NEMATODOS EN CULTIVOS DE PIMIENTO MEDIANTE BIOSOLARIZACIÓN E INJERTO

Ros, C.¹, Guerrero, M.M.¹, Lacasa, C.M.¹, Martínez, V.², Cano, A.³, Martínez, M.C.², González, A.⁴ y Lacasa, A.¹

¹Biotecnología y Protección de Cultivos y ⁴Cultivos Herbáceos IMIDA, c/ Mayor s/n, 30150 La Alberca Murcia. ²Programa de colaboración FECOAM-Consejería de Agricultura y Agua. C/ Caballero 13. 30003 Murcia ³Servicio de Sanidad Vegetal Consejería de Agricultura y Agua. C/ Mayor s/n. 30150 La Alberca Murcia. E-mail: caridad.ros@carm.es

En el cultivo de pimiento en los invernaderos del sureste peninsular la biosolarización es un método de desinfección ampliamente utilizado en producciones ecológica. El control de *Meloidogyne* se muestra deficiente algunas campañas. La reiteración en el mismo suelo del injerto sobre patrones resistentes al nematodo provoca, en algunos invernaderos, la selección de poblaciones virulentas que remontan la resistencia, a partir del segundo año. Tratando de cubrir las lagunas presentadas por estos métodos de control se ha ensayado la combinación de ambos. En un invernadero experimental en el que se habían seleccionado poblaciones virulentas para el patrón Atlante, se han ensayado este y otros patrones plantándolos en suelo biosolarizado durante dos campañas consecutivas (C19, Atlante, DRO-3403; PR-102RZ; Snooker y Tesor en la primera, y C19, Atlante, C53, Snooker y WS-50 en la segunda) y comparando los niveles de control y las producciones con plantas sin injertar puestas en suelo desinfectado con bromuro de metilo (BM) o en suelo sin desinfectar. En la primera campaña, con los patrones Atlante, C19 y Snooker se obtuvieron niveles de control del nematodo (índices de nodulación 0,1; 1,0 y 0,9) similares a los de las plantas sin injertar puestas en suelo desinfectado con BM (1,6), siendo los de los otros tres patrones inferiores al del testigo no desinfectado (6,8). En la segunda campaña la incidencia del nematodo fue muy baja en todos los patrones (índices 0,9, 2,9, 1,7, 1,7 y 1,7), no difiriendo del BM (índice 1,9), pero si del testigo no desinfectado (8,4). En las dos campañas las producciones comerciales obtenidas en las plantas injertadas sobre los diferentes patrones fueron similares a las del BM y entre el 18% y el 42% más altas que las del testigo sin desinfectar en la primera campaña y entre el 22% y el 45% en la segunda.

P-240

**COMPORTAMIENTO DE LA RESISTENCIA A *MELOIDOGYNE* EN
PIMIENTO**

Ros, C.¹, Guerrero, M.M.¹, Lacasa, C.M.¹, Martínez, V.², Cano, A.³, Lacasa, A.¹, Cenis, J.L.¹ y Martínez, C.¹

¹Departamentos de Biotecnología y Protección de Cultivos y IMIDA, c/ Mayor s/n, 30150 La Alberca Murcia. ²Programa de colaboración FECOAM-Consejería de Agricultura y Agua. C/ Caballero 13. 30003 Murcia ³Servicio de Sanidad Vegetal Consejería de Agricultura y Agua. C/ Mayor s/n. 30150 La Alberca Murcia caridad.ros@car.m.es

En el sureste de España, *Meloidogyne incognita* está ampliamente distribuido en los invernaderos de la Región de Murcia donde el pimiento es un monocultivo desde hace más de 20 años. La prohibición del uso del bromuro de metilo como desinfectante del suelo plantea el uso de portainjertos resistentes al nematodo como método de control. En un invernadero contaminado de *M. incognita* se ha reiterado el cultivo de portainjertos resistentes en suelo no desinfectado durante 5 años, comparando el índice de nodulación y el porcentaje de plantas infestadas con suelo desinfectado con bromuro de metilo y no desinfectado donde se cultivaron plantas sin injertar de una variedad sensible. Al segundo año se seleccionaron poblaciones capaces de colonizar un patrón resistente (Atlante) al mismo nivel (5,6 y 100,0%) que las plantas sensibles (7,3 y 100,0%). Tras dos años más de reiteración del mismo patrón, se comparó el 4º año con tres patrones puestos en suelo con poblaciones virulentas, resultando ser poco afectados (C19: 0,3 y 13,3%; DRO 8801: 0,3 y 13,3%; Snooker: 1,0 y 53,3%) . Un año más de reiteración de estos últimos puso de manifiesto un nuevo proceso de selección, al ser colonizados (C19: 2,4 y 76,7%; Snooker: 3,7 y 80,0%). Se realizan pruebas moleculares para tratar de identificar los genes implicados en la resistencia a este nematodo en los portainjertos.

