



Libro de Resúmenes

XVI Congreso de la Sociedad Española de Fitopatología

**Málaga
17-21 de septiembre de 2012
Hotel Barceló Málaga**

Edita:

GRONTAL SOLUCIONES BIOTECNOLÓGICAS S.L. en
colaboración con la Sociedad Española de Fitopatología

Edición literaria a cargo de: Eva Arrebola, Francisco M.
Cazorla, Alejandro Pérez, Diego F. Romero y Juan A. Torés

Imprime: *Artigraf*

Depósito Legal: GR-2472-2012

ISBN: 978-84-92991-88-4

ÍNDICE

PRÓLOGO	5
ENTIDADES ORGANIZADORAS, COLABORADORAS Y PATROCINADORAS	7
COMITÉ ORGANIZADOR Y COMITÉ CIENTÍFICO	9
PROGRAMA ABREVIADO	11
PROGRAMA	13
LISTA DE PANELES	29
RESÚMENES DE PONENCIAS INVITADAS	57
RESÚMENES DE COMUNICACIONES ORALES	65
Sesiones plenarias (PL-1 a PL-16)	67
Sesión simultánea 1: Etiología, diagnóstico y epidemiología I (SIM-1 a SIM-7)	85
Sesión simultánea 2: Control I (SIM-8-SIM-14)	95
Sesión simultánea 3: Interacciones planta-bacteria (SIM-15 a SIM-22)	105
Sesión simultánea 4: Interacciones planta-hongo (SIM-23 a SIM-28)	115
Sesión simultánea 5: Interacciones planta-patógeno (SIM-29 a SIM-36)	125
Sesión simultánea 6: Etiología, diagnóstico y epidemiología II (SIM-37 a SIM-43)	135
Sesión simultánea 7: Control II (SIM-44 a SIM-50)	145
Sesión simultánea 8: Interacciones planta-virus I (SIM-51 a SIM-58)	155
Sesión simultánea 9: Etiología, diagnóstico y epidemiología III (SIM-59 a SIM-65)	165
Sesión simultánea 10: Control III (SIM-66 a SIM-72)	175
Sesión simultánea 11: Interacciones planta-virus II (SIM-73 a SIM-80)	185
RESÚMENES DE PANELES	195
Control (PAN-1 a PAN-75)	197
Epidemiología (PAN-76 a PAN-113)	275
Etiología y diagnóstico (PAN-114 a PAN-160)	315
Interacciones planta-patógeno (PAN-160 a PAN-201)	365
ÍNDICE ALFABÉTICO DE AUTORES	409

PRÓLOGO

El comité organizador del XVI Congreso de la Sociedad Española de Fitopatología os da la bienvenida a Málaga. Con este congreso la SEF vuelve a Málaga veinte años después; en este tiempo tanto la SEF como Málaga han cambiado mucho, esperamos que durante esta semana podáis disfrutar de la evolución positiva de ambas.

Málaga, y sobre todo su gente, os reciben con los brazos abiertos. En estos días podréis conocer los últimos avances de la ciencia fitopatológica española y también, los atractivos de esta acogedora ciudad, su pequeño pero a la vez amable e interesante centro histórico (Catedral, Alcazaba, Teatro Romano, Museos), la proximidad del mar y su remozado puerto, el Parque; y cómo no, su gastronomía y sus tapas, acompañadas adecuadamente. Y todo ello, a sólo unos minutos caminando desde la sede del Congreso y la mayoría de los alojamientos sugeridos.

También podréis contemplar los fuertes contrastes de su agricultura, que va desde la tradicional del olivar o los viñedos en las comarcas interiores, a la moderna y en expansión de los frutales subtropicales en la comarca de la Axarquía, cuyo desarrollo se ve acompañado de nuevos y desconocidos problemas fitopatológicos.

¡Ay! Si el Congreso de Vitoria fue el de la crisis ¿cómo vamos a llamar a éste? Pero dejemos a un lado este tema, no nos vayamos a quedar de nuevo cortos dentro de dos años. Seamos positivos, hemos hecho todo lo posible porque la crisis se note lo menos posible; y así, es una gran satisfacción y responsabilidad para nosotros que el número de congresistas esté de nuevo alrededor de los 300. Hemos estructurado el Congreso en 15 sesiones (4 plenarias y 11 simultáneas), agrupadas en diferentes áreas temáticas, además de una mesa redonda y la sesión de clausura. El incremento de sesiones simultáneas respecto a congresos anteriores permitirá la presentación de un mayor número de comunicaciones orales, 97, entre sesiones plenarias y simultáneas, además de las 5 conferencias invitadas y los 4 participantes en la mesa redonda. Asimismo, se presentarán en exposición permanente 201 paneles que podrán ser discutidos en dos sesiones. Por tanto, se presentarán un total de 298 comunicaciones.

No podemos olvidar y queremos agradecer sinceramente la ayuda comprometida por diferentes instituciones públicas, como el INIA, la Universidad de Málaga o la Junta de Andalucía; y sobre todo de las diferentes empresas que han colaborado en la organización de este Congreso, y entre las que debemos destacar el especial patrocinio de KOPPERT Biological Systems. Muchísimas gracias a todos por su ayuda, para que este Congreso pueda celebrarse a pesar de las circunstancias económicas. Y como no, gracias a todos esos “voluntarios” quienes de forma desinteresada se esforzarán para que el Congreso funcione.

Deseamos que os encontréis lo más a gusto posible estos días en Málaga, y a ello hemos dedicado nuestro esfuerzo en los últimos meses. Como es lógico habrá fallos y cosas que podrían haberse hecho de otra forma, y por ello ya os pedimos sinceras disculpas, aunque siempre actuamos con la mejor de nuestras intenciones. Nuestro deseo es que Vds. disfruten del XVI Congreso de la SEF y de Málaga.

EL COMITÉ ORGANIZADOR

ENTIDADES ORGANIZADORAS

Sociedad Española de Fitopatología
Universidad de Málaga
Consejo Superior de Investigaciones Científicas

ENTIDADES COLABORADORAS

Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y
Alimentaria
Junta de Andalucía
Ayuntamiento de Málaga

ENTIDADES PATROCINADORAS

KOPPERT Biological Systems

BASF Crop Protection España
BIOIBERICA S.A.
BIOMOL S.L.
DICSA S.L.
Enza Zaden España S.L.
Grontal Soluciones Biotecnológicas S.L.
Jardín Botánico-Histórico “La Concepción”
Phytoma España S.L.
Rijk Zwaan Ibérica S.A.
SAT 2803 “TROPS”
Semillas Fitó S.A.
Semillas Nunhems España S.A.

...

COMITÉ ORGANIZADOR DEL XVI CONGRESO DE LA SOCIEDAD ESPAÑOLA DE FITOPATOLOGÍA

Presidente: Alejandro Pérez García (Universidad de Málaga)

Vicepresidente: Enrique Moriones Alonso (CSIC)

Secretario: Francisco M. Cazorla López (Universidad de Málaga)

Tesorero: Cayo Ramos Rodríguez (Universidad de Málaga)

Vocales: Juan A. Torés Montosa (CSIC)

Antonio de Vicente Moreno (Universidad de Málaga)

Jesús Navas Castillo (CSIC)

Eva Arrebola Díez (CSIC)

Diego F. Romero Hinojosa (Universidad de Málaga)

COMITÉ CIENTÍFICO

María Milagros López González (IVIA)

Jesús Murillo Martínez (Universidad Pública de Navarra)

María A. Ayllón Talavera (Universidad Politécnica de Madrid)

Alejandro Pérez García (Universidad de Málaga)

Juana I. Páez Sánchez (Junta de Andalucía)

Francisco J. Sorribas Royo (Universitat Politècnica de Catalunya)

César Llave Correas (CSIC)

Blanca Landa del Castillo (CSIC)

Amaia Ortiz Barredo (NEIKER-Tecnalia)

Programa abreviado

Horario		Lunes 17	Martes 18	Miércoles 19	Jueves 20	Viernes 21		
09:00-09:30	1ª Reunión del Grupo Especializado en Detección, Diagnóstico e Identificación	Acreditación y recogida de documentación. Colocación de paneles	Ponencia invitada y Sesión plenaria 2	Ponencia invitada y Sesión plenaria 3	Ponencia invitada y Sesión plenaria 4	Excursión técnica a la Axarquía: SAT 2803 "TROPs" e IHSM "La Mayora"		
09:30-10:00			Pausa café	Pausa café	Pausa café			
10:00-10:30			Sesiones simultáneas 1, 2 y 3	Sesiones simultáneas 6, 7 y 8	Sesiones simultáneas 9, 10 y 11			
10:30-11:00			Almuerzo	Almuerzo	Almuerzo			
11:00-11:30								
11:30-12:00	Inauguración	Discusión de paneles 1 (impares) y café	Sesiones simultáneas 4 y 5	Mesa Redonda	Clausura	Almuerzo en La Viñuela		
12:00-12:30							Visita guiada a la ciudad	
12:30-13:00								Asamblea de la SEF
13:00-13:30								
13:30-14:00								
14:00-14:30	Conferencia inaugural y Sesión plenaria 1	Recepción de bienvenida (Rectorado de la UMA) Avda. de Cervantes, 2 (Paseo del Parque)			Visita guiada al Jardín Botánico-Histórico "La Concepción" y Cena de despedida	Regreso a Málaga		
14:30-15:00								
15:00-15:30								
15:30-16:00								
16:00-16:30								
16:30-17:00	Conferencia de clausura							
17:00-17:30								
17:30-18:00								
18:00-18:30								
18:30-19:00								
19:00-19:30								
19:30-20:00								
20:00-20:30								
20:30-21:00								
21:00-21:30								
21:30-22:00								
22:00-22:30								
22:30-23:00								
23:00-02:00								

PROGRAMA

	Lunes, 17 de septiembre.	
11:30 - 13:30	1ª Reunión del Grupo Especializado en Detección, Diagnóstico e Identificación.	
12:00 – 16:30	Acreditación y recogida de documentación. Colocación de paneles.	
16:30 – 17:30	Inauguración.	
17:30 – 19:30	Sesión Plenaria 1 Moderadores: Jesús Murillo y José M. Díaz Mínguez	
17:30 – 18:30	Conferencia Inaugural: INV-1 EVOLUTION OF <i>Pseudomonas syringae</i> pv. phaseolicola VIA GENOMIC ISLAND LOSS AND GAIN. <i>Dr. Arnold, D.L., University of the West of England, Bristol, Reino Unido.</i>	59
18:30 - 18:45	PL-1: CONTRIBUCIÓN A LA VIRULENCIA Y ESPECIFICIDAD DE HUÉSPED DE EFECTORES DEL T3SS DE CODIFICACIÓN PLASMÍDICA EN <i>Pseudomonas savastanoi</i> NCPPB 3335. <i>Castañeda-Ojeda, M.P., López-Solanilla, E., Ramos, C.</i>	69
18:45 – 19:00	PL-2: BASES GENÉTICAS DE LA PRODUCCIÓN DE MANGOTOXINA. <i>Carrión, V.J., Arrebola, E., van der Voort, Gutiérrez-Barranquero, J.A., M., Murillo, J., Raaijmakers, J.M., de Vicente, A., Cazorla, F.M.</i>	70
19:00 – 19:15	PL-3: PDST12 (FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN) DE <i>Penicillium digitatum</i> IMPLICADO EN VIRULENCIA DURANTE LA INFECCIÓN DE FRUTOS CÍTRICOS. <i>De Ramón-Carbonell, M., Sánchez-Torres, P.</i>	71
19:15 – 19:30	PL-4: LA INFECCIÓN POR EL VIRUS DEL CASCABELEO DEL TABACO (TRV) ESTIMULA LA REGULACIÓN NEGATIVA DE <i>BIR1</i>, UN REPRESOR DE RESPUESTAS DE DEFENSA, A TRAVÉS DE SILENCIAMIENTO GÉNICO. <i>Hamada, I.B., Fernández, L., Donaire, L., Llave, C.</i>	72
20:30 - 22:30	Recepción de bienvenida. Rectorado de la Universidad de Málaga	

	Martes, 18 de setiembre.	
09:00 - 11:00	Sesión Plenaria 2: Moderadores: Juan José López-Moya y Enrique Moriones	
9:00 - 10:00	Conferencia invitada: INV-2 CROSS TALKS BETWEEN PLANT AND INSECTS CAN BE PERCEIVED BY INFECTING VIRUSES: PUTATIVE ECOLOGICAL CONSEQUENCES. <u>Dr. Blanc, S., UMR BGPI INRA-CIRAD-SupAgro, Montpellier, Francia.</u>	60
10:00 - 10:15	PL-5 PRODUCCIÓN DE ACILSACAROSAS EN TOMATE PARA EL CONTROL DE MOSCAS BLANCAS Y LOS VIRUS QUE TRANSMITEN. <u>Rodríguez-López, M.J., Escobar-Bravo R., Alba J.M., Garzo, E., Bonani, J.P., Fereres, A., Fernández-Muñoz, R., Moriones, E.</u>	73
10:15 - 10:30	PL-6 INTERVENCIÓN HUMANA Y RIESGO DE ENFERMEDAD: PAPEL DE LA BIODIVERSIDAD Y DE LA DENSIDAD DE HUÉSPED. <u>Pagán, I., González-Jara, P., Moreno-Letelier, A., Rodelo-Urrego, M., Fraile, A., Piñero, D., García-Arenal, F.</u>	74
10:30 - 10:45	PL-7 LA DIVERGENCIA VÍRICA EN LA RAZA EUROPEA DE <i>Gremmeniella abietina</i> NO SE CUMPLE EN LA POBLACIÓN ESPAÑOLA. <u>Botella, L., Tuomivirta, T.T., Hantula, J., Díez, J.J.</u>	75
10:45 - 11:00	PL-8 BASES EPIDEMIOLÓGICAS PARA LA ESTIMACIÓN DEL IMPACTO DEL CAMBIO CLIMÁTICO EN LA VERTICILLOSIS DEL OLIVO. <u>Lucena, C., Trapero-Casas, J.L., Navas-Cortés, J.A.</u>	76
11:00 - 11:30	PAUSA CAFÉ	
11:30 - 13:30	Sesión Simultánea 1: Etiología, Diagnóstico y Epidemiología I Moderadores: Antonio Vicent y Dolores Fernández Ortuño	
11:30 - 11:45	SIM-1 RECOMBINACIÓN ENTRE LOS BEGOMOVIRUS TYLCV Y TYLCSV EN ITALIA <u>Panno, S., Davino, S., Accotto, G. P., Davino, M., Rubio, L.</u>	87
11:45 - 12:00	SIM-2 ESTUDIO DE LA DIVERSIDAD VIRAL EN CEPAS DE <i>Botrytis cinerea</i> AISLADAS DE DIFERENTES HUÉSPEDES. <u>Rodríguez-García, C., Alonso, A., Ayllón, M. A.</u>	88
12:00 - 12:15	SIM-3 INFECCIÓN POR VIRUS DE dsRNA PERTENECIENTES A LAS FAMILIAS <i>Endornaviridae</i>	89

	Y <i>Chrysoviridae</i> EN AGUACATE <u>Villanueva, F.</u> , Sabanadzovic, S., Valverde, R.A., Navas-Castillo, J.	
12:15 - 12:30	SIM-4 SINERGISMO Y ANTAGONISMO EN MEZCLAS DE VARIANTES VIRALES DE TSWV. IMPLICACIONES EPIDEMIOLÓGICAS <u>Aramburu, J.</u> , López, C., Galipienso, L., Soler, S.	90
12:30 - 12:45	SIM-5 <i>Xanthomonas arboricola</i> pv. pruni: CRECIMIENTO Y FORMACIÓN DE AGREGADOS. <u>Sabuquillo, P.</u> , Ferragud, E., Redondo, C., Cubero, J.	91
12:45 - 13:00	SIM-6 CONTRIBUCIÓN DEL GEN <i>rpoS</i> A LA SUPERVIVENCIA EN CONDICIONES DE ESTRÉS, VIRULENCIA Y MOVILIDAD DE <i>Erwinia amylovora</i> <u>Santander, R. D.</u> , M. Monte-Serrano, J.F. Català-Senent, J.J. Rodríguez-Herva, E. López-Solanilla, P. Rodríguez-Palenzuela, E.G. Biosca	92
13:00 - 13:15	SIM-7 DESARREGLOS VEGETATIVOS EN APIO ASOCIADOS CON LA BACTERIA " <i>Candidatus</i> Liberibacter solanacearum" <u>Teresani, G.R.</u> , Bertolini, E., Alfaro-Fernández, A., Martínez, M.C., Villaescusa, F.J., Ferrándiz, J.A., Bartolomé, P., Sanjuán, S., Roselló, M., Dalmau, V., Hermoso, A., Tanaka, F., Kitajima, E.W., López, M.M., Cambra, M., Font, M.I.	93
11:30 - 13:30	Sesión Simultánea 2: Control I Moderadores: Amaia Ortiz y Antonieta de Cal	
11:30 - 11:45	SIM-8 INFLUENCIA DE FACTORES AMBIENTALES SOBRE LA SUPERVIVENCIA Y CRECIMIENTO DEL AGENTE DE BIOCONTROL <i>Penicillium oxalicum</i> EN SUELO <u>Larena, J.</u> , Vázquez, G., Herranz, Y., De Cal, A., Melgarejo, P., Magan, N.	97
11:45 - 12:00	SIM-9 EFICACIA DE DISTINTOS TIPOS DE BIOSOLARIZACIÓN EN EL CONTROL DE <i>Macrophomina phaseolina</i> EN EL CULTIVO DE LA FRESA EN HUELVA. <u>Chamorro M.</u> , Zubac M., Domínguez P., Medina-Mínguez J.J., Miranda L., Soria C., López-Aranda J.M., Romero F., de los Santos B.	98
12:00 - 12:15	SIM-10 IDENTIFICACIÓN DE DETERMINANTES DE <i>Pseudomonas fluorescens</i> PICF7 IMPLICADOS EN EL CONTROL DE LA VERTICILLOSIS DEL OLIVO <u>Maldonado-González M.M.</u> , Schiliro, E., Mercado-Blanco J.	99
12:15 - 12:30	SIM-11 RESISTENCIA A HONGOS Y BACTERIAS FITOPATÓGENAS EN ARROZ MEDIANTE LA EXPRESIÓN DE PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS SINTÉTICOS EN EL EMBRIÓN Y ENDOSPERMO	100

	DE SEMILLAS Montesinos, L., Bundó, M., Izquierdo, E., <u>Badosa, E.</u> , Campo, S., San Segundo, B., Feliu, L., Planas, M., Bardají, E., Rossignol, M., Coca, M., Montesinos, E.	
12:30 - 12:45	SIM-12 <i>Candida sake</i> CPA-1, UNA ALTERNATIVA EFICAZ PARA EL CONTROL DE LA PODREDUMBRE GRIS EN UVA DE VINIFICACIÓN <u>Calvo, C.</u> , Viñas, I., Usall, J., Elmer, P., Bartra, E., Teixidó, N.	101
12:45 - 13:00	SIM-13 CONTROL DE LAS AGALLAS RADICULARES DEL CLAVEL MEDIANTE ENMIENDAS ORGÁNICAS AL SUELO, SEGUIDAS DE SOLARIZACIÓN. <u>Melero-Vara, J.M.</u> , Vela, M.D., Basallote-Ureba, M.J., López-Herrera, C.J., Pelegrín, F., Talavera, M.	102
13:00 - 13:15	SIM-14 EFECTO DE LA RESISTENCIA VEGETAL Y EL AGENTE DE BIOCONTROL <i>Paecilomyces lilacinus</i> CEPA 251 SOBRE LA EPIDEMIOLOGÍA DE <i>Meloidogyne incognita</i> EN LA ROTACIÓN TOMATE-PEPINO EN INVERNADERO. <u>Giné, A.</u> , Ornat, C., Sorribas, F.J.	103
11:30 - 13:30	Sesión Simultánea 3: Interacciones planta-bacteria Moderadores: Jaime Cubero y Maria Trinidad Gallegos	
11:30 - 11:45	SIM-15 SAGRA: UNA NUEVA HERRAMIENTA PARA EL ANÁLISIS DE GENOMAS DE BACTERIAS ASOCIADAS A PLANTAS Río-Álvarez, I., Rodríguez-Herva, J.J., Palacios, J., López-Solanilla, E., de Vicente, A., Cazorla, F.M., Arrebola, E., García-Gutiérrez, L., Carrión, V., Magno, C., Zeirouh, H., Gutiérrez-Barranquero, J.A. Pérez-García, A., Ramos, C., Matas, I., Castañeda, P., Crespo, J.I., Murillo, J., Bardají, L., <u>Rodríguez-Palenzuela, P.</u>	107
11:45 - 12:00	SIM-16 PAPEL BIOLÓGICO DE UN OPERÓN DE SÍNTESIS DE CELULOSA LOCALIZADO EN EL GENOMA DE <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i> UMAF0158. <u>Arrebola, E.</u> , Cazorla, F. M., Carrión, V. J., Gutiérrez-Barranquero, J.A., Rodríguez-Palenzuela, P., de Vicente, A.	108
12:00 - 12:15	SIM-17 DgcP, UNA DIGUANILATO CICLASA ESPECÍFICA DE <i>Pseudomonas</i> IMPLICADA EN LA VIRULENCIA DE <i>Pseudomonas savastanoi</i> <u>Aragón, I.M.</u> , Pérez-Mendoza, D., Gallegos, M.T. y Ramos, C.	109
12:15 - 12:30	SIM-18 CARACTERIZACIÓN DE BIOPELÍCULAS EN	110

	<i>Xanthomonas citri</i> subsp. <i>citri</i> . Sena, M., Gell, I., Garita-Cambronero, J., Ferragud, E., Redondo, C., Girón, J., Cubero, J.	
12:30 - 12:45	SIM-19 IDENTIFICACIÓN DE NUEVOS EFECTORES DEL SISTEMA DE SECRECIÓN TIPO III EN <i>Pseudomonas savastanoi</i> pv. <i>savastanoi</i> <u>Matas, I.M.</u> , Castañeda-Ojeda, M.P., Aragón, I.M., Antúñez-Lamas, M., López-Solanilla, E., Rodríguez-Palenzuela, P., Ramos, C.	111
12:45 - 13:00	SIM-20 SUPERACIÓN DE RESISTENCIAS FRENTE A EFECTORES BACTERIANOS MEDIANTE SUPRESIÓN CRUZADA. Rufián, J. S., Lucía, A., Guevara, C. M., Macho, A. P., Zumaquero, A., Ruiz-Albert, J., <u>Beuzón, C. R.</u>	112
13:00 - 13:15	SIM-21 EFECTO DE LOS FLAVONOIDES SOBRE <i>Pseudomonas syringae</i> pv. tomato DC3000 <u>Farias, G.A.</u> , Vargas, P., Rivilla, R., Olmedilla, A., Gallegos, M.T.	113
13:15-13:30	SIM-22 CONTROL DE LA VIRULENCIA POR LUZ EN <i>Pseudomonas syringae</i> pv. tomato DC3000. <u>Río-Álvarez, I.</u> , Rodríguez-Herva, J. J., Rottwinkel, G., Navas, M., Lamparter, T., Rodríguez-Palenzuela, P., López-Solanilla, E.	114
14:00-15:30	ALMUERZO	
15:30-17:00	Discusión de Paneles 1 (Impares) y café	
17:00 - 19:00	Sesión Simultánea 4: Interacciones planta-hongo Moderadores: Aurora Fraile y Ernesto Pérez Benito	
17:00 - 17:15	SIM-23 IMPLICACIÓN DE UN TRANSPORTADOR DE SACAROSA (<i>PdSUT1</i>) EN LA PATOGENESIS Y VIRULENCIA DEL HONGO <i>Penicillium digitatum</i> . <u>De Ramón-Carbonell, M.</u> Sánchez-Torres, P.	117
17:15 - 17:30	SIM-24 DESARROLLO Y ULTRAESTRUCTURA DEL HAUSTORIO DE <i>Podosphaera fusca</i> , AGENTE CAUSAL DEL OÍDIO DE LAS CUCURBITÁCEAS <u>Martínez-Cruz, J.</u> , Vela, D., de Vicente, A., Pérez-García, A.	118
17:30 - 17:45	SIM-25 CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DE UN REGULADOR CRÍTICO DE PROCESOS MORFOGENÉTICOS EN <i>Verticillium dahliae</i> Y <i>V. albo-atrum</i> . <u>Sarmiento-Villamil, J.L.</u> , Baeza-Montañez, L, García-Pedrajas, M.D.	119
17:45 - 18:00	SIM-26 FUNCIONES FISIOLÓGICAS DEL ÓXIDO NÍTRICO (NO) en <i>Botrytis cinerea</i> : ANÁLISIS TRANSCRIPTÓMICO DE LA EXPOSICIÓN A NO.	120

	<u>Santander, D., Benito, E.P.</u>	
18:00 - 18:15	SIM-27 MODULACIÓN DE pH AMBIENTAL Y PATOGENICIDAD EN <i>Fusarium</i> . De Vega-Bartol, J.J., Tello, V., Casado del Castillo, V., Ramos, B., Núñez- Corcuera, B., Thomma, B.P.H.J., Prusky, D., Díaz-Mínguez, J.M.	121
18:15 - 18:30	SIM-28 MÉTODOS TRADICIONALES DE AISLAMIENTO VS. "NEXT GENERATION SEQUENCING": ¿CUÁNTAS ESPECIES DE <i>Phytophthora</i> SE PUEDEN DETECTAR EN SUELOS FORESTALES? Català, S., López-García, M.C., Beltrán, A., Berbegal, M., Abad-Campos, P., Pérez-Sierra, A.	122
18:30 - 18:45	SIM-29 ANÁLISIS FUNCIONAL DE EFECTORES CANDIDATOS DE <i>Blumeria graminis</i> f. sp. <i>hordei</i> , MEDIANTE SILENCIAMIENTO GÉNICO INDUCIDO POR EL HOSPEDADOR <u>Pliego C.</u> , Nowara D., Bonciani G., Gheorghe D., Schweizer P., Bindschedler L.V., Cramer R., Spanu P.D.	123
17:00 - 19:00	Sesión Simultánea 5: Interacciones planta-patógeno Moderadores: Cayo Ramos y Ramón Peñalver	
17:00 - 17:15	SIM-30 ¿CÓMO RESPONDE <i>Erwinia amylovora</i> AL ESTRÉS POR COBRE? <u>Águila-Clares, B.</u> , McNally, R., Marco-Noales, E., López, M.M., Sundin, G. W.	127
17:15 - 17:30	SIM-31 SEGUIMIENTO DEL DESARROLLO DE LA INFECCIÓN DE <i>Pseudomonas syringae</i> pv. phaseolicola EN INFECCIONES MIXTAS MEDIANTE MICROSCOPIA CONFOCAL. Rufián, J.S., Corry, D.S., Mansfield, J.W., Arnold, D.L., Beuzón, C.R.	128
17:30 - 17:45	SIM-32 <i>Orobanche cumana</i> (JOPO DEL GIRASOL) EN EUROPA: DIVERSIDAD DE POBLACIONES DE ALTA VIRULENCIA. García-Carneros, A.B., Melero-Vara, J.M., <u>Molinero-Ruiz, L.</u>	129
17:45 - 18:00	SIM-33 DIFERENCIAS ENTRE ESPECIES DE <i>Meloidogyne</i> EN LA PENETRACIÓN Y DESARROLLO EN RAÍCES DE SANDÍA (<i>Citrullus lanatus</i>). <u>López-Gómez, M. F.</u> ; Blanco, M., Verdejo-Lucas, S.	130
18:00 - 18:15	SIM-34 MUTAGÉNESIS LETAL IN VIVO DEL VIRUS DEL MOSAICO DEL TABACO POR 5-FLUOROURACILO. Mieg, I. B. Díaz Martínez, L., <u>Grande Pérez, A.</u>	131
18:15 - 18:30	SIM-35 SEGUIMIENTO VISUAL DE LA DINÁMICA	132

	DE INFECCIÓN DE PLANTAS POR VIRUS. Bedoya, L., Martínez, F., Orzáez, D., <u>Darós, J.A.</u>	
18:30 - 18:45	SIM-36 ESTUDIO FUNCIONAL DEL DOMINIO R DE LA PROTEÍNA DE CUBIERTA DEL VIRUS DE LAS MANCHAS NECRÓTICAS DEL MELÓN (MNSV). <u>Serra-Soriano, M., Pallás, V., Navarro, J.A.</u>	133
18:45-19:00	SIM-37 ESTUDIO DEL MECANISMO DE ACCIÓN Y EFECTO SINÉRGICO DE LA PROTEÍNA SUPRESORA DE SILENCIAMIENTO p22 DEL CRINIVIRUS TOMATO CHLOROSIS VIRUS <u>Landeo-Ríos Y., Navas-Castillo, J., Moriones E., Cañizares, M.C.</u>	
20:00-22:00	Visita guiada a la ciudad	
	Miércoles, 19 de setiembre.	
09:00 - 11:00	Sesión Plenaria 3: Moderadores: Rafael Jiménez Díaz y Pablo Rodríguez Palenzuela	
9:00 - 10:00	Conferencia invitada: INV-3 THE <i>Blumeria</i> GENOME: HOW A LONG AND INTIMATE ASSOCIATION WITH A PLANT HOST MOULDED THE MILDEW'S GENES. <u>Dr. Spanu, P., Imperial Collegue London, Londres, Reino Unido.</u>	61
10:00 - 10:15	PL-9 ESTRUCTURA GENÉTICA DE LAS POBLACIONES DE <i>Fusarium circinatum</i> EN ESPAÑA. <u>Berbegal, M., Pérez-Sierra, A., Armengol, J., García-Jiménez, J., Grünwald, N.J.</u>	77
10:15 - 10:30	PL-10 C2 FROM BEET CURLY TOP VIRUS PROMOTES A CELL ENVIRONMENT SUITABLE FOR EFFICIENT REPLICATION OF GEMINIVIRUSES, PROVIDING A NOVEL MECHANISM OF VIRAL SYNERGISM Caracuel, Z., Lozano-Durán, R., Huguet, S., Arroyo-Mateos, M., Rodríguez-Negrete, E. A., <u>Bejarano, E. R.</u>	78
10:30 - 10:45	PL-11 DESCRIPCIÓN DEL TRANSCRIPTOMA DE PLANTAS DE MELÓN INFECTADAS CON VIRUS DE DISTINTOS GÉNEROS, Y CON CEPAS DEL MISMO VIRUS <u>Gómez-Aix, C., Pascual, L., Cañizares, J., Sánchez-Pina, M. A., Aranda, M.A.</u>	79
10:45 - 11:00	PL-12 CARACTERIZACIÓN GENOTÍPICA Y ESTUDIO FENOTÍPICO DE <i>Xanthomonas arboricola</i> pv. <i>pruni</i> Y DE LOS PROCESOS ASOCIADOS A LOS PRIMEROS ESTADIOS DE INFECCIÓN.	80

	<u>Garita-Cambronero, J.</u> , Sabuquillo, P., Sena, M., Ferragud, E., Casero, C., Palacio-Bielsa, A., López, M. M., Cubero, J.	
11:00 - 11:30	PAUSA CAFÉ	
11:30 - 13:30	Sesión Simultánea 6: Etiología, diagnóstico y epidemiología II Moderadores: Josep Armengol y Juan Antonio Navas Cortés	
11:30 - 11:45	SIM-38 INCIDENCIA DE <i>Meloidogyne</i> spp. EN CULTIVOS HORTÍCOLAS PROTEGIDOS DEL SUDESTE ESPAÑOL <u>Talavera, M.</u> , Sayadi, S., Flor-Peregrín, E., Verdejo-Lucas, S.	137
11:45 - 12:00	SIM-39 COLONIZACIÓN DE LAS HERIDAS DE PODA DE LA VID POR HONGOS PATÓGENOS CAUSANTES DE ENFERMEDADES DE LA MADERA. <u>Luque, J.</u> , Elena, G., Garcia-Figueres, F., Reyes, J., Barrios, G., Legorburu, J.	138
12:00 - 12:15	SIM-40 DETECCIÓN DE <i>Ilyonectria</i> spp. CAUSANTES DEL PIE NEGRO DE LA VID EN EL PROCESO DE PRODUCCIÓN DE PLANTA INJERTADA EN VIVEROS. <u>Agustí-Brisach, C.</u> , Gramaje D., García-Jiménez, J., Armengol, J.	139
12:15 - 12:30	SIM-41 EVALUACIÓN DE LA DISPERSIÓN, INCIDENCIA Y SEVERIDAD DEL MOTEADO DEL NÍSPERO (<i>Fusicladium eriobotryae</i>) EN UNA PARCELA COMERCIAL González-Domínguez, E., Michereff, S., Armengol, J., Miñana, A., Quintanilla, P., García-Jiménez, J.	140
12:30 - 12:45	SIM-42 EVOLUCIÓN DE LAS ESPECIES DE <i>MONILINIA</i> SPP. EN TRES HUERTOS DE MELOCOTONEROS DEL VALLE DEL EBRO TRAS LA INTRODUCCIÓN DEL PATÓGENO DE CUARENTENA <i>Monilinia fructicola</i> . Villarino, M., Melgarejo, P., Morales, M.T., Castillo, R., Egüen, B., Lamarca, N., Casals, C., Segarra, J., Usall, J., <u>De Cal, A.</u>	141
12:45 - 13:00	SIM-43 PRESENCIA Y VIABILIDAD DE <i>Monilinia</i> spp. EN LOS FRUTOS MOMIFICADOS. Casals, C., Segarra, J., de Cal, A., Lamarca, N., <u>Usall, J.</u>	142
13:00 - 13:15	SIM-44 ANÁLISIS ESPACIAL DE LAS EPIDEMIAS DE LA PODREDUMBRE PARDA DEL MELOCOTONERO CAUSADO POR <i>Monilinia</i> spp. <u>Segarra, J.</u> , De Cal, A., Lamarca, N., Casals, C.,	143

	Usall, J.	
11:30 - 13:30	Sesión Simultánea 7: Control II Moderadores: Vicente Medina e Inmaculada Larena	
11:30 - 11:45	SIM-45 EFECTO DEL TRATAMIENTO CON ÁCIDO SALICÍLICO EN LA FISIOLOGÍA Y EN LA RESISTENCIA DEL TOMATE A <i>Virus X de la patata</i> (PVX). <u>Falcioni T.</u> , Ferrio J.P., Cueto-Ginzo A., Giné J., Achón M.A., Medina V.	147
11:45 - 12:00	SIM-46 FO47 INDUCE RESPUESTAS DEFENSIVAS EN <i>Capsicum annuum</i> Y REDUCE LA VERTICILLOSIS. Veloso, J., Olivain, C., Cordier, C., Pastor, V., Alabouvette, C., Flors, V., <u>Díaz, J.</u>	148
12:00 - 12:15	SIM-47 RESISTENCIA A FUNGICIDAS Y FITNESS DE LA POBLACIÓN DE <i>Monilinia</i> spp. EN HUERTOS DE MELOCOTONERO DEL VALLE DEL EBRO. <u>Egüen, B.</u> , Melgarejo, P. De Cal, A.	149
12:15 - 12:30	SIM-48 CONTROL DEL VIRUS DE LA SHARKA MEDIANTE TRATAMIENTOS CON ACEITES MINERALES EN DIFERENTES ESCENARIOS ECOLÓGICOS. Vidal, E., Zagrai, L., Milusheva, S., Bozhkova, V., Tasheva-Terzieva, E., Kamenova, I., Zagrai, I., <u>Cambra, M.</u>	150
12:30 - 12:45	SIM-49 DEFENSA Y CONTRA DEFENSA FRENTE AL VIRUS DEL MOSAICO DEL PEPINO (CMV) EN MELÓN. <u>Martín-Hernández, A.M.</u> , Monforte, A.J., Gyetvai, G., Correa, R., Guiu, C., García-Mas, J.	151
12:45 - 13:00	SIM-50 ESTRATEGIAS DE REDUCCIÓN DE COBRE PARA EL CONTROL DEL REPILO DEL OLIVO CAUSADO POR <i>Fusicladium oleagineum</i> . Roca, L.F., Romero, J., Trapero, A.	152
13:00 - 13:15	SIM-51 LA INSERCIÓN DE LOS GENES <i>copG</i> Y <i>czcCBA</i> EN EL OPERÓN <i>copABCD</i> DE <i>Pseudomonas syringae</i> pv <i>syringae</i> , INCREMENTAN LA RESISTENCIA A COBRE. <u>Gutiérrez-Barranquero, J.A.</u> , Cazorla, F.M., de Vicente, A., Sundin, G.W.	153
11:30 - 13:30	Sesión Simultánea 8: Interacciones planta-virus I Moderadores: Francisco Tenllado y Jesús Navas Castillo	
11:30 - 11:45	SIM-52 IMPLICACIÓN DE LAS OXILIPINAS EN LA MANIFESTACIÓN DE LA NECROSIS SISTÉMICA INDUCIDA POR UNA INFECCIÓN VIRAL	157

	COMPATIBLE. <u>Pacheco, R.</u> , García-Marcos, A., Manzano, A., Tenllado, F.	
11:45 - 12:00	SIM-53 IMPLICACIÓN DEL METABOLISMO PRIMARIO EN LA SUSCEPTIBILIDAD DE LAS PLANTAS A LA INFECCIÓN VIRAL: UNA VISIÓN TRANSCRIPTÓMICA, METABOLÓMICA Y FUNCIONAL Del Toro, F.J., Fernández-Calvino, L., Donaire, L., Osorio, S., Fernie, A., Yu, A. <u>Llave, C.</u>	158
12:00 - 12:15	SIM-54 LA UNIÓN A RNAs DE LA PROTEÍNA 2b DEL VIRUS DEL MOSAICO DEL PEPINO ES MÁS CRÍTICA PARA SU FUNCIÓN SUPRESORA DEL SILENCIAMIENTO QUE LA LOCALIZACIÓN NUCLEAR. González, I., Rakitina, D., Semashko, M., Taliansky, M., Praveen, S., Palukaitis, P., Carr, J., Kalinina, N., <u>Canto, T.</u>	159
12:15 - 12:30	SIM-55 STRUCTURE, DIVERSITY AND SELECTION OF THE L. RESISTANCE GENE TOWARD TOBAMOVIRUSES IN <i>Capsicum annuum</i> var. aviculare WILD POPULATIONS IN MEXICO. <u>Poulicard, N.</u> , González-Jara, P., Fraile, A., Piñero D., García-Arenal, F.	160
12:30 - 12:45	SIM-56 LA PROTEÍNA P23 DEL VIRUS DE LA TRISTEZA DE LOS CÍTRICOS: DISECCIÓN DETALLADA DE LOS DETERMINANTES DE LOCALIZACIÓN NUCLEOLAR Y DE SU EFECTO SOBRE LA SUPRESIÓN Y PATOGÉNESIS. <u>Ruiz-Ruiz, S.</u> , Navarro, L., Moreno, P., Peña, L., Flores, R.	161
12:45 - 13:00	SIM-57 CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DEL DETERMINANTE GENÉTICO DEL VIRUS DEL BRONCEADO DEL TOMATE RESPONSABLE DE SUPERAR LA RESISTENCIA MEDIADA POR EL GEN SW-5 <u>Peiró, A.</u> , Cañizares, M.C., López, C., Aramburu, J., Rubio, L., Prins, M., Resende, R.O., Moriones, E., Sánchez-Navarro, J.A.	162
13:00 - 13:15	SIM-58 ESTUDIO DE LA FUNCIÓN DE GENES DE CÍTRICOS UTILIZANDO UN VECTOR VIRAL BASADO EN EL GENOMA DEL MANCHADO FOLIAR DE LOS CÍTRICOS. <u>Agüero, J.</u> , Velázquez, K., Vives, M.C., Pina, J.A., Navarro, L., Moreno, P., Guerri, J.	163
13:15 – 13:30	SIM-59 SAHH, UNA PROTEÍNA DE PLANTA QUE INTERACCIONA CON LA PROTEÍNA DE LA CÁPSIDA DE UN CRINIVIRUS, ESTÁ INVOLUCRADA TANTO EN SILENCIAMIENTO DE	164

	RNA COMO EN SU SUPRESIÓN. <u>Cañizares, M.C.</u> , Lozano-Durán, R., Canto, T., Bejarano, E.R., Bisaro, D.M., Navas-Castillo, J., Moriones, E.	
14:00-15:30	ALMUERZO	
15:30-17:00	Discusión de Paneles 2 (Pares) y café	
17:00-18:30	Mesa Redonda: PATÓGENOS DE CUARENTENA EN LA UNIÓN EUROPEA. Moderador: Antonio de Vicente Participantes: José María Cobos, Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente. Ana María Pérez Sierra, Universidad Politécnica de Valencia. José Luis Palomo Gómez, Centro Regional de Diagnóstico, Junta de Castilla y León.	
18:30 – 20:30	ASAMBLEA DE LA SEF	
	Jueves, 20 de setiembre	
09:00 - 11:00	Sesión Plenaria 4: Patrocinada por KOPPERT Biological Systems Moderadores: Esther Badosa y Diego Romero	
09:00 - 10:00	Conferencia invitada: INV-4 EFFECTS OF INDUCED RESISTANCE ON THE RHIZOSPHERE MICROBIOME. <u>Dr. Bakker, P.A.H.M.</u> , <i>Utrecht University, Utrecht, Países Bajos</i>	62
10:00 - 10:15	PL-13 ANÁLISIS TRANSCRIPTÓMICO DE LA INTERACCIÓN ENTRE EL ENDÓFITO <i>Pseudomonas fluorescens</i> PICF7 Y RAÍCES DE OLIVO. Schiliro`, E., Ferrara, M., Nigro, F., <u>Mercado-Blanco, J.</u>	81
10:15 - 10:30	PL-14 CONTROL DEL FUEGO BACTERIANO DE LAS ROSÁCEAS MEDIANTE BACTERIAS DEL ÁCIDO LÁCTICO PRODUCTORAS DE BACTERIOCINAS. <u>Roselló, G.</u> , Francés, J., Montesinos, L., Montesinos, E., Bonaterra, A.	82
10:30 - 10:45	PL-15 RESISTENCIA GENÉTICA EN MELÓN A <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>melonis</i>: RESULTADOS DE 10 AÑOS DE ESTUDIOS.	83

	<u>Oumouloud, A.</u> , González-Torres, R., Chikh-Rouhou, H., Garcés, A., Álvarez, J. M.	
10:45 – 11:00	PL-16 FACTORES AGRONÓMICOS, AMBIENTALES Y MICROBIOLÓGICOS ASOCIADOS A LA CALIDAD BIOLÓGICA Y SUPRESIVIDAD DE SUELOS DE OLIVAR A LA VERTICILOSIS: UNA APROXIMACIÓN METAGENÓMICA. Montes-Borrego, M., Metsis, M., Gramaje, D., Simm, J., Tamames, J., Navas-Cortés, J. A., <u>Landa, B. B.</u>	84
11:00 - 11:30	PAUSA CAFÉ	
11:30 - 13:30	Sesión Simultánea 9: Etiología, diagnóstico y epidemiología III Moderadores: Ana Pérez Sierra y Eva Arrebola	
11:30 - 11:45	SIM-60 PROGRESOS Y RETOS EN LA SISTEMÁTICA DEL MILDIU DE LA ADORMIDERA: IMPLICACIONES PARA EL DESARROLLO DE VARIEDADES RESISTENTES <u>Montes-Borrego, M.</u> , Voglmayr, H., Cantalapiedra, C., Landa, B.B.	167
11:45 - 12:00	SIM-61 DIAGNOSTICO Y DIVERSIDAD DE LOS AISLADOS DE <i>Fusarium</i> CAUSANTES DE LA MALFORMACIÓN DEL MANGO EN LA AXARQUÍA. <u>Crespo, M.</u> , Cazorla, F.M., Freeman, S., Arrebola, E., Torés, J.A., de Vicente, A.	168
12:00 - 12:15	SIM-62 CARACTERIZACIÓN MOLECULAR Y MORFOLÓGICA DE <i>Diplodia seriata</i> Y ESTUDIO DE LA COMPATIBILIDAD VEGETATIVA. <u>Elena, G.</u> , Luque, J., Garcia-Figueres, F., Reigada, S.	169
12:15 - 12:30	SIM-63 EL DECAIMIENTO DE <i>Quercus</i> spp. ASOCIADO A <i>Phytophthora</i> spp. EN LA COMUNIDAD VALENCIANA. <u>Pérez-Sierra, A.</u> , López-García, C., Puértolas, A., León, M., García-Jiménez, J., Jung, T., Abad-Campos, P.	170
12:30 - 12:45	SIM-64 EVALUACIÓN DE MODELOS DE PREDICCIÓN DE LA MANCHA MARRÓN DE LAS MANDARINAS CAUSADA POR <i>Alternaria alternata</i> : ANÁLISIS MEDIANTE CURVAS ROC. Bassimba, D.D.M., Mira, J.L., <u>Vicent, A.</u>	171
12:45 - 13:00	SIM-65 <i>Prolasioptera berlesiana</i> : VECTOR DE <i>Botryosphaeria dothidea</i> AGENTE CAUSAL DEL ESCUDETE DEL OLIVO. Aldebis, H.K., Eldesouki-Arafat, I., <u>Moral, J.</u> , López-Escudero, F.J., Traperó, A., Vargas-Osuna, E.	172
13:00 - 13:15	SIM-66 IDENTIFICACIÓN MEDIANTE TERMOGRAFÍA Y FLUORESCENCIA DE IMAGEN	173

	DE “MARCAS DE IDENTIDAD” DE ENFERMEDADES BACTERIANAS DE PLANTAS. Pérez-Bueno, M.L., Pineda, M., Granum, E., López-Solanilla, E., Rodríguez-Palenzuela, P., Ramos, C., <u>Barón, M.</u>	
11:30 - 13:30	Sesión Simultánea 10: Control III Moderadores: José María Melero y Anna Bonaterra	
11:30 - 11:45	SIM-67 “PROFILE KIT” EN FRESAS: UNA NUEVA HERRAMIENTA PARA MONITORIZAR PROBLEMAS DE RESISTENCIA A FUNGICIDAS EN <i>Botrytis cinerea</i> . <u>Fernández-Ortuño, D.</u> , Grabke, A., Schnabel, G.	177
11:45 - 12:00	SIM-68 SUPERVIVENCIA DE <i>Phytophthora capsici</i> A DISTINTOS TRATAMIENTOS DE BIOSOLARIZACIÓN EN CONDICIONES CONTROLADAS DE LABORATORIO. Larregla, S., Núñez-Zofío, M., Pérez, E., Núñez-Zofío, M., Guerrero, M.M., Lacasa, C.M., Martínez, V. Ros, C. Martínez, M.A., Lacasa, A.	178
12:00 - 12:15	SIM-69 EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD DE INMUNOMODULACIÓN DE DIFERENTES scFv ESPECÍFICOS DE <i>Plum pox virus</i> . <u>Gil, M.</u> , Esteban, O., García J.A., Peña, L., Cambra, M.	179
12:15 - 12:30	SIM-70 INTERFERENCIA DE GENES DEL VECTOR PARA EL BLOQUEO DE LA TRANSMISIÓN DE VIRUS DE PLANTAS: ADMINISTRACIÓN DE RNAs DE DOBLE CADENA POR DIETA ARTIFICIAL. <u>Vilaplana, L.L.</u> , Urizarna, M., Mingot, A., López-Abella, D., López-Moya, J.J.	180
12:30 - 12:45	SIM-71 RELACIÓN ENTRE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA Y LA DISTRIBUCIÓN DE GENES BIOSINTÉTICOS DE CICLOPÉPTIDOS, EN <i>Bacillus</i> spp. AISLADOS DE PLANTAS. Mora, I., <u>Cabrefiga, J.</u> , Montesinos, E.	181
12:45 - 13:00	SIM-72 PAPEL DE LA SURFACTINA EN LA FORMACIÓN DE BIOPELÍCULAS Y LA CAPACIDAD DE CONTROL BIOLÓGICO DE <i>Bacillus</i> . <u>Zerrouh, H.</u> , García-Gutiérrez, L., de Vicente, A., Romero, D., Pérez-García, A.	182
13:00 - 13:15	SIM-73 EL PROGRAMA DE MEJORA DEL OLIVO POR RESISTENCIA A LA VERTICILLOSIS. <u>Trapero, C.</u> , Muñoz-Díez, C., Rallo, L., López-Escudero, F.J., Barranco, D.	183

11:30 - 13:30	Sesión Simultánea 11: Interacciones planta-virus II Moderadores: Miguel Ángel Aranda y Carmen Cañizares	
11:30 - 11:45	SIM-74 ¿SON LAS INFECCIONES VIRALES UN FACTOR EN LA EVOLUCIÓN DE LAS PLANTAS? Montes, N., Fraile, A., Alonso-Blanco, C., García-Arenal, F.	187
11:45 - 12:00	SIM-75 LA ACTIVIDAD SUPRESORA DEL FACTOR HCPRO DEL VIRUS Y DE LA PATATA DEPENDE DE LA PRESENCIA AGUAS ARRIBA DE LA PROTEÍNA P1 DURANTE SU TRADUCCIÓN. Tena, F., González, I., Doblas, P., Sahana, N., Praveen, S., Canto, T.	188
12:00 - 12:15	SIM-76 LA PROTEÍNA DE MOVIMIENTO DEL VIRUS DEL MOSAICO DEL PEPINO (CMV) DETERMINA LA VIRULENCIA EN LA ACCESIÓN DE MELÓN "SONWANG CHARM", PI161375. <u>Guiu, C.</u> , Díaz-Pendón, J. A., Martín-Hernández, A. M.	189
12:15 - 12:30	SIM-77 OVER-ACCUMULATION OF ALFALFA MOSAIC VIRUS COAT PROTEIN IN THE NUCLEOPLASM INDUCES CELL DEATH. <u>Aparicio, F.</u> , Prada, C., Pallás, V.	190
12:30 - 12:45	SIM-78 ESTUDIO CELULAR DE LOS PROCESOS TEMPRANOS QUE TIENEN LUGAR EN COTILEDONES DE MELÓN INFECTADOS POR MNSV. <u>Sánchez-Pina, M.A.</u> , Gómez Aix, C., Aranda, M.A.	191
12:45 - 13:00	SIM-79 LA LOCALIZACIÓN SUBCELULAR Y LA CAPACIDAD SUPRESORA DE LA PROTEÍNA DE LA CÁPSIDA p25 DIFIERE ENTRE AISLADOS DEL VIRUS DE LA TRISTEZA DE LOS CÍTRICOS. Navarro-López, J., Ruiz-Ruiz, S., Flores, R., Moreno, P., <u>Ambrós, S.</u>	192
13:00 - 13:15	SIM-80 LA PROTEÍNA P14 DEL VIRUS B DE LA VID: LOCALIZACIÓN SUBCELULAR Y EFECTO PATOGENICO Y SUPRESOR DEL SILENCIAMIENTO. <u>Davino, S.</u> , Ruiz-Ruiz, S., Flores, R.	193
13:15 - 13:30	SIM-81 GEMINIVIRUS REP PROTEIN INTERFERES WITH THE PLANT DNA METHYLATION MACHINERY AND SUPPRESSES TRANSCRIPTIONAL GENE SILENCING. Rodríguez-Negrete, E., Lozano-Durán, R., Piedra-Aguilera, A., Cruzado, L., Bejarano, E.R., Castillo, A.G.	194
14:00 - 15:30	Almuerzo	

16:00 – 17:00	Conferencia Clausura Moderadores: M. Ángeles Ayllón y Fernando García-Arenal INV-5 MYCOVIRUSES AT THE FUNGUS-PLANT INTERFACE: HOW PLANT PATHOGENIC FUNGI DEFEND AGAINST VIRUS-MEDIATED HYPOVIRULENCE AT THE CELLULAR AND POPULATION LEVELS. <i>Dr. Nuss, D., Institute for Bioscience and Biotechnology Research, University of Maryland, Maryland, USA</i>	65
17:00 - 17:30	Clausura	
19:30 – 2:00	Visita al Jardín Botánico-Histórico de La Concepción. Cena de despedida.	
	Viernes, 21 de septiembre	
9:30-14:30	Excursión técnica a la Axarquía: SAT 2803 “TROPES” e IHSM “La Mayora”	
14:30-16:30	Almuerzo en la Viñuela	
16:30-17:30	Regreso a Málaga	

LISTA DE PANELES

PAN-1 PROTECCIÓN DEL ÁCIDO SALICÍLICO CONTRA LA INFECCIÓN DEL VIRUS DEL MOSAICO ENANIZANTE DEL MAÍZ (*Maize dwarf mosaic virus*, MDMV)

Cueto-Ginzo A., Serrano, L., Sin, E., Rodríguez, R., Falcioni, T., Medina, V., Achón, M.A.

PAN-2 EVALUACIÓN DE *Pseudomonas fluorescens* PICF7 COMO AGENTE DE BIOCONTROL DE *Plasmopara halstedii* EN GIRASOL

Maldonado-González, M.M., García-Carneros, A., Prieto, P., Lucena-Lucena, N., Molinero-Ruiz, L., Mercado-Blanco J.

PAN-3 RESPUESTA DE TRES ESPECIES DE PLANTAS AROMÁTICAS A *Rosellinia necatrix* MODULADA POR LA MICORRIZACIÓN CON *Glomus intraradices*

Calvet, C., García-Figueres, F., Prat, M., Reigada, S., Camprubí, A.

PAN-4 LOS GENES *dar* ESTÁN IMPLICADOS EN LA CAPACIDAD DE BIOCONTROL DE *Pseudomonas fluorescens* PCL1606

Calderón, C.E., Bonilla, N., Carrión, V.J., de Vicente, A.1, Cazorla, F.M.

PAN-5 *Arabidopsis thaliana* COMO MODELO PARA ELUCIDAR LOS MECANISMOS DE BIOCONTROL DE *Pseudomonas fluorescens* PICF7 FRENTE A *Verticillium dahliae*

Maldonado-González, M.M., Bakker, P.A.H.M. , Mercado-Blanco, J.

PAN-6 DE LA RAÍZ AL TALLO: INTERACCIÓN *Pseudomonas fluorescens* PICF7-*Pseudomonas savastanoi* NCPPB 3335 EN TUMORES DE OLIVO

Maldonado-González M.M., Prieto P., Ramos C., Mercado-Blanco J.

PAN-7 EFICACIA POTENCIAL DE PRODUCTOS QUÍMICOS PARA REDUCIR LAS INFESTACIONES DEL AGUA POR CONIDIAS DE DISTINTOS GRUPOS DE VIRULENCIA DE *Verticillium dahliae* SOBRE OLIVO

Santos Rufo, A., Rodríguez Jurado, D.

PAN-8 VARIACIÓN EN EL PATRÓN DE LAS POBLACIONES FÚNGICAS DE DOS SUELOS AGRÍCOLAS A LO LARGO DEL CICLO DE CULTIVO DEL TOMATE TRAS LA APLICACIÓN DE *Penicillium oxalicum*

Vázquez, G., Melgarejo, P., Herranz, Y., Mallorquí, M., Martínez-Alonso, M., Gaju, N., Larena, I.

PAN-9 MÉTODO DE CUANTIFICACIÓN DEL AGENTE DE BIOCONTROL *Penicillium oxalicum* CEPA 212 EN DIFERENTES TIPOS DE SUELO

Vázquez, G., Herranz, Y., De Cal, A., Melgarejo, P., Larena, I.

PAN-10 MÉTODO DE TRANSFORMACIÓN DE *Penicillium oxalicum*, UN EFICAZ AGENTE DE BIOCONTROL

Martínez, F., Herranz, Y., Villarino, M., Espeso, E. A., Melgarejo, P., Larena, I.

PAN-11 EVALUACIÓN DE GENOTIPOS DE OLIVO PARA RESISTENCIA A LA VERTICILLOSIS

Arias Calderón, R., León, L., Bejarano Alcázar, J., de la Rosa, R., Belaj, A., Rodríguez Jurado, D.

PAN-12 CONTROL INTEGRADO FRENTE A ENFERMEDADES FÚNGICAS DEL SUELO EN VIVEROS DE FRESA

De Cal, A., Martínez-Trecheño, A., Morales-Clemente, M.T., Vázquez, G., Melgarejo, P.

PAN-13 ECOFISIOLOGÍA DE TRES AGENTES DE BIOCONTROL EN LA FILOSFERA Y RIZOSFERA DE UN ECOSISTEMA NATURAL

Larena, I., Herranz, Y., Morales-Clemente, M.T., Castillo, R., Melgarejo, P., De Cal, A.

PAN-14 COMPORTAMIENTO DE VARIEDADES COMERCIALES DE FRESA FRENTE A ENFERMEDADES EN VIVEROS

Redondo, C., Larenas, J., López-Aranda, J.M., Soria, C., Martínez-Trecheño, A., Melgarejo, P., De Cal, A.

PAN-15 EL EFECTO DE LA TEMPERATURA EN LA EFICACIA DE LA RESISTENCIA A TSWV EN PIMIENTO

Aramburu, J., Galipienso L., López, C., Soler, S.

PAN-16 EL CAPSINOIDE VANILLILNONANOATO PROTEGE AL PIMIENTO FRENTE A *Phytophthora capsici* Y *Botrytis cinerea*

García, T., Veloso, J., Díaz, J.

PAN-17 IDENTIFICACIÓN DE GENES DEL AGENTE DE BIOCONTROL *Pseudomonas pseudoalcaligenes* AVO110 IMPLICADOS EN LA MICOLOGÍA DE *Rosellinia necatrix*

Crespo-Gómez J. I., Pliego C., de Vicente A., Calderón, C. E., Ramos, C., Cazorla F. M.

PAN-18 EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD DE BIOCONTROL DE *Trichoderma* spp. FRENTE A AISLAMIENTOS DE *Sclerotinia sclerotiorum* PROCEDENTES DE IGP “ALUBIA DE LA BAÑEZA-LEÓN”

Mayo, S., González, O., Rodríguez, A., Campelo, M. P., Lorenzana, A., Gutiérrez, S., Casquero, P. A.

PAN-19 EVALUACIÓN DE LA RESISTENCIA DE CULTIVARES DE FRESA A *Macrophomina phaseolina*, AGENTE CAUSAL DE PODREDUMBRE CARBONOSA

Chamorro, M., Romero, F., de los Santos, B.

PAN-20 EFICACIA DE *Trichoderma harzianum* (CEPA T-22) SOBRE LAS NECROSIS DE LA BASE DEL TALLO DE LA JUDÍA OCASIONADAS POR *Pythium solare*

Galeano, M., Gómez, J., Moreno, J., Belda, J.E.

PAN-21 ANTAGONISMO IN VITRO DE LA CEPA T-22 DE *Trichoderma harzianum* SOBRE HONGOS PATÓGENOS DE HORTALIZAS EN EL SUDESTE ESPAÑOL

Galeano, M., Gómez, J., Rodríguez, M.V., Belda, J.E.

PAN-22 IDENTIFICACIÓN DE NUEVOS PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS CAPACES DE BLOQUEAR LA FORMACIÓN DE APRESORIO DEL HONGO FITOPATÓGENO *Magnaporthe oryzae*

Rebollar, A., López-García, B.

PAN-23 IDENTIFICACIÓN DE UNA FUENTE DE TOLERANCIA AL ToMV EN *Solanum lycopersicoides*

Soler, S., Belmonte, I., Aramburu, J., Galipienso, L., López, C., Díez, M. J.

PAN-24 ANTIMICROBIANOS DERIVADOS DE PÉPTIDOS LINEALES Y ANÁLOGOS DE BACTERIOCINAS Y CICLOLIPOPÉPTIDOS PARA EL CONTROL DE HONGOS Y BACTERIAS FITOPATÓGENOS

Badosa, E., Güell, I., Ng-Choi, I., Cabrefiga, J., Talleda, M., Vilà, S., Cano, L., Micaló, L., Soler, M., Cerezo, V., Ferre, R., Feliu, L., Planas, M., Bardají, E., Montesinos, E.

PAN-25 ANÁLISIS GENÓMICO DE DOS CEPAS DE *Bacillus* CON CAPACIDAD DE BIOCONTROL FRENTE A OÍDIO DE CUCURBITÁCEAS

Magno, M. C., Arrebola, E., Zeriuoh, H., García-Gutiérrez, L., Romero, D., de Vicente, A., Ramos, C., Rodríguez-Palenzuela, P., Pérez-García, A.

PAN-26 PAPEL DE LOS TRANSPORTADORES ABC EN LA RESISTENCIA A FUNGICIDAS EN *Podosphaera fusca*

Bellón-Gómez, D., Deising, H. B., Pérez-García, A., Torés J. A.

PAN-27 DIEZ AÑOS SIN RESISTENCIA A MICLOBUTANIL EN OÍDIO DE CUCURBITÁCEAS EN ESPAÑA

Bellón-Gómez, D., Abad, R., Pérez-García, A., Torés J. A.

PAN-28 ESCLARECIMIENTO DEL MECANISMO DE ACCIÓN DE LOS FUNGICIDAS DE LA FAMILIA DE LOS BENZIMIDAZOLES

Vela, D., Romero, D., de Vicente, A., Torés, J. A., Pérez-García, A.

PAN-29 EFICACIA DEL CONTROL QUÍMICO EN EL CHANCRO DEL CASTAÑO

Trapiello, E., González-Varela, G., Campelo, M. P., González, A. J.

PAN-30 EFECTO DE *Fusarium circinatum* SOBRE LA GERMINACIÓN Y LA SUPERVIVENCIA DE DIFERENTES CONÍFERAS

Martínez-Álvarez, P., Blanco, J., de Vallejo, M., Diez, J. J.

PAN-31 CONTROL BIOLÓGICO DE *Gremmeniella abietina* CON HONGOS ENDÓFITOS EN PLÁNTULAS DE PINO CARRASCO

Romeralo, C., Botella, L., Santamaría, O., Diez, J. J.

PAN-32 EFICACIA DE LA BIOSOLARIZACIÓN CON PELLETS DE *Brassica carinata* PARA EL CONTROL DE *Meloidogyne incognita* EN PIMIENTO DE INVERNADERO

Guerrero, M. M., Martínez, V., Lacasa, C. M., Hernández, A., Lacasa, A., Ros, C.

PAN-33 COMPORTAMIENTO DE DIVERSOS FUNGICIDAS FRENTE AL MOTEADO DEL NÍSPERO (*Fusicladium eriobotryae*) EN ENSAYOS *IN VITRO* E *IN VIVO*

González-Domínguez E., Rodríguez-Reina, J. M., Armengol, J., García-Jiménez, J.

PAN-34 FACTORES QUE AFECTAN A LA VIABILIDAD DEL MATERIAL DE PROPAGACIÓN DE VID TRATADO POR TERMOTERAPIA CON AGUA CALIENTE

Gramaje, D., Armengol, J.

PAN-35 EVALUACIÓN DE LA SUPRESIVIDAD FRENTE A VERTICILLOSIS DE COMPOSTS DE ALPERUJO FORMULADOS COMO SUSTRATOS

Avilés, M., Gata, A., Castillo, S., Castaño, R., Mulero, A., Segarra, G., Trillas, M. I., Borrero, C.

PAN-36 INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA EN EL EFECTO BIOFUMIGANTE DE ESPECIES DE *Brassicaceae*: INACTIVACIÓN *IN VITRO* DE *Phytophthora nicotianae* Y *Fusarium oxysporum*

Picón-Toro, J., Morales-Rodríguez, M.C., Palo, C., Palo, E., García-Gallego, A., Rodríguez-Molina, M.C.

PAN-37 INHIBICIÓN DEL CRECIMIENTO MICELIAR DE *Phytophthora nicotianae* Y *Fusarium oxysporum* POR ESPECIES DE *Brassicaceae*

Picón-Toro, J., Morales-Rodríguez, M. C., Palo, C., Palo, E., García-Gallego, A., Rodríguez-Molina, M. C.

PAN-38 COMPORTAMIENTO PRODUCTIVO DE LOTES DE PATATA DE REEMPLERO CON NIVELES CONOCIDOS DE PVY Y PLRV

García-Calvo, L., Pesqueira, A. M., González-Núñez P., Cabaleiro, C.

PAN-39 TOLERANCIA DE *Vitis vinifera* cv mencia FRENTE A GLRaV EN VIÑEDOS TRADICIONALES

Pesqueira, A. M., Cabaleiro, C.

PAN-40 CONTROL DE PODREDUMBRES FÚNGICAS EN MANZANA, FRESÓN Y UVA DE MESA MEDIANTE PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS SINTÉTICOS

Francés, J., Badosa, E., Montesinos, E.

PAN-41 BLOQUEO DE LA EXPRESIÓN DE GENES DE INSECTO POTENCIALMENTE IMPLICADOS EN TRANSMISIÓN DE VIROSIS ENTRE PLANTAS: USO DE VECTORES VIRALES

Urizarna, M., Mingot, A., Vilaplana, Ll., López-Moya, J. J.

PAN-42 NUEVOS PATRONES DE AGUACATE DE RAZA ANTILLANA TOLERANTE-RESISTENTES A LA PODREDUMBRE DE RAÍZ (*Phytophthora cinnamomi* Rands) PARA SU DESARROLLO COMERCIAL EN PAÍSES PRODUCTORES

Gallo Llobet, L., Domínguez Correa, P., Siverio de la Rosa, F., Rodríguez Padrón, C., Rodríguez Pérez, A.

PAN-43 CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA DE PATRONES DE AGUACATE ANTILLANO TOLERANTE-RESISTENTES A *Phytophthora cinnamomi* Rands PARA SU REGISTRO COMERCIAL

Gallo Llobet, L., García Luque, M., Domínguez Correa, P., Rodríguez Pérez, A., Rodríguez Padrón, C., Marrero Domínguez, A.

PAN-44 USO DE PCR EN TIEMPO REAL PARA EVALUAR LA EFICACIA DE PRODUCTOS NATURALES EN EL CONTROL DE *Colletotrichum acutatum* EN FRESA

Aguado, A., Pastrana, A. M., De los Santos, B., Romero, F., Capote, N.

PAN-45 OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES DE PRODUCCIÓN Y ANÁLISIS DE CICLOLIPÉPTIDOS CON ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA EN CEPAS DE *Bacillus* spp.

Mora, I., Cabrefiga, J., Montesinos, E.

PAN-46 EVALUACIÓN DE LA SUPRESIVIDAD INDUCIDA FRENTE A VERTICILOSIS POR LA ENMIENDA CON COMPOST DE ALPERUJO

Avilés, M., Gata, A., Castillo, S., Borrero, C., Castaño, R., Segarra, G., López-Escudero F. J., Trillas, M. I.

PAN-47 CONTROL DE TRES AISLADOS DE *Phytophthora cinnamomi* MEDIANTE BIOFUMIGANTES NATURALES

Brun Esquiliche, P., Basallote Ureba, M. J., Romero Muñoz, F., Barrau García, C.

PAN-48 INFLUENCIA DEL FOTOPERIODO EN ESTUDIOS DE EVALUACIÓN DE RESISTENCIA DE CULTIVARES DE OLIVO A LA VERTICILOSIS

García-Ruiz, G. M., Trapero, C., Del Río, C., López-Escudero, F. J.

PAN-49 EFICACIA Y ESTRATEGIAS DE APLICACIÓN DE PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS PARA EL CONTROL DE *Stemphylium vesicarium* EN PERAL

Puig, M., Ruz, L., Moragrega, C., Montesinos, E., Llorente, I.

PAN-50 EVALUACIÓN DE LA EFICACIA DEL MODELO RIMPRO EN LA DETERMINACIÓN DE EMISIÓN DE INÓCULO Y CONTROL DEL MOTEADO DEL MANZANO (*Venturia inaequalis* (Cke.) Wint.)

Vilardell, P., Vilajeliu, M., Batllori, L., Agustí, E., Llorente, I.

PAN-51 SELECCIÓN DE ACBs CONTRA LA FUSARIOSIS VASCULAR DEL TOMATE Y EVALUACIÓN DE DOS AGENTES SELECCIONADOS EN TRES SUSTRATOS HORTÍCOLAS

Castaño, R., Borrero, C., Trillas, M. I., Avilés, M.

PAN-52 COMPOST DE ALPERUJO EN LA INDUCCIÓN DE RESISTENCIA SISTÉMICA EN PLANTAS DE *Solanum lycopersicum* FRENTE A *Botrytis cinerea*

Fernández, E., Segarra, G., Avilés, M., Trillas, M. I.

PAN-53 ANÁLISIS GENÉTICO DEL QUIMIOTACTISMO EN EL AGENTE DE BIOCONTROL *Rhizobium rhizogenes* K84

Peñalver, R., Bernet, G.

PAN-54 FORMULACIÓN DEL AGENTE DE BIOCONTROL *Bacillus subtilis* CPA-8 POR ATOMIZACIÓN

Yáñez-Mendizábal, V., Viñas, I., Usall, J., Torres, R., Abadías, M., Solsona, C., Teixidó, N.

PAN-55 TOLERANCIA A *Rosellinia necatrix* DE PLANTAS DE FRESA TRANSFORMADAS CON EL GEN ATNPR1

Ruano-Rosa, D., Barceló Muñoz, M., Palomo Ríos, E., Blanco Portales, R., Muñoz Blanco, J., Mercado, J. A., Pliego- Alfaro, F., López-Herrera, C. J.

PAN-56 EFECTO SOBRE *Rosellinia necatrix* DE METABOLITOS SECUNDARIOS PRODUCIDOS POR *Trichoderma* spp.

Arjona Girona, I., Ruano-Rosa, D., Vinale, F., López Herrera, C. J.

PAN-57 EFECTO DE MÉTODOS DE RIEGO Y DESHOJE SOBRE LA SEVERIDAD DE SIGATOKA NEGRA (*Mycosphaerella fijiensis*) DEL BANANO EN EL TRÓPICO SECO DE MÉXICO

Orozco-Santos, M., Manzo-Sánchez, G., García-Mariscal, K., Velázquez-Monreal, J. J., Robles-González, M. M., Nieto-Ángel, D.

PAN-58 ESTUDIO DE TRAZABILIDAD DEL AGENTE DE BIOCONTROL *Pantoea agglomerans* CPA-2 APLICADO EN PRECOSECHA DE NARANJA EMPLEANDO MARCADORES MOLECULARES

Soto-Muñoz, L., Teixidó, N., Lamarca, N., Viñas, I., Yáñez-Mendizabal, V., Torres, R.

PAN-59 EVALUACIÓN DE ENMIENDAS ORGÁNICAS Y MICROORGANISMOS PARA EL CONTROL DE *Verticillium dahliae*

Varo, A., Raya, M. C., Roca, L. F., Trapero, A.

PAN-60 EVALUACIÓN DEL EFECTO CURATIVO E INDUCTOR DE RESISTENCIA DEL COBRE PARA EL CONTROL DEL REPILO DEL OLIVO

Roca, L. F., Trapero, A.

PAN-61 ACTIVIDAD *IN VITRO* DE SAPONINAS EXTRAÍDAS DE *Asparagus* spp. FRENTE A *Fusarium oxysporum* f. sp. *asparagi*

Molinero-Ruíz, L., González-Domínguez, E., Guillén-Bejarano, R., Basallote-Ureba, M. J.

PAN-62 BIOFUMIGACIÓN DE SUELO MODERADAMENTE INFESTADO POR *Fusarium oxysporum* f.sp. *dianthi*, PARA EL CULTIVO DEL CLAVEL

Vela, M.D., Melero-Vara, J. M., López-Herrera, C. J., Talavera, M., Basallote-Ureba, M. J.

PAN-63 CARACTERIZACIÓN DE AISLADOS DE *Fusarium* PATÓGENOS DE ESPÁRRAGO Y MANEJO DE LA PODREDUMBRE DE RAÍCES Y CUELLO CON ENMIENDAS ORGÁNICAS DE SUELO

Borrego-Benjumea, A., Basallote-Ureba, M. J., Melero-Vara, J. M., Pervaiz Abbasi.

PAN-64 EFECTO DE TRATAMIENTOS DE TERMOTERAPIA EN LA ERRADICACIÓN DE *Verticillium Dahliae* EN PLANTONES DE OLIVO

Morello, P., Codes, M., Trapero, A., Barranco, D., Rayo, L., Moral, J.

PAN-65 EVALUACIÓN DE FUNGICIDAS PARA EL CONTROL DE *Neofusicoccum mediterraneum*, AGENTE CAUSAL DEL CHANCRO DE RAMAS DEL OLIVO

Pérez-Rodríguez, M., Palma, M. J., Roca, L.F., Moral, J., Trapero, A.

PAN-66 RUTAS DE SEÑALIZACIÓN Y DETERMINANTES BACTERIANOS IMPLICADOS EN LA RESISTENCIA SISTÉMICA INDUCIDA POR *Bacillus subtilis* UMAF6639

García-Gutiérrez, L., Zeriuoh, H., Romero, D., Cubero, J., de Vicente, A., Pérez-García, A.

PAN-67 CONTROL DE LA PRODUCCIÓN DE INÓCULO DE *Stemphylium vesicarium* Y *Pleospora allii* EN PERAL MEDIANTE CEPAS SELECCIONADAS DE *Bacillus* sp.

Ruz, L., Puig, M., Agustí, E., Moragrega, C., Montesinos, E., Llorente, I.

PAN-68 EL GENOMA DE *Rhizobium rhizogenes* K84 POSEE UN REMARCABLE ALTO NÚMERO DE GENES DE SECRECIÓN

De Paz, H. D., Peñalver, R.

PAN-69 APROVECHAMIENTO Y BIODEGRADACIÓN DE RESIDUOS DE INDUSTRIAS OLEÍCOLAS EN PROTECCIÓN DE LA MADERA

Llinares, F., Jiménez, P., Troya, M. T., Raposo, R., Elvira-Recuenco, M., Campos, J. M., García, M. A., Martínez, A.

PAN-70 EFECTO DE LA APLICACIÓN DE HONGOS ENTOMOPATÓGENOS SOBRE EL DESARROLLO DE LA VERTICILLOSIS EN CONDICIONES CONTROLADAS

Lozano-Tovar, M. D., Quesada-Moraga, E., Varo, A., Trapero, A.

PAN-71 ENMIENDAS ORGÁNICAS PARA EL CONTROL DE *Rosellinia necatrix* EN AGUACATE

Bonilla, N., Cazorla, F. M., Landa, B. B., Hermoso, J. M., González-Fernández, J., Martínez-Alonso, M., Gaju, N., de Vicente, A.

PAN-72 INCREMENTO DE LA TOLERANCIA AL FITOPLASMA *Candidatus Phytoplasma Prunorum* EN CIRUELOS MICORRIZADOS

Batlle, A., Laviña, A., Sabaté, J., Camprubí, A., Calvet, C.

PAN-73 IDENTIFICACIÓN DE UNA FUENTE DE TOLERANCIA AL ToMV EN UNA COLECCIÓN DE LÍNEAS DE INTROGRESIÓN DERIVADA DE *Solanum lycopersicoides* LA2951

Soler, S., Belmonte, I., Aramburu, J., Galipienso, L., López, C., Sifres, A., Pérez-de-Castro, A., Díez, M. J.

PAN-74 EVALUACIÓN DEL PRODUCTO ARMUOX® COMO INDUCTOR DE DEFENSAS EN MELÓN FRENTE A OÍDIO DE CUCURBITÁCEAS

Botta, A., García-Gutiérrez, L., Pérez-García, A.

PAN-75 DESARROLLO DE UN BIOENSAYO CON AGENTES DE CONTROL BIOLÓGICO FRENTE A *Diplodia seriata* Y *Phaeomoniella chlamydospora*

Elena, G., Luque, J., Usall, J., Teixidó, N.

PAN-76 SITUACIÓN DE "LA PODREDUMBRE DEL CUELLO Y DE LAS RAÍCES" DEL TOMATE CAUSADA POR *Fusarium*

***oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*”, EN LOS INVERNADEROS DE ALMERÍA**

Aguilar M. I., Pérez, A., Gómez, J.

PAN-77 EVALUANDO LA INFLUENCIA DEL RIEGO POR GOTEO SOBRE EL DESARROLLO DE LA VERTICILLOSIS DEL OLIVO EN CONDICIONES DE AMBIENTE NATURAL

Santos Rufo, A., Vega, V., Hidalgo, J., Hidalgo, J.C., Rodríguez Jurado, D.

PAN-78 ESTUDIO DE LA VARIABILIDAD INTERESPECÍFICA CON MARCADORES MORFOLÓGICOS Y PATOLÓGICOS ENTRE AISLADOS Y ESPECIES DE *Monilinia spp.*

Villarino M., Larena, I., Morales, M. T., Castillo, R., Melgarejo, P., De Cal, A.

PAN-79 LA SUSCEPTIBILIDAD DE LAS HERIDAS DE PODA DE LA VID A LA INFECCIÓN POR ASCOSPORAS DE *Eutypa lata* SIGUE UN MODELO DE DECAIMIENTO EXPONENCIAL

Muruamendiaraz, A., Legorburu, F. J.

PAN-80 LOS PARASITOIDES MODIFICAN EL GRADO DE DISPERSIÓN Y LA DISTRIBUCIÓN ESPACIAL DE VIRUS TRANSMITIDOS POR PULGONES EN PEPINO

Dáder, B., Moreno, A., Fereres, A.

PAN-81 INCIDENCIA DE *Lecanicillium fungicola* EN DOS MEZCLAS DE COBERTURA UTILIZADAS PARA EL CULTIVO DE CHAMPIÑÓN

Navarro, M. J., Carrasco, J., Santos, M., Dianeze, F., Gea, F. J.

PAN-82 ANÁLISIS DE *Pseudomonas syringae* PROCEDENTES DE CULTIVOS DE JUDÍA GRANJA ASTURIANA Y MALAS HIERBAS

Fernández, A. M., Rodicio, M. R., González, A. J.

PAN-83 VARIACIÓN GENÓMICA EN *Pseudomonas viridiflava*, PATÓGENO EMERGENTE EN CULTIVOS ASTURIANOS

San José, M.¹, Fernández, A. M.², González, A. J.², Rodicio, M. R.¹

PAN-84 CARACTERIZACIÓN DE AISLAMIENTOS LOCALES DE *Fusarium* PRESENTES EN VARIEDADES DE SEMILLA DE ALUBIA DE LEÓN

Campelo, M. P., Reinoso, B., Lorenzana, A., González, A. J.

PAN-85 RESUCITACIÓN DE *Ralstonia solanacearum* FILOTIPO II TRAS SU ENTRADA EN EL ESTADO VIABLE NO CULTIVABLE INDUCIDO POR BAJA TEMPERATURA

Álvarez, B., López, M. M., Biosca, E. G.

PAN-86 IDENTIFICACIÓN, INCIDENCIA Y PATOGENICIDAD DE *Cladobotryum mycophilum*, AGENTE CAUSAL DE LA TELARAÑA EN CULTIVOS DE CHAMPIÑÓN.

Carrasco, J., Navarro, M.J., Santos, M., Gea, F.J.

PAN-87 *Fusicladium eriobotryae*: EFECTO DE LA TEMPERATURA Y EL PERÍODO DE HUMECTACIÓN SOBRE EL CRECIMIENTO MICELIAR, LA GERMINACIÓN DE CONIDIOS Y EL DESARROLLO DE INFECCIONES EN PLANTA DE NÍSPERO

González-Domínguez, E., Martorell-Reig, A., Armengol, J., García-Jiménez, J.

PAN-88 HONGOS DE LA MADERA ASOCIADOS AL DECAIMIENTO Y MUERTE DE ALMENDROS EN LA ISLA DE MALLORCA: NUEVAS PERSPECTIVAS EN LA EPIDEMIOLOGÍA DE HONGOS DE LA MADERA

Gramaje, D., Agustí-Brisach, C., Pérez-Sierra, A., Moralejo, E., Olmo, D., Mostert, L., Damm, U., Armengol, J.

PAN-89 GRUPOS DE APAREAMIENTO Y DIVERSIDAD GENÉTICA Y DE VIRULENCIA DE *Togninia minima* EN ESPAÑA

Gramaje, D., Armengol, J., Ridgway, H. J.

PAN-90 DIVERSIDAD GENÉTICO/PATOGÉNICA DE LAS POBLACIONES DE *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* EN EL SUR DE ESPAÑA

Gómez-Lama, C., Valverde-Corredor, A., Melero-Vara, J. M., Pérez-Artés, E.

PAN-91 ESTUDIO DE LA DIVERSIDAD GENÉTICA DEL BEGOMOVIRUS DE LA DEFORMACIÓN DE LA HOJA DEL TOMATE EN PERÚ

Martínez-Ayala, A., Sánchez-Campos, S., Márquez-Martín, B., Aragón-Caballero, L., Navas-Castillo, J., Moriones, E.