P-241**INFLUENCIA DEL TRATAMIENTO CON ACIDO HEXANOICO EN PLANTAS DE TOMATE Y CHILE SOBRE LA PATOGÉNESIS DE NEMÁTODOS FORMADORES DE AGALLAS**

Sanz-Alférez, S., Gaytán, M., Mochales, R. y López-García, B.

Departamento de Biología, Universidad Autónoma de Madrid. Cantoblanco. 2804-Madrid soledad.sanz@uam.es

Los nemátodos fitopatógenos son organismos biotrofos que interaccionan con las raíces, sustrayendo nutrientes y permitiendo su desarrollo hasta completar su ciclo vital. El género *Meloidogyne* es el principal representante de nematodos endoparásitos formadores de agallas, que interaccionan con una gran variedad de plantas de interés económico, como por ejemplo *Solanum lycopersicon* y *Capsicum annum*.

La SAR (*Systemic Acquired Resistance*) es un tipo de mecanismo de defensa inducible de las plantas frente a los organismos patógenos, que implica la obtención de inmunidad fisiológica en tejidos distantes. La aparición de la SAR puede producirse por el tratamiento con inductores químicos ó elicitores provocando en último término la activación de la expresión de un conjunto de genes que codifican proteínas de defensa (PRs), proteínas antimicrobianas, e inhibidores de proteasas, entre otras.

El tratamiento de las plantas con elicitores, que activen los mecanismos de defensa, constituye una estrategia que disminuye la infección de los patógenos en algunos sistemas. Trabajos previos realizados con variedades susceptibles de tomate tratados con INA y BTH nos han permitido determinar la inducción de algunas PRs, acompañada de una limitada reducción de la patogenicidad de *Meloidogyne javanica*, y relacionada con una reducción de la expresión de la PRs (Sanz-Alférez et al. 2008). En el presente estudio se incluyen los ensayos realizados con ácido hexanoico sobre distintas variedades de *S. lycopersicon* y en *C. annum*, tanto en susceptibles como resistentes. Se ha analizado su efecto en la fisiología de las plantas, así como los cambios a lo largo del tiempo en la expresión de genes de defensa, tanto a nivel local como sistémico, y se ha estudiado si estos cambios en la defensa alteran el grado de patogénesis de *Meloidogyne*. La identificación de un elicitor óptimo para la limitación del ataque de nemátodos, y su correlación con el mecanismo de defensa inducido, nos facilitaría en el futuro la determinación de alternativas de su control.

Sanz-Alférez S., Mateos B., Alvarado R. y Sánchez M. 2008. SAR induction in tomato plants is not effective against root-knot nematode infection. Eur. J. Plant Pathology 120(4): 417-425.

P-242

EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA DE RESISTENCIA DE LOS PATRONES HÍBRIDOS DE TOMATE BEAUFORT Y MAXIFORT FRENTE A DISTINTAS POBLACIONES DE *MELOIDOGYNE*

Cortada, L.¹, Ornat, C.², Sorribas, F.J.² y Verdejo-Lucas, S.¹

¹IRTA. Protecció Vegetal, ²Departament d'Enginyeria Agroalimentària i Biotecnologia. UPC. E-mail: laura.cortada@irta.cat