PAN-92 PATOGENICIDAD Y ANÁLISIS RAPD DE AISLADOS DE *Fusarium oxysporum* DE SUELOS Y PLANTAS DE TABACO DE CÁCERES

Rodríguez-Molina, M.C., Morales-Rodríguez, M.C., Picón-Toro, J., Palo, C., Osuna, M. D., García-Gallego, A., Iglesias, M. J., García J.A.

PAN-93 ESPECIFICIDAD PARASITARIA Y DIFERENCIACIÓN GENOTÍPICA ENTRE AISLADOS DE *Phytophthora nicotianae*

Morales-Rodríguez, M. C., Picón-Toro, J., Palo, C., Palo, E.J., García-Gallego, A., Rodríguez-Molina, M. C.

PAN-94 DISTRIBUCIÓN EN LAS AGROZONAS ANDALUZAS DE LOS VIRUS QUE AFECTAN A PIMIENTO

Simón Martínez, A., García García, M. C., Pascual Aso, F., Ruiz García, M. L., Janssen, D., Cuadrado Gómez, I. M.

PAN-95 ANÁLISIS DE LA TRANSMISIBILIDAD POR MOSCA BLANCA DE DOS IPOMOVIRUS, CUCUMBER VEIN YELLOWING VIRUS Y SWEET POTATO MILD MOTTLE VIRUS

Vilaplana, Ll., Tovar, R., Navas-Castillo, J., López-Moya, J. J.

PAN-96 *Biscogniauxia nummularia*: PATÓGENO EN HAYEDOS Y ENDÓFITO EN PASTOS DE LA SIERRA DE URBASA

Canals, R. M., Pedro, J., Gómez, J., Zabalgoeazcoa, I.

PAN-97 Patogenicidad de *Neofusicoccum parvum* en especies forestales nativas y exóticas del País Vasco

Quaglia, F., Mesanza, N., Berta, G., Iturritxa, E.

PAN-98 DISTRIBUCIÓN DE *Cryphonectria parasitica* Y PRESENCIA DE HIPOVIRULENCIA EN CASTILLA Y LEÓN

Zamora, P., Martín, A. B., Rigling, D., Diez, J. J.

PAN-99 EFECTO DE LA FRECUENCIA DE RIEGO EN LA VERTICILLOSIS DEL OLIVO

Pérez-Rodríguez, M., Serrano, N., Arquero, O., Lorite, I., Orgaz, F., López-Escudero, F. J.

PAN-100 COMPARACIÓN DE LA POBLACIÓN DE *Verticillium dahliae* EN SUELO Y EN ÁRBOLES INFECTADOS EN PLANTACIONES DE OLIVO

Trapero C., Raya-Ortega, C., Valverde-Corredor, A., Mercado-Blanco, J. López-Escudero, F. J.

PAN-101 RELACIÓN ENTRE LAS DENSIDADES INICIALES DE POBLACIÓN Y LA TASA DE MULTIPLICACIÓN DE *Meloidogyne javanica* EN SANDÍA

Blanco, M., López-Gómez, M. F., Verdejo-Lucas, S.

PAN-102 ANÁLISIS DE EXPRESIÓN DE GENES RELACIONADOS CON LA RESPUESTA AL ESTRÉS POR OLIGOTROFIA A TEMPERATURAS AMBIENTALES EN *E. amylovora*

Santander, R. D., Oliver, J. D., Biosca, E. G.

PAN-103 ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS DE LA MANCHA MARRÓN DE LAS MANDARINAS CAUSADA POR *Alternaria alternata* EN CONDICIONES DE CLIMA MEDITERRÁNEO

Bassimba, D. D. M., Mira, J. L., Vicent, A.

PAN-104 EPIDEMIOLOGÍA Y CONTROL DE LA MANCHA GRASIENTA DE LOS CÍTRICOS CAUSADA POR *Mycosphaerella citri* EN PANAMÁ

Aguilera-Cogley, V., Vicent, A.

PAN-105 EFECTO ANTAGÓNICO DEL VIRUS DEL BRONCEADO DEL TOMATE (TSWV) EN LA INFECTIVIDAD EN HABA POR EL VIRUS DEL MARCHITAMIENTO DEL HABA (BBWV-1)

Ferriol, I., Debreczeni, D. E., Puchades, A. V., Luis Rubio, L.

PAN-106 PRODUCCIÓN DE MICROESCLEROCIOS DE *Verticillium dahliae* PARA LA INFESTACIÓN ARTIFICIAL DEL SUELO

Varo, A., Raya, M. C., Roca, L. F., Lozano, M. D., Trapero, A.

PAN -107 GERMINACIÓN DE BELLOTAS DE *Quercus ilex* EN SUELOS INFESTADOS POR *Phytophthora quercina*, *P. gonapodyides* Y *P. cinnamomi*

Solla, A., Miranda, J., Corcobado, T., Martín-García, J., Cubera, E., Pérez, A., Pérez-Sierra, A., Jung, T.

PAN-108 SUSCEPTIBILIDAD DE *Quercus ilex* A INOCULACIONES COMBINADAS DE DISTINTAS ESPECIES DEL GÉNERO *Phytophthora*

Miranda, J., Corcobado, T., Jung, T., Martín-García, J., Pérez-Sierra, A., Abad-Campos, P., Solla, A.

PAN-109 EVALUACIÓN DEL BARRENILLO DEL OLIVO (*Phloeotribus scarabaeoides*) COMO VECTOR DE *Verticillium dahliae* AGENTE DE LA VERTICILIOSIS DEL OLIVO

Eldesouki-Arafat, I., Aldebis, H.K., Vargas Osuna, E., Trapero, A., López-Escudero, F. J.

PAN-110 CARACTERIZACIÓN DE AISLAMIENTOS LOCALES DE *Fusarium* PRESENTES EN VARIEDADES DE SEMILLA DE ALUBIA DE LEÓN

Campelo, M. P., Reinoso, B., Lorenzana, A., González, A. J.

PAN-111 LA MULTIPLICACIÓN DIFERENCIAL DE AMPELOVIRUS EN PLANTAS DE VID PODRÍA EXPLICAR LAS DIFERENCIAS DE INCIDENCIA EN LOS VIÑEDOS

Velasco, L., Padilla, C. V., Padilla, V., García, B., Hita, I., Bota, J. M., Montero, R.

PAN-112 EFECTO DE LA PRESENCIA DE *Fusarium circinatum* EN SEMILLA DE PINO EN LA GERMINACIÓN Y DESARROLLO DE PLÁNTULAS

Elvira-Recuenco, M., Raposo, R.

PAN-113 ESTUDIO EPIDEMIOLÓGICO DE LA PROLIFERACIÓN DEL MANZANO CAUSADA POR *Candidatus phytoplasma mali*, EN ESPAÑA

Laviña, A., Sabaté, J., Berra, D., Batlle, A.

PAN-114 MICOFLORA ENCONTRADA EN SEMILLAS CERTIFICADAS DE *Pinus pinaster* DE DIFERENTES ORÍGENES GEOGRÁFICOS EN ESPAÑA

Beltrán, R., Naya, M., Aguado, A.

PAN-115 PRIMER REGISTRO DE *Monilinia fructicola* EN CIRUELO EN EL SUROESTE DE ESPAÑA

Arroyo, F.T., Camacho, M., Daza, A.

PAN-116 PREVALENCIA DE VIRUS DE VID EN LA DENOMINACIÓN DE ORIGEN ALICANTE ESTIMADA POR ELISA, SINGLEPLEX Y MULTIPLEX RT-PCR A TIEMPO REAL

Olmos, A., Yuste, A., Bertolini, E., Martínez, C., García, J., Cambra, M.

PAN-117 HONGOS DE LA FAMILIA *Diatrypaceae* ASOCIADOS A ENFERMEDADES DE LA MADERA DE LA VID

Luque, J., Elena, G., Garcia-Figueroes, F., Legorburu, J., Muruamendiaraz, A., Armengol, J., Trouillas, F.

PAN-118 ENFERMEDADES EMERGENTES EN LOS VIVEROS DE ALTURA DE FRESA TRAS LA RETIRADA TOTAL DEL BROMURO DE METILO EN 2009

Redondo, C., Villarino, M., Larenas, J., Melgarejo, P., De Cal, A.

PAN-119 FILOGENIA Y DIVERSIDAD MOLECULAR DE NEMATODOS DEL GRUPO *Xiphinema americanum* MEDIANTE DIAGNÓSTICO POLIFÁSICO

Gutiérrez-Gutiérrez, C., Cantalapiedra-Navarrete, C., Palomares-Rius, J.E. Y Castillo, P.

PAN-120 FALTA DE RELACIÓN ENTRE SÍNTOMAS FOLIARES Y ESPECIES DE HONGOS AISLADAS DE MADERA EN LA EUTIPIOSIS DE LA VID.

Muruamendiaraz, A., Legorburu, F.J.

PAN-121 VIRUS DEL ENROLLADO DE LA VID EN LA VITICULTURA ESPAÑOLA

Padilla V., Hita, I., García de Rosa, B., Salmerón, E., Velasco, L. Padilla, C.V.

PAN-122 *Heterobasidion annosum*: HONGO ASOCIADO AL DECAIMIENTO DEL PINO NEGRAL EN CASTILLA Y LEÓN

Prieto-Recio, C., Díez, J. J.

PAN-123 HONGOS E INSECTOS ASOCIADOS AL CHANCRO RESINOSO DEL PINO EN PLANTACIONES DE *Pinus radiata* EN CANTABRIA

Bezós, D., Fernández, M., Martínez-Álvarez, P., Lomba, J.M, Díez, J.J.

PAN-124 PRESENCIA DE PLÁSMIDOS pEA29 y pEI70 EN NUEVOS FOCOS DE *Erwinia amylovora* EN LA COMUNIDAD VALENCIANA Y ARAGÓN

Palacio-Bielsa, A., Roselló, M., Cambra, M.A., Berruete, I.M., Collados, R., Palazón, M.L., Peñalver, J., Navarro, I., López, M.M.

PAN-125 DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN DE *Erwinia piriflorinigrans* MEDIANTE PCR CONVENCIONAL Y A TIEMPO REAL

Barbé, S. Llop, P., Bertolini, E., López, M.M.

PAN-126 HONGOS DE LA FAMILIA Botryosphaeriaceae ASOCIADOS A CHANCROS Y MUERTE DE RAMAS EN NÍSPERO.

González-Domínguez, E., León M., Armengol, J.

PAN-127 ESTADO SANITARIO RESPECTO A VIRUS Y FITOPLASMAS DEL CEREZO DULCE (*Prunus avium*, L.) EN ESPAÑA

Martínez, M.C., Bertolini, E., Capote, N., Santiago, R., García, M.T., Cambra, M.A, Cambra, M.

PAN-128 PREVALENCIA DE *Potato spindle tuber viroid* Y *Peach latent mosaic viroid* DETERMINADA POR RT-PCR A TIEMPO REAL

Bertolini, E., Martínez, M.C., Serra, P., Durán-Vila, N., Cambra, M.

PAN-129 IDENTIFICACIÓN DE *Cylindrocladiella parva* Y *C. peruviana* ASOCIADAS A EL PIE NEGRO DE LA VID EN ESPAÑA

Agustí-Brisach, C., Alaniz, S., Gramaje, D., Pérez-Sierra, A., Armengol, J., Landeras, E., Izquierdo, P.M.

PAN-130 PRESENCIA DE *Cladobotryum mycophilum* EN CULTIVOS DE SETA DE CARDO (*Pleurotus eryngii*)

Gea, F.J., Carrasco, J., Navarro, M.J.

PAN-131 DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE *Ilyonectria* spp. CAUSANTES DEL PIE NEGRO DE LA VID EN SUELOS DE VIVEROS MEDIANTE NESTED-MULTIPLEX PCR y PCR A TIEMPO REAL

Agustí-Brisach, C., Armengol, J.¹, Mostert, L.

PAN-132 DESCRIPCIÓN DE UN NUEVO BEGOMOVIRUS QUE INFECTA CULTIVOS DE TOMATE, PIMIENTO Y JUDÍA EN PERÚ

Martínez-Ayala, A., Sánchez-Campos, S., Aragón-Caballero, L., Navas-Castillo, J., Moriones, E.

PAN-133 *Hemicycliophora* spp. ¿UN NUEVO PROBLEMA EN EL CULTIVO DE LA FRESA EN HUELVA?

Bascón, J., C. Arcos, S., Páez, J.I., Avilés, M., Robertson, L., Vega, J.M^a, Navas; A.

PAN-134 DISEÑO DE UN PROTOCOLO DE DETECCIÓN DE *Mycosphaerella nawae* EN MUESTRAS VEGETALES DE CAQUI

Berbegal, M., Mora, B., García-Jiménez, J.

PAN-135 CARACTERIZACIÓN DE AISLADOS DE LA PHYTOPHTHORA DEL ALISO PROCEDENTES DE MASAS CON DECAIMIENTO DE CASTILLA Y LEÓN

Haque, M.M., Hidalgo, E., de Lucas, A.I., Díez, J.J.

PAN-136 AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE ESPECIES DE *Phytophthora* Y *Phytophythium* EN CULTIVOS DE AGUACATE DE LAS ISLAS CANARIAS

Rodríguez Padrón, C., Domínguez Correa, P., Siverio de la Rosa, F., Pérez Sierra, A., Gallo Llobet, L., Rodríguez Pérez, A.

PAN-137 INCIDENCIA Y CARACTERIZACIÓN DE HONGOS PATÓGENOS DE FRESA EN PLANTAS Y SUELOS DE VIVEROS DE ALTURA Y FINCAS DE PRODUCCIÓN DE FRUTO

Pastrana, A.M., Aguado, A., De los Santos, B., Sánchez, M.C., Chamorro, M., Romero, F., Capote, N.

PAN-138 IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DEL HONGO DE PUDRICIÓN DE RAÍZ *Heterobasidion annosum* (FR.) BREF. sensu lato EN EL PAÍS VASCO

Mesanza, N., Iturrirxa, E.

PAN-139 PRIMERA CITA DE PUNTISECADO CAUSADO POR *Neofusicoccum parvum* Y *N. australe* EN ARÁNDANO EN ESPAÑA

Borrero, C., Castaño R., Castillo, S., Rodríguez, A., Avilés, M.

PAN-140 CARACTERIZACIÓN BIOLÓGICA Y MOLECULAR DE *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* EN EL SUR DE ESPAÑA

Castaño, R., Avilés, M.

PAN-141 DETECCIÓN DE *Pseudomonas syringae* pv. pisi y *P. syringae* pv. *syringae* EN LOTES DE SEMILLA DE GUISANTE. EFECTIVIDAD DE LA DESINFECCIÓN CON HIPOCLORITO SÓDICO

Martín-Sanz, A., Palomo, J.L., Pozo, B., García-Vaquero, C.A., Aguado, E., Rodríguez-Cachón, M.J., Caminero, C.

PAN-142 ESTADO ACTUAL DE LA INFECCIÓN NATURAL POR EL VIRUS DEL ENANISMO MOTEADO DE LA BERENJENA (EMDV) EN ESPAÑA

Monge, P., Luis Arteaga, M., Tornos, T., Escriu, F.

PAN-143 DEFORMACIONES EN LOS PINOS RELACIONADAS CON “*Candidatus Phytoplasma pini*”

Alfaro-Fernández, A., Mas, H., Pérez-Laorga E., Hernández-Llopis, A., Fernández-Serrano, A., Pastor, C., Pali, J., Dolz L., Font, M.I.

PAN-144 ESTUDIOS PRELIMINARES SOBRE LA PRESENCIA DE OOMICETOS EN LA LAURISILVA EN TENERIFE

Beltrán, A., León, M., Abad-Campos, P., Siverio, F., Gallo, L., Pérez-Sierra, A.

PAN-145 DIVERSIDAD DE OOMICETOS Y PATÓGENOS FÚNGICOS EN VIVEROS FORESTALES

Abad-Campos, P., Puértolas, A., Ortega, A., Guirao, P., León, M., García-Jiménez, J., Pérez-Sierra, A.

PAN-146 ENFERMEDADES FÚNGICAS DE LOS CÍTRICOS EN PANAMÁ

Aguilera-Cogley, V., Vicent, A.

PAN-147 VIRUS DETECTADOS EN HIGUERAS DE LA PENÍNSULA IBÉRICA

Alfaro-Fernández, A., Hernández Llopis, A., Font, M.I.

PAN-148 PATÓGENOS DETECTADOS EN CULTIVOS DE ZANAHORIA ESPAÑOLES CON AMARILLOS, ENROJECIMIENTOS Y DEFORMACIONES

Alfaro-Fernández, A., Hernández Llopis, A., Serrano Fernández, A., Villaescusa, F.J., Teresani, G.R., Bertolini, E., Martínez, M.C., Ferrándiz, J.A., Bartolomé, P., Sanjuán, S., Hermoso, A., López, M.M., Cambra, M., Font, M.I.

PAN-149 DETECCIÓN DE LOS VIRUS DEL GÉNERO *FABAVIRUS* MEDIANTE HIBRIDACIÓN CON UNA ÚNICA Sonda

Rangel, E.A., Ferriol, I., Rubio, L.

PAN-150 EXPRESIÓN DE LOS GENES DE LA PROTEÍNA DE LA CÁPSIDA DE LOS POTYVIRUS MOSAICO COMÚN Y MOSAICO COMÚN NECRÓTICO DE LA JUDÍA MEDIANTE UN RNA DEFECTIVO DEL VIRUS MOTEADO DEL HABA

Torres, R., Carazo, G., Romero, J.

PAN-151 CARACTERIZACIÓN DE AISLADOS DE *Colletotrichum* spp. CAUSANTES DE LA ANTRACNOSIS DEL OLIVO EN AUSTRALIA.

Jurado, J., Moral, J., Pérez, M., Xavier, C., Sergeeva, V., Trapero, A.

PAN-152 COMPARACIÓN DE MÉTODOS SEROLÓGICOS Y MOLECULARES PARA LA IDENTIFICACIÓN DE AISLADOS DE *CUCUMBER MOSAIC VIRUS*

Alfaro-Fernández, A., Beltrán, R., Fernández-Serrano, A., Font, M.I.

PAN-153 DETECCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE AISLADOS DEL VIRUS DEL AMARILLEAMIENTO NECRÓTICO DEL HABA (FBNYV) INFECTANDO LEGUMINOSAS DE GRANO EN CASTILLA-LEÓN

Larenas, J., Carazo, G., Romero, J.

PAN-154 ETIOLOGÍA DE LA MANCHA FOLIAR DEL OLIVO CAUSADA POR *Phoma* sp.

Romero, J., Moral, J., Trapero, A.

PAN-155 DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DEL VIRUS DEL TORRADO DEL TOMATE MEDIANTE RT-PCR EN TIEMPO REAL

Herrera-Vásquez, J.A., Ferriol, I., Alfaro-Fernández, A., Font, M.I., Rubio, L.

PAN-156 DETECCIÓN Y DIAGNÓSTICO DEL VIRUS DEL AMARILLEO DEL TOMATE (*TOMATO CHLOROSIS VIRUS*, TOCV) EN PIMIENTO EN LA ISLA DE TENERIFE

Espino de Paz, A.I., Botella Guillén, M., Reyes Carlos, J.A., González García, A.C., Gómez González, E.

PAN-157 DETECCIÓN DE LOS PRINCIPALES VIRUS Y VIROIDES QUE AFECTAN AL CULTIVO DE VID EN LA REGIÓN DE REQUENA

Zamorano, A., Fiore, N., Sánchez-Diana, N., Pallás, V., Sánchez-Navarro, J.A.

PAN-158 *Plantago coronopus* L. UN NUEVO HOSPEDANTE NATURAL DE IMPATIENS NECROTIC SPOT VIRUS

Tornos, T., Córdoba-Sellés, M.C., Alfaro-Fernández, A., Martí, M., García-Murillo, J.L., Monton, C., Font, M.I.

PAN-159 CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE AISLADOS DE LOS FITOPLASMAS *Ca. P. prunorum* Y *Ca. P. pyri* EN ESPAÑA

Bech, J., Laviña, A., Torres, E., Sabaté, J., Batlle, A.

PAN-160 EVALUACIÓN DE LA EFICIENCIA DE LAS TÉCNICAS PCR A TIEMPO REAL Y LAMP PARA LA DETECCIÓN DE *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni* EN MUESTRAS SINTOMÁTICAS DE ALMENDRO

Palacio-Bielsa, A., López-Soriano, P., Bühlmann, A., van Doorn, J., Pham, K., Cambra, M.A., Berruete, I.M., Collados, R., Palazón, M.L., Olmos, A., López, M.M.

PAN-161 GRADO DE RESISTENCIA DE ESPECIES HUÉSPED Y NO-HUÉSPED AL MILDIU DE LA VID (*Plasmopara viticola*) MEDIANTE MICROSCOPIA DE EPIFLUORESCENCIA

Huerga, V., Kassemeyer, H.H., Díez-Navajas, A.M.

PAN-162 DISEÑO DE UN CULTIVO AUTOTRÓFICO “IN VITRO” DE HIGUERA PARA EVALUAR INTERACCIONES ENTRE *Armillaria mellea* Y EL HONGO ARBUSCULAR *Glomus intraradices*

Camprubí, A., García-Figueroes, F., Bordas, M., Barnés, V., Calvet, C.

PAN-163 EL VIRUS DEL MANCHADO FOLIAR DE LOS CÍTRICOS (CLBV) INVADE TEJIDOS MERISTEMÁTICOS DE *Nicotiana benthamiana* Y CÍTRICOS

Agüero, J., Vives, M.C., Velázquez, K., Ruiz-Ruiz, S., Juárez J., Navarro, L., Moreno, P., Guerri, J.

PAN-164 EVALUACIÓN DE LA RESISTENCIA DE TOMATE A *Meloidogyne incognita* MEDIANTE ENSAYOS BIOLÓGICOS Y MOLECULARES.

Touriño, A., Portillo, I., Herradón, E., Moyano, C.

PAN-165 CONTRIBUCIÓN A LA VIRULENCIA DE *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* DE UNA REGIÓN GENÓMICA ESPECÍFICA DE *Pseudomonas* PATÓGENAS DE HUÉSPEDES LEÑOSOS

Caballo, E., Matas, I.M., Ramos, C.

PAN-166 IMPORTANCIA DE LA PRODUCCIÓN DE ÁCIDO GLUCÓNICO EN LA EXPRESIÓN DE ENDOPOLIGALACTOURONASAS DE *Monilinia fructicola* EN MEDIO DE CULTIVO

Martínez, F., Morales-Clemente, M.T., Prusky, D., Melgarejo, P., De Cal, A.

PAN-167 ANÁLISIS POR MICROARRAYS DE LA RESISTENCIA MEDIADA POR EL GEN *Mi-1* DEL TOMATE A NEMATODOS FORMADORES DE NÓDULOS (*Meloidogyne javanica*)

Emiliozzi, M., Nombela, G.

PAN-168 REEVALUACIÓN DEL EFECTO DE LA INFECCIÓN VIRAL DE YEMAS DE VID EN LA PROPAGACIÓN E IMPLANTACIÓN DEL CULTIVO

Muruamendiaraz, A., Cibriain, J.F., Aguirrezábal, F., Legorburu, F.J.

PAN-169 EVOLUCIÓN DE LA VIRULENCIA DE UN VIRUS DE PLANTAS EN DOS HUÉSPEDES DISTINTOS

Moreno, M.G., García-Arenal, F., Fraile, A.

PAN-170 SUSCEPTIBILIDAD VARIETAL AL CHANCRO DEL ALMENDRO (*Phomopsis amygdali* (Delacr.) J.J. Tuset & M.T. Portilla)

Miarnau, X., Luque, J., Marimon, N., Alegre, S., Vargas, J.F.

PAN-171 SUSCEPTIBILIDAD VARIETAL A LA 'MANCHA OCRE' (*Polystigma ochraceum* (Whalenb.) Sacc.) EN EL CULTIVO DEL ALMENDRO

Marimon, N., Luque, J., Vargas, F.J., Alegre, S., Miarnau, X.

PAN-172 IMPLICACIÓN DE LAS ENZIMAS β -1,3-GLUCANASA Y QUITINASA EN LA RESPUESTA DE DEFENSA DE LA CAÑA DE AZÚCAR FRENTE A *S. scitamineum*

Vicente, C., Santiago, R., Alarcón, B., Blanch, M., Legaz, M. E.

PAN-173¿ESTÁN IMPLICADAS LAS PROTEÍNAS DIRIGENTES DE CAÑA DE AZÚCAR EN LA RESISTENCIA A LA ENFERMEDAD DEL CARBÓN CAUSADA POR *Sporisorium scitamineum*?

Díaz, E.M., de Armas, R., Sacristán, M., Vicente, C., Legaz, M.E.

PAN-174 CARACTERIZACIÓN PARCIAL DE CINAMIL ALCOHOL DESHIDROGENASAS EN TALLOS DE CAÑA DE AZÚCAR ELICITADOS CON FACTORES DE VIRULENCIA DE *Sporisorium scitamineum*

Sacristán, M., Alarcón, B., Vicente, C., Legaz, M.E.

PAN-175 ACCIÓN DE LAS PROTEÍNAS R DE CAÑA DE AZÚCAR SOBRE LA QUIMIOTAXIS DE TELIOSPORAS DE *Sporisorium scitamineum*

Sánchez-Elordi, E., Díaz, E.M., de Armas, R., Vicente, C., Legaz, M.E.

PAN-176 COMPORTAMIENTO DE AISLADOS DE *Phytophthora* spp. Y LA RESISTENCIA GENÉTICA EN PIMIENTO

Hernández-Piñera, A., Sánchez, F., Lacasa, CM., Sánchez, E., Lacasa, A.

PAN-177 EFECTOS DE INFECCIONES VIRALES SOBRE EL DESARROLLO Y LA PRODUCTIVIDAD DE PLANTAS DE INTERÉS EN BIORREFINERÍAS

Zurita, L., Mansilla, C., Sánchez, F., Ponz, F.

PAN-178 ANÁLISIS GENÉTICO DE LA CONTRIBUCIÓN INDIVIDUAL A LA VIRULENCIA DE LOS EFECTORES DEL SISTEMA DE SECRECIÓN TIPO III DE *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*

Macho, A.P., Zumaquero, A., González-Plaza, J.J., Ortiz-Martín, I., Rufián, J.S., Beuzón, C.R.

PAN-179 ANÁLISIS DE EXPRESIÓN MEDIANTE MICROARRAYS DEL SOLAPAMIENTO ENTRE LA RESPUESTA DE LA PLANTA A LA INFECCIÓN BACTERIANA Y AL SILENCIAMIENTO GÉNICO

Zumaquero, A., Bejarano, E., Beuzón, C.R.

PAN-180 EFECTO DEL ENCHARCAMIENTO SOBRE LA INFECCIÓN POR *Phytophthora cinnamomi* Rands EN PATRONES DE AGUACATE

Álvarez Acosta, C., Domínguez Correa, P., Gallo Llobet, L., Rodríguez Padrón, C., Marrero Domínguez, A.

PAN-181 CARACTERIZACIÓN DE MUTANTES EN BOMBAS DE EXTRUSIÓN EN *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 Y *Dickeya dadantii* 3937

Senovilla, M., González-Mula, A., Río-Álvarez, I., Rodríguez-Herva, J. J., Rodríguez-Palenzuela, P., López-Solanilla, E.

PAN-182 PMER, UN REGULADOR TRANSCRIPCIONAL QUE CONTROLA LA RESISTENCIA A FLAVONOIDES EN *P. syringae* pv. *tomato* DC3000

Vargas, P., Gallegos, M.T.

PAN-183 LA PROTEÍNA MENOR DE LA CÁPSIDA DEL CRINIVIRUS TOMATO CHLOROSIS VIRUS INTERACCIONA CON DOS PROTEÍNAS DE *B. tabaci*

Martín-Rodríguez, P., Castillo, A.G., Navas-Castillo, J., Moriones, E.

PAN-184 GENERACIÓN DE CLONES AGROINFECTIVOS DEL CRINIVIRUS TOMATO CHLOROSIS VIRUS

Orílio, A.F., Fortes, I.M., Navas-Castillo, J.

PAN-185 INTERACCIÓN ENTRE EL CRINIVIRUS SWEET POTATO CHLOROTIC STUNT VIRUS Y EL BEGOMOVIRUS SWEET POTATO LEAF CURL LANZAROTE VIRUS.

Orílio, A.F., Navas-Castillo, J.

PAN-186 LA MUTACIÓN GENÉTICA COMO FUENTE DE DIVERSIFICACIÓN Y ADAPTACIÓN DE LOS BEGOMOVIRUS IMPLICADOS EN LA ENFERMEDAD DEL RIZADO AMARILLO DEL TOMATE A SUS HUÉSPEDES NATURALES

Sánchez-Campos, S., Domínguez-Huerta, G., Tomás, D.M., Navas-Castillo, J., Grande-Pérez, A., Moriones, E.

PAN-187 *Pseudomonas syringae* pv. tomato INDUCE CAMBIOS EPIGENÉTICOS EN EL GENOMA DE *Arabidopsis*

Hulak, N., Lucía, A., Rodríguez-Negrete, E., Zumaquero, A., Beuzón, C.R., Castillo, A.G.

PAN-188 LA PROTEÍNA REGULADORA Ust1 CONTROLA CAMBIOS MORFOLÓGICOS ASOCIADOS AL DESARROLLO EN PLANTA EN *Ustilago maydis*

Baeza-Montañez, L., Gold, S.E., García-Pedrajas, M.D.

PAN-189 UN RECOMBINANTE ENTRE DOS VIRUS DE ESPECIES DISTINTAS SUPERA UNA RESISTENCIA MEDIADA POR EIF4E MEDIANTE LA GANANCIA DE UNA FUNCIÓN EN TRADUCCIÓN DEL RNA VIRAL

Miras, M., Aranda, M.A. Truniger, V.

PAN-190 SUPRESIÓN DE RESISTENCIA MEDIADA POR GENES R POR EL EFECTOR DE TIPO III HOPZ1A DE *Pseudomonas syringae*

Lucía, A., Rufián, J.S., Macho, A., Beuzón, C.R., Ruiz-Albert, J.

PAN-191 INSIGHTS INTO TYPE III SECRETION SYSTEMS REGULATORY NETWORKS

Charova, S., Gazi, A., Beuzón, C.R., Panopoulos, N., Kokkinidis, M.

PAN-192 MODIFICACIONES HISTOLÓGICAS PRODUCIDAS POR *Phytophthora cinnamomi* EN RAÍCES DE PLÁNTULAS DE *Quercus ilex*

Redondo, M.A., Pérez-Sierra, A., Abad-Campos, P., García-Jiménez, J., Solla, A., Reig, J., García-Breijo, F.

PAN-193 CAPACIDAD DE INFECCIÓN EN LA RELACIÓN NARANJA-PATÓGENO. INTERACCIÓN COMPATIBLE (*Penicillium digitatum*) Y NO-COMPATIBLE (*P. expansum*).

Vilanova, L., Teixidó, N., Viñas, I., Usall, J., Buron-Moles, G., Solsona, C., Torres, R.

PAN-194 PRODUCCIÓN DE H₂O₂ COMO RESPUESTA A LA INFECCIÓN POR *Penicillium expansum* (COMPATIBLE) Y *P. digitatum* (NO-COMPATIBLE) EN MANZANAS A DIFERENTES ESTADOS DE MADUREZ

Buron-Moles, G., Torres, R., Teixidó, N., Usall, J., Vilanova, L., Sánchez, C., Viñas, I.

PAN-195 IDENTIFICATION OF HOST GENES INVOLVED IN GEMINIVIRUS INFECTION USING A REVERSE GENETICS APPROACH: NEW HINTS ON THE IMPORTANCE OF HORMONAL CROSSTALK

Rosas-Díaz, T., Lozano-Durán, R., Luna, A.P., Bejarano, E.R.

PAN-196 ANÁLISIS DE LAS RUTAS DE SEÑALIZACIÓN MEDIADAS POR FITOHORMONAS FRENTE AL VIRUS DEL RIZADO AMARILLO DEL TOMATE Y A SU INSECTO VECTOR

Sánchez-Guzmán, M.J., Pozo, M.J., Moriones, E., Díaz-Pendón, J.A.

PAN-197 RESISTENCIA DE ACEBUCHE A LA ANTRACNOSIS DEL OLIVO CAUSADA POR *Colletotrichum* spp. Y SU POSIBLE ORIGEN

Xaviér¹, C.J, Moral, J.², Cherifi, F¹., Díez, C.M¹, Trapero, A¹.

PAN-198 PROSPECCIÓN DE GENES IMPLICADOS EN LA PRODUCCIÓN DE FASEOLOTOXINA EN *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*

Bardaji, L., Martínez del Pino, L., Murillo, J.

PAN-199 LA VIRULENCIA DE *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 ES DEPENDIENTE DE LA EXPRESIÓN DE LOS GENES *iaaL* y *matE*

Castillo Lizardo M.G., Aragón I.M., Carvajal V., Matas I.M., Gallegos M.T., Barón M., Ramos C.

PAN-200 FUNCIÓN DE PROTEÍNAS QUIMIORRECEPTORAS (MCP) EN DOS BACTERIAS FITOPATÓGENAS MODELO

Río-Álvarez, I., Navas, M., Rodríguez-Herva, J.J., Rodríguez-Palenzuela, P., López-Solanilla, E.

PAN-201 *D. dadantii* 3937 REPROGRAMA SU VIRULENCIA EN RESPUESTA A PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS DE PLANTAS

Río-Álvarez, I., Rodríguez-Iglesias, A., Rodríguez-Herva, J.J., Rodríguez-Palenzuela, P., López-Solanilla, E.

RESÚMENES DE PONENCIAS INVITADAS

INV-1

EVOLUTION OF *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* VIA GENOMIC ISLAND LOSS AND GAIN

Arnold, D.L.¹, Lovell, H.C.¹, Godfrey, S.A.C.¹, Jackson, R.W.², Mansfield, J.W.³

¹Centre for Research in Biosciences, University of the West of England, Bristol, United Kingdom. E-mail: dawn.arnold@uwe.ac.uk

²School of Biological Sciences, University of Reading, Reading, United Kingdom.

³Division of Biology, Imperial College London, London, United Kingdom.

Pseudomonas syringae pv. *phaseolicola* (*Pph*) is the seed borne causative agent of halo blight in the common bean, *Phaseolus vulgaris*. Gene-for-gene interactions underpin varietal resistance and race structure in the *Pph*/bean interaction. *Pph* race 4 strain 1302A contains the avirulence gene *avrPphB*, which matches resistance gene *R3* and causes a rapid hypersensitive reaction (HR) in bean cultivar Tendergreen. *avrPphB* resides on a 106kb genomic island designated PPHGI-1, which if deleted from the genome of *Pph* 1302A causes a change in virulence and the production of water-soaking lesions typical of disease causing strains of *Pph*. Evolution of virulent strains from 1302A is caused by selection pressure on the pathogen to lose its avirulence gene in bean leaf tissue undergoing the HR. This is an example of host imposed stress leading to beneficial changes within the bacterial genome. Using confocal microscopy for *in-planta* visualization of *Pph* colony development in the leaf mesophyll has shown how the HR defense response greatly affects colony morphology and bacterial survival. The presence of PPHGI-1 was found to cause a reduction of colony development in susceptible *P. vulgaris* leaf tissue. PPHGI-1 can also be transferred to other *Pph* strains by the process of *in planta* transformation. We also present evidence that the circular PPHGI-1 episome is able to replicate autonomously when excised from the genome and that when this occurs expression of genes on the island can be reduced. These results shed more light onto the plasticity of the bacterial genome as it is influenced by *in planta* conditions.

INV-2

CROSS TALKS BETWEEN PLANT AND INSECTS CAN BE PERCEIVED BY INFECTING VIRUSES: PUTATIVE ECOLOGICAL CONSEQUENCES

Blanc, S., Martinière, A., Bak, A., Drucker, M.

INRA, UMR BGPI INRA-CIRAD-SupAgro, Cirad TA-A54/K, Campus International de Baillarguet, 34398 Montpellier Cedex 05, France. E-mail: blanc@supagro.inra.fr

Most plant viruses are transmitted by vectors, particularly by hemipteran insects. The interactions between plants, viruses and insect vectors are obviously highly sophisticated, but they remain only very fragmentarily understood. Indeed, while countless reports have focused on two way interactions between the couples plant-insect, plant-virus, and virus-insect, the studies actually addressing three ways interactions in this type of biological system remains extremely scarce. The impact of plant viral-infection on the insect behavior have sometimes been addressed, reporting for example increased insect attraction due to changes in leaf colors, in volatile emission, or in sap composition. Surprisingly enough, despite the fact that common defense pathways are induced in plants by viral infection and by insect attack, a possible impact of the insect colonization of the plants onto the viral infection cycle has never been addressed.

We have recently demonstrated that *Cauliflower mosaic virus* (CaMV) is able to hijack the plant perception of aphid feeding, and to immediately react by producing transmission specific morphs within infected plant cells. Interestingly, we demonstrated that non-aphid stresses such as wounding, or exposure to CO₂-saturated atmosphere is provoking the same CaMV reaction, correlatively enhancing the efficiency of vector-transmission. This discovery is opening a wide new horizon for research in this field, evaluating the possible range of viral reactions to the feeding of insect vectors, and the range of unrelated biotic or non-biotic stresses that can “falsely” provoke these viral reactions and increase transmission.

INV-3

THE *Blumeria* GENOME: HOW A LONG AND INTIMATE ASSOCIATION WITH A PLANT HOST MOULDED THE MILDEW'S GENES

Spanu, P.D.

Department of Life Sciences, Imperial College London, London, SW7 2AZ, UK. E-mail: p.spanu@imperial.ac.uk

The genomes of the powdery mildew fungi sequenced so far have revealed extraordinary features: they are much larger than closely related ascomycetes, have relatively few protein coding genes but appear to encode a hugely expanded complement of effectors. The overall increase in genome size is determined by the proliferation of lineage specific retro-transposons, possibly as a consequence of the loss of the "RIP" pathway. Fewer than 7000 protein coding genes were detected in the barley powdery mildew *Blumeria graminis* f. sp. *hordei*. The gene losses are mostly due to a marked reduction in the size of gene families and the number of paralogs. This is particularly noticeable for genes encoding enzymes in secondary metabolism pathways and carbohydrate active enzymes. A few primary metabolic pathways are also missing, such as those required for the assimilation of inorganic nitrogen, the biosynthesis of thiamine and anaerobic fermentation. Unusually in these filamentous fungi there are no hydrophobins. In the face of this massive gene loss, we have detected nearly 500 genes encoding small secreted proteins with features typical of pathogen effectors. A systematic functional analysis of a subset of these identified seven effectors which, when silenced, lead to a reduction in haustorial development in *B. graminis*. I will present data to explain how some of these effectors of pathogenicity work.

INV-4

EFFECTS OF INDUCED RESISTANCE ON THE RHIZOSPHERE MICROBIOME

Bakker, P.A.H.M., Berendsen, R.L., Doornbos, R.F., Zamioudis, C., Pieterse, C.M.J.

Plant-Microbe Interactions, Utrecht University, Padualaan 8, 3584 CH Utrecht, Netherlands. E-mail: p.a.h.m.bakker@uu.nl

Microbial communities that are associated with plant roots are highly diverse and harbor tens of thousands of bacterial and archaeal species. Several functions sustained by this so-called rhizosphere microbiome are drivers of plant health and include the suppression of infectious diseases. The latter function is prominent in disease suppressive soils. From such soils micro-organisms have been selected that can effectively control soil borne diseases. The mechanisms implicated in disease suppression by these biological control agents include competition for nutrients and space, antibiosis, and induced systemic resistance (ISR). For many biological control agents, and especially fluorescent *Pseudomonas* spp., ISR has been recognized as a major mechanism of disease suppression. ISR eliciting traits of fluorescent *Pseudomonas* spp. have been identified, they are diverse and in many cases there is redundancy of ISR elicitors. Here we will discuss implications of induced resistance on the ecology of ISR eliciting biocontrol agents and on the recruitment and functioning of the rhizosphere microbiome.

INV-5

MYCOVIRUSES AT THE FUNGUS-PLANT INTERFACE: HOW PLANT PATHOGENIC FUNGI DEFEND AGAINST VIRUS-MEDIATED HYPOVIRULENCE AT THE CELLULAR AND POPULATION LEVELS

Nuss, D.

Institute for Bioscience and Biotechnology Research, University of Maryland, 9600 Gudelsky Dr., Rockville, Maryland 20850, USA.

E-mail: dnuss@umd.edu

While most viruses of fungi lead secret lives, a number reduce the ability of their fungal hosts to cause disease in plants. This phenomenon, termed “hypovirulence”, has attracted attention owing to the importance of fungal disease in agriculture and the limited strategies available for the control of plant-pathogenic fungi. The persistent, exclusively intracellular nature of fungal virus infections presents technical challenges to experimental design, but also provides opportunities for examining fundamental aspects of virus-host interactions from a perspective that is quite different from that pertaining for most plant and animal virus infections. This view will be illustrated by recent advances in the understanding of antiviral defense responses against one group of fungal viruses for which the technical experimental challenges have been overcome, the hypoviruses responsible for hypovirulence of the chestnut blight fungus *Cryphonectria parasitica*. Studies on fungal host RNA silencing revealed new insights into the induction and suppression of RNA silencing as an antiviral defense response at the cellular level and an unexpected role for RNA silencing in viral RNA recombination. A comparative genomics approach was used to identify genes associated with the non-self vegetative incompatibility (*vic*) system, the first for a plant pathogenic fungus, which serves as an antiviral defense mechanism at the population level. The implications of these new insights into fungal antiviral defense mechanisms for fundamental studies and practical applications will be discussed.

RESÚMENES DE COMUNICACIONES ORALES

Sesiones plenarias

PL-1

CONTRIBUCIÓN A LA VIRULENCIA Y ESPECIFICIDAD DE HUÉSPED DE EFECTORES DEL T3SS DE CODIFICACIÓN PLASMÍDICA EN *Pseudomonas savastanoi* NCPPB 3335

Castañeda-Ojeda, M.P.¹, López-Solanilla, E.² y Ramos, C.¹

¹Área de Genética, Universidad de Málaga, Instituto de Hortofruticultura Subtropical y Mediterránea "La Mayora", Universidad de Málaga-CSIC (IHSM-UMA-CSIC), Campus de Teatinos, 29071-Málaga. E-mail: crr@uma.es

²Centro de Biotecnología y Genómica de Plantas (CBGP), Universidad Politécnica de Madrid. E-mail: emilia.lopez@upm.es.

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. La secuenciación de los tres plásmidos de la cepa Psv NCPPB 3335 ha revelado la codificación en los mismos de dos genes homólogos a efectores del sistema de secreción tipo III (T3SS): *hopAF1* (pPsv48A) y *hopAO1* (pPsv48B). Por otro lado, el cromosoma de NCPPB 3335 codifica un gen parálogo de *hopAF1* (*hopAF1-1*). La construcción de mutantes de pérdida de función de los efectores de codificación plasmídica (mutantes Δ *hopAF1* y Δ *hopAO1*), y su posterior inoculación individual en plantas de olivo micropropagadas *in vitro* y plantas de olivo leñosas, ha revelado que el tamaño y morfología de los tumores generados por estos dos mutantes es semejante a los inducidos por la cepa silvestre. Sin embargo, los tumores inducidos por Δ *hopAO1*, cuyo crecimiento *in planta* se encuentra significativamente reducido con respecto a la cepa silvestre, muestran una necrosis temprana del tejido vegetal. Ensayos de translocación de estos tres efectores, revelaron que todos ellos se translocan a través del T3SS de Psv. Con el objetivo de profundizar en la expresión de estos genes, se han llevado a cabo análisis mediante qRT-PCR y fusiones transcripcionales al gen *lacZ* de las secuencias localizadas en el extremo 5' de sus ORFs (secuencias "Hrp-box"). Los resultados obtenidos mostraron un aumento de la expresión de *hopAF1-1* y *hopAO1* durante la fase estacionaria de crecimiento, siendo constitutiva la expresión de *hopAF1*. En la actualidad, estamos analizando el papel de estos efectores sobre las respuestas de defensa de las plantas. Para ello, cada uno de estos genes se expresa individualmente desde 1) un derivado de DC3000 (D28E) carente de 28 los genes codificadores de efectores T3SS y, 2) una cepa de *Pseudomonas fluorescens* 5 (Pf5) que expresa los genes necesarios para la biosíntesis del T3SS. En el primer caso, se analiza la visualización de la respuesta hipersensible (HR) en plantas de *Nicotiana tabacum*, mientras que la expresión desde Pf5 en el mismo huésped se analiza mediante ensayos de deposición de callosa y formación de especies reactivas de oxígeno (ROS).

Financiación: AGL2011-30343-C02-01 (MINECO), cofinanciado por FEDER.

BASES GENÉTICAS DE LA PRODUCCIÓN DE MANGOTOXINA

Carrión, V.J.¹, Arrebola, E.¹, van der Voort, M.², Gutiérrez-Barranquero, J.A., Murillo, J.³, Raaijmakers, J.M.², de Vicente, A.¹, Cazorla, F.M.¹

¹*Departamento de Microbiología, Universidad de Málaga, Instituto de Hortofruticultura Subtropical y Mediterránea "La Mayora" (IHSM-UMA-CSIC), Campus de Teatinos, 29071 Málaga. E-mail: vcarrion@uma.es*

²*Laboratory of Phytopathology, Wageningen University, Wageningen, The Netherlands.*

³*Laboratorio de Patología Vegetal, E.T.S. de Ingenieros Agrónomos, Universidad Pública de Navarra, 31006 Pamplona.*

Mangotoxina es una toxina antimetabolito considerada como factor de virulencia, fundamentalmente producida por cepas de *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* aisladas de mango, aunque recientemente se describió su producción en cepas pertenecientes a los patovares *avellanae* y *pisi*. La mangotoxina es un pequeño oligopéptido que inhibe a la enzima ornitina N-acetil transferasa, paso clave en la ruta de biosíntesis de ornitina y arginina. Se dispone de una colección de mutantes defectivos en la producción de mangotoxina en nuestra cepa modelo *P. syringae* pv. *syringae* UMAF0158. Estudios previos han demostrado la implicación del gen *mgoA* en la producción de mangotoxina, el cual codifica para una posible péptido sintetasa no ribosomal. Este gen pertenece al operón *mgo* (*mangotoxin generating operon*), el cual contiene cuatro genes implicados en la producción de mangotoxina. En este trabajo, se ha descrito el operón denominado *mbo* (*mangotoxin biosynthetic operon*) que contiene seis genes (*mboABCDEF*), el cual es específico y esencial para la biosíntesis de mangotoxina. Por otro lado, se ha realizado un estudio de la regulación de la producción de mangotoxina, mediante análisis por Q-PCR, donde se ha observado que mutantes en el sistema de regulación de dos componentes GacS/GacA disminuyen los niveles de expresión de los operones *mgo* y *mbo*, y que en los mutantes en el operón *mgo* se reduce la expresión de los genes del operón *mbo*. Estos resultados sugieren que el sistema de dos componentes GacS/GacA junto con el operón *mgo*, intervienen en la regulación de la producción de mangotoxina. Sin embargo, experimentos de sobreexpresión, y expresión del promotor del operón *mbo* en diferentes fondos genéticos sugieren que, los productos del operón *mgo* podrían actuar como potenciadores de la transcripción del operón *mbo*.

Este trabajo ha sido financiado por fondos CICE-Junta de Andalucía, ayudas Grupo PAIDI AGR-169 e Incentivos a Proyecto de Excelencia (P07-AGR-02471), cofinanciado con fondos FEDER (EU).

PL-3

PDST12 (FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN) DE *Penicillium digitatum* IMPLICADO EN VIRULENCIA DURANTE LA INFECCIÓN DE FRUTOS CÍTRICOS

De Ramón-Carbonell, M., Sánchez-Torres, P.

Departamento de Protección Vegetal y Biotecnología, Instituto Valenciano de Investigaciones Agraria (IVIA), 46113 Moncada, Valencia. E-mail: palomas@ivia.es

Penicillium digitatum es el principal agente patógeno de herida causante de la podredumbre verde en los frutos cítricos durante la post-cosecha. El conocimiento de los mecanismos de virulencia constituye un paso muy importante para dirigir la búsqueda de nuevos tratamientos de control alternativos a los fungicidas usados actualmente. Dentro de los factores de transcripción fúngicos implicados en patogenicidad/virulencia uno de los más estudiados es Ste12 descrito en numerosos microorganismos y en particular en los hongos *C. lagenarium*, *C. lindemuthianum*, *F. oxysporum* y *B. cinerea*. En todos los casos estos factores de transcripción juegan un papel primordial en la virulencia del patógeno. Así pues, se ha identificado PdSt12 factor de transcripción en *P. digitatum* homólogo a Ste12 que presenta una pauta de lectura abierta de 2346nt y 4 intrones y codifica una proteína de 693 aminoácidos con las secuencias típicas de dedos de zinc de los factores de transcripción. Mediante transformación mediada por *Agrobacterium tumefaciens* (ATMT) se ha llevado a cabo tanto la sobreexpresión como la disrupción del gen PdSt12. Los resultados obtenidos han confirmado la implicación este gen en patogénesis/virulencia ya que los mutantes nulos analizados presentaron una reducción en capacidad infectiva significativa así como la capacidad de esporulación afectada durante la infección de frutos cítricos. Además los mutantes de sobreexpresión mejoraron su capacidad de infección, en particular en los aislados cuyo parental es Pd149 que tiene menor virulencia. Los estudios de expresión mediante qRT-PCR mostraron un incremento en el tiempo en las cepas parentales virulentas y la ausencia de expresión en los mutantes disruptos. Mientras que las cepas transformadas con copias extras del gen mostraron una inducción respecto a las cepas parentales. Por otro lado, se confirmó el papel de este gen como regulador negativo en genes transportadores tanto MFS como ABC, implicados en resistencia a fungicidas y patogénesis y en otros factores de transcripción ya que la expresión de los mismos se induce de forma llamativa en las cepas con PdSt12 disrupto y sin embargo ejerce una regulación positiva en genes implicados en virulencia. Todo ello abre la posibilidad de conocer de manera más profunda los mecanismos que regulan procesos como la capacidad infectiva o virulencia, la resistencia a fungicidas y la posible implicación en el estrés oxidativo o los mecanismos de defensa del hospedador.

PL-4

LA INFECCIÓN POR EL VIRUS DEL CASCABELEO DEL TABACO (TRV) ESTIMULA LA REGULACIÓN NEGATIVA DE *BIR1*, UN REPRESOR DE RESPUESTAS DE DEFENSA, A TRAVÉS DE SILENCIAMIENTO GÉNICO

Hamada, I.B., Fernández, L., Donaire, L., Llave, C.

Departamento de Biología Medioambiental, Centro de Investigaciones Biológicas (CSIC), Ramiro de Maeztu, 9, 28040 Madrid. E-mail: hamada@cib.csic.es.

La naturaleza de los cambios transcriptómicos asociados al proceso de infección viral en plantas se encuentran relativamente bien caracterizados. Se desconocen sin embargo las causas y los mecanismos reguladores que controlan la expresión de los genes de respuesta al virus. El objetivo de este trabajo es demostrar que la regulación de algunos de estos genes alterados depende, al menos en parte, de procesos de silenciamiento génico mediados por pequeños RNAs (sRNA) y profundizar en el conocimiento y la relevancia de la regulación por éstos durante la infección. Utilizando el sistema modelo *Virus del cascabeleo del tabaco* (TRV)–*Arabidopsis thaliana*, hemos empleado una herramienta de genómica funcional que combina el enriquecimiento de productos de procesamiento por microRNAs y/o sRNAs interferentes y su hibridación con “microarrays” de *Arabidopsis* (Affimetrix). Comparando los datos obtenidos en plantas sanas e infectadas sistemáticamente hemos podido identificar 21 genes procesados diferencialmente ($P\text{-value} < 0,05$) que podrían ser candidatos a dianas de silenciamiento y cuya regulación ocurre mayoritariamente en presencia de virus. Entre ellos se encuentra el gen *BIR1*, un regulador negativo del sistema inmune en plantas. Mediante la técnica de 5'-RACE hemos podido corroborar el procesamiento de su mRNA, e identificar la existencia de un sitio preferente de corte en su secuencia nucleotídica. El procesamiento del mRNA de *BIR1* no ocurre en planta sana. Para verificar que el procesamiento del gen *BIR1* depende de la maquinaria de silenciamiento y no de otros procesos de degradación, se analizó por qRT-PCR la acumulación relativa de su mRNA en mutantes defectivos en diferentes rutas del silenciamiento génico. En ausencia de virus, *BIR1* se expresaba en plantas silvestres Col-0 al mismo nivel que en el mutante *ago1-27* (cuya capacidad de procesamiento se encuentra inhibida parcialmente). Sin embargo, su mRNA se acumulaba a niveles significativamente superiores en *ago1-27* respecto al fondo silvestre cuando las plantas estaban infectadas. Este resultado indicaba que 1) *BIR1* se induce transcripcionalmente en presencia de TRV, y 2) *BIR1* está reprimido post-transcripcionalmente por degradación mediada por silenciamiento de su mRNA. Para profundizar en el papel biológico de *BIR1* en el proceso infectivo, analizamos por qRT-PCR la acumulación viral en mutantes defectivos para el gen. La acumulación viral en estas plantas estaba muy disminuida, muy probablemente a causa de la expresión constitutiva de genes de defensa en *bir1-1* que pudieran estar comprometiendo el desarrollo de la infección. Este resultado sugiere que el procesamiento de *BIR1* resulta determinante en la regulación del proceso infectivo. La identificación de *BIR1* y del mecanismo que lo regula durante la infección profundiza en la base molecular de la interacción compatible planta-virus.

PL-5

PRODUCCIÓN DE ACILSACAROSAS EN TOMATE PARA EL CONTROL DE MOSCAS BLANCAS Y LOS VIRUS QUE TRANSMITEN

Rodríguez-López, M.J.¹, Escobar-Bravo R.¹, Alba J.M.¹, Garzo, E.², Bonani, J.P.², Fereres, A.², Fernández-Muñoz, R.¹, Moriones, E.¹

¹*Instituto de Hortofruticultura Subtropical y Mediterránea "La Mayora", Consejo Superior de Investigaciones Científicas (IHSM-UMA-CSIC), E-29750 Algarrobo-Costa, Málaga. E-mail: mjrodriguez@eelm.csic.es*

²*Instituto de Ciencias Agrarias (ICA), Consejo Superior de Investigaciones Científicas, c/Serrano 115 Dpto, E-28006 Madrid*

Bemisia tabaci y *Trialeurodes vaporariorum* son dos especies de mosca blanca que ocasionan daños directos en tomate y como vectores de virus. La resistencia a insectos puede ser una buena estrategia para el control del desarrollo de las plagas y para limitar la dispersión de enfermedades producidas por los virus que transmiten. De hecho, la transmisión de virus planta a planta depende en gran medida del comportamiento del insecto, siendo la selección y asentamiento en la planta hospedadora factores clave en el proceso de dispersión de una enfermedad viral. En tomate, una vez seleccionada la planta, la mosca blanca prefiere asentarse en el envés de las hojas, donde se alimenta, deposita sus huevos y posteriormente se desarrollan las larvas. Hemos demostrado que la introgresión en la especie cultivada de tricomas glandulares de tipo IV productores de acilsacarosas y localizados principalmente en el envés de las hojas, mediante cruzamiento recurrente a partir del tomate silvestre *S. pimpinellifolium*, resulta en resistencia a *B. tabaci*. En este trabajo ponemos de manifiesto que dicha resistencia obliga a este insecto a desplazarse hacia el haz de las hojas donde su alimentación es menos eficiente y determina una mayor exposición a los enemigos naturales. La resistencia también se ha mostrado efectiva frente a *T. vaporariorum*, y en ambos casos implica una disminución de la ovoposición y supervivencia, limitando su daño directo como plaga. Además, hemos demostrado en el caso de *B. tabaci* que tanto la no preferencia como la modificación en el comportamiento alimentario en plantas resistentes determina una menor dispersión del begomovirus causante del rizado amarillo del tomate (tomato yellow leaf curl virus) transmitido por este insecto. La resistencia así introgresada sólo resulta efectiva en plantas con un estadio de desarrollo avanzado, cuando la producción de acilsacarosas es óptima. Sin embargo, la aplicación de tratamientos de metiljasmonato en plantas jóvenes preactiva la resistencia, se promueve la formación de tricomas tipo IV y la secreción de acilsacarosas, y el resultado es la disminución de la dispersión del begomovirus también en estados fenológicos tempranos.

INTERVENCIÓN HUMANA Y RIESGO DE ENFERMEDAD: PAPEL DE LA BIODIVERSIDAD Y DE LA DENSIDAD DE HUÉSPED

Pagán, I.¹, González-Jara, P.¹, Moreno-Letelier, A.², Rodelo-Urrego, M.¹, Fraile, A.¹, Piñero, D.², García-Arenal, F.¹

¹*Centro de Biotecnología y Genómica de Plantas (UPM-INIA), E.T.S.I. Agrónomos, Campus de Montegancedo, Universidad Politécnica de Madrid, Pozuelo de Alarcón (Madrid). E-mail: Fernando.garciaarenal@upm.es*

²*Departamento de Ecología Evolutiva, Instituto de Ecología, Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado Postal 70-275, México, D.F. 04510, México*

Una hipótesis clásica en Patología Vegetal establece que la reducción de la biodiversidad en los agroecosistemas, y el aumento de densidad de plantas huésped, son factores centrales en la emergencia de enfermedades en los cultivos, o en el mayor impacto de éstas en comparación con ecosistemas silvestres. Esta hipótesis se basa en evidencia circunstancial, habiendo una carencia notable de datos al respecto. La teoría predice que el aumento de densidad del huésped favorecerá la transmisión de los patógenos y su evolución a mayor virulencia. Por otro lado, la relación entre biodiversidad y riesgo de enfermedad se ha explicado por dos hipótesis que predicen, la primera, que ambos factores están positivamente correlacionados, ya que cuanto mayor es la biodiversidad, mayor es el número de fuentes potenciales de inóculo para el huésped focal, mientras que la segunda predice una correlación negativa entre biodiversidad y riesgo de enfermedad, ya que una mayor biodiversidad puede resultar en una menor abundancia del huésped focal. Con objeto de analizar la relación entre factores ecológicos y riesgo de enfermedad se realizaron estimas de la incidencia de plantas sintomáticas, y de plantas infectadas por virus en poblaciones del pimiento silvestre o chiltepín entre 2007 y 2009. Las poblaciones muestreadas representan distintos niveles de intervención humana, desde poblaciones puramente silvestres a cultivadas. En cada población se cuantificó también la diversidad de especies de plantas, la diversidad genética del huésped y su densidad. Los resultados indican que el riesgo de enfermedad aumenta con el nivel de intervención humana, que a su vez disminuye la diversidad de especies del hábitat y la diversidad genética del chiltepín, y aumenta la densidad de plantas. La diversidad de especies fue el principal predictor del riesgo de enfermedad en el conjunto de las poblaciones y entre las poblaciones silvestres, mientras que en las poblaciones antropizadas el predictor principal fue la diversidad genética del huésped. La densidad de huésped fue en todos los casos un factor secundario. Estos resultados demuestran que la alteración humana del hábitat es un determinante de la emergencia de enfermedades, y subrayan el papel de diferentes factores ecológicos en distintos ecosistemas. Los resultados son relevantes para el diseño de estrategias encaminadas a impedir o prever la emergencia de enfermedades.

PL-7

LA DIVERGENCIA VÍRICA EN LA RAZA EUROPEA DE *Gremmeniella abietina* NO SE CUMPLE EN LA POBLACIÓN ESPAÑOLA

Botella, L.¹, Tuomivirta, T. T.², Hantula, J.², Diez, J.J.¹

¹*Instituto Universitario de Gestión Forestal Sostenible, Universidad de Valladolid-INIA, Avda. Madrid 44, Edificio E, 34004 Palencia. E-mail: lbotella@pvs.uva.es*

²*Instituto Finlandés de Investigaciones Forestales, Metla, Joikiniemenkuja, 1, FI-01301 Vantaa, Finlandia. E-mail: jarkko.hantula@metla.fi*

La raza Europea del ascomicete *Gremmeniella abietina* var. *abietina* es un complejo de especies y biotipos (A, B y Alpino) que alberga infecciones y mult infecciones de cepas víricas pertenecientes a diferentes familias. Las familias *Narnaviridae*, *Totiviridae* y *Partitiviridae* son las más abundantes, y en particular, *Narnaviridae* está representada por el género *Mitovirus*, el cual tiene un genoma compuesto de ARN cadena simple positiva (+ssRNA) con una fase replicativa en forma de ARN de doble cadena (dsRNA). En general, los biotipos A y B de *G. abietina* parecen albergar una comunidad vírica divergente, lo que es muy importante para el estudio filogenético de dicho patógeno en España, ya que los aislados españoles pertenecen a una altamente diferenciada población, con origen en el biotipo A y variabilidad genética intrapoblacional extremadamente baja. En este trabajo, se analizó la presencia de mitovirus en 353 aislados de la raza Europea procedentes de Canadá, Finlandia, España, Suiza, Turquía y Estados Unidos. En base a estos resultados se obtuvieron 60 secuencias parciales (ca. 500 bp) de la ARN polimerasa dependiente de ARN (RdRp) mediante RT-PCR y secuenciación. Dichas secuencias correspondían a 33 aislados de la población española de *G. abietina*, 31 aislados finlandeses del biotipo A, 1 aislado finlandés y 2 turcos del biotipo B y 5 aislados del biotipo Alpino. Así, los resultados conseguidos confirman la existencia de dos especies de mitovirus distintas, GMV1 y GMV2, previamente relacionadas con los biotipos A y B, respectivamente. Sin embargo, ambas especies están contenidas en la población española, siendo ésta la primera vez que dos especies de virus aparecen en la misma población de *G. abietina*, y sugiere que entre la población española y el biotipo B podría haber ocurrido una transmisión vírica horizontal.

PL-8

BASES EPIDEMIOLÓGICAS PARA LA ESTIMACIÓN DEL IMPACTO DEL CAMBIO CLIMÁTICO EN LA VERTICILOSIS DEL OLIVO

Lucena, C., Trapero-Casas, J.L., Navas-Cortés, J.A.

Instituto de Agricultura Sostenible, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Apdo. 4084, 14080 Córdoba. E-mail: j.navas@csic.es

La temperatura y la concentración de dióxido de carbono (CO₂) son las variables ambientales asociadas al Cambio Climático que mayor impacto pueden ejercer sobre los patosistemas agrícolas. La Verticilosis del olivo, causada por *Verticillium dahliae* constituye el principal problema fitopatológico del cultivo, y en particular en el Sur de España donde amenaza su viabilidad. En este trabajo se ha evaluado y modelizado el efecto de la temperatura y CO₂ ambiental sobre el desarrollo de la Verticilosis, y su interacción con el nivel de virulencia de patotipos de *V. dahliae* y la susceptibilidad de cultivares de olivo.

Se han realizado experimentos en condiciones controladas usando plantones de olivo de 9 meses de edad de los cvs. Picual y Arbequina, que crecieron en suelo infestado por los patotipos defoliante (D) y no defoliante (ND) de *V. dahliae* e incubados a temperatura constante de 20, 24 y 28°C y cada uno de tres valores de CO₂ ambiental de 386, 550 y 750 ppm. Estas condiciones son representativas de los niveles actuales de ambas variables ambientales así como sus predicciones por modelos de simulación de clima para los escenarios SRES A2 y B2 del IPCC para el sur de España. La enfermedad se evaluó por la incidencia de infección y severidad de síntomas, así como diversos parámetros de crecimiento y de respuesta a estrés. Se han utilizado modelos de regresión para describir el progreso temporal de la enfermedad, así como GLM y mixtos para determinar la relación de ésta con la temperatura y concentración de CO₂ para las interacciones de cultivar x patotipo evaluadas.

Los resultados indican un efecto diferencial de los distintos componentes del patosistema evaluados en el desarrollo de la Verticilosis. Así, en concentraciones de CO₂ actual, la temperatura óptima para el desarrollo de la Verticilosis se estimó en 20-24°C, siendo su desarrollo más rápido y severo en la combinación más favorable: 'Picual'/D seguida de 'Arbequina'/D, retrasándose en el tiempo y con niveles de infección inferiores en la combinación menos favorable 'Picual'/ND. Por otro lado, para estos mismos niveles óptimos de temperatura, el incremento de la concentración de CO₂ determinó una ralentización del desarrollo y menor cantidad de enfermedad. Valores extremos de temperatura (28°C) y CO₂ (750 ppm) limitan el desarrollo de Verticilosis. Se discutirá la aplicación de estos resultados para el desarrollo de modelos de predicción de riesgo de Verticilosis en condiciones de clima actual y futuro para el sur de España.

Financiación: P08-AGR-0385, CICE-Junta Andalucía y FEDER.

PL-9

ESTRUCTURA GENÉTICA DE LAS POBLACIONES DE *Fusarium circinatum* EN ESPAÑA

Berbegal, M.¹, Pérez-Sierra, A.¹, Armengol, J.¹, García-Jiménez, J.¹, Grünwald, N.J.²

¹Instituto Agroforestal Mediterráneo, Universidad Politécnica de Valencia, Camino de Vera s/n, 46022-Valencia. E-mail: mobermar@etsia.upv.es

²Horticultural Crops Research Laboratory, USDA Agricultural Research Service, Corvallis, OR, USA

Fusarium circinatum es el agente causal del chancro resinoso de los pinos, una enfermedad que produce importantes pérdidas económicas en plantaciones y viveros forestales. El objetivo de este trabajo fue analizar la estructura genética de poblaciones y el modo de reproducción de *F. circinatum* a partir de una amplia colección internacional de aislados. De este modo, se pretendía obtener información sobre los potenciales eventos de introducción y vías de dispersión del patógeno en España. Para ello, a partir de 223 aislados procedentes de 5 regiones españolas (Asturias, Cantabria, Castilla y León, Galicia y País Vasco), y 8 países (Chile, Estados Unidos, Francia, Japón, Méjico, Portugal, Sudáfrica y Uruguay), se identificaron 66 genotipos multilocus (GML) mediante 8 marcadores microsatélite o SSR (simple sequence repeats). Una vez identificados los GMLs, se analizó la diversidad genotípica y la posible contribución del modo de reproducción del patógeno en la diversidad observada. Además, se analizó la relación evolutiva entre los GMLs, construyendo “minimum spanning networks” a partir de la distancia genética de Bruvo. En cuanto a las poblaciones estudiadas, se realizó un análisis multivariante (DACP) para estimar el número más probable de poblaciones que podían diferenciarse de los datos sin considerar criterios geográficos. Asimismo, la estructura genética de las poblaciones se evaluó mediante el análisis molecular de la varianza.

En las poblaciones españolas estudiadas se observó una estructura clonal y se separaron claramente dos grupos, incluyendo cada uno de ellos uno de los GMLs que se identificaron con más frecuencia. En estos grupos además de los españoles, sólo se identificaron GMLs de Portugal y Estados Unidos. Los resultados obtenidos apoyarían la hipótesis de dos introducciones independientes de al menos, dos genotipos del patógeno en España, potencialmente a partir de importaciones de semillas de pino infectadas.

Financiado por un convenio INIA-MARM y un Contrato Postdoctoral Campus de Excelencia Internacional, UPV.

PL-10

C2 FROM BEET CURLY TOP VIRUS PROMOTES A CELL ENVIRONMENT SUITABLE FOR EFFICIENT REPLICATION OF GEMINIVIRUSES, PROVIDING A NOVEL MECHANISM OF VIRAL SYNERGISM

Caracuel, Z.¹, Lozano-Durán, R.¹, Huguet, S.², Arroyo-Mateos, M.¹, Rodríguez-Negrete, E. A.¹, Bejarano, E.R.¹

¹*Instituto de Hortofruticultura Subtropical y Mediterránea 'La Mayora', Universidad de Málaga-Consejo Superior de Investigaciones Científicas (IHSM-UMA-CSIC), Departamento Biología Celular, Genética y Fisiología, Universidad de Málaga, Campus Teatinos, 29071 Málaga*

²*Unité de Recherche en Genomique Ve getale (URGV), UMR INRA 1165 – Université d'Evry Val d'Essonne – ERL CNRS 8196, 2 rue G. Cremieux, CP 5708, F-91057 Evry Cedex, France*

Geminiviruses are plant viruses with circular, single-stranded (ss) DNA genomes that infect a wide range of species and cause important losses in agriculture. Geminiviruses do not encode their own DNA polymerase, and rely on the host cell machinery for their replication. Here, we identify a positive effect of the curtovirus *Beet curly top virus* (BCTV) on the begomovirus *Tomato yellow leaf curl Sardinia virus* (TYLCSV) infection in *Nicotiana benthamiana* plants.

Our results show that this positive effect is caused by the promotion of TYLCSV replication by BCTV C2. Transcriptomic analyses of plants expressing C2 unveil an up-regulation of cell cycle-related genes induced on cell cycle re-entry; experiments with two mutated versions of C2 indicate that this function resides in the N-terminal part of C2, which is also sufficient to enhance geminiviral replication. Moreover, C2 expression promotes the replication of other geminiviral species, but not of RNA viruses.

We conclude that BCTV C2 has a novel function in the promotion of viral replication, probably by restoring the DNA replication competency of the infected cells and thus creating a favourable cell environment for viral spread. Because C2 seems to have a broad impact on the replication of geminiviruses, this mechanism might have important epidemiological implications.

PL-11

DESCRIPCIÓN DEL TRANSCRIPTOMA DE PLANTAS DE MELÓN INFECTADAS CON VIRUS DE DISTINTOS GÉNEROS, Y CON CEPAS DEL MISMO VIRUS

Gómez-Aix, C.¹, Pascual, L.², Cañizares, J.², Sánchez-Pina, M.A.¹, Aranda, M.A.¹

¹*Centro de Edafología y Biología Aplicada del Segura (CEBAS-CSIC), Departamento de Biología del Estrés y Patología Vegetal, Campus de Espinardo, 30100 Murcia*

²*Departamento de Biotecnología, Instituto de Conservación y Mejora de la Agrodiversidad Valenciana (COMAV-UPV), Camino de Vera s/n, 46022 Valencia*

El desarrollo de un microarray de oligonucleótidos de DNA específico de melón ha permitido caracterizar el transcriptoma de plantas de melón infectadas con el Virus del mosaico del pepino (CMV), así como la respuesta a la infección por el Virus del mosaico de la sandía (WMV) de plantas de una variedad de melón resistente (Mascarell-Creus, et al., (2009) BMC Genomics 10:467-467; Gonzalez-Ibeas, et al., (2012) MPMI 25(1):107-118). En este trabajo hemos ampliado estos resultados con un doble objetivo: (i) por un lado, hemos utilizado estos datos y generado nuevos resultados para comparar los transcriptomas de plantas de melón infectadas por CMV, WMV y por el Virus de las manchas necróticas del melón (MNSV), pertenecientes a géneros distintos. Así, hemos identificado cambios específicos de virus, y cambios comunes entre parejas de virus. Los cambios comunes a los tres virus fueron mínimos, lo cual nos llevó a explorar la hipótesis de que la dinámica de la infección viral juega un papel fundamental en las modificaciones metabólicas de la planta huésped. Esta hipótesis la hemos contrastado utilizando un set limitado de transcritos de melón y RT-qPCR, comparando estos resultados con la dinámica de acumulación de cada uno de los tres virus también medida mediante RT-qPCR. (ii) Por otro lado, hemos analizado, utilizando el microarray, los cambios transcriptómicos de plantas de melón asociados con la infección por cepas de MNSV que no difieren en las proteínas que codifican sus genomas, sino en la región no codificante del extremo 3' del RNA genómico (3'-UTR). Significativamente, los cambios transcriptómicos entre los dos tratamientos, monitorizados en un experimento temporal, fueron importantes. Estos resultados se discutirán en el contexto de la función del 3'-UTR de MNSV en la traducción del RNA viral.

**CARACTERIZACIÓN GENOTÍPICA Y ESTUDIO FENOTÍPICO DE
Xanthomonas arboricola pv. *pruni* Y DE LOS PROCESOS ASOCIADOS
A LOS PRIMEROS ESTADIOS DE INFECCIÓN**

Garita-Cambroner, J.¹, Sabuquillo, P.¹, Sena, M.¹, Ferragud, E.¹, Casero, C.¹, Palacio-Bielsa, A.², López, M.M.³, Cubero, J.¹

¹Departamento de Protección Vegetal, INIA. Ctra. de la Coruña km. 7,5, 28040 Madrid. E-mail: cubero@inia.es

²Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria de Aragón. Av. Montañana 930, 50059 Zaragoza

³Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias. Ctra. de Moncada a Náquera km 4,5, 46113 Moncada, Valencia

Xanthomonas arboricola pv. *pruni* (Xap) es una de las principales bacterias fitopatógenas asociada a daños en hojas, ramas y frutos en frutales y ornamentales del género *Prunus*. Este patógeno se encuentra ampliamente distribuido y está presente en la mayor parte de las áreas dedicadas a la producción de frutales de hueso a nivel mundial. En España, se localizó por primera vez en 2002 en Badajoz, habiendo sido extendida posteriormente a las principales zonas productoras de melocotonero, nectarino, ciruelo y almendro. Los estudios epidemiológicos de la enfermedad han demostrado una amplia variabilidad entre las cepas de Xap, que podría reflejarse en diferencias en su patogenicidad. El género *Xanthomonas* presenta varias características fenotípicas asociadas al inicio y desarrollo de la enfermedad, entre ellas la síntesis de enzimas extracelulares, la producción del exopolisacárido xanthano, la motilidad y la quimiotaxis asociada al movimiento de la bacteria en la planta y la organización en estructuras tipo biopelícula.

En este estudio se han caracterizado genotípica y fenotípicamente una selección de aislados del género *Xanthomonas* obtenidos de varios huéspedes del género *Prunus* procedentes de ocho localidades españolas. El análisis genotípico, realizado mediante secuenciación multi-locus utilizando cuatro genes, mostró variabilidad entre los distintos aislados estudiados, confirmando además que la mayor parte de los aislados, pero no todos, podían considerarse dentro de Xap. En cuanto al análisis fenotípico realizado, el sistema BIOLOG[®] GN2, mostró variabilidad en la utilización de compuestos de carbono entre las cepas estudiadas. Los resultados de la motilidad tipo *swarming* también indicaron diferencias entre las cepas en cuanto a la morfología de las colonias, así como al área de las mismas. La actividad surfactante, característica asociada al movimiento superficial, fue evaluada mediante los métodos de atomización de aceite y colapso de gota, determinándose variación en la actividad surfactante solamente por medio del primer método. Además, se ha evaluado la capacidad de movimiento en medio semisólido, *swimming*, de las cepas de Xap, encontrando también variación en su motilidad. Se ha evaluado la posible asociación entre las diversas características analizadas y el tipo de movimiento.

ANÁLISIS TRANSCRIPTÓMICO DE LA INTERACCIÓN ENTRE EL ENDOFITO *Pseudomonas fluorescens* PICF7 Y RAÍCES DE OLIVO

Schiliro, E.¹, Ferrara, M.², Nigro, F.², Mercado-Blanco, J.¹

¹*Departamento Protección de Cultivos, Instituto Agricultura Sostenible (CSIC), Campus 'Alameda del Obispo', Avd. Menéndez Pidal s/n, 14004 Córdoba. E-mail: jesus.mercado@ias.csic.es*

²*Dipartimento di Biologia e Chimica Agro-forestale ed Ambientale, Università degli Studi di Bari 'Aldo Moro', Via Amendola 165/A, 70126 Bari, Italia*

El control biológico es una de las medidas a implementar en una estrategia de manejo integrado de la Verticilosis del olivo (*Olea europaea* L.) (VO), enfermedad causada por el hongo *Verticillium dahliae* Kleb. y considerada como una de las amenazas más importantes para el cultivo de esta leñosa. Diversas cepas de *Pseudomonas* spp., colonizadores naturales de raíces de olivo, han demostrado su efectividad como agentes de control biológico (ACBs) frente a la VO. Asimismo, el carácter endofítico de *Pseudomonas fluorescens* PICF7, uno de los mejores ACBs frente a la VO, ha quedado demostrado utilizando condiciones experimentales diversas. El control efectivo de la VO parece requerir tanto de la colonización superficial de raíces intactas por PICF7 como de su establecimiento endofítico. Sin embargo, los mecanismos implicados en el biocontrol de *V. dahliae* por parte de esta bacteria son aún desconocidos. Este trabajo tiene como objetivo elucidar las respuestas genéticas que tienen lugar en raíces de olivo durante la interacción con la cepa PICF7. Se ha generado una genoteca de cDNA, mediante la metodología "Suppression Subtractive Hybridization", enriquecida en genes inducidos en tejidos radiculares de olivo (cv. Arbequina) durante el proceso de colonización por PICF7 (hasta 21 días). Se han identificado unas 450 "Expressed Sequences Tags" inducidas diferencialmente a lo largo de este intervalo temporal. El análisis computacional reveló la presencia de un elevado número de genes implicados en respuestas defensivas a diferentes tipos de estrés (p.e., PAL, acetona cianohidrin liase, lipoxigenasa, β -1,3-glucanasa, endochitininas o peroxidasas formadoras de lignina). Asimismo, diversos factores de transcripción tales como bHLH, GRAS1, ARF2 y WRKYs también se inducen en raíces de olivo tras la inoculación con PICF7. Por último, un 20% de los transcritos detectados corresponden a genes no identificados. La validación mediante PCR cuantitativa en tiempo real confirmó la inducción de una selección de genes que participan en respuestas defensivas en plantas. En resumen, la cepa con modo de vida endofítico *P. fluorescens* PICF7 es capaz de desencadenar una amplia gama de respuestas de defensa en raíces de olivo que ayudan a explicar su capacidad de biocontrol frente a la VO.

Financiado por los proyectos P07-CVI-02624 (Junta de Andalucía) y AGL2009-07275 (MICINN), ambos con fondos FEDER de la UE.

PL14

CONTROL DEL FUEGO BACTERIANO DE LAS ROSÁCEAS MEDIANTE BACTERIAS DEL ÁCIDO LÁCTICO PRODUCTORAS DE BACTERIOCINAS

Roselló, G., Francés, J., Montesinos, L., Montesinos, E., Bonaterra, A.

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

Existe una imperiosa necesidad de disponer de nuevos productos y estrategias para el control del fuego bacteriano en el marco de las directrices europeas de uso sostenible y comercialización de productos fitosanitarios (Directiva 128/2009, Reglamento CE 1107/2009). En la actualidad y a nivel mundial existen diversas cepas microbianas ya sea experimentales o comerciales a partir de las que se han desarrollado productos biológicos para el control del fuego bacteriano, principalmente a base de *Pantoea agglomerans*, *Pseudomonas fluorescens* y *Bacillus subtilis*. Sin embargo, los principales obstáculos en el desarrollo de nuevos bioplaguicidas microbianos están relacionados con la bioseguridad. Por ello nuestro grupo ha centrado en los últimos años su investigación en las bacterias del ácido láctico (BAL) que han sido calificadas como seguras (QPS por la EFSA, UE; GRAS por la EPA, USA). La actividad antibacteriana de las BAL es debida a diversos mecanismos entre los que destacan la producción de ácidos orgánicos, bacteriocinas y otros compuestos de bajo peso molecular.

En el presente trabajo se ha prestado especial atención a BAL productoras de bacteriocinas, un tipo de péptidos antimicrobianos que han sido objeto de numerosos estudios en el ámbito de la tecnología de alimentos. Se ha constituido una extensa colección de 500 aislados de BAL, obtenidos a partir de plantas y productos vegetales, en las que se ha determinado la presencia de genes que codifican para las bacteriocinas plataricina, mesentericina y nisina, así como su actividad antibacteriana *in vitro* frente a *Erwinia amylovora* y otras bacterias fitopatógenas indicadoras. Las cepas más activas han sido evaluadas en cuanto a su eficacia en el control de infecciones por *E. amylovora* *ex vivo* (flores, frutos inmaduros y hojas de peral) y en plantas cultivadas en maceta en condiciones de ambiente controlado o invernadero. Varias cepas de *Lactobacillus plantarum* han mostrado eficacias similares o incluso mejores que cepas de referencia en productos comerciales (*Pantoea vagans* C9-1, *Bacillus subtilis* QST713) o experimentales (*Pseudomonas fluorescens* EPS62e). En dichas cepas ha sido confirmada la producción de varios tipos de plantaricinas mediante purificación y aislamiento (RP-HPLC, SDS-PAGE) e identificación (MALDI-TOF, ESI-MS) que parecen contribuir significativamente en el mecanismo de biocontrol de *E. amylovora*.