La resistencia vegetal en tomate asociada al gen *Mi-1* es, actualmente, la medida de control más eficaz y rentable en la lucha frente a *Meloidogyne spp.* El empleo de los patrones de tomate ha aumentado notablemente en los agrosistemas más intensificados ya que proporcionan resistencia frente a diversos patógenos del suelo y aportan a las variedades injertadas mayor vigor y tolerancia en situaciones de estrés. La evaluación previa de la respuesta de resistencia de los patrones híbridos de tomate comerciales Beaufort y Maxifort frente a una población avirulenta de *M. javanica* (MJ-05), mostró que ambos patrones presentaban un comportamiento susceptible frente a esta población. Para conocer si la respuesta de estos patrones variaba en función de la población de *Meloidogyne* estudiada, se diseñó un nuevo ensayo en maceta con 5 poblaciones avirulentas: 1 población de *M. arenaria* (MA-68), 2 poblaciones de *M. incognita* (Almería y Crosses) y 2 poblaciones de *M. javanica* (Ibiza y MJ-05). Cada planta se inoculó con 3000 huevos del nematodo y se realizaron siete repeticiones para cada combinación población-cultivar. Los parámetros evaluados al finalizar el ensayo fueron la tasa de multiplicación (Pf/Pi), expresada como la población del nematodo al finalizar el ensayo respecto al inóculo inicial y el índice de reproducción (IR%) que indica cuántas veces se ha reproducido el nematodo en una planta resistente respecto al control susceptible. Los resultados indicaron que existen diferencias en la respuesta de resistencia de los patrones en función de la población de *Meloidogyne*. Así, Beaufort y Maxifort se mostraron resistentes o moderadamente resistentes frente a las poblaciones de *M. arenaria* y *M. incognita*, presentando IR máximos de 33%. En cambio, estos mismos patrones presentaron una respuesta de susceptibilidad frente a las dos poblaciones de *M. javanica*, con Pf/Pi superiores a 50 e IR por encima de 64%. En el caso de la combinación *M. incognita* (Almería)-Maxifort, se alcanzaron IR>50% pero probablemente se debió a la baja reproducción de la población en el control. Por lo tanto, ambos patrones presentaron un comportamiento susceptible frente a *M. javanica* pero no frente a las otras poblaciones de *M. arenaria* y *M. incognita*. Otra conclusión que se desprenden de este trabajo es la mayor reproducción del nematodo en el patrón Maxifort, de forma consistente independientemente de las poblaciones estudiadas.

PANELES

OTROS

PANELES HONGOS	387 (P-243)
PANELES OTROS	390 (P-246)

P-243**CARACTERIZACIÓN DE HONGOS FORMADORES DE MICORRIZAS ARBUSCULARES ASOCIADOS A LA PROTECCIÓN DE PLANTAS PSAMÓFILAS EN REPLANTACIÓN DE DUNAS LITORALES**

Camprubí, A., Calvet, C., Estaún, V. y Pitet, M.

Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentàries (IRTA). Departamento de Protección Vegetal. Ctra. de Cabrils km 2. 08348 Cabrils. Barcelona.

Los suelos arenosos de las zonas litorales se caracterizan por tener un bajo contenido en materia orgánica y presentar pocos nutrientes minerales. Las temperaturas de la arena en verano son muy altas por lo que la superficie del suelo se seca y la principal fuente de agua es la lluvia que filtra a través de las raíces. Las plantas psamófilas están adaptadas a crecer bajo estas condiciones extremas y ayudan a fijar la arena formando hábitats especiales para muchas especies. Son plantas tolerantes a suelos arenosos sujetos a la influencia de la sal y del viento, a la exposición de las raíces a la erosión, a las altas temperaturas y a un bajo aporte de nutrientes. En estos sistemas naturales de dunas de arena existe un equilibrio microbiano conseguido tras años de sucesión que mantiene el sistema estable. Al romperse este equilibrio se crea un vacío microbiano incapaz de controlar la aparición de organismos patógenos por lo que para rehabilitar estos espacios degradados se ha de restaurar también el equilibrio que se crea entre las plantas y los hongos simbioses formadores de micorrizas.