RESISTENCIA GENÉTICA EN MELÓN A *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis*: RESULTADOS DE 10 AÑOS DE ESTUDIOS.

Oumouloud, A.^{1,2}, González-Torres, R.², Chikh-Rouhou, H.², Garcés, A.², Álvarez, J.M.²

¹Institut Agronomique et Vétérinaire Hassan II, Agadir BP. 121, Km 2, Route de Taroudant, 80150-Ait Melloul, Marruecos. E-mail: ali.oumouloud@gmail.com

²Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria de Aragón, Avda. Montañana 930, 50059-Zaragoza

La Fusariosis vascular del melón (*Cucumis melo* L.), causada por el hongo *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* (*Fom*), está ampliamente extendida a nivel mundial. Un control efectivo sólo puede ser proporcionado a través de la resistencia genética. Actualmente, hay descritas cuatro razas fisiológicas de *Fom*: 0, 1, 2, y 1,2. La resistencia a las razas 1 y 2 está conferida por los genes dominantes *Fom-2* y *Fom-1* respectivamente; ambos genes también controlan la resistencia a la raza 0, mientras que la resistencia a la raza 1,2 parece tener un control poligénico. En el transcurso de 10 años, se ha llevado a cabo en el Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria de Aragón un programa de investigación sobre el estudio de la resistencia genética a *Fom*. En un cribado realizado sobre materiales de melón presentes en Bancos de Germoplasma, se encontraron fuentes de resistencia las razas 0, 1 y/o 2. También identificó la resistencia a la raza 1,2 en 3 entradas ('KNM', 'C-211' y 'C-40') procedentes de japon y en la entrada portuguesa 'BG-5384'. La caracterización morfológica y molecular de las entradas resistentes indicó que varias entradas resistentes pertenecientes a las var. *canatalupensis* e *inodorus* podrían servir como fuentes de resistencia a las razas 0, 1 y/o 2 en cultivares de estos tipos. Sin embargo, las entradas 'KNM', 'C-211' y 'C-40' son muy distintas de las variedades comerciales. Por otra parte, el estudio de herencia permitió identificar en la entrada española 'Tortuga' un nuevo gen recesivo (*fom-4*) que confiere resistencia junto con *Fom-1* a las razas 0 y 2. Se ha demostrado, también que la resistencia a la raza 1,2 en 'KNM', 'C-211', 'C-40', y 'BG-5384' presenta un control poligénico. Por otro lado, se han desarrollado 4 marcadores ligados a *Fom-1* (SB17₆₄₅, SV01₅₇₄, SV06₁₀₉₂ y 618-CAPS), cuyo uso sería muy útil, en la selección asistida por marcadores, para la introducción del gen *Fom-1* en cultivares comerciales. Por último, el análisis de la secuencia del *Fom-2* permitió detectar un nuevo alelo de este gen en la entrada 'Cum-355'. También se desarrollaron dos marcadores funcionales *Fom2-R*₄₀₈ y *Fom2-S*₃₄₂, ligados a *Fom-2* cuya utilidad fue confirmada en un conjunto de 27 entradas de varios tipos de melón. En la actualidad, nuestro grupo de investigación está llevando a cabo trabajos tendentes a la clonación del gen *Fom-1*, y un análisis de QTLs implicados en la resistencia a la raza 1,2 utilizando una población RILs derivada del cruce 'Piel de Sapo' x 'BG5384'. Además, se están desarrollando marcadores de ADN ligados al gen *fom-4*.

**FACTORES AGRONÓMICOS, AMBIENTALES Y MICROBIOLÓGICOS
ASOCIADOS A LA CALIDAD BIOLÓGICA Y SUPRESIVIDAD DE
SUELOS DE OLIVAR A LA VERTICILOSIS: UNA APROXIMACIÓN
METAGENÓMICA**

Montes-Borrego, M.¹, Metsis, M.², Gramaje, D.¹, Simm, J.², Tamames, J.³,
Navas-Cortés, J.A.¹, Landa, B.B.¹

¹*Instituto de Agricultura Sostenible, CSIC, Apdo. 4084, 14080-Córdoba.*
E-mail: blanca.landa@csic.es; ²*Center for Biology of Integrated Systems,*
Tallinn University of Technology, 12618 Tallinn, Estonia; ³*Centro Nacional*
de Biotecnología-CSIC, Campus de Cantoblanco, 28049, Madrid

El objetivo de este estudio ha sido el determinar el estatus de calidad biológica y nivel de supresividad a la Verticilosis del olivo (VO) de suelos de olivar en el sur de España, analizando el impacto que los diferentes sistemas de manejo pueden ejercer sobre dichas propiedades. Para ello, 93 suelos de olivares comerciales representativos de todas las zonas y tipos de cultivo característicos de Andalucía (ecológico, convencional y acebuche) se han caracterizado por sus características ambientales, propiedades fisico-químicas, diversidad funcional (APIZYM y ECOPLATE), y densidad de población de bacterias cultivables. Adicionalmente, se ha utilizado la técnica de pirosecuenciación para caracterizar las comunidades bacterianas, fúngicas y de micorrizas arbusculares (MA) de esos suelos. Las secuencias de pirosecuenciación obtenidas se agruparon en OTUs y se eliminaron las quimeras, y cada OTU fue alineado con la base de datos de Greengenes (bacterias), Silva (micorriza) y Unite-Taxonomy (hongos) utilizando PyNAST o UCLUST para su identificación. Además, se calcularon diversos índices de diversidad α y β , las curvas de rarefacción y se realizó PCoA entre los suelos.

Los resultados indican que 25% de los suelos presentan una alta supresividad al desarrollo de la VO, y que dicho fenómeno es de naturaleza microbiana y transferible. En el análisis de pirosecuenciación se identificaron un total de 514.274 secuencias, de las cuales 3.054, 527, y 206 (nº medio/suelo) fueron de bacterias, hongos y MA, respectivamente. Los resultados de los análisis de índices de diversidad α y β indicaron que la rizosfera de olivo sustenta una diversidad microbiana muy elevada y en general altamente estable. Así, no se encontraron grandes diferencias en la estructura microbiana (particularmente bacterias) entre los diferentes sistemas de manejo de olivar analizados; sin embargo, las comunidades rizosféricas estuvieron determinadas en cierta medida por la variedad de olivo, así como por la textura y el sistema de manejo del suelo. Se han llevado a cabo diferentes análisis multivariantes (CCA y RDA) que están permitiendo determinar los factores bióticos (diversidad funcional, grupos específicos de microorganismos) y abióticos que están altamente asociados con niveles altos de supresividad de esos suelos a la VO.

Financiado por P. Excelencia P10-AGR-5908, CICE-Junta Andalucía y FEDER (EU).

Sesión simultánea 1
Etiología, diagnóstico y epidemiología I

SIM-1

RECOMBINACIÓN ENTRE LOS BEGOMOVIRUS TYLCV Y TYLCSV EN ITALIA

Panno, S.¹, Davino, S.¹, Accotto, G. P.², Davino, M.³, Rubio, L.⁴

¹Dipartimento DEMETRA, University of Palermo, Viale della Scienze Ed. 5, Palermo –Italia. E-mail: pannostefano@virgilio.it

²Istituto di Virologia vegetale, CNR, Strada delle Cacce 73, Torino, Italia

³Dipartimento DISPA, University of Catania, Via S. Sofia 100, Catania, Italia

⁴Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA), 46113, Moncada, Valencia

El rizado amarillo del tomate es una de las enfermedades más graves que afectan a cultivos de tomate de diversas partes del mundo. Esta enfermedad puede estar causada por diferentes especies virales del género *Begomovirus* que pueden encontrarse formando infecciones mixtas y en ocasiones recombinar. Desde el 2002, en cultivos de tomate de Italia coexisten dos especies virales que causan esta enfermedad, *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV) y *Tomato yellow leaf curl Sardinia virus* (TYLCSV).

En este trabajo se analizó la presencia de recombinantes de estos dos virus en muestras de campo recogidas durante 4 años. Para ello, se recogieron 100 muestras de cultivos de tomate de Sicilia por año que mostraban los síntomas típicos de esta enfermedad. Mediante un método de PCR multiplex se analizó la presencia de estas dos especies virales y de posibles recombinantes. En todas las muestras se encontraron moléculas recombinantes y al menos uno de los parentales.

Para estudiar la generación *de novo* de recombinantes, diez plantas de tomate fueron coinoculadas con clones infectivos de TYLCV y TYLCSV. Se analizaron estas plantas mediante el método de PCR multiplex a los 10, 24, 45 y 60 días. Solamente se detectaron recombinantes en algunas plantas a partir de los 45 días después de la inoculación, mientras que a los 60 días todas las plantas tenían recombinantes.

Para localizar los sitios de recombinación, primero se realizó una PCR con un primer directo específico de TYLCSV y otro reverso específico de TYLCV que abarcaban casi todo el genoma viral. Por cada producto de PCR (por cada muestra) se obtuvieron cinco clones y se determinaron sus secuencias nucleotídicas. El análisis de estas secuencias reveló que algunos sitios del genoma viral eran propensos a recombinar (*hotspots*) y otros presentaban una baja frecuencia de recombinación (*coldspots*). Se encontró una gran correlación entre los sitios de recombinación generados *de novo* y los encontrados en muestras de campo.

SIM-2

ESTUDIO DE LA DIVERSIDAD VIRAL EN CEPAS DE *Botrytis cinerea* AISLADAS DE DIFERENTES HUÉSPEDES

Rodríguez-García, C., Alonso, A., Ayllón, M.A.

Centro de Biotecnología y Genómica de Plantas (UPM-INIA), Universidad Politécnica de Madrid, M-40 Km 38, Pozuelo de Alarcón 28223 Madrid

Botrytis cinerea es un hongo necrotrofo patógeno de plantas de amplia gama de huéspedes que causa enormes pérdidas económicas en todo el mundo en cultivos tan importantes como hortícolas o vid. El uso de micovirus para entender las bases moleculares de la virulencia de los hongos fitopatógenos, así como su posible utilización como agentes de biocontrol en diversos modelos de hongos, entre ellos *B. cinerea*, es objeto del interés de distintos grupos de investigación en el mundo. En España no se había realizado ningún estudio sobre este tema por lo que en este trabajo nos planteamos realizar el análisis de 96 cepas de *B. cinerea* procedentes de siete huéspedes diferentes: judía verde, calabacín, berenjena, pimiento, pepino, tomate (aisladas de invernaderos de Almería) y vid (aisladas de diferentes viñedos de Castilla-León). Se ha analizado el contenido de ácidos nucleicos totales y de RNA de doble cadena (dsRNA) y se han detectado elementos extracromosómicos (EE) (posibles micovirus) en el 57 % de las cepas analizadas. Se ha observado variabilidad en el número de cepas que presentaban EE dependiendo del huésped del que fuera aislado el hongo, y en el número y tamaño de los EE encontrados así como de los perfiles de dsRNA obtenidos en cepas del mismo o de diferentes huéspedes. La naturaleza del ácido nucleico de las bandas observadas se ha determinado mediante digestión con endonucleasas y en la mayoría de los casos se ha determinado que corresponden a dsRNA. Se ha realizado una purificación de partículas tipo virus (VLPs) de todas las cepas de *B. cinerea* que presentaban EE y en algunas de ellas no se detectaron VLPs, de lo que se deduce que los posibles micovirus presentes en dichas cepas no están encapsidados. La extracción de ácidos nucleicos totales de dichas VLPs y su posterior tratamiento con endonucleasas confirmó la presencia de dsRNA como ácido nucleico viral. También se ha procedido a la caracterización molecular de algunos de los micovirus detectados, así como a su eliminación de las cepas infectadas, para hacer un análisis comparativo del grado de esporulación, morfología de la colonia, presencia de estructuras de supervivencia y grado de virulencia. Algunas de las secuencias obtenidas hasta el momento presentan identidad variable con virus del viroma de vid analizado por Al Rwahnih y colaboradores (2011), entre ellos con *Grapevine associated narnavirus*, por lo que en algunos casos los micovirus caracterizados en nuestro estudio corresponderían al mismo virus o a aislados de la misma especie de virus.

Este trabajo ha sido financiado por fondos MICINN AGL2009-11778.

SIM-3

INFECCIÓN POR VIRUS DE dsRNA PERTENECIENTES A LAS FAMILIAS *Endornaviridae* Y *Chrysoviridae* EN AGUACATE

Villanueva, F.¹, Sabanadzovic, S.², Valverde, R.A.³, Navas-Castillo, J.¹

¹*Instituto de Hortofruticultura Subtropical y Mediterránea 'La Mayora' (IHSM-UMA-CSIC), Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Estación Experimental 'La Mayora', 29750 Algarrobo-Costa, Málaga. E-mail: jnavas@eelm.csic.es*

²*Department of Biochemistry, Molecular Biology, Entomology and Plant Pathology, Mississippi State University, Mississippi State, MS 39762, USA*

³*Department of Plant Pathology and Crop Physiology, Louisiana State University AgCenter, Baton Rouge, LA 70803, USA*

Las moléculas de RNA de doble cadena (dsRNA) de alto peso molecular presentes en plantas han sido identificadas clásicamente como formas replicativas de virus de RNA de cadena sencilla. Sin embargo muchas de estas moléculas constituyen el genoma de virus de dsRNA relacionados filogenéticamente con virus que infectan a hongos. Estos virus, aunque pertenecen a grupos taxonómicos diferentes, poseen en común algunas características: sólo se transmiten verticalmente (ni siquiera se transmiten por injerto), se encuentran en todos los órganos y tejidos de la planta y no causan síntomas obvios en sus huéspedes. El genoma de algunos de ellos no se encuentra encapsidado. En este trabajo hemos analizado la presencia de virus de dsRNA en diversas variedades de aguacate (*Persea americana*) y clonado y secuenciado dos virus de la variedad 'Fuerte'.

Uno de ellos, con un genoma de 13,5 kpb, constituye una nueva especie del género *Endornavirus* (familia *Endornaviridae*), para la que hemos propuesto el nombre *Persea americana endornavirus* (PaEV). PaEV siempre se encuentra asociado con una molécula de dsRNA de 700 pb que podría tratarse del primer RNA satélite descrito en la familia *Endornaviridae*.

El otro virus presente en la variedad 'Fuerte' posee un genoma constituido por tres moléculas de dsRNA de 3,5, 3,3 y 2,8 kpb. El análisis de su secuencia puso de manifiesto cierta relación filogenética con virus del género *Chrysovirus*, descritos hasta ahora sólo en hongos. Este virus podría constituir una especie perteneciente a un nuevo género de la familia *Chrysoviridae*.

SIM-4

SINERGISMO Y ANTAGONISMO EN MEZCLAS DE VARIANTES VIRALES DE TSWV. IMPLICACIONES EPIDEMIOLÓGICAS

Aramburu, J.¹, López, C.², Galipienso, L.¹, Soler, S.²

¹*Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentariès (IRTA), 08348 Cabriels, Barcelona*

²*Instituto de Conservación y Mejora de la Agrodiversidad Valenciana- Universitat Politècnica de València COMAV-UPV, 46022 Valencia*

El virus del bronceado del tomate (*Tomato spotted wilt virus*, TSWV) es uno de los virus de hortalizas que ha causado pérdidas económicas más cuantiosas en España y en todo el mundo. Las resistencias naturales introducidas en tomate (*gen Sw-5*) y pimiento (*gen Tsw*) resolvieron temporalmente el problema, hasta la aparición de variantes virales capaces de sobrepasarlas, aunque por causas no determinadas su dispersión parece tener ciertas limitaciones. Inoculaciones mixtas, realizadas sobre tomates y pimientos con resistencia a TSWV, utilizando parejas de aislados que incluyen variantes que sobrepasan la resistencia en tomate (T), pimiento (P) y las que no sobrepasan ninguna de las resistencias (N) nos han permitido concluir que:

1º Las mezclas de tipo T-P filtradas a través de tomate resistente son capaces de infectar pimientos resistentes en múltiples ocasiones, debido a la formación de pseudo-recombinantes que incorporan el segmento M de las variantes T y el segmento S de las variantes P. Sin embargo, estos pseudo-recombinantes no se obtuvieron cuando las mezclas se filtraron en primer lugar a través de pimientos resistentes. Los resultados parecen indicar que existe un efecto de antagonismo de los segmentos M, que conlleva una selección negativa del segmento M de las variantes T en ausencia del gen de resistencia *Sw-5*.

2º Los pimientos resistentes inoculados con mezclas de tipo P-N muestran síntomas de necrosis sistémica y colapso diferentes de los causados por las variantes P, debido a la incapacidad del gen *Tsw* de bloquear efectivamente la multiplicación de la variante N, o al menos del segmento S en el que se encuentran los factores de avirulencia. Estos resultados parecen indicar que se está produciendo un efecto de sinergismo entre ambas variantes.

Las implicaciones epidemiológicas de este tipo de interacciones virales se discutirán en este trabajo.

SIM-5

***Xanthomonas arboricola* pv. *pruni*: CRECIMIENTO Y FORMACIÓN DE AGREGADOS**

Sabuquillo, P., Ferragud, E., Redondo, C., Cubero, J.

Departamento de Protección Vegetal, Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria (INIA), Ctra. De La Coruña km 7,5, 28040 Madrid. E-mail: cubero@inia.es

Xanthomonas arboricola pv *pruni* (*Xap*) causa la mancha bacteriana de los frutales de hueso, enfermedad caracterizada por la aparición de lesiones foliares y chancros en ramas y troncos en las plantas del género *Prunus*. *Xap* es una bacteria fitopatógena considerada de cuarentena según la legislación fitosanitaria de la Unión Europea y la Organización Europea y Mediterránea de Protección de Plantas (EPPO). En España se detectó por primera vez en 2002 en Extremadura y posteriormente ha sido identificada en otras Comunidades Autónomas afectando a distintas especies de frutales de hueso y almendro. El establecimiento de la enfermedad y el patrón epidémico están fuertemente influenciados por las condiciones climáticas, por la susceptibilidad de las especies y/o cultivar de la planta huésped y por las condiciones del cultivo, como la irrigación, fertilización y tiempo y frecuencia de la poda.

El conocimiento de la biología de esta bacteria, y especialmente de los mecanismos que están implicados en su patogenicidad, es fundamental para evitar que una enfermedad que actualmente es considerada emergente en nuestro país, se convierta en una grave epidemia, que pueda ocasionar graves pérdidas en un sector agrícola extremadamente importante para la agricultura española. Con el objeto de establecer algunas características del patrón de comportamiento de *Xap*, se seleccionaron distintas cepas de esta bacteria procedentes de diferentes huéspedes que presentaban diferencias en algunas características fenotípicas, como por ejemplo en el movimiento en placa de cultivo. El objetivo principal del trabajo estaba dirigido a determinar la capacidad de *Xap* para formar biopelículas y establecer una relación entre el crecimiento de la bacteria y su capacidad de agregación. Los resultados obtenidos han mostrado diferencias en la capacidad de agregación entre las distintas cepas de *Xap* estudiadas. Además se ha observado que existen cepas que forman mayor agregación en el estado estacionario, mientras que otras lo hacen en fase de crecimiento o estacionario, dependiendo de factores ambientales desfavorables. En la actualidad se están realizando estudios que van dirigidos a determinar si los agregados observados son verdaderas biopelículas y el papel que éstas pueden jugar en los primeros estadios de infección en la mancha bacteriana de los frutales de hueso y almendro.

SIM-6
CONTRIBUCIÓN DEL GEN *rpoS* A LA SUPERVIVENCIA EN
CONDICIONES DE ESTRÉS, VIRULENCIA Y MOVILIDAD DE *Erwinia*
amylovora

Santander, R.D.¹, Monte-Serrano¹, M., Català-Senent¹, J.F., Rodríguez-Hervá², J.J., López-Solanilla², E., Rodríguez-Palenzuela², P., Biosca^{1*}, E.G.

¹Universidad de Valencia, Departamento de Microbiología y Ecología, Avenida Dr. Moliner 50, 46100, Burjassot, Valencia. E-mail: elena.biosca@uv.es

²Universidad Politécnica de Madrid (UPM), Centro de Biotecnología y Genómica de Plantas (CBGP), Campus de Montegancedo, 28223, Pozuelo de Alarcón, Madrid.

Erwinia amylovora es el agente causal del fuego bacteriano de las rosáceas, una enfermedad de difícil control debido, en parte, a la gran capacidad de supervivencia y diseminación de este patógeno en distintos medios. La persistencia de las bacterias en la naturaleza depende de su habilidad para responder a fluctuaciones en distintos factores ambientales, tales como la disponibilidad de nutrientes, temperatura, pH, actividad de agua, etc. En bacterias gram negativas la respuesta a distintos tipos de estrés está regulada por el producto del gen *rpoS*, un factor sigma alternativo de la ARN polimerasa. Este gen también parece estar implicado en las respuestas de supervivencia en el estado de inanición y en el estado viable no cultivable (VNC), así como en virulencia y movilidad en algunos patógenos bacterianos, pero apenas se conoce su contribución en *E. amylovora*. Con el fin de investigar el papel del gen *rpoS* en las respuestas de supervivencia de este patógeno se obtuvo un mutante en el gen *rpoS* mediante intercambio alélico. Después, se evaluó el efecto de la mutación de dicho gen en la supervivencia de *E. amylovora* en el estado de inanición y en el estado VNC en condiciones que simularan algunos de los estreses ambientales a los que debe enfrentarse este patógeno, tanto fuera como dentro del hospedador, así como su posible contribución en virulencia y movilidad. Como control se incluyeron la cepa silvestre y una cepa complementada con una copia funcional del gen *rpoS*. Los resultados revelaron una menor capacidad de supervivencia del mutante en el estado de inanición, así como una inducción más rápida del estado VNC en comparación con la cepa silvestre y la complementada, bajo los distintos tipos de estrés ensayados, tales como oligotrofia, estrés térmico, osmótico, ácido y oxidativo. Además, se observó una atenuación de su virulencia en frutos inmaduros y una menor movilidad con respecto a la cepa silvestre y la complementada. En conjunto, los resultados indican que el gen *rpoS* en *E. amylovora* es importante para su adaptación a distintas condiciones de estrés ambiental y también parece contribuir a su virulencia y movilidad.

Este trabajo ha sido financiado por los proyectos AGL2008-05723, UV-INV-AE 112-66196, y AGL2009-12757.

SIM-7

DESARREGLOS VEGETATIVOS EN APIO ASOCIADOS CON LA BACTERIA "*Candidatus Liberibacter solanacearum*"

Teresani, G.R.¹, Bertolini, E.¹, Alfaro-Fernández, A.², Martínez, M.C.¹, Villaescusa, F.J.², Ferrandiz, J.A.³, Bartolomé, P.³, Sanjuán, S.³, Roselló, M.⁴, Dalmau, V.⁴, Hermoso, A.¹, Tanaka, F.⁵, Kitajima, E.W.⁵, López, M.M.¹, Cambra, M.¹, Font, M.I.²

¹*Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA), Ctra. Moncada a Náquera km 5, 46113 Moncada, Valencia. E-mail: teresani@ivia.es*

²*Grupo de Virología Vegetal. Instituto Agroforestal Mediterráneo. Universidad Politécnica de Valencia. Cno. Vera s/n, 46022 Valencia.*

³*Agrícola Villena Coop. V. Ctra. Del Puerto s/n 03400 Villena, Alicante.*

⁴*Laboratorio del Servicio de Análisis Agroalimentario, Ctra. Alicante-Valencia, km 276.5, 46460, Silla, Valencia.*

⁵*Dpto. de Fitopatología e Nematología ESALQ/USP. Piracicaba-S.P. Brasil.*

El apio (*Apium graveolens* L.) se ve afectado por distintas plagas y enfermedades conocidas. En 2008 se observaron en Villena (Alicante) nuevos desarreglos vegetativos caracterizados por brotaciones excesivas y retorcimiento de pencas que causaron pérdidas de hasta 70% de la producción. Los primeros análisis revelaron la presencia de fitoplasmas y virus y posteriormente también fue detectada la bacteria "*Candidatus Liberibacter solanacearum*" (CaLSol). Esta bacteria ha sido asociada a distintas enfermedades en patata, tomate, pimiento y zanahoria entre otros, pero no en apio. Es Gram negativa, no cultivable, restringida al floema y diseminada, de forma persistente, por psílicos vectores. Para la detección sensible y específica de la bacteria en apio se han diseñado iniciadores y una sonda TaqMan para PCR a tiempo real y métodos directos de preparación de muestras. Se ha podido asociar mediante análisis estadístico, la presencia de desarreglos vegetativos en apio, con la detección de CaLSol por PCR a tiempo real. Además, en plantas de apio positivas por dicha técnica, se han detectado células típicas del género "*Ca. Liberibacter*" mediante microscopía electrónica. La bacteria también ha sido detectada en psílicos capturados en apio. Secuencias de CaLSol, obtenidas mediante PCR convencional, han mostrado alto porcentaje de identidad con las secuencias de CaLSol descritas en otros huéspedes. El cultivo bajo malla evitó la aparición de síntomas, pero distintos tratamientos químicos no fueron efectivos en el control de vectores. Se están realizando ensayos de transmisión para demostrar los postulados de Koch y confirmar la etiología de la nueva enfermedad.

Actividades financiadas por la Consellería de Agricultura-GVA y proyectos IVIA (5301) e INIA (RTA2011000142-C03-00).

Sesión simultánea 2

Control I

SIM-8

INFLUENCIA DE FACTORES AMBIENTALES SOBRE LA SUPERVIVENCIA Y CRECIMIENTO DEL AGENTE DE BIOCONTROL *Penicillium oxalicum* EN SUELO

Larena, I.¹, Vázquez, G¹., Herranz, Y.¹, De Cal, A.¹, Melgarejo, P.¹, Magan, N.²

¹INIA, Departamento de Protección Vegetal, Carretera de La Coruña 7,500, 28040 Madrid. E-mail: ilarena@inia.es

²Applied Mycology Group, Cranfield Health, Cranfield University, Bedford MK43 0A.

Las condiciones ambientales afectan a la supervivencia de los agentes de control biológico (ACB) y también a su eficacia frente a las enfermedades vegetales. Aquellos ACBs que sean más flexibles en términos de adaptación ambiental podrán ser desarrollados con éxito como productos comerciales, ya que sus aplicaciones y mercados de destino pueden ser más amplios que aquellos que requieren condiciones ambientales específicas. Por tanto, los parámetros ambientales y condiciones ambientales óptimas de un ACB deberán ser tenidos en cuenta a la hora de su selección y aplicación.

Se planteó el objetivo de evaluar la influencia de la combinación de varios factores ambientales sobre la supervivencia de *Penicillium oxalicum* cepa 212 (PO212) en suelo, ACB que ha demostrado ser eficaz frente a varios organismos fitopatógenos de suelo. Se evaluaron dos parámetros: (i) número de unidades formadoras de colonias (UFCs) de PO212 por g suelo seco sobre agar patata dextrosa (APD) modificado, y (ii) ng biomasa seca de PO212 por g suelo seco mediante PCR en tiempo real. El efecto combinado de la temperatura (15 y 25°C), disponibilidad de agua (alta, media y baja), y suelo (tres tipos con diferente textura, pH y composición orgánica) sobre la supervivencia y crecimiento de dos formulaciones de PO212 fue evaluado en ensayos estáticos de microcosmos de suelo.

El efecto de la temperatura, actividad de agua y tipo de formulación varió según el tipo de suelo (franco arenoso, arenoso franco o franco). PO212 creció en todos los suelos, temperaturas y actividades hídricas estudiadas aunque su crecimiento fue mayor en suelos en condiciones de sequía que en suelos encharcados o en condiciones de humedad media. La adición de aditivos en la formulación del ACB no mejoró ni su supervivencia ni su crecimiento.

En conclusión una mayor comprensión de las características ecofisiológicas de las formulaciones de PO212 contribuirá al desarrollo de una estrategia de control biológico de organismos fitopatógenos de suelo más racional y eficiente.

Esta investigación ha sido financiada por los proyectos RTA2007-00067 y RTA2010-00093 (Plan Nacional de I+D, Ministerio de Ciencia e Innovación).

SIM-9

EFICACIA DE DISTINTOS TIPOS DE BIOSOLARIZACIÓN EN EL CONTROL DE *Macrophomina phaseolina* EN EL CULTIVO DE LA FRESA EN HUELVA

Chamorro, M.¹, Zubac, M.¹, Domínguez, P.¹, Medina-Mínguez, J.J.¹, Miranda, L.¹, Soria, C.², López-Aranda, J.M.², Romero, F.¹, de los Santos, B.¹

¹Centro IFAPA Las Torres-Tomejil, Ctra Sevilla-Cazalla km 12,2 Alcalá del Río (Sevilla) C.P.: 41200. manuel.chamorro.rodriguez.ext@juntadeandalucia.es

²Centro IFAPA Churriana, CAPMA –JA, Málaga

La podredumbre carbonosa, agente causal *Macrophomina phaseolina*, se detectó por primera vez en la provincia de Huelva, principal productor de fresas en España, en mayo de 2006. Este patógeno ocasiona un colapso súbito en plantas de fresa y se mantiene en el suelo formando esclerocios, lo que dificulta su control. Desde 2009 a 2012, se ha evaluado la eficacia de distintos tratamientos de biosolarización en el control de las poblaciones de este patógeno en suelo y su influencia en el desarrollo de la enfermedad. Los ensayos se han llevado a cabo en una parcela, que nunca había sido desinfestada con fumigantes químicos, ubicada en la Finca Experimental El Cebollar (Moguer, Huelva). Se aplicaron siete tratamientos de biosolarización en un diseño de bloques al azar con cuatro repeticiones, y un control no desinfestado. Cada año, se tomaron muestras de suelo antes y después de la aplicación de los tratamientos (coincidiendo con la plantación) y se recogieron las plantas muertas, realizándose aislamientos de tejido. En el primer año, la mortalidad alcanzó, a finales de mayo, un 14% en parcelas no tratadas, mientras que en las tratadas con biosolarización con gallinaza fresca (dosis de 25.000 kg/ha o 12.500 kg/ha) o con vinaza de remolacha (15.000 kg/ha) la mortalidad fue inferior al 2%, no observándose diferencias significativas entre el control y los tratamientos en la población de suelo. En el segundo año, se incrementó la población de *M. phaseolina*, en suelos de parcelas control, y la mayoría de los tratamientos redujeron la población de forma significativa. La muerte de plantas alcanzó el 43% en parcelas no tratadas, siendo los tratamientos de biosolarización antes citados eficaces en el control de la enfermedad. En el último año, todos los tratamientos redujeron tanto la población de suelo como la muerte de plantas de forma significativa respecto al control.

SIM-10

IDENTIFICACIÓN DE DETERMINANTES DE *Pseudomonas fluorescens* PICF7 IMPLICADOS EN EL CONTROL DE LA VERTICILOSIS DEL OLIVO

Maldonado-González, M.M., Schiliro, E., Mercado-Blanco, J.

Departamento de Protección de Cultivos, Instituto de Agricultura Sostenible, CSIC, Avd. Menéndez Pidal s/n, Apdo. 4084, 14080 Córdoba; E-Mail: mercedesm@ias.csic.es.

Verticillium dahliae Kleb., agente causal de la verticilosis del olivo (VO), es un patógeno de difícil control. Sólo mediante la implementación de una estrategia de manejo integrado puede confrontarse la creciente amenaza que supone esta enfermedad. El tratamiento de la planta con agentes de control biológico (ACB), sobre todo durante el proceso de propagación viverística, es una medida con potencial dentro de dicha estrategia. *Pseudomonas fluorescens* PICF7 es un ACB efectivo de la VO. Asimismo, antagoniza de forma eficaz a *V. dahliae* *in vitro*, produce ácido salicílico, ácido cianhídrico y el sideróforo pioverdina, desarrolla motilidad tipo “swimming” y es capaz de establecerse de forma endofítica en raíces de olivo. Sin embargo, aún se desconocen los determinantes bacterianos de PICF7 implicados en el biocontrol de la VO. Elucidar dichos caracteres constituye el principal objetivo de este estudio. Se generó un banco de mutantes (>9.000 inserciones) por transposición al azar de Tn5. El escrutinio de esta ‘mutateca’ se centró, principalmente, en la identificación, utilizando los protocolos adecuados, de fenotipos alterados en motilidad tipo “swimming”, producción de sideróforo(s) y antagonismo frente a *V. dahliae*. Se obtuvo así una selección preliminar de 56 mutantes de los que finalmente 18 se sometieron a análisis mediante PCR arbitraria anidada para localizar el lugar exacto del genoma de PICF7 en que se habían producido las inserciones. Las secuencias adyacentes a éstas se compararon en las bases de datos “GenBank” y “*Pseudomonas* Genome Database”. Se eligieron cuatro mutantes cuyas inserciones se localizaron en secuencias que presentaban elevada identidad con genes de *P. fluorescens* SBW25, entre otras bacterias: 1) mutante ME424, con inserción en el homólogo al gen *flil* que codifica para “flagellum-specific ATP synthase”; 2) ME589, afectado en el gen *pvdI* (“peptide synthase pyoverdine synthetase”); 3) ME419 con inserción en el gen *gltA* (“type II citrate synthase”); y 4) ME1508, con el gen que codifica para una “putative sulfite reductase” interrumpido. Estos mutantes están siendo evaluados respecto a su capacidad de biocontrol del patotipo defoliante de *V. dahliae* en ensayos con plantones del cv. Picual. Los resultados hasta ahora obtenidos muestran que el mutante ME1508, disminuido en la capacidad de antagonizar *V. dahliae* *in vitro*, pierde de forma significativa la capacidad de controlar la VO.

Financiado por los proyectos AGL2009-07275 (MICINN) y P07-CVI-02624 (Junta de Andalucía), cofinanciados por FEDER de la UE.

SIM-11

RESISTENCIA A HONGOS Y BACTERIAS FITOPATÓGENAS EN ARROZ MEDIANTE LA EXPRESIÓN DE PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS SINTÉTICOS EN EL EMBRIÓN Y ENDOSPERMO DE SEMILLAS

Montesinos, L.¹, Bundó, M.², Izquierdo, E.³, Badosa, E.¹, Campo, S.², San Segundo, B.², Feliu, L.¹, Planas, M.¹, Bardají, E.¹, Rossignol, M.³, Coca, M.², Montesinos, E.¹

¹*Institut de Tecnologia Agroalimentària-CIDSAV-XaRTA y LIPPSO, Universitat de Girona;* ²*Departamento de Genética Molecular, Centre de Recerca en Agrigenòmica (CRAG);* ³*INRA UR1199 - Laboratoire de Protéomique Fonctionnelle, Montpellier*

Los péptidos antimicrobianos sintéticos ofrecen actualmente un gran potencial para el control de enfermedades de las plantas. Con el fin de explorar su posible aplicación tanto en la mejora de la resistencia de las plantas como en su producción usando plantas como biofactoría, se ha generado una quimioteca de péptidos antimicrobianos sintéticos para ser expresados en plantas. Dicha quimioteca se basa en derivados del undecapéptido BP100 que presentan actividad contra bacterias fitopatógenas y controlan infecciones en plantas causadas por *E. amylovora* en peral y manzano, *P. syringae* en peral y *X. vesicatoria* en pimiento. Los péptidos se diseñaron incluyendo secuencias que permiten una mejora de la relación estructura-función, así como su retención en el retículo endoplasmático o su posterior procesamiento enzimático. Los péptidos que mostraron un mejor perfil de actividad, menor toxicidad y mayor estabilidad a proteasas, se seleccionaron como candidatos para diseñar los correspondientes genes para su expresión en plantas. En este trabajo se investigó la expresión en semillas de arroz, concretamente en endospermo (cuerpos proteicos) y embrión (cuerpos oleicos) utilizando promotores específicos de dichos tejidos (Glutelina B-4, Glutelina B-1 o Globulina, Oleosina 18 KDa). Las construcciones genéticas incluyeron las secuencias de los promotores, péptido señal, del gen codificante del péptido antimicrobiano y del terminador, que se clonaron en el vector de expresión en planta pCambia1300. La transformación se realizó sobre callos embriogénicos mediante *A. tumefaciens*, posterior regeneración de los transformantes hemizigotos y obtención de las líneas T3 homocigóticas para su evaluación. Como péptidos antimicrobianos modelo se han utilizado la Cecropina A y BP178, que es un derivado de BP100. Las semillas transgénicas obtenidas muestran un incremento muy significativo de la resistencia a infecciones por *Fusarium verticillioides* y *Dickeya chrysanthemi*. La purificación de los cuerpos proteicos (endospermo) y oleicos (embrión) de la semilla de arroz ha permitido detectar los productos de expresión mediante análisis Western-blot, confirmando así la producción de los péptidos en el compartimiento celular diana. Estos resultados han sido confirmados mediante espectrometría de masas ESI-MS. Los niveles de acumulación de los PAM en semillas están dentro del rango de 20-50 µg/g p.s., lo que indica que dichas plantas pueden utilizarse como biofactoría para su producción.

Este trabajo ha sido financiado en parte por el proyecto EUI 2008-035725

SIM-12

Candida sake CPA-1, UNA ALTERNATIVA EFICAZ PARA EL CONTROL DE LA PODREDUMBRE GRIS EN UVA DE VINIFICACIÓN

Calvo, C.¹, Viñas, I.¹, Usall, J.², Elmer, P.³, Bartra, E.⁴, Teixidó, N.²

¹Universitat de Lleida. Postcollita-XaRTA, Av. Rovira Roure, 191, 25198-Lleida. carlos.calvo@irta.cat, neus.teixido@irta.cat

²IRTA. Postcollita-XaRTA, Av. Rovira Roure, 191, 25198-Lleida.

³The New Zealand Institute for Plant & Food Research Limited, Ruakura Res. Centre, Private Bag 3230, Waikato Mail Centre, Hamilton, 3240, New Zealand

⁴INCAVI, Pl. Àgora 2-3 08720-Vilafranca del Penedés, Barcelona

La podredumbre gris, producida por *Botrytis cinerea* es una enfermedad de la viña capaz de producir importantes pérdidas en uva de vinificación. *Candida sake* CPA-1 es una levadura que ha demostrado potencial en el control de la podredumbre por *Botrytis* mediante su aplicación en campo.

Durante tres campañas vitícolas consecutivas (2009, 2010 y 2011), se llevaron a cabo ensayos de campo aplicando *C. sake* CPA-1 junto con el aditivo Fungicover®. En 2009 la efectividad de los tratamientos fue comparada con otros productos registrados alternativos a los fungicidas químicos. En 2010 el objetivo fue el estudio del efecto de *C. sake* y Fungicover, así como la reducción del número de aplicaciones y de la dosis del aditivo. En ambas campañas se realizaron seguimientos de las poblaciones del agente de biocontrol, así como microvinificaciones con uva tratada para evaluar posibles efectos adversos de los tratamientos sobre el producto final. Los tratamientos consistentes en aplicaciones durante toda la campaña en 2009 y 2010, lograron reducciones superiores al 64% de la incidencia y al 89% de la severidad en el momento de cosecha, comparado con el control no tratado. Así mismo, las pruebas de vinificación no mostraron alteraciones en la calidad de los vinos elaborados y las poblaciones de *C. sake* sobre flores y bayas se mantuvieron en los niveles esperados.

Estos resultados incentivaron la aplicación a mayor escala, que se llevó a cabo en 2011 en tres viñedos comerciales de las D.O. Penedés y Costers del Segre con pulverizadores comerciales. En estas condiciones, realizando entre dos y tres aplicaciones con dosis alta de *C. sake* (2.5×10^7 ufc/ml), los tratamientos redujeron entre el 43% y el 64 % de la incidencia y entre el 68% y el 85% de la severidad comparado con el control no tratado.

Este estudio demuestra la efectividad de los tratamientos de *C. sake* y Fungicover a lo largo de tres campañas incluyendo aplicaciones a mayor escala. Las reducciones de incidencia y severidad registradas con diferentes características climáticas, en viñedos ecológicos y convencionales, confirman el potencial de este agente de control biológico como una alternativa fiable para el control de la podredumbre por *Botrytis*.

Este trabajo ha sido financiado por el proyecto Europeo REDBIO y el Proyecto Ecológico de la Universitat de Lleida (Beca Pre-doctoral C. Calvo y proyecto de investigación).

SIM-13

CONTROL DE LAS AGALLAS RADICULARES DEL CLAVEL MEDIANTE ENMIENDAS ORGÁNICAS AL SUELO, SEGUIDAS DE SOLARIZACIÓN

Melero-Vara, J.M.¹, Vela, M.D.², Basallote- Ureba, M.J.³, López-Herrera, C.J.¹, Pelegrín, F.⁴, Talavera, M.⁴

¹IAS, CSIC. Apdo. 4084, 14080, Córdoba E-mail: jmmelero@ias.csic.es

²IFAPA Centro Chipiona. Camino de Esparragosa s/n. 11550 Chipiona.

³IFAPA Centro Las Torres-Tomejil, Apdo. Oficial, 41200 Alcalá del Río

⁴IFAPA Centro Camino del Purchil, Apdo. 2027, 18004 Granada

Resultados previos en un invernadero infestado con *Meloidogyne incognita* (Mi) mostraron, durante 2005-10, un control similar de Mi y de las agallas radicales en clavel (ARC) cuando se aplicó al suelo, en pre-plantación, gallinaza (G) o pellet de gallinaza (PG) seguido de solarización (12-22 días), que cuando se desinfestó con 1,3 dicloropropeno + cloropicrina (1,3D+Pic). También los rendimientos de cultivo durante 9 meses fueron similares. En 2010-12 se evaluaron en el mismo invernadero estas enmiendas orgánicas (EO) junto a las aplicaciones al suelo de pellet de Brassica (PB) y compost de orujo de vid (COV), cubriendo a continuación el suelo húmedo con PE transparente durante un mes, antes de plantar clavel 'Kiss' y 'Pícaro', susceptible y muy susceptible al nematodo. En el testigo no tratado hubo un retraso de 1 mes en alcanzar el 100% de plantas muertas de 'Kiss' respecto a 'Pícaro'. El progreso epidémico fue muy lento en las parcelas de 'Kiss' tratadas con G y PG, mientras que en 'Pícaro', con mayor tasa de progreso, ésta disminuía en 1,3D+Pic y fue moderada en PG, demorándose 50-70 días su inicio en los tratamientos 1,3D+Pic y PB, respecto a otras EO. Aunque el comienzo de la epidemia en 1,3D+Pic se retrasó también en 'Kiss', su progreso se asemejó al de PB. Los índices de agallas y promedios de las ABCPES de ambos cvs. fueron menores para 1,3D+Pic y para todas las EO, menos COV, que obtuvo valores intermedios entre los anteriores y el testigo. Se sugiere repetir las aplicaciones de las EO al iniciarse cada nuevo cultivo susceptible. El incremento en las densidades de nematodos en suelo se correlacionó con el progreso epidémico hasta que se alcanzó el 100% de plantas muertas, momento a partir del cual empezaron a disminuir. Para ambos cvs, los rendimientos de cultivo acumulados desde enero 2011 a abril 2012 fueron superiores con PG e intermedios con G, 1,3D+Pic, y PB. La calidad de los tallos fue superior para 'Kiss' que para 'Pícaro', al aumentar en aquél las proporciones de calidad extra.

Financiado por el Proyecto AT06-006-C7-3, incentivos al grupo PAIDI AGR-217, el Convenio INIA-Junta de Andalucía CC09-074 y fondos FEDER (UE).

SIM14

EFFECTO DE LA RESISTENCIA VEGETAL Y EL AGENTE DE BIOCONTROL *Paecilomyces lilacinus* CEPA 251 SOBRE LA EPIDEMIOLOGÍA DE *Meloidogyne incognita* EN LA ROTACIÓN TOMATE-PEPINO EN INVERNADERO

Giné, A., Ornat, C., Sorribas, F.J.

Departament d'Enginyeria Agroalimentària i Biotecnologia. UPC. Esteve Terradas 8, Edifici D4. 08860 Castelldefels, Barcelona. francesc.xavier.sorribas@upc.edu

La resistencia vegetal en tomate se ha mostrado efectiva para el control de las tres principales especies de *Meloidogyne* presentes en España. Sin embargo es preciso combinarla con otros métodos de control para preservar su durabilidad. El control biológico es un buen candidato ya que actúa sobre la viabilidad del inóculo y disminuye la tasa de crecimiento de la población. Además, ambos métodos de control contribuyen a disminuir el uso de plaguicidas químicos. Se está realizando un estudio iniciado en 2011 para determinar el efecto del gen *Mi* y *P. lilacinus* cepa 251, único microorganismo incluido en la directiva europea como nematocida, sobre el desarrollo de las poblaciones del nematodo en la rotación tomate- pepino en invernadero. Los cultivares utilizados son el tomate resistente Monika (TR), y el susceptible Durinta (TS); y el pepino Dasher II. Los tratamientos ensayados son: i) TR con *P. lilacinus* (PI) - pepino con PI; TR con PI - pepino sin PI; (iii) TR sin PI - pepino con PI; (iv) TR sin PI - pepino sin PI; (v) TS con PI - de pepino con PI; (vi) TS con PI seguido de pepino sin PI; (vii) TS sin PI seguido de pepino con PI; (viii) TS sin PI seguido de pepino sin PI. El diseño experimental es de bloques estratificados al azar, y cada tratamiento se repite cinco veces. La dosis y momentos de aplicación de *P. lilacinus* se realiza según las indicaciones de la casa comercial. El suelo del invernadero se muestrea en pretrasplante y al final de cada cultivo para determinar las densidades de población del nematodo en suelo y en raíz. La temperatura y agua disponible del suelo se monitoriza a 15 cm de profundidad. Al final del cultivo se determina el porcentaje de parasitismo de huevos contenidos en 30 masas. El ensayo de 2012 está en ejecución. Además, se ha determinado el efecto de la temperatura y del agua disponible sobre el desarrollo del hongo, así como el efecto de fungicidas comerciales para el control de enfermedades del suelo. Los resultados de la campaña 2011 han mostrado que el factor limitante para el desarrollo del nematodo es el cultivar de tomate. El parasitismo de huevos en ambos cultivos osciló en torno al 3%. Las temperaturas cardinales de crecimiento del micelio fueron 13,2, 22-24, y 33,8 °C. La temperatura media del suelo a 15 cm de profundidad osciló entre 17 y 35 °C, siendo 48 el número de días con temperaturas medias superiores a la óptima de crecimiento. No todos los fungicidas ensayados inhibían el crecimiento del micelio de *P. lilacinus*.

Agradecimientos a INIA por financiar el proyecto RTA2010-00017-C02-02, y a Belchim Crop Protection por facilitar el formulado de *P. lilacinus*

Sesión simultánea 3
Interacciones planta-bacteria

SIM-15

SAGRA: UNA NUEVA HERRAMIENTA PARA EL ANALISIS DE GENOMAS DE BACTERIAS ASOCIADAS A PLANTAS

Río-Alvarez, I.¹, Rodríguez-Herva, J.J.¹, Palacios, J.¹, López-Solanilla, E.¹, de Vicente, A.², Cazorla, F.M.², Arrebola, E.², García-Gutiérrez, L.², Carrión, V.², Magno, C.², Zerrouh, H.², Gutiérrez-Barranquero, J.A.², Pérez-García, A.², Ramos, C.², Matas, I.², Castañeda, P.², Crespo, J.I.², Murillo, J.³, Bardají, L.³, Rodríguez-Palenzuela, P.¹

¹*Centro de Biotecnología y Genómica de Plantas U.P.M. – I.N.I.A. Parque Científico y Tecnológico de la U.P.M. Campus de Montegancedo, 28223 Pozuelo de Alarcón (Madrid)*

²*Instituto de Hortofruticultura Subtropical y Mediterránea “La Mayora” (IHSM-UMA-CSIC), Campus de Teatinos, 29071 Málaga*

³*Departamento de Producción Agraria. Universidad Pública de Navarra. Edificio Departamental Los Olivos Campus Arrosadía 31006 Pamplona*

Las nuevas tecnologías de secuenciación han supuesto una disminución muy significativa de los costes de secuenciación de genomas completos, lo que hace esta técnica muy asequible para los genomas bacterianos. Pese a la gran cantidad de información que puede proporcionar esta técnica, el análisis bioinformático de genomas sigue presentando considerables dificultades.

SAGRA (Suite de Anotación de Genomas Relevantes en Agricultura) es un conjunto herramientas bioinformáticas específicamente diseñadas para la anotación de genomas de especies bacterianas asociadas a plantas, en particular bacterias fitopatógenas y cepas empleadas en control biológico.

Las principales funcionalidades de esta suite son:

1) Permite la importación de datos desde otras bases de datos (p.e. NCBI) o a partir de datos de secuenciación completa o parcial (drafts), y su traducción a un formato interno, basado en hashes.

2) Identifica genes posiblemente implicados en factores de virulencia/control biológico, tales como efectores, toxinas, antibióticos, enzimas extracelulares, hormonas vegetales, adhesinas, sideróforos, etc...empleando una estrategia mixta basada en diversas herramientas (BLAST, HMMER, Gene Ontology, búsquedas semánticas).

3) Identifica y analiza conjuntos de genes que pueden estar implicados en virulencia/control biológico además de mediar otros fenómenos importantes para la bacteria, tales como receptores quimiotácticos, bombas de eflujo, sistemas de secreción, reguladores transcripcionales y genes implicados en la producción de biofilms.

El programa está escrito en Perl y utiliza SQL con el módulo DBI. Así mismo, incorpora programas escritos en lenguaje R.

SIM-16

PAPEL BIOLÓGICO DE UN OPERÓN DE SÍNTESIS DE CELULOSA LOCALIZADO EN EL GENOMA DE *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* UMAF0158

Arrebola, E.¹, Cazorla, F.M.², Carrión, V.J.², Gutiérrez-Barranquero, J.A.², Rodríguez-Palenzuela, P.³, de Vicente, A.²

¹Instituto de Hortofruticultura Subtropical y Mediterránea "La Mayora" (IHSM-UMA-CSIC). Estación Experimental La Mayora, Algarrobo-Costa, 29750-Málaga.

²Instituto de Hortofruticultura Subtropical y Mediterránea "La Mayora" (IHSM-UMA-CSIC). Departamento de Microbiología, Facultad de Ciencias, Universidad de Málaga. Campus de Teatinos s/n, 29071-Málaga.

³Universidad Politécnica de Madrid, Centro de Biotecnología y Genómica de Plantas. ETS Ingenieros Agrónomos, E-28223-Madrid.

Pseudomonas syringae pv *syringae* está descrito como el agente causal de la necrosis apical del mango, enfermedad que afecta al cultivo de éste frutal en el sur de España. Desde su caracterización se viene realizando un estudio exhaustivo de su etiología y patología, tomando como modelo, para algunos de estos estudios, la cepa UMAF0158 (CECT7752). Actualmente se dispone de un borrador de la secuencia completa de su genoma lo que supone un avance en el estudio de este patógeno. La anotación automática de su dotación genética ha revelado, entre otras cuestiones, la presencia de un cluster de genes que presentan una homología muy alta con el operón de síntesis de celulosa de otras bacterias, tales como operón *wss* de *Pseudomonas fluorescens* SBW25 o *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000. Esto nos ha llevado a plantear un estudio focalizado en la funcionalidad de estos genes y en determinar el posible papel de estos en la interacción patógeno-planta, así como en la formación de biopelículas. La importancia de las biopelículas para cepas de antagonistas utilizadas en biocontrol y de bacterias patógenas es conocida en animales y humanos. Sin embargo, el papel de las biopelículas en patógenos vegetales y su influencia en el proceso infeccioso está menos estudiado. A partir de la cepa de *P. syringae* pv. *syringae* UMAF0158, se ha construido mutantes defectivos en este hipotético operón, así como transformantes super-productores de celulosa mediante la introducción de un plásmido que lleva clonado un regulador de la producción de celulosa de *P. fluorescens* SBW25. La comparación fenotípica del parental con los mutantes defectivos y el super-productor durante la síntesis de celulosa, establecida mediante la medida de intensidad de fluorescencia de colonias teñidas con calcoflúor, el análisis de formación de biopelículas y movimiento bacteriano han revelado importantes diferencias. Estos fenotipos han mostrado estar directamente influenciados por la funcionalidad de este hipotético operón de síntesis de celulosa. Además se están realizando experimentos en planta para determinar el papel de la celulosa en el proceso infeccioso.

Este trabajo ha sido financiado por fondos CICE-Junta de Andalucía, Incentivos a Proyecto de Excelencia (P07-AGR-02471), cofinanciado con fondos FEDER (EU). Este trabajo ha sido realizado durante el programa JAEDoc09 (Junta para la Ampliación de Estudios) cofinanciado por FSE.

SIM-17

DgcP, UNA DIGUANILATO CICLASA ESPECÍFICA DE *Pseudomonas* IMPLICADA EN LA VIRULENCIA DE *Pseudomonas savastanoi*

Aragón, I.M.¹, Pérez-Mendoza, D.², Gallegos, M.T.² y Ramos, C.¹

¹Instituto de Hortifruticultura Subtropical y Mediterránea "La Mayora" (IHSM-UMA-CSIC), Área de Genética, Universidad de Málaga, Campus de Teatinos s/n, 29071-Málaga. E-mail: crr@uma.es

²Departamento de Microbiología del Suelo y Sistemas Simbióticos, Estación Experimental del Zaidín, CSIC, c/ Profesor Albareda 1, 18008 Granada.

El diguanilato cíclico (c-di-GMP) es un segundo mensajero implicado en el control de numerosas funciones bacterianas, tales como la biosíntesis y secreción de adhesinas y exopolisacáridos (EPS), la motilidad, la respuesta a condiciones de estrés, la progresión del ciclo celular y la expresión de factores de virulencia en bacterias patógenas de animales y plantas. El c-di-GMP se sintetiza a partir de dos moléculas de GTP por la acción de diguanilato ciclasas (DGC), y se hidroliza en 5'-fosfoguanilil-(3'-5')-guanosina (pGpG) por fosfodiesterasas específicas. La actividad DGC es dependiente de un dominio proteico GGDEF, que puede encontrarse asociado a un dominio de regulación alostérica negativa, RXXD. La aplicación de la estrategia *Signature Tagged Mutagenesis* a la cepa de *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* (Psv) NCPPB 3335 durante la infección de olivo, permitió identificar una hipotética DGC, específica del género *Pseudomonas* y aquí denominada DgcP, requerida para la multiplicación y supervivencia de esta cepa *in planta*. Para estudiar el papel de esta proteína en la virulencia de Psv NCPPB 3335 se llevó a cabo la construcción de un mutante $\Delta dgcP$ mediante intercambio alélico. Dicho mutante, mostró un aumento en la motilidad tipo *swimming*, una disminución en la formación de EPS, y una reducción de la formación de *biofilm* con respecto a la cepa silvestre. Ensayos de virulencia en plantas de olivo *in vitro* y en plantas leñosas, mostraron que los tumores inducidos por el mutante son significativamente menores que los formados por la cepa silvestre. Además, la expresión ectópica del gen *dgcP* en dicho mutante tuvo como consecuencia la restauración de todos los fenotipos alterados, incluida la virulencia en olivo. La purificación de la proteína DgcP fusionada a una etiqueta de His (His-Tag) permitió cuantificar la producción de c-di-GMP en función de la concentración de proteína, demostrándose por vez primera la actividad DGC de esta proteína específica de *Pseudomonas*. Para determinar el efecto de los dominios RXXD y GGDEF sobre la actividad DGC de DgcP, se han construido mutantes puntuales en ambos dominios proteicos y actualmente se están llevando a cabo con ellos ensayos fenotípicos y de virulencia en olivo.

Financiación: AGL2011-30343-C02-01 y BIO2011-23032 (MINECO), P10-CVI-5800 (Junta de Andalucía), todos ellos cofinanciados por FEDER.

SIM-18

CARACTERIZACIÓN DE BIOPELÍCULAS EN *Xanthomonas citri* subsp. *citri*

Sena, M.¹, Gell, I.¹, Garita-Cambronero, J.¹, Ferragud, E.¹, Redondo, C.¹, Girón, J.², Cubero, J.¹

¹Departamento de Protección Vegetal, INIA. Ctra. de la Coruña km. 7,5 28040. Madrid.

²Molecular genetics and microbiology Department, Emerging Pathogen Institute. The University of Florida. 2055 Mowry Road, Gainesville, FL 32610, USA. E-mail: cubero@inia.es

Xanthomonas citri subsp. *citri* (Xcc) es una de las especies del género *Xanthomonas* que causa la canchrosis de los cítricos, enfermedad caracterizada por la aparición de lesiones necróticas en hojas, ramas y frutos que puede derivar en la caída prematura de estos últimos y ocasionar una acusada defoliación en el árbol. Xcc es capaz de formar biopelículas que permiten a la bacteria sobrevivir en condiciones adversas como desecación y radiación, confiriéndoles, además, resistencia frente a las defensas de la planta. Está demostrado que la formación de biopelículas es necesaria para el establecimiento de la enfermedad en Xcc puesto que mutantes en distintos genes relacionados directa o indirectamente con la formación de biopelículas han mostrado una disminución en la virulencia.

Estudios realizados mediante microscopía electrónica de barrido de agregados de Xcc han mostrado la presencia de fibras que conforman el esqueleto de la biopelícula, cuya formación se ve favorecida por condiciones de estrés ambiental. Dichas fibras se han observado tanto en la superficie como en el interior de los tejidos de hojas y frutos de cítricos infectados. Además se han visto diferencias en la forma de agregarse de dos cepas de Xcc que varían en su gama de huésped. Mientras que la cepa que infecta la mayor parte de las especies de cítricos presenta estructuras de fibras entrelazadas, la que afecta únicamente a lima mejicana muestra estructuras lineales, sobre todo al principio del proceso de la formación de la biopelícula. Los trabajos posteriores han ido encaminados a caracterizar la naturaleza de la matriz de la biopelícula. Para ello, se han purificado las proteínas de la superficie bacteriana mediante centrifugación diferencial, y SDS-PAGE. Se seleccionaron por su tamaño (alrededor de 15 kD) e hidrofobicidad dos bandas que fueron secuenciadas mediante espectrometría de masas. Una de las proteínas coincidía con una proteína secretada y la otra coincidía en secuencia con PilA, proteína estructural del pili tipo IV. En la actualidad se está purificando esta proteína en cantidad suficiente para la obtención de un antisuero que va a ser utilizado en estudios dirigidos a identificar la naturaleza de las fibras que conformarían el esqueleto de los agregados bacterianos y su posible relación con la diferente capacidad de las cepas para formar biopelículas.

SIM-19

IDENTIFICACIÓN DE NUEVOS EFECTORES DEL SISTEMA DE SECRECIÓN TIPO III EN *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*

Matas, I.M.¹, Castañeda-Ojeda, M.P.¹, Aragón, I.M.¹, Antúñez-Lamas, M.², López-Solanilla, E.², Rodríguez-Palenzuela, P.², Ramos, C.¹

¹Área de Genética, Instituto de Hortofruticultura Subtropical y Mediterránea 'La Mayora', Universidad de Málaga-CSIC, Campus de Teatinos, 29071-Málaga. E-mail: crr@uma.es

²Centro de Biotecnología y Genómica de Plantas, Universidad Politécnica de Madrid, Campus de Montegancedo, 28223 Pozuelo de Alarcón (Madrid).

Pseudomonas savastanoi pv. *savastanoi* (Psv) es el agente causal de la tuberculosis del olivo. La secuenciación del genoma de la cepa Psv NCPPB 3335 ha permitido el abordaje de estrategias de alto rendimiento para la identificación de genes codificadores de posibles efectores (T3Es) del sistema de secreción tipo III (T3SS). La búsqueda bioinformática de T3Es en NCPPB 3335 reveló la existencia tanto de T3Es homólogos a otros descritos previamente, como de proteínas no identificadas anteriormente en otras bacterias patógenas. Con el fin de comprobar la translocación los T3Es predichos, se seleccionaron 15 de los 34 candidatos identificados, con los que se llevó a cabo un ensayo de translocación basado en el análisis de fusiones de los mismos a un dominio adenilato ciclase (Cya). El resultado de este estudio reveló que 10 de estas proteínas se translocan a través del T3SS de Psv. Cinco de estos efectores, son homólogos a otros previamente caracterizados en otras bacterias, aunque la translocación de dos de ellos no se había confirmado previamente. De entre los restantes cinco efectores, dos de ellos se habían identificado previamente como factores de virulencia en bacterias filogenéticamente relacionadas con Psv, y los otros tres, se encuentran anotados actualmente como proteínas hipotéticas. En la actualidad, se está analizando el papel de estos T3Es en las respuestas de defensa de las plantas y especificidad de huésped, utilizando para ello diversas cepas desde las que se expresan individualmente los efectores identificados: 1) visualización macroscópica de la respuesta hipersensible (HR) inducida en *Nicotiana tabacum* por un derivado de *P. syringae* pv. tomado DC3000 carente de efectores (Pto D28E); 2) estudio de la viabilidad de los diferentes derivados de Pto D28E en plantas de *N. benthamiana* y; 3) análisis de la interferencia de los mismos con respuestas relacionadas a la HR en *N. tabacum*, como la acumulación de especies reactivas de oxígeno (ROS) y la deposición de callosa. En este último análisis, se utiliza una cepa derivada de *P. fluorescens* PF55 que expresa los genes necesarios para la expresión del T3SS y cada uno de los T3Es.

Financiación: AGL2011-30343-C02-01 (MINECO), cofinanciado por FEDER.

SIM-20

SUPERACIÓN DE RESISTENCIAS FRENTE A EFECTORES BACTERIANOS MEDIANTE SUPRESIÓN CRUZADA

Rufián, J.S., Lucía, A., Guevara, C.M., Macho, A.P., Zumaquero, A., Ruiz-Albert, J., Beuzón, C.R.

Instituto de Hortofruticultura Subtropical y Mediterránea, Universidad de Málaga, Consejo Superior de Investigaciones Científicas (IHSM-UMA-CSIC), Departamento Biología Celular, Genética y Fisiología, Campus de Teatinos, Málaga E-29071, Spain. cbl@uma.es

Una familias de efectores secretados por el sistema de secreción tipo III Hrp más diversas es la familia HopZ de *P. syringae*. Su elevado grado de diversidad se considera determinado por la adaptación de los diferentes miembros de esta familia a sus hospedadores bajo la fuerte presión negativa de la resistencia que disparan en la mayoría de las especies. Este proceso se ha denominado patoadaptación, y la familia de efectores HopZ está considerada su paradigma. Durante la evolución de los efectores HopZ, los diferentes miembros, cada uno presente en un patógeno diferente, habrían acumulado cambios que les permitiría evadir los mecanismos de resistencia presentes en sus correspondientes hospedadores.

La familia HopZ también muestra una de las mayores tasas de transferencia horizontal de todas las analizadas, con numerosos eventos de adquisición y pérdida, y readquisición de genes que codifican para diferentes miembros de la familia, lo cual apoya el que estos efectores estén sujetos a una fuerte selección negativa en la planta determinada por genes de resistencia (genes R).

Curiosamente, el modelo de evolución de esta familia, así como otros propuestos para otras familias de efectores, no tienen presente que la adaptación a un hospedador pueda estar determinada por la superación de la resistencia frente a un efector mediante la supresión de dicha defensa por la acción de otro efector del mismo patógeno, como se ha descrito que ocurre en *P. syringae* pv. *phaseolicola* por la acción de VirPphA. Además, el caso de VirPphA no parece ser un caso aislado ya que la capacidad de suprimir defensas disparadas por efectores (mediadas por genes R) ha sido mostrada para numerosos efectores de *P. syringae*, si bien los mecanismos y dianas implicados no han sido descritos aún. En este trabajo analizamos el papel de la supresión mediada por efectores en la adaptación de patógenos portadores de efectores HopZ a sus respectivos hospedadores, y demostramos que la supresión mediada por efectores es la principal causa de la superación de las resistencias frente a los efectores de esta familia.

SIM-21

EFFECTO DE LOS FLAVONOIDES SOBRE *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000

Farias, G.A.¹, Vargas, P.¹, Rivilla, R.³, Olmedilla, A.², Gallegos, M.T.¹

¹*Departamento de Microbiología del Suelo y Sistemas Simbióticos,*

²*Departamento de Bioquímica, Biología Molecular y Celular de Plantas, Estación Experimental del Zaidín (CSIC), c/ Profesor Albareda 1, 18008 Granada.*

³*Departamento de Biología, Universidad Autónoma de Madrid, Campus de Cantoblanco, c/Darwin 2, 29049 Madrid.*

Los flavonoides son compuestos que las plantas sintetizan como parte de su sistema de defensa contra patógenos. Sin embargo, las bacterias son capaces de eliminar de forma activa estos compuestos tóxicos mediante proteínas de membrana específicas denominadas transportadores de eflujo o bombas. En *Pseudomonas syringae* pv. tomato (Pto), una cepa fitopatógena para tomate y arabidopsis, hemos observado que determinados flavonoides son los mejores sustratos de una de estas bombas, MexAB-OprM, siendo además los mejores inductores de su expresión a nivel transcripcional tras su unión a PmeR. Además y mediante experimentos *in planta*, hemos demostrado que el sistema PmeR/MexAB-OprM facilita la supervivencia inicial en la superficie de la hoja, la colonización posterior del hospedador y el desarrollo de la enfermedad en plantas de tomate.

Con el objetivo de descifrar cómo Pto DC3000 detecta y responde a las moléculas de defensa producidas por plantas, como los flavonoides, y cómo esas señales se transmiten a nivel transcripcional, hemos llevado a cabo la caracterización de algunos fenotipos bacterianos afectados por la presencia de flavonoides. Hemos estudiado el efecto de estos compuestos sobre la morfología y distintas funciones bacterianas, como la motilidad y la expresión del sistema de secreción tipo III. Hemos observado que la presencia de flavonoides disminuye la motilidad bacteriana, tanto de tipo swimming como swarming y, mediante microscopía electrónica de transmisión, hemos analizado cómo se ve afectada la abundancia de flagelos. Asimismo, hemos determinado que los flavonoides disminuyen la expresión de distintos genes importantes en la expresión del sistema de secreción tipo III.

Financiación: BIO2011-23032 (MINECO) y P08-CVI-3475 y P10-CVI-5800 (Junta de Andalucía), todos ellos cofinanciados por FEDER.

SIM-22

CONTROL DE LA VIRULENCIA POR LUZ EN *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000

Río-Álvarez, I.¹, Rodríguez-Herva, J.J.¹, Rottwinkel, G.², Navas, M.¹, Lamparter, T.², Rodríguez-Palenzuela, P.¹, López-Solanilla, E.¹

¹*Centro de Biotecnología y Genómica de Plantas. Departamento de Biotecnología. ETSI Agrónomos. Universidad Politécnica de Madrid – I.N.I.A. Parque Científico y Tecnológico de la U.P.M. Campus de Montegancedo, 28223 Pozuelo de Alarcón. Madrid. E-mail: isabel.rio@upm.es*

²*KIT Karlsruhe Institute of Technology, Institute of Botany Kaiserstr. 2, Geb. 10.40 D 76131 Karlsruhe, Alemania.*

Recientemente se ha puesto de manifiesto el papel de la luz durante los mecanismos de defensa vegetales frente al ataque de patógenos. De forma paralela se ha descrito la capacidad de determinadas bacterias de percibir la luz. En concreto, en patógenos de animales se ha relacionado esta percepción con el control de los mecanismos de virulencia.

En nuestro laboratorio hemos analizado la respuesta fototáctica de *Pseudomonas syringae* pv tomato DC3000, el patógeno causante de la mancha bacteriana en tomate. Este análisis nos ha llevado a estudiar *in silico* la presencia de proteínas con dominios implicados en la percepción de la luz.

De las proteínas identificadas se han seleccionado para un análisis más profundo dos fotorreceptores de luz roja y un fotorreceptor de luz azul.

En esta comunicación se presentará el análisis de sus propiedades espectrales, la obtención de los mutantes correspondientes, el análisis fenotípico de los mismos así como los estudios que hemos llevado a cabo para conocer la relación de este fenómeno con la virulencia.

Este trabajo ha sido financiado por el proyecto AGL2009-12757 del Ministerio de Ciencia e Innovación.

Sesión simultánea 4
Interacciones planta-hongo

SIM-23

IMPLICACIÓN DE UN TRANSPORTADOR DE SACAROSA (*PdSUT1*) EN LA PATOGENESIS Y VIRULENCIA DEL HONGO *Penicillium digitatum*

De Ramón-Carbonell, M., Sánchez-Torres, P.

Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias, Ctra Moncada-Náquera, Km. 4,5, Moncada, 46113-Valencia. E-mail: mramon@ivia.es; E-mail: palomas@ivia.es

El hongo necrotrofo *Penicillium digitatum* produce grandes pérdidas económicas en la post-cosecha de frutos cítricos al causar la podredumbre verde. Por ello, es importante conocer los diferentes aspectos implicados en los mecanismos de patogénesis, virulencia y resistencia a fungicidas que permitan ejercer un mejor control.

Se han descrito genes que codifican transportadores de sacarosa que revelan su implicación en aspectos de patogénesis/virulencia. Si bien estos genes se han estudiado más ampliamente en plantas y levaduras, recientemente en el hongo biotrofo *Ustilago maydis* se ha encontrado relación entre transportadores de sacarosa y virulencia.

Por ello, se ha identificado y caracterizado el gen *PdSUT1* de *P. digitatum* que codifica un transportador de sacarosa a partir de una librería genómica. Dicho gen se ha empleado para transformar diferentes aislados de *P. digitatum* con distintos fenotipos respecto a su resistencia a fungicidas y su grado de virulencia, utilizando para ello un sistema de transformación mediada por *Agrobacterium tumefaciens*.

Por un lado, se han obtenido mutantes nulos en el aislado virulento y resistente a fungicidas Pd1 que mostraron una reducción en su capacidad infectiva y por otro, transformantes de sobreexpresión en dos aislados con diferente grado de virulencia y resistencia a fungicidas (Pd27 y Pd149) que mostraron un incremento de la misma en ensayos de infección de frutos cítricos.

No se observó ningún efecto respecto a su implicación en la resistencia a fungicidas, comportándose de manera idéntica a los parentales.

Este transportador de sacarosa es el primero en ser descrito en el hongo *P. digitatum* y podría constituir una diana atractiva para nuevas estrategias de control.

SIM-24

DESARROLLO Y ULTRAESTRUCTURA DEL HAUSTORIO DE *Podosphaera fusca*, AGENTE CAUSAL DEL OÍDIO DE LAS CUCURBITÁCEAS

Martínez-Cruz, J., Vela, D., de Vicente, A., Pérez-García, A.

Instituto de Hortofruticultura Subtropical y Mediterránea "La Mayora" (IHSM-UMA-CSIC), Campus de Universitario de Teatinos, 29071 Málaga. E-mail: jmcruz@alu.uma.es

Los oídios son patógenos biotrofos obligados que requieren células vivas de la planta para su completar su ciclo de vida asexual. Estos patógenos establecen una íntima relación con el citoplasma de las células de su hospedador. Un aspecto crucial de la interacción hongo-huésped, es la formación de una estructura de infección especializada de origen fúngico denominada 'haustorio'. A pesar de estar localizada en el interior de las células epidérmicas de la planta, el haustorio permanece separado del citoplasma de la planta por una membrana plasmática derivada de la planta, denominada membrana extrahaustorial (EHM), cuya diferenciación y/o formación es aún desconocida. La EHM está unida la membrana plasmática de la planta por una región del cuello denominada septum. Entre la pared celular del haustorio y la membrana extrahaustorial se localiza la matriz extrahaustorial (EHMx), en la cual se debe producir el intercambio de moléculas entre el parásito y su huésped. Dentro de esta matriz se extienden unas proyecciones del cuerpo del haustorio, denominadas lóbulos.

En este trabajo presentamos un método desarrollado para el aislamiento de complejos del haustorio de *Podosphaera fusca*, el principal agente causal del oídio de las cucurbitáceas en España, a partir de hojas de calabacín densamente infectadas con el hongo. La pared celular del hongo fue visualizada con un anticuerpo específico contra quitina, uno de los componentes estructurales mayoritarios de la pared celular de hongos. De esta manera, se marcaron con fluorescencia diferentes estructuras del haustorio como el cuerpo, lóbulos, cuello y septum, no así EHM y EHMx. Además, se observó que la presencia de los lóbulos alrededor del cuerpo del haustorio aumentaba progresivamente en el tiempo hasta rodearlo completamente, lo que era indicativo de la madurez del mismo. Al igual que los lóbulos, los depósitos de calosa alrededor del complejo del haustorio aumentaron con el tiempo. En paralelo, se realizó un estudio detallado de la ultraestructura del haustorio mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM).

Este trabajo ha sido financiado por ayudas del Plan Nacional de I+D+I del Ministerio de Ciencia e Innovación (AGL2010-21848-CO2-01), cofinanciado con fondos FEDER (EU).

SIM-25

CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DE UN REGULADOR CRÍTICO DE PROCESOS MORFOGENÉTICOS EN *Verticillium dahliae* Y *V. albo-atrum*

Sarmiento-Villamil, J.L., Baeza-Montañez, L, y García-Pedrajas, M.D.

Instituto de Hortofruticultura Subtropical y Mediterránea "La Mayora" (IHSM-UMA-CSIC), Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Estación Experimental "La Mayora", 29750 Algarrobo-Costa, Málaga. E-mail: jsarmiento@eelm.csic.es

El patógeno vascular *Verticillium dahliae* Kleb, principal agente causal de la verticilosis, carece de especificidad de huésped afectando a una gran variedad de cultivos de importancia agronómica a nivel mundial. Con el objetivo de evaluar con precisión el papel de los procesos morfogénicos en la invasión del huésped, un aspecto de virulencia que no ha sido explorado en las especies de *Verticillium*, hemos rastreado la secuencia genómica de *V. dahliae* para identificar los genes que codifican componentes de las rutas de señalización que controlan morfogénesis en hongos, y seleccionado un subgrupo de ellos para su caracterización funcional mediante la producción de mutantes de delección. Este trabajo nos ha llevado a la identificación del gen *vst1*, anotado como VDAG_08656 y que codifica un factor de transcripción de tipo APSES, como un regulador crítico de morfogénesis. Delección de *vst1* en *V. dahliae* da lugar a colonias que carecen de estructuras de resistencia melanizadas, los microesclerocios, y presentan una superficie brillante y de aspecto "húmedo". En medio líquido, por su parte, las cepas mutadas muestran una reducción clara de la esporulación, que según observaciones microscópicas podría deberse a la producción de conidióforos de morfología aberrante. Sin embargo, a pesar de estas alteraciones, en inoculaciones de plantas de tomate los mutantes mantienen unos niveles de virulencia similares a los de las cepas parentales, y se reaíslan con normalidad del sistema vascular tras la infección. El gen *vst1* también se ha deleccionado en la especie *V. albo-atrum*, estrechamente relacionado con *V. dahliae*, observándose alteraciones morfológicas similares. Cabe destacar que *V. albo-atrum* no genera microesclerocios sino micelio de paredes melanizadas como estructuras de resistencia, y que esta melanización de las hifas está totalmente ausente en los mutantes. Esto sugiere un papel para *Vst1* en la regulación de la síntesis de metabolitos secundarios como la melanina, independiente de su papel en morfogénesis. Por otra parte, datos iniciales de virulencia indican que a diferencia de lo que ocurre en *V. dahliae*, en *V. albo-atrum* delección de *vst1* sí parece tener un efecto en la severidad de los síntomas inducidos. Actualmente estamos cuantificando la reducción en esporulación en los mutantes carentes de *vst1*, analizando si existe una correlación con una reducción de la esporulación en la planta, y caracterizando posibles diferencias en el modo de colonización por parte de *V. dahliae* y *V. albo-atrum* que puedan explicar un efecto diferencial de la ausencia de *vst1* en virulencia en ambas especies.

Este trabajo ha sido financiado con fondos del Proyecto AGL2009-13445.

SIM-26

FUNCIONES FISIOLÓGICAS DEL ÓXIDO NÍTRICO (NO) en *Botrytis cinerea*: ANÁLISIS TRANSCRIPTÓMICO DE LA EXPOSICIÓN A NO

Santander, D., Benito E.P.

Dpto. de Microbiología y Genética, Centro Hispano-Luso de Investigaciones Agrarias (CIALE), Universidad de Salamanca, Campus de Villamayor. C. Río Duero, 12. 37185 Villamayor, Salamanca. E-mail: dsantander@usal.es

Botrytis cinerea causa importantes pérdidas económicas en numerosas especies cultivadas. Es un hongo necrótrofo, generalista y muy versátil que puede hacer uso de diversos factores y mecanismos de patogenicidad. *B. cinerea* puede modular, e incluso acentuar, la respuesta de respuesta de hipersensibilidad (HR) de la planta para facilitar su crecimiento a partir de las células muertas. El óxido nítrico (NO) producido durante la HR juega un papel fundamental en la orquestación de las respuestas defensivas de la planta y crea, además, unas condiciones de estrés nitrosativo que limitan el crecimiento de patógenos biótrosos. Estas condiciones no limitan, sin embargo, el desarrollo de *B. cinerea*. Estudios recientes llevados a cabo en nuestro laboratorio demuestran que *B. cinerea* dispone de un sistema muy eficiente de detoxificación de NO basado en una enzima de tipo flavohemoglobina que confiere protección frente a estrés nitrosativo. No obstante, los análisis funcionales llevados a cabo demuestran que esta enzima no puede considerarse un factor de patogenicidad de *B. cinerea* y que las funciones fisiológicas en las que participa parecen estar más relacionadas con la regulación de los niveles de NO endógeno que el propio patógeno produce.

En la actualidad nuestro interés se centra en la determinación y caracterización de las funciones fisiológicas en las que participa el NO en *B. cinerea*. La aplicación de aproximaciones farmacológicas sugiere que el NO, tanto exógeno como endógeno, desempeña un papel relevante en la morfogénesis de *B. cinerea*, concretamente en germinación. Los análisis de expresión génica global llevados a cabo sobre esporas en germinación y sobre micelio en desarrollo demuestran que la exposición a NO exógeno determina cambios en los niveles de expresión génica de un número importante de genes en ambos estadios, siendo la mayor parte de los genes regulados en uno y otro diferentes. Es interesante destacar que más del 10% de los genes codificadores de factores de transcripción anotados en el genoma de *B. cinerea* responden a NO exógeno. En este grupo se incluyen representantes de todas la clases de factores de transcripción descritos en hongos. También se han identificado genes implicados en desarrollo en hongos y genes codificadores de productos que participan en el metabolismo redox celular, entre otros. En la misma línea apuntan los resultados obtenidos en los análisis de los efectos de la regulación de la expresión génica por NO endógeno. En el presente trabajo se discuten los principales resultados obtenidos.

Este trabajo ha sido financiado por fondos del proyecto AGL2009-08954.

SIM-27

MODULACIÓN DE pH AMBIENTAL Y PATOGENICIDAD EN *Fusarium*

De Vega-Bartol, J.J., Tello, V., Casado del Castillo, V., Ramos, B., Núñez-Corcuera, B., Thomma, B.P.H.J., Prusky, D., Díaz-Mínguez, J.M.

CIALE (Centro Hispano-Luso de Investigaciones Agrarias), Dpto. Microbiología y Genética, Universidad de Salamanca, C/ Duero 12, Villamayor, 37185 Salamanca, Spain. josediaz@usal.es

Durante el crecimiento de varias estirpes patógenas de *Fusarium oxysporum*, con diferentes grados de virulencia, en medio de cultivo con L-glutamato como fuente de nitrógeno ajustado a pH 4.0, se observó la acumulación de amonio en el sobrenadante del medio, con un efecto de incremento del pH del mismo hasta valores superiores a 5.0. La actividad transcripcional de varios genes implicados en el metabolismo del nitrógeno, tales como *GDH2*, *GLT*, *MEPB* y *GS* (codificadores de la glutamato deshidrogenasa específica de NAD⁺, importador de glutamato, importador/exportador de glutamato y glutamina sintasa, respectivamente) se incrementó entre 15 y 20 veces durante el periodo de acumulación de amonio e incremento de pH. La alcalinización también se observó en frutos de tomate inoculados. Los transformantes silenciados en el gen *ftf2* de *Fusarium oxysporum* muestran un fenotipo opuesto al observado en las estirpes silvestres, con reducción en la acumulación de amonio e incremento de pH, falta de activación de la expresión de los genes anteriores e incapacidad para la colonización de frutos de tomate. *ftf2* es un gen homólogo a *ftf1*. Ambos codifican factores de transcripción con un motivo dedo de zinc binuclear para la unión a ADN, si bien *ftf1* presenta varias copias por genoma y muestra un drástico incremento de expresión en plantas infectadas.