En este trabajo se ha estudiado la presencia y la diversidad natural de los hongos formadores de micorrizas arbusculares asociados a las raíces de plantas psamófilas en cuatro zonas del litoral Mediterráneo. Se han estudiado dos zonas bien preservadas y dos zonas de dunas embrionarias recientemente protegidas del acceso público. Para detectar y clasificar los hongos formadores de micorrizas arbusculares presentes en estas zonas se han utilizado las técnicas tradicionales basadas en la morfología de las especies y las técnicas moleculares. Se han identificado y aislado especies de *Scutellospora persica*, *Glomus ambisporum*, *Glomus diaphanum*, *Glomus clarum*, *Glomus intraradices*, *Glomus microaggregatum* y *Gigaspora margarita*. Las esporas del género *Glomus* fueron las más abundantes en el suelo mientras que las especies pertenecientes al grupo Gigasporaceae fueron las más abundantes en las raíces de las plantas. En las zonas litorales mejor conservadas fue donde se recuperaron mayor número de esporas y mayor diversidad de especies. También se ha constatado que las plantas pioneras en las zonas litorales degradadas son plantas ruderales pertenecientes a familias que normalmente no forman micorrizas arbusculares como Cariofiláceas, Crucíferas y Polygonáceas.

P-244**MEDIOS DE CULTIVO Y TRAMPAS VEGETALES PARA ESTIMULAR LA REPRODUCCIÓN SEXUAL DE *Pythium solare*.**

Porcel, E.¹, Blanco, R.¹, Melero, J.M.², Serrano, Y.³ y Gómez, J.³

¹Dpto. de Producción Vegetal. EPS Universidad de Almería, Carretera de San Urbano 4120 Almería. ²Instituto de Agricultura Sostenible (CSIC), Apartado 4084, 14080 Córdoba. ³IFAPA. Centro La Mojonera. Almería.
E-mail: juliom.gomez@juntadeandalucia.es

En una prospección fitopatológica, realizada en invernaderos cultivados de judía (*Phaseolus vulgaris*) del sureste de Andalucía, se aisló una nueva especie de *Pythium*, a la que se denominó *Pythium solare*, que causa estrías necróticas en el tallo y en el sistema radicular de plantas adultas y su muerte. Una de las principales dificultades encontradas para su caracterización morfológica y posterior determinación taxonómica, fue la usualmente escasa presencia de oogonios en los medios de cultivo agarizados de harina de maíz (CMA) y de patata y zanahoria (PZA), y en las trampas vegetales realizadas con pétalos de clavel. El objetivo del estudio fue encontrar medios de cultivos y trampas vegetales económicas en las que *P. solare* formara órganos sexuales de forma rápida y fiable. Para ello se estudiaron a dos temperaturas (20° y 25°C) seis aislados de *P. solare* sobre 16 medios de cultivos y 14 trampas vegetales. Se utilizaron algunos medios de cultivo conocidos y otros originales, en los que se usaron extractos de hojas, frutos, raíces y semillas de judía y de otras especies vegetales.

En las trampas vegetales se utilizaron hojas de distintas especies (judía, melón, tomate, pimiento, naranjo, pino, grama y geranio); frutos (judía, pimiento y pepino), y otras partes vegetales como raíces de judía, cotiledones de cañamón y pétalos inmaduros de clavel. Para cada temperatura, medio de cultivo y trampa vegetal se realizaron 3 repeticiones de cada aislado. Las observaciones se realizaron a partir de los 2 días y hasta los 15-25 días.

De los 16 medios de cultivo, *P. solare* se reprodujo sexualmente en nueve de ellos, y en sólo seis a las dos temperaturas, siendo la de 25°C en la que mayor número de repeticiones presentaron órganos sexuales. Tras analizar los resultados obtenidos, se estima que los mejores medios de cultivo agarizados son el de jugo de verduras V8 y el de frutos de judía triturados. En ambos casos se consiguió, a las dos temperaturas, un mayor número de repeticiones con órganos sexuales.

En el caso de las trampas vegetales, *P. solare* se reprodujo sexualmente en todas, pero en nueve de ellas ocurrió a las dos temperaturas. Los cebos utilizados en esas nueve trampas fueron hojas de melón, naranjo, tomate y pimiento; fruto de judía, pimiento y pepino; pétalos inmaduros de clavel y raíces de judía.

P-245**CARACTERIZACIÓN DEL SISTEMA *Arabidopsis thaliana* Y SUS ENDOFITOS NATURALES PARA SU UTILIZACIÓN COMO MODELO DE ESTUDIO DE LOS FACTORES ECOLÓGICOS Y MOLECULARES IMPLICADOS EN LA EVOLUCIÓN DE LA VIRULENCIA**

Alonso, A. y Sacristán, S.

Centro de Biotecnología y Genómica de Plantas y Departamento de Biotecnología, Universidad Politécnica de Madrid, 28040 Madrid.