Los resultados obtenidos indican que *ftf2* codifica un factor de transcripción cuya expresión está relacionada con la modulación del pH ambiental mediada por acumulación de amonio, y sugieren que este mecanismo puede modular la patogenicidad.

MÉTODOS TRADICIONALES DE AISLAMIENTO VS. “NEXT GENERATION SEQUENCING”: ¿CUÁNTAS ESPECIES DE *Phytophthora* SE PUEDEN DETECTAR EN SUELOS FORESTALES?

Català, S.¹, López-García, M.C.¹, Beltrán, A.², Berbegal, M.¹, Abad-Campos, P.¹, Pérez-Sierra, A.¹

¹*Instituto Agroforestal Mediterráneo, Universitat Politècnica de València, Camino de Vera s/n, 46022 Valencia. E-mail: sangarca@upv.es*

²*Instituto Canario de Investigaciones Agrarias, Ctra. de El Boquerón s/n, Valle Guerra, La Laguna, 38270 Tenerife.*

La detección de *Phytophthora* en suelo es complicada debido a la complejidad estructural, física y biológica del mismo. En la mayoría de los casos, otros microorganismos que crecen más rápido que *Phytophthora* enmascaran el aislamiento, dificultando la obtención de cultivos puros. Para detectar *Phytophthora*, tradicionalmente se han utilizado técnicas basadas en medios selectivos y en diferentes trampas vegetales. Las ventajas de utilizar trampas vegetales frente a medios selectivos son: (i) poder utilizar mayor cantidad de suelo, lo que incrementa la probabilidad de detectar poblaciones que se encuentren en bajas densidades, y (ii) facilitar la detección de especies homotáticas, que forman oosporas para sobrevivir en el suelo. Ambas técnicas consumen mucho tiempo y no siempre son capaces de detectar todas las especies de *Phytophthora* presentes. Las tecnologías de “Next Generation Sequencing” (NGS) (454-pyrosequencing, Illumina, SOLiD) permiten obtener cientos de miles de lecturas en una única carrera, con un menor coste proporcional que la secuenciación tradicional por Sanger. Durante los últimos años las plataformas de NGS se han convertido en una potente herramienta en metagenómica y caracterización de comunidades complejas. Cabe destacar también el menor tiempo que requiere la preparación de la librería de secuenciación masiva frente a una librería de clonación, además de obtener con mayor probabilidad una mejor representación del metagenoma objeto de estudio. En el presente trabajo se compara las especies de *Phytophthora* detectadas con técnicas de aislamiento tradicionales con las obtenidas por pirosecuenciación de amplicones en paralelo, en muestras de suelo de dos ecosistemas diferentes: bosques macaronésicos subtropicales de laurisilva y bosques mediterráneos esclerófilos dominados por encinas. Asimismo, se valora la resolución filogenética del ITS1 como marcador en la caracterización metagenómica de comunidades de *Phytophthora* en suelos.

Este trabajo ha sido financiado por el Proyecto AGL2011-30438-C02-01 del Ministerio de Ciencia e Innovación y cofinanciado con fondos FEDER (EU).

SIM-29

ANÁLISIS FUNCIONAL DE EFECTORES CANDIDATOS DE *Blumeria graminis* f. sp. *hordei*, MEDIANTE SILENCIAMIENTO GÉNICO INDUCIDO POR EL HOSPEDADOR

Pliego C.¹, Nowara D.², Bonciani G.¹, Gheorghe D.¹, Schweizer P.², Bindschedler L.V.³, Cramer R.³, Spanu P.D.¹

¹Departamento de Life Science, Imperial College London, London SW7 2AZ, U.K. E-mail: clarapliego@uma.es

²Leibniz-Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research, Germany

³Departamento de Química, Universidad de Reading, RG6 6AS, U.K.

Blumeria graminis es el agente causal del oidio de los cereales, siendo una de las enfermedades de hojas más extendidas del mundo en dichos cultivos. En este biotrofo obligado, el haustorio es responsable de la adquisición de nutrientes del hospedador y estudios recientes apoyan la hipótesis de que también está implicado en la liberación de proteínas efectoras con el objetivo de modular el desarrollo de la enfermedad. En este trabajo se seleccionaron un total de 50 efectores candidatos, centrándonos en genes que codifican proteínas de pequeño tamaño, con expresión preferencial en el haustorio y señal de secreción. El análisis funcional se llevó a cabo mediante silenciamiento de dichos genes en *Blumeria* inducido por la expresión transitoria de RNAi en la hoja de cebada. Tras silenciar el gen se evaluó la interacción *Blumeria graminis*/cebada calculando el Índice de Haustorio: número de células transformadas con haustorio/número total de células transformadas. Siete efectores fueron seleccionados por disminuir significativamente el porcentaje de conidios capaces de desarrollar haustorios. Los efectos más llamativos se obtuvieron tras el silenciamiento de BEC1011 y BEC1054, dos genes que forman parte de una pequeña familia génica. Se llevaron a cabo ensayos de complementación de estos dos efectores mediante expresión transitoria en células epidérmicas de los genes sintéticos wobbleBEC1011 y wobbleBEC1054, que codifican para la misma proteína efectora y escapan del silenciamiento por RNAi, debido a mutaciones puntuales en la región codificante. Estos estudios demostraron que ambos efectores ejercen su función de manera independiente y que actúan dentro de la célula hospedadora. Estudios similares demostraron que BEC1011 parece interferir con los sistemas de defensa de la planta. Las secuencias de tres efectores, BEC1005, BEC1054 y BEC1019, muestran dominios presentes en glucosidasas, RNAsas-like y proteasas, respectivamente. Se están obteniendo plantas transgénicas de cebada expresando RNAi de BEC1011, BEC1054 y BEC1019, con el fin de evaluar si el silenciamiento de dichos efectores confiere protección frente al desarrollo de la enfermedad.

Sesión simultánea 5
Interacciones planta-patógeno

SIM-30

¿CÓMO RESPONDE *Erwinia amylovora* AL ESTRÉS POR COBRE?

Águila-Clares, B.¹, McNally, R.², Marco-Noales, E.¹, López, M.M.¹, Sundin, G.W.²

¹Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias. Centro de Protección Vegetal y Biotecnología. Laboratorio de Bacteriología. 46113, Moncada, Valencia, España. baguila@ivia.es

²College of Agriculture and Natural Resources. Department of Plant Pathology. 107 Center for Integrated Plant Systems. Michigan State University, East Lansing, MI. 48824-1311. USA.

El fuego bacteriano de las rosáceas está causado por *Erwinia amylovora* (Burrill) Winslow *et al.* (1920), y afecta a varias especies de frutales y ornamentales de interés económico en España. *E. amylovora* es un organismo de cuarentena en la UE y, hasta ahora, el método de control más ampliamente utilizado en Europa todavía siguen siendo los tratamientos con compuestos cúpricos.

El cobre actúa como cofactor en funciones esenciales para la célula bacteriana, pero por encima de una determinada concentración resulta tóxico, debido, al menos en parte, a que produce especies reactivas del oxígeno. Por tanto, las bacterias necesitan desarrollar mecanismos que controlen los niveles de cobre y asegurar así su supervivencia en presencia de este metal.

El objetivo del trabajo es conocer la expresión diferencial de genes en *E. amylovora* en presencia de cobre, utilizando la tecnología transcriptómica de hibridación de *microarrays*. Los *microarrays* contenían unos 3500 genes cromosómicos y los genes plasmídicos correspondientes a los plásmidos: pEU30, pEL60, pEI70 y los plásmidos de 29 y 71kb de la cepa *E. amylovora* 273. Se hibridaron con RNA extraído de células en fase exponencial expuestas a CuSO₄ 0.5mM durante 5min. Cada *microarray* contenía triplicados de cada oligonucleótido específico de gen colocados en un patrón al azar. Se realizaron 2 experimentos independientes con 2 y 4 réplicas técnicas respectivamente. En cada experimento, las réplicas técnicas fueron analizadas individualmente. Finalmente, para un análisis más detallado, se seleccionaron aquellos genes que se habían expresado diferencialmente y en el mismo sentido en los dos experimentos y no sólo en uno.

Los resultados han mostrado que, en las condiciones ensayadas, se inducen 23 genes y se reprimen 21. Los 23 genes que se inducen se distribuyen en las siguientes categorías funcionales: transporte (7), estrés (7), movimiento (1), reprogramación del metabolismo (1), muerte celular programada (1); además hay una proteína conservada y 5 genes a los cuales no se les ha asociado una función. El estudio inicial *in silico* de los genes inducidos nos ha permitido asociar, directa o indirectamente, 14 de ellos con la respuesta al estrés por cobre en otros modelos bacterianos.

La continuación de estos y otros análisis genéticos nos permitirá describir un modelo de respuesta a la toxicidad del cobre en *E. amylovora*.

SIM-31

SEGUIMIENTO DEL DESARROLLO DE LA INFECCIÓN DE *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* EN INFECCIONES MIXTAS MEDIANTE MICROSCOPIA CONFOCAL

Rufián, J. S.¹, Corry, D.S.², Mansfield, J.W.³, Arnold, D.L.², Beuzón, C.R.¹

¹*Instituto de Hortofruticultura Subtropical y Mediterránea, Universidad de Málaga, Consejo Superior de Investigaciones Científicas (IHSM-UMA-CSIC), Departamento Biología Celular, Genética y Fisiología, Campus de Teatinos, Málaga E-29071. cbl@uma.es*

²*University of the West of England. Faculty of Health and Life Sciences. Frenchay Campus, Coldharbour Lane, Bristol BS16 1QY.*

³*Imperial College London. Department of Life Sciences. South Kensington Campus, London SW72AZ*

Pseudomonas syringae es una bacteria fitopatógena gram-negativa muy extendida en la naturaleza y que produce severos daños en gran cantidad de cultivos, y primer modelo de interacción planta-bacteria en el que se puso a punto el uso del índice de competitividad (CI) en infecciones mixtas como ensayo de virulencia (Macho et al., 2007). El uso de los CI ha permitido el estudio de diferentes aspectos del proceso de infección, la regulación de la expresión de determinantes de virulencia, la translocación mediante el sistema tipo III, y la contribución a la virulencia de los efectores translocados, (Macho et al., 2009; Ortiz-Martin et al., 2010; Zumaquero et al., 2010; Macho et al., 2012). Una correcta puesta a punto de las condiciones experimentales al utilizar infecciones mixtas es imprescindible para evitar interferencias entre las estirpes co-inoculadas (complementación o dominancia negativa) si se quiere usar este método como ensayo de virulencia (Macho et al., 2007).

En este trabajo mostramos que tanto la progresión de la infección como la formación de micro colonias mixtas son dependientes de la dosis de inóculo inicial así como del tiempo. Utilizando un mutante deficiente en el sistema de secreción tipo III ($\Delta hrcV$) observamos que el crecimiento de dicho mutante puede ser complementado por la estirpe silvestre a altas dosis de inóculo, pero no a bajas. Asimismo, utilizando una estirpe que produce HR (Respuesta de Hipersensibilidad), demostramos que la respuesta de defensa disparada por dicha estirpe no afecta a la silvestre siempre que las micro colonias se encuentren alejadas.

SIM-32

***Orobanche cumana* (JOPO DEL GIRASOL) EN EUROPA: DIVERSIDAD DE POBLACIONES DE ALTA VIRULENCIA**

García-Carneros, A.B., Melero-Vara, J.M., Molinero-Ruiz, L.

Departamento de Protección de Cultivos, Instituto de Agricultura Sostenible, CSIC, Alameda del Obispo s/n, Apdo. 4084, 14080 Córdoba, España. E-Mail: leire.molinero@csic.es.

El girasol (*Helianthus annuus* L.) es el cultivo oleaginoso anual más importante en España, y la planta parásita *Orobanche cumana* Wallr. (jopo) constituye la principal limitación biótica a su producción. El método de control más efectivo de la enfermedad es el uso de resistencia genética, si bien se han descrito distintas razas de *O. cumana* que superan diferentes genes de resistencia incorporados en el girasol. El gen *Or₅* es el más habitual, y suele expresarse de forma horizontal en campo. La raza F de *O. cumana*, que supera este gen, es la más extendida en Europa. Se han referido poblaciones de raza F que difieren en agresividad, pero también se ha propuesto la existencia de poblaciones de virulencia mayor (raza G). El objetivo de este trabajo fue comparar poblaciones altamente virulentas de *O. cumana* de Europa. Se estudió la patogenicidad de 12 poblaciones procedentes de España, Hungría, Rumania y Turquía mediante inoculación de la planta parásita en líneas de girasol diferenciadoras de razas de *O. cumana* de alta virulencia (líneas NR5, L86 y P96), incubación en cámara controlada (dos semanas) y posterior trasplante a invernadero (10 semanas adicionales), y análisis del área bajo la curva de progreso de la infección estandarizada y del grado final de ataque. Los análisis moleculares inter- e intra- poblacionales se llevaron a cabo por amplificaciones RAPD-PCR de ADN total extraído a partir de tejido liofilizado de 27 poblaciones de España, Hungría y Turquía. Se analizaron 39 muestras correspondientes a diferentes combinaciones población de *O. cumana* x línea de girasol diferenciadora. El patrón resistencia/susceptibilidad en las líneas diferenciadoras permitió la caracterización racial de las 12 poblaciones de *O. cumana* inoculadas; además de la raza F, en poblaciones de los cuatro países, se identificaron la raza E en Rumania y España (Cuenca) y la G en Turquía. Por otro lado, 19 de los 155 cebadores ensayados revelaron gran homogeneidad genética intrapoblacional de *O. cumana* así como entre poblaciones recogidas sobre NR5 (raza F). Las muestras se agruparon por su origen geográfico: las de Turquía aparecieron genéticamente distanciadas de las de España y Hungría, y en España se diferenciaron las muestras de Andalucía y las de Cuenca. Este trabajo muestra, por vez primera, la composición, tanto a nivel molecular como fenotípico, de las poblaciones de jopo en los países europeos donde esta planta parásita constituye una de las principales limitaciones de la producción de girasol.

SIM-33

DIFERENCIAS ENTRE ESPECIES DE *Meloidogyne* EN LA PENETRACIÓN Y DESARROLLO EN RAICES DE SANDÍA (*Citrullus lanatus*)

López-Gómez, M.F.; Blanco, M. y Verdejo-Lucas, S.

IRTA. Protección Vegetal Sostenible. Ctra. de Cabriels, Km 2. 08348. Cabriels (Barcelona). E-mail: manuel.lopez@irta.cat

Las Cucurbitáceas son susceptibles a *Meloidogyne* spp. aunque algunas especies muestran un mayor grado de tolerancia al nematodo que otras. La tasa de penetración de las raíces durante las primeras fases de la interacción nematodo-planta difiere entre las especies del nematodo. Estas diferencias se han caracterizado en Solanáceas pero no en Cucurbitáceas, siendo tal estudio de interés para conocer la patogenicidad de *Meloidogyne* en estos cultivos. El objetivo de este experimento fue comparar la tasa de penetración de *M. arenaria*, *M. incognita* y *M. javanica* en *Citrullus lanatus*. Plantas de sandía cv. Sugar Baby de 2 semanas de desarrollo se inocularon con 200 juveniles de 72 horas de *M. arenaria*, *M. incognita* y *M. javanica* en una cámara climática a 25 °C y fotoperiodo de 16 horas. A los 4, 7 y 11 días post inoculación (dpi) se cosecharon 7 plantas inoculadas con cada una de las especies. Las raíces se tiñeron con fuschina ácida al 0.05% y se examinaron bajo una lupa. Se hizo un recuento del número de nematodos que penetraron la raíz y su estado de desarrollo larvario (J2, J3 o J4). También se cuantificó el número de sitios de infección e individuos por sitio de infección. Los resultados mostraron que la tasa de penetración difería entre las especies de *Meloidogyne*, siendo *M. javanica* la que penetraba en mayor número respecto a *M. arenaria* y *M. incognita*, tanto a 4, 7 como a 11 dpi. El número de J2 de *M. arenaria* y *M. incognita* fue similar en las raíces de sandía. Se encontró un mayor número de de J3 a 7 dpi y J4 a 11 dpi de *M. javanica* en comparación con las otras dos especies. No se encontraron diferencias en el número de sitios de infección asociados a la especie de *Meloidogyne*, pero el número de nematodos por sitio de infección fue mayor cuando se trataba de *M. javanica* que de *M. arenaria* o *M. incognita*.

Financiación: INIA RTA2010-00017-C02-01. López-Gómez recibe financiación de INIA para la realización de su tesis doctoral.

SIM-34

MUTAGÉNESIS LETAL IN VIVO DEL VIRUS DEL MOSAICO DEL TABACO POR 5-FLUOROURACILO

Brichette Mieg, I., Díaz Martínez, L., Grande Pérez, A

Instituto de Hortofruticultura Subtropical y Mediterránea "La Mayora" (IHSM-UMA-CSIC), Área de Genética, Universidad de Málaga, Campus de Teatinos. 29071, Málaga. E-mail: agrande@uma.es

La mutagénesis letal es una nueva terapia antiviral que se basa en el aumento de la tasa de mutación mediante el uso de análogos de base o nucleósido mutagénicos. Actualmente no comprendemos del todo los mecanismos moleculares que conducen a la extinción de virus mediante la mutagénesis incrementada, documentada en la replicación de virus RNA de animales y del hombre principalmente en cultivos celulares y en menor medida *in vivo*. Existen evidencias experimentales que apoyan el modelo de defección letal en la mutagénesis letal de virus RNA en el cual juega un papel clave la actividad interferente de genomas virales defectores con un bajo grado de mutación y una baja infectividad específica. Hasta la fecha no se ha abordado la mutagénesis letal de virus de plantas a pesar de constituir excelentes sistemas modelo *in vivo* que desarrollan rápidas infecciones sistémicas sometidas a cuellos de botella y sin implicaciones éticas. En este trabajo hemos empleado el virus del mosaico del tabaco (TMV) en *Nicotiana tabacum* para estudiar las bases moleculares de la mutagénesis letal *in vivo* causada por el análogo de base 5-fluorouracilo (FU). TMV es un virus de RNA (6,4 kb) de cadena sencilla y polaridad positiva del género Tobamovirus cuya infectividad se ve afectada por tratamiento con análogos de base o de nucleósido, aunque se desconocen las bases moleculares. Para ello *N. tabacum* cultivadas *in vitro* se trataron con 0 (control), 25, 50 y 100 µg/ml de FU, se inocularon con 50 unidades formadora de lesión de TMV-U1 y se analizaron las poblaciones virales tratadas 5 y 10 días, así como tras 10 días con FU seguido de 20 días postratamiento ex vitro sin FU. Se analizaron la infectividad y la carga viral y se caracterizaron espectros de mutantes control y tratados con FU de la polimerasa (RdRp) y la proteína del movimiento (MP) de 11 poblaciones virales. Los resultados muestran que existe un efecto de la dosis del FU sobre la disminución de la infectividad del TMV a los 10 dpi. La frecuencia de mutación en plantas tratadas cuya infectividad disminuyó debido al tratamiento con FU experimentó aumentos moderados. El número de mutaciones en la MP superó en 1,5 veces el de la RdRp en las poblaciones mutagenizadas. El tipo de mutaciones encontradas son principalmente A->G y U-> C, las esperadas por la acción mutagénica del FU. Además, se observó que una vez retirado el tratamiento las poblaciones de TMV mutagenizadas recuperaron la infectividad hasta niveles superiores que aquellos de las muestras control. Se discutirán los datos de infectividad específica viral a 5 y 10 días con FU en el contexto de la defección letal. Se concluye que el FU es mutagénico para el TMV y que el aumento de la frecuencia de mutación debida al el FU está asociado a la disminución de la infectividad viral. Nuestros resultados confirman que TMV en *N. tabacum* es un buen sistema modelo para el estudio de la mutagénesis letal *in vivo*.

SIM-35

SEGUIMIENTO VISUAL DE LA DINAMICA DE INFECCIÓN DE PLANTAS POR VIRUS

Bedoya, L., Martínez, F., Orzáez, D., Darós, J.A.

Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas (CSIC-Universidad Politécnica de Valencia), 46022 Valencia. E-mail: jadaros@ibmcp.upv.es

El factor de transcripción Rosea1 (Ros1) de *Antirrhinum majus* es una proteína de 25.7 kDa que participa en la activación de una serie de genes de la ruta de biosíntesis de las antocianinas, compuestos responsables de muchos de los vistosos colores de flores y frutos en las plantas. Nuestro trabajo ha explorado la posibilidad de utilizar Ros1 como marcador visual para seguir la dinámica de infección de un virus a través de su planta huésped. Para ello se insertó el cDNA de Ros1 en dos posiciones distintas en el genoma del potyvirus del grabado del tabaco (TEV). Al inocular plantas de tabaco con los virus recombinantes se comprobó que, con un pequeño retraso tras la aparición de los síntomas, los tejidos sintomáticos empezaron a tornarse de color rojo intenso. Mediante análisis RT-PCR se confirmó que solo los tejidos que se habían vuelto rojos contenían el RNA viral. A uno de los clones recombinantes del TEV-Ros1 se le introdujeron una serie de mutaciones en el supresor de silenciamiento HC-Pro que se sabía tienen un efecto sobre la acumulación del virus. Con estos virus mutantes se comprobó la existencia de una correlación entre la carga viral y la acumulación de antocianinas, tanto cualitativamente por simple inspección visual de los tejidos, como cuantitativamente contrastando la acumulación de los virus por análisis Western con su correspondiente inducción de antocianinas mediante extracción y medida espectrofotométrica. El inesperadamente alto nivel de acumulación de antocianinas en los tejidos invadidos por el TEV-Ros1 podría ser debido a la activación de otros factores de transcripción endógenos a la planta y que cooperan en la misma ruta como consecuencia de la infección viral o a la actividad del supresor del silenciamiento viral sobre la expresión de Ros1. Por otro lado, mediante pases seriados del TEV-Ros1 de plantas infectadas a sanas cada 9 días se confirmó la elevada estabilidad del cDNA del marcador Ros1 en el genoma viral. Finalmente se analizó la aplicabilidad de esta estrategia a otros sistemas virus-planta, obteniéndose resultados satisfactorios en los casos del potyvirus del mosaico del nabo infectando *Arabidopsis thaliana*, así como el tobamovirus del mosaico del tabaco y el potexvirus X de la patata infectando *Nicotiana benthamiana*. Las propiedades de Ros1 como marcador reportero para seguir visualmente la infección y movimiento de virus en plantas lo convierten en una interesante alternativa frente a las proteínas fluorescentes para las que la observación muchas veces es destructiva y requieren instrumentación especializada.

SIM-36

ESTUDIO FUNCIONAL DEL DOMINIO R DE LA PROTEÍNA DE CUBIERTA DEL VIRUS DE LAS MANCHAS NECROTICAS DEL MELON (MNSV)

Serra-Soriano, M., Pallás, V., Navarro, J.A.

Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas. Consejo Superior de Investigaciones Científicas-Universidad Politécnica de Valencia. Avda. Ingeniero Fausto Elio, 46022 Valencia, España. vpallas@ibmcp.upv.es

El virus de las manchas necróticas del melón (MNSV) es el agente causal de la enfermedad del cribado. Su genoma está compuesto por una molécula de RNA monocatenario de polaridad positiva y codifica cinco proteínas funcionales: p29 y p89, implicadas en la replicación del virus; p7A y p7B relacionadas con el movimiento célula a célula y la proteína de cubierta (CP). La CP es una proteína multifuncional que, a parte de su papel estructural en la encapsidación del virus y de la implicación en la transmisión por su hongo vector, interviene también en el movimiento a larga distancia siendo un determinante de la sintomatología. Además, la CP se ha identificado como un factor capaz de retrasar el silenciamiento génico post-transcripcional (PTGS) favoreciendo el movimiento célula a célula del virus. La CP presenta dos dominios estructurados (P y S) y una región amino terminal flexible (dominio R), rica en aminoácidos básicos, que se asume como la zona más probable de unión al RNA viral durante la encapsidación. Para estudiar la implicación de esta región en las diferentes funciones biológicas desempeñadas por la CP se ha obtenido una colección de mutantes puntuales y de delección que afectan a la región comprendida entre la Met1 y la Val90. Nuestros resultados en ensayos de retardo en gel confirman que, efectivamente, el dominio R es el encargado de interaccionar con el RNA viral siendo la zona comprendida entre los aminoácidos 30-90 la más importante en este proceso. Por otra parte, las propiedades de supresión del silenciamiento génico a nivel local y sistémico de estas CP mutantes se estudiaron mediante su expresión junto con la GFP en hojas de *N. benthamiana* 16C, plantas que expresan constitutivamente la proteína fluorescente GFP. A nivel local no se observó una diferencia significativa entre los mutantes, que prácticamente perdieron su capacidad de retrasar el PTGS de la GFP. Sin embargo, solo la CP silvestre y el mutante que mantenía la misma región caracterizada en los ensayos de unión a RNA (aminoácidos 30-90) suprimieron el silenciamiento génico a nivel sistémico de la GFP transgénica. La implicación del mismo dominio proteico en ambas funciones podría indicar una correlación entre la unión a RNA y la capacidad de suprimir el silenciamiento génico a nivel sistémico.

SIM-37

ESTUDIO DEL MECANISMO DE ACCIÓN Y EFECTO SINÉRGICO DE LA PROTEÍNA SUPRESORA DE SILENCIAMIENTO p22 DEL CRINIVIRUS TOMATO CHLOROSIS VIRUS

Landeo-Ríos Y., Navas-Castillo, J., Moriones E., Cañizares, M.C.

*Instituto de Hortofruticultura Subtropical y Mediterránea "La Mayora" (IHSM-UMA-CSIC), Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Estación Experimental "La Mayora", 29750 Algarrobo-Costa, Málaga.
E-mail: carmen.canizares@eelm.csic.es*

El silenciamiento de RNA es un mecanismo específico de secuencia implicado en regulación de la expresión génica en eucariotas, que también funciona como defensa antiviral. Durante la infección se generan RNAs de doble hebra (dsRNA), originados bien como intermediarios de replicación o por la presencia de zonas muy estructuradas, que son procesados en moléculas de RNAs pequeños (siRNAs) por RNasas específicas (Dicer). A su vez, los virus expresan proteínas capaces de suprimir el silenciamiento de RNA en distintos puntos del proceso. El genoma de tomato chlorosis virus (ToCV, género *Crinivirus*, familia *Closteroviridae*) consta de dos moléculas de RNA, de cadena sencilla y polaridad positiva y, como otros miembros de la compleja familia *Closteroviridae*, codifica en su genoma múltiples proteínas supresoras de silenciamiento. Una de ellas, la proteína p22, codificada en el RNA1, se ha descrito como uno de los supresores más eficientes a nivel local. En este trabajo, como una primera aproximación para conocer el mecanismo de acción de p22, analizamos sus propiedades de unión *in vitro* a dsRNA de distintos tamaños. Nuestros resultados muestran que p22 es capaz de unir dsRNAs de 600 y 145 nucleótidos (nt) de tamaño pero no parece capaz de unir siRNAs de 22 nt. Esta observación sugiere que p22 tiene como diana al dsRNA precursor inhibiendo la producción de siRNAs. Análisis basados en ensayos de corte *in vitro* con Dicer permitirán confirmar esta hipótesis. También, la creación de mutantes de delección de p22 permitirá identificar el dominio responsable de unión a dsRNA, y si se correlaciona con la capacidad de suprimir el silenciamiento de RNA. En el presente trabajo, también se ha estudiado el efecto sinérgico de la proteína p22 cuando se expresa heterológicamente a partir de los virus tobacco rattle virus (TRV, género *Tobravirus*, familia *Virgaviridae*) y potato virus X (PVX, género *Potexvirus*, familia *Alphaflexiviridae*).

Sesión simultánea 6
Etiología, diagnóstico y epidemiología II

SIM-38

INCIDENCIA DE *Meloidogyne* spp. EN CULTIVOS HORTÍCOLAS PROTEGIDOS DEL SUDESTE ESPAÑOL

Talavera, M.^{1*}, Sayadi, S.¹, Flor-Peregrín, E.¹, Verdejo-Lucas, S.²

¹IFAPA Centro Camino de Purchil. Camino de Purchil s/n. 18004 Granada.
E-mail: miguel.talavera@juntadeandalucia.es

²IRTA. Patología Vegetal. Ctra. de Cabrils Km 2. 08348 Cabrils, Barcelona.

Con una superficie de 37.000 hectáreas y una producción anual de tres millones de toneladas, la zona costera del sudeste de España, constituye la mayor área de cultivos hortícolas protegidos en Europa. En este trabajo se evaluó la incidencia de los nematodos noduladores en la zona costera de las provincias de Almería y Granada mediante dos aproximaciones: a) una encuesta sobre la percepción del impacto de las enfermedades causadas por nematodos, mediante entrevistas personales a 120 ingenieros técnicos agrícolas encargados del estado fitosanitario de las explotaciones y b) un muestreo nematológico de cultivos protegidos, a fin de identificar las especies de *Meloidogyne*, su distribución y frecuencia de aparición. Según las respuestas de las entrevistas, el 17,7% de los campos estaban infestados por nematodos y el 18,8% del área cultivable dentro de cada invernadero mostraba síntomas de *Meloidogyne*, lo cual representaba un 2 % del total de la superficie bajo cubierta en la región. La pérdida media de productividad se estimó en un 30,8% y el 38,1% de los técnicos agrícolas consideraron que las infestaciones por nematodos habían incrementado en los últimos cinco años. La mayor parte de los técnicos (78,3%) afirmaron que el método de control más utilizado era la fumigación química del suelo. Los nematicidas no-fumigantes fueron mencionados por un 59,8%, las técnicas de injerto y los cultivares resistentes por un 42,3%, la solarización del terreno por un 38,1%, los extractos de plantas por un 14,4% y la biofumigación por un 6,2%. La mayoría de los técnicos consideraron la aplicación de los nematicidas fumigantes combinados con la solarización y el injerto sobre patrones resistentes, como los métodos más efectivos para el control de nematodos. La especie de nematodos noduladores más abundante fue *Meloidogyne javanica* seguida por *M. incognita* y *M. arenaria*. La distribución de especies de *Meloidogyne* en el área estuvo relacionada con los cultivos hospedadores, y la secuencia de rotación de cultivos predominantes en cada área, así como con el uso de cultivares resistentes y otras prácticas agronómicas.

Este trabajo ha sido financiado por INIA- RTA2010-00017-C02-01 y fondos FEDER procedentes de la Unión Europea

COLONIZACIÓN DE LAS HERIDAS DE PODA DE LA VID POR HONGOS PATÓGENOS CAUSANTES DE ENFERMEDADES DE LA MADERA

Luque, J.¹, Elena, G.¹, Garcia-Figueres, F.², Reyes, J.³, Barrios, G.⁴, Legorburu, J.⁵

¹Patología Vegetal, IRTA. Ctra. de Cabrils km 2, 08348 Cabrils. E-mail: jordi.luque@irta.cat, georgina.elena@irta.cat ; ²Laboratori de Sanitat Vegetal, DAAM Generalitat de Catalunya. Ctra. de Cabrils km 2, 08348 Cabrils. E-mail: fgarciafigueres@gencat.net; ³Oficina Comarcal Alt Penedès, DAAM Generalitat de Catalunya. Plaça Àgora s/n, 08720 Vilafranca del Penedès. E-mail: jreyes@gencat.net; ⁴Serveis Territorials Tarragona, DAAM Generalitat de Catalunya. Av. de Catalunya 50, 43002 Tarragona. E-mail: gbarrios@gencat.net; ⁵Dep. Producción y Protección Vegetal, NEIKER-Tecnalia, Granja Modelo de Arkaute. Apartado 46, 01080 Vitoria/Gasteiz. E-mail: jlegorburu@neiker.net

Los cortes de poda constituyen la vía habitual de entrada de los hongos causantes de enfermedades de la madera de la vid en las plantas adultas. El objetivo de este trabajo consistió en determinar los porcentajes de infección patógena que se dan de forma natural en el período posterior a las tareas de poda. Para ello, se tomaron muestras de sarmientos podados en dos viñedos de la D.O. Penedés (Barcelona), con distintos niveles de enfermedades y en dos épocas distintas: en Febrero, tres meses después de la pre poda realizada en Noviembre, y en Mayo, después de un período de igual duración posterior a la poda de Febrero. En el laboratorio, se realizaron los aislamientos fúngicos, se identificaron las especies asociadas a enfermedades de la vid, y se calcularon las frecuencias de aislamiento de cada taxón.

Los hongos patógenos de la vid aislados durante el período experimental fueron, por orden creciente de abundancia, *Eutypa lata*, *Neofusicoccum parvum*, *Cryptovalsa ampelina*, *Phaeomoniella chlamydospora* y *Diplodia seriata*. Esta última especie fue con diferencia la más frecuente; los porcentajes de infección en los cortes de poda se encontraron entre el 2 y 68 %. *Phaeomoniella chlamydospora* se aisló entre el 0,4 y 12 %. Además, se observó un fuerte componente estacional en ambos patógenos, con aislamientos más frecuentes en primavera (después de la poda) que en invierno (después de la pre poda). El resto de especies patógenas no mostró este comportamiento estacional tan marcado, y las frecuencias de aislamiento se situaron habitualmente por debajo del 3 %. Los resultados obtenidos sugieren que efectuar la poda en los meses de invierno, como es tradicional en la zona del Penedés estudiada, aumenta el riesgo de infección por hongos patógenos causantes de enfermedades de la madera. Por ello, desde el punto de vista fitopatológico, sería aconsejable adelantar la poda en lo posible.

Financiado por el proyecto INIA RTA2010-00009-C03 y FEDER. G. Elena recibe financiación de INIA para la realización de su tesis doctoral.

SIM-40

DETECCIÓN DE *Ilyonectria* spp. CAUSANTES DEL PIE NEGRO DE LA VID EN EL PROCESO DE PRODUCCIÓN DE PLANTA INJERTADA EN VIVEROS

Agustí-Brisach, C.¹, Gramaje, D.², García-Jiménez J.¹, Armengol, J.¹

¹Instituto Agroforestal Mediterráneo, UPV, Camino de Vera s/n, 46022-Valencia, ²Dpto. de Protección de Cultivos, Instituto de Agricultura Sostenible (IAS), Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), Alameda del Obispo s/n, 14080 Córdoba. E-mail: caragbri@upvnet.upv.es

Durante el año 2010 se muestrearon dos viveros comerciales de producción de plantas de vid. Periódicamente, se tomaron muestras de tijeras de poda y de máquinas de injerto mediante lavado con agua con Tween 20 al 0,2%. También se recogieron muestras de agua de las balsas de hidratación y de la turba utilizada para formación del callo basal e inducción de raíces. Las muestras se analizaron mediante “nested-multiplex PCR” usando tres pares de cebadores específicos para *Ilyonectria* spp. (Mac1/MaPa2, Lir1/Lir2 y Pau1/MaPa2). En todas las fases del proceso viverístico se detectó la presencia de *Ilyonectria liriodendri* e *I. macrodidyma*-complex, siendo *I. macrodidyma*-complex la más frecuente. Posteriormente, en cada uno de los viveros se analizaron 10 plantas de 5 combinaciones distintas de patrón/variedad, tanto inmediatamente antes de su plantación en campos de enraizamiento, como tras finalizar la fase de enraizamiento en campo. Para ello se realizaron aislamientos de raíces en medio de cultivo PDAS, identificando los cultivos de *Ilyonectria* obtenidos morfológicamente y mediante la secuenciación del gen de la histona H3. Las raíces también se analizaron mediante “nested-multiplex PCR”, usando los cebadores descritos anteriormente. Tanto en las plantas analizadas inmediatamente antes de su plantación como en las analizadas al finalizar la fase de enraizamiento, se detectó la presencia de las especies *I. liriodendri*, *I. novozelandica* e *I. torresensis*, siendo *I. novozelandica* la más frecuente. En cuanto al análisis mediante “nested-multiplex PCR”, se detectó *I. liriodendri* e *I. macrodidyma*-complex en los dos momentos de muestreo. El uso de “nested-multiplex PCR” incrementó la detección de *Ilyonectria* spp. en raíces en comparación con el aislamiento convencional en PDAS. Con ambas técnicas de análisis se determinó una mayor incidencia de *Ilyonectria* spp. tras la fase de enraizamiento en campo. Estos resultados demuestran que las balsas de hidratación, las tijeras, las máquinas injertadoras y la turba utilizada para la producción del callo basal en viveros son fuentes potenciales de inóculo de *Ilyonectria* spp., y confirman que el material vegetal presenta niveles elevados de infección por estos patógenos. Financiado por el proyecto RTA2010-00009-C03-03 (INIA), cofinanciado con fondos FEDER (EU).

SIM-41

EVALUACIÓN DE LA DISPERSIÓN, INCIDENCIA Y SEVERIDAD DEL MOTEADO DEL NÍSPERO (*Fusicladium eriobotryae*) EN UNA PARCELA COMERCIAL

González-Domínguez, E.¹, Michereff, S.², Armengol, J.¹, Miñana, A.¹, Quintanilla, P.¹, García-Jiménez, J.¹

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

²Universidade Federal Rural de Pernambuco, 52171-900 Recife, Pernambuco, Brasil. Email: elgondo1@upvnet.upv.es

España es el segundo productor mundial de níspero y el primer país exportador. La principal enfermedad asociada al cultivo es el moteado del níspero causado por *Fusicladium eriobotryae*. A pesar de la importancia de la enfermedad sobre la pérdida de cosecha, no existen estudios específicos acerca de la epidemiología de *F. eriobotryae*. Por ello, el objetivo de este trabajo fue evaluar la concentración de esporas de *F. eriobotryae* en aire y agua de lluvia, así como la incidencia y severidad de la enfermedad sobre frutos de níspero. El seguimiento de todos los parámetros se realizó en una parcela experimental de la Cooperativa Agrícola de Callosa d'En Sarrià durante los meses de Enero a Mayo de los años 2011 y 2012. Para evaluar la concentración de esporas en aire se colocaron capturadores verticales y horizontales. Los primeros constaban de cuatro portaobjetos colocados en las cuatro direcciones cardinales, situándose entre dos árboles. Los capturadores horizontales constaban de dos portaobjetos colocados debajo de los árboles. En ambos casos los portaobjetos se cambiaban semanalmente. Para el seguimiento de conidios de *F. eriobotryae* en agua de lluvia se colocaron botellas con embudos debajo de los árboles, las cuales se cambiaron dos veces por semana. Además, en 50 árboles de la misma parcela se realizó un seguimiento de la incidencia de la enfermedad, evaluándose semanalmente el porcentaje de frutos con síntomas (4 ramas/árbol). Finalmente, la severidad fue evaluada semanalmente en 10 árboles (4 ramas/árbol), utilizando una escala diagramática para conocer el porcentaje de fruto con síntomas. Las principales variables climáticas fueron registradas con una estación meteorológica colocada en la parcela. Los resultados obtenidos muestran cómo la dispersión de los conidios va asociada preferentemente a los eventos de lluvia. La incidencia final alcanzada fue mucho más baja en el año 2011 (29,41%) que en el 2012 (96,64%) debido a la menor cantidad de inóculo inicial en la parcela. Lo mismo ocurrió con la severidad; en el primer año la media fue inferior al 10%, mientras que en el segundo alcanzó valores del 33%. Los datos recogidos durante estos dos años servirán para complementar un modelo epidemiológico de la enfermedad.

Este estudio ha sido financiado por la Cooperativa Agrícola de Callosa d'En Sarrià.