Se considera endofitos a aquellos hongos que crecen en el interior de las plantas sin causar síntomas aparentes de enfermedad. El endofitismo se puede considerar también como un estado, que puede ser transitorio, durante el que se produce una infección asintomática, sin tener en cuenta el tipo de interacción entre el hongo y el huésped que puede desarrollarse más adelante o en diferentes condiciones. La gran mayoría de las plantas estudiadas en ecosistemas naturales están colonizadas por endofitos, pudiendo resultar beneficiadas de esta situación en muchos aspectos. En los sistemas agrícolas, en cambio, la frontera entre endofito y patógeno latente puede ser difusa, debido posiblemente a que las prácticas agrícolas hayan favorecido la faceta patogénica de la infección endofita. Explorar diferentes sistemas planta-endofito nos puede ayudar a entender mejor qué es lo que determina que el hongo se comporte como un mutualista o un patógeno, posibilitando la búsqueda de nuevas estrategias contra la interacción negativa que da lugar a la enfermedad.

Arabidopsis thaliana (L) Heynh es la planta modelo mejor estudiada. Su genoma está secuenciado y hay una gran cantidad de información disponible sobre su genética y genómica funcional. La mayor parte del conocimiento disponible en interacción planta-patógeno proviene de sistemas con *A. thaliana* como huésped, y más recientemente se han comenzado a estudiar aspectos evolutivos de esta interacción con poblaciones naturales y experimentales de huésped y patógeno. Sin embargo, aún no existen trabajos publicados sobre el estudio de sus endofitos naturales.

Durante los años 2007 y 2008 hemos muestreado periódicamente distintas poblaciones de *A. thaliana* de la zona central española. Tras esterilizar la superficie de muestras de roseta y escapo floral de plantas asintomáticas y ponerlas en cámara húmeda, observamos, en el 50 a 90 % de los casos, el crecimiento de hongos de distintas especies. En este trabajo presentamos el resultado de estos muestreos, analizando la ocurrencia de las distintas especies de hongos endofitos encontradas en relación con la población del huésped muestreada y su variación en el tiempo.

INICIACIÓN DE CULTIVOS EMBRIOGÉNICOS Y REGENERACIÓN DE PLANTAS PARA LA TRANSFORMACIÓN GENÉTICA DE VID ORIENTADA A LA RESISTENCIA A ENFERMEDADES FÚNGICAS

Taboada, L., Rama, J., Vidal, J.R. y Segura, A.

Departamento de Fisiología Vexetal, Facultade de Bioloxía, Universidad de Santiago de Compostela. Avda. Lope Gómez de Marzoa s/n 15782 Santiago de Compostela. A Coruña

La vid (*Vitis vinifera*) es uno de los cultivos más extendidos en el mundo, siendo las enfermedades de etiología fúngica uno de los problemas que más afectan a la economía del cultivo, la producción y la calidad de la uva. La transformación genética, como herramienta de mejora molecular, es una de las tecnologías más apropiadas para ofrecer soluciones a este problema. Con este objetivo, hemos iniciado la puesta a punto de la transformación genética de la vid con el sistema biolístico. Por una parte, a partir de cultivos embriogénicos se han iniciado suspensiones celulares de las variedades Albariño, Tempranillo y Verdejo de las cuales se obtuvieron un alto porcentaje de emergencia de embriones y regeneración de plantas. Se ha determinado para cada variedad la densidad celular óptima utilizada para la transformación y los niveles mínimos de kanamicina para la selección efectiva de embriones y su conversión en plantas transgénicas. La capacidad de transformación de las suspensiones celulares fué evaluada por bombardeo con el gen glucuronidasa utilizando el sistema Biolístico. El número de eventos de transformación obtenido a los dos días del bombardeo oscila entre cinco y seis mil células transgénicas por placa Petri, lo que confirma la competencia de las suspensiones celulares. Por otra parte, el gen de vid *VvAMP1*, que codifica un péptido antimicrobiano perteneciente a la familia de las defensinas, se ha amplificado con cebadores específicos a partir del genoma de Albariño y clonado en el plásmido pBI221 bajo control del promotor CaMV 35S. La sobreexpresión constitutiva en vid de este gen endógeno podría conferir resistencia a importantes enfermedades fúngicas.