SIM-42

EVOLUCION DE LAS ESPECIES DE *Monilinia* spp. EN TRES HUERTOS DE MELOCOTONEROS DEL VALLE DEL EBRO TRAS LA INTRODUCCIÓN DEL PATÓGENO DE CUARENTENA *Monilinia fructicola*

Villarino M.¹, Melgarejo, P.¹, Morales, M.T.¹, Castillo, R.¹, Egüen, B.¹, Lamarca, N.², Casals, C.², Segarra, J.³, Usall, J.², De Cal, A.¹

¹Departamento de Protección Vegetal, INIA, Carretera de La Coruña km 7, 28040 Madrid. ²Program de Postcosecha, XaRTA, 191 Rovira Roure Ave., 25198 Lleida. ³Departamento de Producción Vegetal y Ciencias Forestales, Universidad de Lleida, 191 Rovira Roure Ave., 25198 Lleida. Email: cal@inia.es

La podredumbre parda causada por *Monilinia* spp. es una de las enfermedades más importantes de los frutales de hueso. 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 *Monilinia laxa* y *Monilinia fructigena*. Sin embargo, recientemente se ha detectado en algunos huertos del Valle del Ebro la especie *Monilinia fructicola* que está incluida en la lista de enfermedades de cuarentena de la Unión Europea y que hasta el momento estaba ausente. Hasta que apareció *M. fructicola* en España, 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%).

La presencia de *M. fructicola* nos ha llevado a estudiar la evolución de la distribución de las tres especies a lo largo de los últimos años y su relación con las condiciones climáticas y la incidencia de la podredumbre el Valle del Ebro. Se estimó el porcentaje de cada una de las especies de *Monilinia* sobre las momias del árbol y del suelo, ramas de poda, infecciones latentes de flores y frutos, y sobre frutos en postcosecha en 16 ensayos llevados a cabo en cuatro huertos durante seis años. Las especies de *Monilinia* eran identificadas mediante métodos morfológicos y/o moleculares. Los datos de los porcentajes de cada especie fueron analizados mediante un modelo lineal generalizado, análisis de correlación y de regresión.

Se está produciendo un incremento significativo de *M. fructicola* a lo largo de los años en detrimento de las otras dos especies. El porcentaje de *M. laxa* comenzó a disminuir de forma significativa desde 2008, a la vez que aumentaba la de *M. fructicola*, especialmente sobre los frutos de postcosecha y las infecciones latentes de los frutos en precosecha. Por el contrario la presencia de *M. fructigena* dejó de detectarse en los huertos estudiados a partir de 2008. El porcentaje de *M. fructicola* está correlacionada con temperaturas elevadas y menores periodos de humectación.

SIM-43

PRESENCIA Y VIABILIDAD DE *Monilinia* spp. EN LOS FRUTOS MOMIFICADOS

Casals, C.¹, Segarra, J.², de Cal, A.³, Lamarca, N.¹, Usall, J.¹

¹IRTA, XaRTA-Postcollita, Av. Rovira Roure 191, 25198-Lleida. E-mail: josep.usall@irta.cat

²Universitat de Lleida. Departament de Producció Vegetal i Ciència Forestal, Escola Tècnica Superior d'Enginyeria Agrària, Av. Rovira Roure, 191, 25198 Lleida.

³INIA, Carretera la Coruña Km 7, 28040-Madrid

Durante el período hibernal en los campos de fruta de hueso, *Monilinia* spp. permanece en los tejidos infectados de los árboles y del suelo, entre ellos, los frutos momificados, que han sido descritos como la principal fuente de inóculo primario. No obstante, para que este inóculo incida en las pérdidas de producción de la fruta de hueso causadas por la podredumbre marrón, las conidias tienen que sobrevivir el invierno y además se tienen que dar las condiciones climatológicas adecuadas para la esporulación del hongo.

En nuestro trabajo se han muestreado y evaluado los frutos momificados localizados en el árbol y en el suelo, a lo largo de 3 campañas y de 3 campos, para así determinar el porcentaje de frutos momificados con presencia de conidias y su viabilidad. Además, el número de conidias y su porcentaje de germinación también se cuantificaron tanto en los frutos momificados del árbol como del suelo.

Se detectó en todos los campos y a lo largo de toda la campaña, presencia de conidias de *Monilinia* spp. en los frutos momificados ubicados en el árbol. En cambio, la presencia de conidias viables en estas mismas momias del árbol fue inferior y en Octubre ya no se observaron.

Para los frutos momificados ubicados en el suelo, la presencia de conidias y su viabilidad fue inferior en comparación con las momias del árbol y los valores disminuyeron más rápido llegando a los valores mínimos en Septiembre.

En general, el número de conidias después del invierno observado en los frutos momificados del árbol disminuyeron lentamente desde 1×10^6 a 1×10^4 conidias/momia desde Noviembre a Septiembre. En cambio, los valores registrados para las momias del suelo fueron nulos ya en Junio.

En general, la lluvia y la humedad relativa se correlacionaron con la presencia de conidias en los frutos momificados y en su viabilidad.

El conocimiento de las dinámicas que siguen las conidias de *Monilinia* spp. en relación a su presencia y su viabilidad en los frutos momificados que han invernado en los campos de fruta de hueso, ayudará a entender la epidemiología de la enfermedad causada por *Monilinia* spp. siendo una herramienta muy importante para el manejo del desarrollo de la enfermedad.

SIM-44

ANÁLISIS ESPACIAL DE LAS EPIDEMIAS DE LA PODREDUMBRE PARDA DEL MELOCOTONERO CAUSADO POR *Monilinia* spp.

Segarra, J.¹, De Cal, A.³, Lamarca, N.², Casals, C.², Usall, J.²

¹*Departament de Producció Vegetal i Ciència Forestal, Universitat de Lleida, Escola Tècnica Superior d'Enginyeria Agrària, Av. Alcalde Rovira Roure, 191, 25198 Lleida. E-mail: segarra@pvcf.udl.cat.*

²*Postcollita-XaRTA, Centre IRTA de Lleida, Av. Alcalde Rovira Roure, 191, 25198 Lleida, E-mail: josep.usall@irta.cat.*

³*Departamento de Protección Vegetal, INIA, Carretera de La Coruña Km7, 28040 Madrid, E-mail: cal@inia.es*

La podredumbre parda del melocotonero y nectarino causada por *Monilinia* spp. provoca graves pérdidas económicas. El control de la enfermedad se basa en la retirada durante la poda de las principales fuentes de inóculo primario, las momias y los chancros de los árboles, y la aplicación sistemática de tratamientos fungicidas principalmente durante la floración y al final del período de cultivo que corresponde con los períodos de mayor susceptibilidad del cultivo.

Desde el año 2006 se estudia en diferentes campos comerciales de la zona frutícola de Lleida la dinámica de la enfermedad, la cantidad de inóculo aéreo, la incidencia de las infecciones latentes y las fuentes de inóculo primario. El análisis de los datos pone de manifiesto que la enfermedad no se presenta de forma uniforme en los campos sino de forma agregada con lo cual hace necesario tener en cuenta la dimensión espacial de la enfermedad para comprender las epidemias que se desarrollan en campo. Para poder evaluar la distribución espacial de la enfermedad en cada huerto se eligieron aleatoriamente 30 árboles los cuales se muestrearon periódicamente durante 6 años la incidencia de la enfermedad.

En el presente trabajo se caracteriza la distribución espacial de la enfermedad mediante índices de dispersión y la distribución de frecuencias del número de frutos podridos observados en cada uno de los 30 árboles/campo muestreados. Por último se realiza un análisis de autocorrelación espacial y se ajustan distintos modelos estadísticos a los semivariogramas obtenidos para distintas epidemias. Dichos análisis permiten obtener el rango, es decir, la distancia a partir de la cual la incidencia de la enfermedad es independiente espacialmente. El rango obtenido varió según huerto y año desde 4 hasta 20 metros. Dicho parámetro tiene un gran interés epidemiológico y permite inferir la distancia de dispersión del patógeno en condiciones naturales.

Sesión simultánea 7
Control II

SIM-45

EFFECTO DEL TRATAMIENTO CON ÁCIDO SALICÍLICO EN LA FISIOLÓGÍA Y EN LA RESISTENCIA DEL TOMATE A *Virus X de la patata* (PVX)

Falcioni T.¹, Ferrio J.P.¹, Cueto-Ginzo A.¹, Giné J.², Achón M.A.¹, Medina V.¹

¹*Departament de Producció Vegetal i Ciència Forestal, Universitat de Lleida, Avda. Rovira Roure 191, 25198, Lleida.*

²*Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentàries (IRTA), Avda. Alcalde Rovira Roure, 191, 25198 Lleida*

El ácido salicílico (SA) es un inductor de resistencia sistémica adquirida (SAR). Varios estudios han demostrado que SA podría ser un candidato potencial para el control de virosis en plantas. El *virus X de la patata* (*Potato virus X*, PVX), miembro tipo de la familia *Potexvirus*, es un patógeno que induce mosaico suave en tomate. La aparición de virosis emergentes, inducidas por infecciones simples o mixtas con virus como PVX, explica en parte que, actualmente, las virosis se hayan convertido en el primer factor limitante en la producción de productos hortícolas, particularmente el tomate.

En este trabajo se estudió el efecto de la aplicación exógena de diferentes dosis de SA sobre plantas de tomate sanas e inoculadas con PVX. Se analizaron los efectos de SA en los distintos parámetros fisiológicos, la activación del metabolismo secundario, la acumulación viral, y la elicitación de proteínas de la patogenicidad como β -1,3-glucanasas (PR-2) y quitinasas (PR-3).

El tratamiento con SA retrasa la replicación viral en plantas de tomate inoculadas con PVX. Sin embargo, el efecto de este tratamiento es reducido en los parámetros fisiológicos analizados, con excepción de la composición isotópica de oxígeno $\delta^{18}\text{O}$. No obstante, se constata una mayor expresión de PR-2, acompañada de una mayor activación de la fenilalanina amonio liasa (PAL) y cambios elevados en la concentración de compuestos antioxidantes a las 168 horas del tratamiento. La expresión de PR-3 es más temprana que la de PR-2.

Los resultados obtenidos en este estudio confirman que SA induce cambios importantes en la resistencia en tomate y sugieren que el tratamiento exógeno con SA podría utilizarse para el control de infecciones asociadas con PVX.

Este trabajo ha sido financiado por el proyecto del Ministerio de Ciencia e Innovación (MICINN), actual Ministerio de Economía y Competitividad (MEC) (AGL AGL2010-15691) y por el programa IMPULS de la Universitat de Lleida (UdL)

SIM-46

FO47 INDUCE RESPUESTAS DEFENSIVAS EN *Capsicum annuum* Y REDUCE LA VERTICILIOSIS

Veloso, J.¹, Olivain, C.², Cordier, C.², Pastor, V.³, Alabouvette, C.², Flors, V.³,
Díaz, J.¹

¹*Departamento de Biología Animal, Biología Vegetal e Ecología. Universidade da Coruña. Campus da Zapateira s/n 15071 A Coruña, España. Email: josefv@udc.es*

²*INRA – UMR MSE, Dijon, Francia.*

³*Departament de Ciències Agràries i del Medi Natural, Universitat Jaume I, Castellón, España.*

Fusarium oxysporum Fo47 es un agente de control biológico que fue aislado de un suelo supresivo frente a la fusariosis en Châteaurenard (Francia), y su eficacia contra cepas patógenas de *Fusarium* ha sido demostrada en tomate y otras plantas. En el presente trabajo se ha comprobado que Fo47 también muestra un buen efecto protector en pimiento frente a *Verticillium dahliae*. Para estudiar la interacción de ambos hongos *in vivo* se transformaron Fo47 y *Verticillium dahliae* de modo que expresaran las proteínas fluorescentes GFP y DsRed. El análisis por microscopía confocal de las plantas inducidas con Fo47 y/o inoculadas con *Verticillium dahliae*, demostró que Fo47 inhibe el crecimiento del patógeno en la superficie de las raíces. Análisis de qPCR mostraron que Fo47 induce varios genes relacionados con la respuesta defensiva en pimiento, como *CASC1* (que codifica para una sesquiterpeno ciclasa, responsable de la síntesis de la fitoalexina capsidiol), *CABGLU* (una β -1,3-glucanasa) y *CACHI2* (una quitinasa). Ensayos de microarrays mostraron que Fo47 también induce la expresión de genes implicados en la reorganización de la pared y en la señalización por fitohormonas, particularmente el etileno. Además, mediante HPLC-MS se comprobó que Fo47 indujo en la planta un incremento en los fenoles solubles, así como variaciones en los niveles de salicilatos y jasmonatos. El mecanismo por el que Fo47 protege a la planta se debe a una combinación de efectos directos sobre el patógeno y a una inducción de respuestas en la planta.

Este trabajo ha sido parcialmente financiado por la Xunta de Galicia (PGDIT01AGR10301PR y 10MRU103009PR) y el INIA (RTA2007-00062-C02-02, cofinanciado con fondos FEDER de la EU).

SIM-47

RESISTENCIA A FUNGICIDAS Y FITNESS DE LA POBLACIÓN DE *Monilinia* spp. EN HUERTOS DE MELOCOTONERO DEL VALLE DEL EBRO

Egüen, B., Melgarejo, P., De Cal, A.

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

La podredumbre parda es una enfermedad causada por *Monilinia* spp. que ocasiona importantes pérdidas en frutales de hueso. Tradicionalmente se identificó a los agentes causales de la enfermedad en España como *M. laxa* y *M. fructigena*; en 2006, sin embargo, se detectó de manera aislada la presencia de una tercera especie, *M. fructicola*, en huertos del Valle del Ebro. *M. fructicola* se encuentra en la lista EPPO-A2 de organismos de cuarentena.

Esta especie presenta un alto potencial de desarrollo de resistencia a bencimidazoles, dicarboximidas y triazoles y son frecuentes las poblaciones resistentes en aquellos países donde esta especie se establece a largo plazo. Hasta el año 2006, no se había detectado ningún aislado resistente de *M. laxa* o *M. fructigena* en España.

Se estudió la resistencia a bencimidazoles (metiltiofanato), dicarboximidas (iprodiona) y triazoles (ciproconazol) de aislados de campo de *M. laxa* y *M. fructicola* a partir de 2006, año en que se detecta por primera vez la especie de cuarentena *M. fructicola*. Se realizó un ensayo de sensibilidad in vitro para caracterizar un total de 1.327 aislados de los años 2006, 2007, 2008, 2009 y 2010 frente a los tres fungicidas. La frecuencia de distribución de la resistencia a metiltiofanato presentó un perfil de tipo cualitativo para ambas especies, coincidente con un tipo de resistencia monogénica, sin diferencias significativas entre los años estudiados en el caso de *M. fructicola* y con una gradual evolución hacia poblaciones más resistentes en *M. laxa*. Las tasas de crecimiento relativo intermedias sobre iprodiona en las dos especies fueron las propias de un tipo de resistencia cuantitativa o multigénica. Ningún aislado de *M. laxa* fue resistente a ciproconazol, sin embargo, la resistencia a este fungicida fue detectada por primera vez en la población de *M. fructicola* en 2010.

Una vez caracterizada la población, se realizaron ensayos de fitness sobre los diferentes fenotipos mediante inoculaciones in vitro en flor y fruto, así como a través de bioensayos de competencia y recuperación en medio selectivo. En *M. fructicola* los resultados no mostraron diferencias significativas entre fenotipos en cuanto a la duración de los periodos de incubación y latencia en los procesos de infección, sin embargo el fenotipo $M^R I^S CPZ^S$ resultó significativamente más competitivo. El fenotipo $M^R I^S CPZ^S$ de *M. laxa* demostró mayor fitness que los demás, con inferiores periodos de incubación y latencia.

La evolución temporal de las poblaciones hacia fenotipos multirresistentes ($M^R I^R CPZ^S$ es el fenotipo mayoritario de *M. laxa* y *M. fructicola* a partir de 2007) plantea dificultades en el control de la enfermedad, máxime tras la aparición del fenotipo triple resistente ($M^R I^R CPZ^R$) en *M. fructicola* a partir de 2010.

SIM-48

CONTROL DEL VIRUS DE LA SHARKA MEDIANTE TRATAMIENTOS CON ACEITES MINERALES EN DIFERENTES ESCENARIOS ECOLÓGICOS

Vidal, E.¹, Zagrai, L.², Milusheva, S.³, Bozhkova, V.³, Tasheva-Terzieva, E.⁴, Kamenova, I.⁵, Zagrai, I.², Cambra, M.^{1*}

¹*Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA), Ctra. Moncada a Náquera km 5, 46113 Moncada, Valencia. E-mail: mcambra@ivia.es*

²*Fruit Research & Development Station Bistrita, Drumul Dumitrei Nou Street, no. 3, 420127 Bistrita, Romania.*

³*Fruit Growing Institute, Ostromila 12 str., 4004 Plovdiv, Bulgaria.*

⁴*Department of Zoology and Antropology, Faculty of Biology, Sofia University "St. Kliment Ohridski", 8 Dragan Tsankov Blvd., 1164 Sofia, Bulgaria.*

⁵*AgroBioInstitute, 8 Dragan Tsankov Blvd., 1164 Sofia, Bulgaria.*

Los tratamientos basados en la aplicación de aceites minerales se han citado como posible estrategia de control del virus de la sharka (*Plum pox virus*, PPV) en viveros de frutales de hueso. Se ha evaluado, durante dos períodos vegetativos como mínimo, el efecto de los tratamientos con aceite mineral hortícola Sunspray Ultrafine (1%) sobre la dispersión natural del virus de la sharka en bloques de plantas de vivero de los patrones Nemaquard y Mariana GF8-1. Así, se establecieron tres parcelas experimentales en tres zona ecológicas diferentes y con una elevada fuente de inóculo en todas ellas de los aislados de PPV más prevalentes: Plovdiv, Bulgaria (PPV-M y Rec); Bistrita, Rumania (PPV-D y Rec); Llíria, España (PPV-D). Los tratamientos fueron aplicados semanalmente durante el período vegetativo, aunque fueron interrumpidos en verano. Las plantas fueron analizadas anualmente mediante ELISA-DAS utilizando el anticuerpo monoclonal 5B-IVIA (Plant Print Diagnóstico). La dinámica poblacional de los pulgones presentes en las diferentes parcelas fue monitorizada mediante trampas amarillas de Moericke y mediante el método del brote pegajoso. En todas las parcelas experimentales el pico poblacional de pulgones se estableció en primavera. El uso del aceite mineral hortícola redujo significativamente ($p < 0.05$) la incidencia de PPV en las tres parcelas experimentales, así como en los dos patrones estudiados. Sin embargo, no consiguió prevenir totalmente la infección, quizás debido a la alta prevalencia de PPV en las tres zonas experimentales. El control de PPV en bloques de plantas de vivero basado en el uso de tratamientos con aceites minerales hortícolas, se sugiere como una estrategia de control de la enfermedad compatible con el medio ambiente debido a su modo físico de acción.

DEFENSA Y CONTRA DEFENSA FRENTE AL VIRUS DEL MOSAICO DEL PEPINO (CMV) EN MELÓN

Martín-Hernández, A.M.¹, Monforte, A.J.², Gyetvai, G.¹, Correa, R.¹, Guiu, C.¹, Garcia-Mas, J.¹

¹CIRAG –Centro de Investigación en Agrigenómica (CSIC-IRTA-UAB-UB), Campus UAB, Bellaterra (Cerdanyola del Vallés), 08193 Barcelona, Spain. E-mail:montse.martin@irta.es. ² Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas (IBMCP)(CSIC-UPV) Ingeniero Fausto Elio, s/n CPI “Ciudad Politécnica de la Innovación”- Edificio 8E, 46022 Valencia, Spain.

La resistencia al virus del Mosaico del Pepino (CMV) en el melón coreano Sonwang Charmi”, PI161375 (PI) ha sido descrita como oligogénica y recesiva, con varios genes actuando de manera cuantitativa (QTLs) frente a varias cepas. Sin embargo, el gen *cmv1* por si mismo es capaz de conferir resistencia total a las cepas P9, P104.82 y LS, mientras que las cepas M6, TL y FNY sobrepasan esta resistencia. Dado que el melón PI es resistente a estas cepas, debe haber en su genoma otro u otros genes que confieran resistencia frente a éstas. Disponemos en el laboratorio de dos poblaciones obtenidas entre el melón español “Piel de Sapo” (PS), susceptible a CMV, y el melón PI161375. En la colección de líneas casi isogénicas (NILs) cada línea contiene un fragmento del genoma de PI en el fondo genético de PS, de manera que la colección completa contiene todo el genoma de PI. En la colección de líneas doble haploides (LDH), la mitad del genoma pertenece a un parental y la mitad al otro. De esta manera, si se requiere más de un gen, habrá algunas líneas que resultarán resistentes. Se realizó un ensayo inoculando toda la colección de NILs con la cepa M6, observándose que ninguna era resistente, lo que indica que la resistencia requiere más de un gen. Para comprobarlo realizamos el mismo screening en nuestra colección de 69 LDHs. Un análisis de QTLs mostró que había tres QTLs implicados y uno de ellos era el propio *cmv1*. Los otros dos se localizaban en los grupos de ligamiento X (*cmv2*) y III (*cmv3*) . Además, se necesitan los tres para producir la resistencia total. Actualmente estamos generando las poblaciones encaminadas al mapeo fino y clonaje de los QTLs *cmv2* y *cmv3*. El gen *cmv1* está en proceso de ser clonado y se encuentra en un intervalo de 140Kb.

La resistencia a CMV en melón está compuesta, por tanto, de varios niveles: en un primer nivel, un gen, *cmv1*, es suficiente para conferir resistencia total a algunas cepas. Sin embargo, otras cepas serían capaces de interactuar con *cmv1* para producir una infección sistémica si otros dos genes, *CMV2* y *CMV3* están presentes. En un segundo nivel, para producir resistencia a estas cepas, el alelo mutante de estos dos genes, *cmv2* y *cmv3*, debe estar presente, de manera que hacen falta los alelos mutantes de tres genes conjuntamente para producir resistencia total.

SIM-50

ESTRATEGIAS DE REDUCCIÓN DE COBRE PARA EL CONTROL DEL REPILO DEL OLIVO CAUSADO POR *Fusicladium oleagineum*

Roca, L.F., Romero, J., Trapero, A.

Dpto. Agronomía (Patología Agroforestal), Universidad de Córdoba. Campus de Rabanales, Edificio C-4, 14071, Córdoba. E-mail: ag3rocal@uco.es

El Repilo del olivo, causado por el hongo *Fusicladium oleagineum* es una enfermedad extendida por todas las zonas olivareras del mundo, originando defoliación y debilitamiento de los árboles afectados. El manejo de esta enfermedad se basa en el uso de fungicidas, principalmente productos cúpricos, debido a su eficacia y elevada persistencia. Parece probable la imposición de una limitación en la cantidad de cobre aplicado por hectárea y año a corto o medio plazo, fruto de la revisión actual de la normativa comunitaria relativa al uso de fitosanitarios. Por ello se planteó el presente trabajo de investigación, cuyo objetivo fue evaluar distintas estrategias de aplicación de los productos cúpricos, fundamentalmente en relación a dosis y mezclas con otras materias activas, uso de productos de bajo contenido en cobre, inductores de resistencia y productos biológicos para el control del Repilo. Se llevaron a cabo dos experimentos en campo, sobre olivos adultos del cultivar Picual, en una finca con alta incidencia de la enfermedad. Los tratamientos se realizaron en otoño, invierno y primavera, durante dos años consecutivos, siguiendo los criterios del modelo epidemiológico “Repilos”. La evaluación de la enfermedad se realizó atendiendo a los parámetros de incidencia y severidad, a partir de los cuales se calculó un índice de enfermedad porcentual. La reducción de la dosis de cobre en los tratamientos con oxiclورو de cobre en otoño y primavera, así como la mezcla de dicha materia activa, también a dosis reducidas, con tebuconazol o kresoxim-metil permitieron un control satisfactorio de la enfermedad, con valores del Índice de enfermedad inferiores al 10% en todos los casos y con una cantidad total de cobre aplicado de 3,2 y 2 kg por ha y año, respectivamente, lo que supuso una reducción del 44 y 65%, en comparación con el tratamiento convencional con oxiclورو de cobre a dosis normal en los tres tratamientos anuales. El valor del Índice de enfermedad en los tratamientos con los inductores de resistencia, los productos biológicos comerciales a base de extractos de cítricos y los productos con bajo contenido en cobre osciló entre el 26 y el 79%, no logrando por tanto un adecuado control de la enfermedad, a pesar de que las aplicaciones se realizaron en los momentos idóneos según el modelo epidemiológico “Repilos”.

SIM-51

LA INSERCIÓN DE LOS GENES *copG* Y *czcCBA* EN EL OPERON *copABCD* DE *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, INCREMENTAN LA RESISTENCIA A COBRE

Gutiérrez-Barranquero, J.A.¹, Cazorla, F.M.¹, de Vicente, A.¹, Sundin, G.W.²

¹*Departamento de Microbiología, Universidad de Málaga, Instituto de Hortofruticultura Subtropical y Mediterránea "La Mayora" (IHSM-UMA-CSIC), Campus de Teatinos, 29071 Málaga. E-mail: jagutierrez@uma.es.*

²*Department of Plant Pathology, Center for Integrated Plant Systems, Michigan State University, East Lansing, MI 48824, USA.*

La secuenciación de plásmidos nativos de cepas de *Pseudomonas syringae*, ha revelado la presencia de un plásmido nativo conservado de 61,6 Kb en 2 cepas patógenas de *P. syringae* pv *syringae*, la cepa 6-9 aislada de cerezo en Michigan (USA) y la cepa UMAF0081 aislada de mango en Málaga (España). Este plásmido se caracteriza por la presencia de una novedosa estructura, donde el gen *copG* y los genes *czcCBA* se encuentran insertados en el operón *copABCD*, involucrado en la resistencia a cobre. En este trabajo, se ha estudiado la base genética de la resistencia a cobre y a otros metales pesados potencialmente detoxificados por el sistema *czcCBA* en catorce cepas *P. syringae* pv. *syringae* (Pss), dos cepas de diferentes patovares de *P. syringae* y una cepa de la especie *Pseudomonas fluorescens*. El análisis de la secuencia de los genes *czc* del plásmido (pCzc) ha revelado que estos genes eran diferentes en homología e identidad a los genes *czc* cromosómicos presentes en los genomas de otras cepas *P. syringae* previamente secuenciadas. El análisis filogenético llevado a cabo usando dos genes de housekeeping (*gyrB* y *rpoD*) y usando los genes *czc* (crCzc y pCzc) reveló una distribución filogenética diferente de los genes pCzc en comparación con la historia evolutiva natural de *P. syringae* pv. *syringae*. Para conocer el papel que estos nuevos genes (pCzc y *copG*) en la resistencia cobre u otros metales pesados se llevó a cabo el análisis de la concentración mínima inhibitoria para cada uno de los diferentes metales pesados. Los resultados obtenidos mostraron que estos genes presentaban un papel en la detoxificación del cobre. Para confirmar estos resultados, se llevó a cabo una curva de crecimiento en medio mínimo (MG) suplementado con cobre, confirmando la implicación de estos genes de la detoxificación de cobre. Este estudio se ha demostrado la presencia de una novedosa estructura genética del operón *copABCD* presente en un plásmido nativo conservado, y el papel de los nuevos genes (pCzc y *copG*) asociados al operón *copABCD* en el aumento de la resistencia a cobre.

Este trabajo ha sido financiado por fondos CICE-Junta de Andalucía, ayudas Grupo PAIDI AGR-169 e Incentivos a Proyecto de Excelencia (P07-AGR-02471), cofinanciado con fondos FEDER (EU).

Sesión simultánea 8
Interacciones planta-virus I

SIM-52

IMPLICACIÓN DE LAS OXILIPINAS EN LA MANIFESTACIÓN DE LA NECROSIS SISTÉMICA INDUCIDA POR UNA INFECCIÓN VIRAL COMPATIBLE

Pacheco, R., García-Marcos, A., Manzano, A., Tenllado, F.

Departamento de Biología Medioambiental, Centro de Investigaciones Biológicas, CSIC, Ramiro de Maeztu 9, 28040, Madrid. E-mail: tenllado@cib.csic.es

Evidencias recientes muestran que la muerte celular programada (PCD) está implicada en la manifestación de necrosis sistémica (NS), una sintomatología extrema producida en interacciones planta-virus compatibles que comparte rasgos comunes con la respuesta hipersensible (HR). Entre los factores reguladores de la HR se encuentran las oxilipinas, un conjunto de ácidos grasos oxigenados, entre los que se encuentra el ácido jasmónico (JA), con un papel en procesos de PCD inducidos por hongos y bacterias fitopatógenas. Estudios previos de perfiles de expresión indicaron la alteración de algunos genes de la ruta de biosíntesis de oxilipinas en interacciones virales tanto compatibles como incompatibles.

En el presente trabajo, plantas de *Nicotiana benthamiana* infectadas por PVX/HC-Pro, una quimera viral del virus X de la patata expresando la proteína HC-Pro del virus de la sharka, fueron tratadas con MeJA. Se observó un aumento en la NS inducida por la infección viral que correlacionó con un incremento en la acumulación del mRNA 9-Lipoxigenasa (9-LOX). Se realizaron análisis de pérdida de función de genes de biosíntesis (9-LOX) y de percepción (COI1) de oxilipinas, mediante silenciamiento génico inducido por virus (VIGS). En el primer caso, se produjo un retraso y aminoración en la manifestación de la NS, documentada mediante la detección de liberación de iones, mientras que en plantas COI1 silenciadas se observó un aumento en la NS producida por la infección viral. Además, se silenció el gen SGT1, implicado en regulación de PCD en la HR frente a diversos patógenos, y relacionado con la señalización por JA por su asociación a complejos ligasa SCF (SKP1–Cullin–F-box). El silenciamiento de SGT1 inhibió la señalización por JA y resultó en un retraso en la aparición de la NS. Estos datos indican la implicación de las oxilipinas en la manifestación de NS en la infección compatible por PVX/HC-Pro, y apoyan la idea de que los procesos de PCD en infecciones virales compatibles e incompatibles comparten rasgos comunes.

Este trabajo ha sido financiado con fondos de la Convocatoria de Proyectos de Investigación Fundamental (BIO2009-10172) del MICINN y de un contrato JAE-Doc del CSIC.

IMPLICACIÓN DEL METABOLISMO PRIMARIO EN LA SUSCEPTIBILIDAD DE LAS PLANTAS A LA INFECCIÓN VIRAL: UNA VISIÓN TRANSCRIPTÓMICA, METABOLÓMICA Y FUNCIONAL

del Toro, F.J.¹, Fernández-Calvino, L.¹, Donaire, L.¹, Osorio, S.², Fernie, A.², Yu, A.³, Llave, C.¹

¹Dpto. Biología Medioambiental. Centro de Investigaciones Biológicas. CSIC. Ramiro de Maeztu 9, 28040-Madrid. cesarllave@cib.csic.es

²Max-Planck-Institut für Molekulare Pflanzenphysiologie, Potsdam-Golm, Germany.

³Unité Mixte de Recherche en Génomique Végétale. Institut National de la Recherche Agronomique 1165. CNRS 8114. UEVE, 91057 Evry Cedex. France.

Las plantas responden al ataque de patógenos modulando la expresión de sus propios genes, de los cuales un buen número controlan funciones diversas en el metabolismo primario. En este trabajo empleamos estrategias “ómicas” para estudiar de forma global alteraciones en el transcriptoma y metaboloma en la interacción compatible entre el *Virus del cascabeleo del tabaco* (TRV) y *Arabidopsis thaliana*. Nuestros resultados revelan un papel esencial del metabolismo primario durante el proceso infectivo, de tal modo que la planta reprograma su transcriptoma para garantizar la síntesis de nuevas moléculas y energía. El análisis de metabolitos muestra un aumento significativo de azúcares y polioles en el tejido infectado, aún cuando no se aprecia una expresión diferencial de genes relacionados con la síntesis y/o degradación del almidón, o de invertasas de pared celular que pudieran explicar su incremento. La abundancia de azúcares sí explica la represión de genes de fotosíntesis y biosíntesis de clorofila observada en hojas infectadas. Sin embargo, el contenido de clorofila es similar en plantas infectadas y sanas, lo que sugiere que está regulación negativa no compromete la actividad fotosintética durante la infección. Nuestros resultados sugieren alteraciones en el metabolismo de proteínas orientadas a la represión de la biosíntesis y la inducción de la ruta de degradación por el proteosoma. Este hecho concuerda con la sobreacumulación de aminoácidos libres en el tejido infectado respecto al tejido sano. Dado que algunos de estos aminoácidos son glucogénicos, su acumulación podría favorecer la disponibilidad de sustrato para la gluconeogénesis y otras rutas generadoras de energía. Por ejemplo, los genes que codifican las enzimas glutamato deshidrogenasa 1 (GDH1) y α -ketoglutarato deshidrogenasa 1 (DIN4) se inducen significativamente en tejido infectado. Ambas enzimas participan en el catabolismo de aminoácidos para proporcionar intermediarios en el ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA). La inactivación genética de *DIN4* reduce la acumulación de TRV en plantas infectadas lo que sugiere que su inducción contribuye a aumentar la susceptibilidad de *Arabidopsis* a la infección por TRV.

Finalmente, nuestros resultados demuestran que las plantas infectadas eran más resistentes al estrés por congelación que las plantas control no infectadas, de acuerdo con la mayor acumulación de putrescina, espermidina y otros compuestos osmoprotectores en el tejido infectado por TRV.

SIM-54

LA UNIÓN A RNAs DE LA PROTEÍNA 2b DEL VIRUS DEL MOSAICO DEL PEPINO ES MÁS CRÍTICA PARA SU FUNCIÓN SUPRESORA DEL SILENCIAMIENTO QUE LA LOCALIZACIÓN NUCLEAR

González, I.¹, Rakitina, D.², Semashko, M.², Taliansky, M.³, Praveen, S.⁴, Palukaitis, P.⁵, Carr, J.⁶, Kalinina, N.², Canto, T.¹

¹*Departamento de Biología Medioambiental, Centro de Investigaciones Biológicas (CIB-CSIC), Ramiro de Maeztu, 9, 28040 Madrid. E-mail: tomas.canto@cib.csic.es*

²*Moscow State University. Leninskye Gory 119991, Rusia.* ³*The James Hutton Institute. Invergowrie-Dundee DD2 5DA, Reino Unido.* ⁴*Indian Agricultural Research institute, Delhi 110-012, India.* ⁵*Seoul Women's University, Seoul, Korea.* ⁶*University of Cambridge, Cambridge, CB2 3EA, United Kingdom.*

En un trabajo de investigación anterior habíamos encontrado que la actividad supresora de la proteína 2b nativa del *virus del mosaico del pepino* (*Cucumber mosaic virus*, CMV) y las de una batería de seis mutantes correlacionaban tanto con la capacidad de unir RNAs pequeños de doble cadena (siRNAs) en vitro, como con su presencia nuclear/nucleolar en vivo (González et al., 2010. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 23, 294-303). En este trabajo hemos discriminado la contribución respectiva a la actividad supresora de la proteína 2b de: i) unión a RNAs pequeños frente a ii) localización nuclear. Para ello hemos caracterizado las cinéticas de unión *in vitro* de la proteína 2b nativa y de nueve mutantes diferentes a un siRNA, a un RNA de cadena sencilla (ss sRNA) y a un microRNA (miRNA). También hemos añadido una señal de exportación nuclear (nuclear export signal, NES) a la proteína 2b y determinado cómo afecta a su distribución subcelular y a su actividad supresora.

Hemos encontrado que, en solución, la proteína 2b nativa une siRNAs, miRNAs y ss sRNAs con una alta afinidad, a ratios molares proteína:RNA de ~2:1. De los cuatro mutantes de 2b con actividad supresora, tres mostraron perfiles de unión a RNAs pequeños similares a los de la proteína nativa, mientras que un cuarto unió ss RNAs a ratios molares 2:1, pero siRNAs con una afinidad 1.5-2 veces menor. Tres de los cinco mutantes que carecían de actividad supresora no pudieron unir RNAs pequeños en vitro a ningún ratio molar, mientras que el cuarto pudo hacerlo, pero a ratios muy elevados y el quinto unió eficazmente miRNAs y ss sRNAs pero no siRNAs. Proteína 2b marcada con NES se traslocó al citoplasma, pero su actividad supresora en "patch assays" locales no se alteró. Estos resultados apoyan que la capacidad de unir RNAs pequeños a ratios molares proteína:RNA en el entorno 2:1 es crítica para la actividad supresora de la proteína 2b. También demuestran que la proteína 2b citoplásmica tiene actividad supresora de silenciamiento y que su presencia permanente en el núcleo no se requiere para esta función (González et al., 2012. *RNA* 18, 771-782).

SIM-55

STRUCTURE, DIVERSITY AND SELECTION OF THE L RESISTANCE GENE TOWARDS TOBAMOVIRUS IN *Capsicum annuum* var. *aviculare* WILD POPULATIONS IN MEXICO

Poulicard, N.¹, González-Jara, P.¹, Fraile, A.¹, Piñero D.², García-Arenal, F.¹

¹*Centro de Biotecnología y Genómica de Plantas, Campus de Montegancedo, Universidad Politécnica de Madrid, Spain. E-mail: nils.poulicard@upm.es*

²*Departamento de Ecología Evolutiva, Instituto de Ecología, Universidad Nacional Autónoma de México, México.*

Host-pathogen co-evolution is at the root of important phenomena such as host switch and host range expansion, including the overcoming of host resistance. However, contrary to agroecosystems, evidences for plant-pathogen co-evolution in wild ecosystems are almost non-existent for plant viruses. Thus, we propose to use as a model system the wild pepper *Capsicum annuum* var. *aviculare* (chile chiltepin) which is considered as the wild ancestor of the domestic *C. annuum*. A large collection of samples representing wild chiltepin population in Mexico has been generated, and the infecting viruses have been characterised. Resistance to tobamoviruses in *Capsicum* spp. is controlled by alleles at the *L* locus. The *L* resistance gene has recently been cloned and characterised. This gene is a single-gene locus encoding a CC-NB-LRR protein which target the coat protein (CP) of tobamoviruses. This recognition initiates signalling pathways leading to resistance by hypersensitive response (HR).

First, the frequency of the *L* gene in wild chiltepins populations was assessed among different geographical regions, and then was compared with populations protected or cultivated by humans. A high frequency of this resistance gene was observed in wild populations (from 60% to 95%), which correlates with the observations of HR resistance to tobamovirus infection in wild environment. Interestingly, the *L* gene frequency in these populations is significantly higher than in the cultivated populations, which suggest that the pre-domestication of this species was not focused on the tobamoviruses resistance. Then, the analysis of more than 50 full-length *L* gene sequences showed an important variability, but also a strong geographical structuration of this gene in Mexico. In addition, several codons were detected under positive selection, mainly located in the domain involved in the tobamovirus CP recognition.

Altogether, these results suggest that the *L* resistant gene is target for selection, which could support the hypothesis of co-evolution between chiltepin populations and tobamoviruses in wild environment.

**LA PROTEÍNA P23 DEL VIRUS DE LA TRISTEZA DE LOS CÍTRICOS:
DISECCIÓN DETALLADA DE LOS DETERMINANTES DE
LOCALIZACIÓN NUCLEOLAR Y DE SU EFECTO SOBRE LA
SUPRESIÓN Y PATOGENESIS**

Ruiz-Ruiz, S.¹, Navarro, L.², Moreno, P.², Peña, L.², Flores, R.¹

¹Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas (UPV-CSIC), 46022 Valencia, España, ²Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias, Centro CPVyB, Moncada, 46113-Valencia, España

El silenciamiento mediado por RNA funciona en plantas y otros organismos eucarióticos como un mecanismo de defensa frente a infecciones virales. Para superar esta barrera, el virus de la tristeza de los cítricos (*Citrus tristeza virus*, CTV), género *Closterovirus*, codifica en su genoma tres proteínas supresoras del silenciamiento. Una de ellas, p23 (una proteína de unión a RNA de 209 aminoácidos con un dedo de Zn flanqueado por motivos básicos), actúa sólo intracelularmente en plantas de *N. benthamiana* y *N. tabacum*, une RNA de manera cooperativa y es un determinante de patogenicidad en cítricos. Considerando que la localización subcelular de p23 podría aportar información acerca de su función, en trabajos previos fusionamos la secuencia codificante de la proteína verde fluorescente (GFP) al extremo 3' del gen p23, y la proteína de fusión se expresó en *N. benthamiana* por agroinfiltración. El examen mediante microscopía láser confocal reveló su acumulación en el nucleolo y cuerpos de Cajal, así como en plasmodesmos, siendo estos resultados confirmados por la colocalización de p23-GFP con diversas proteínas marcadoras. Puesto que p23 contiene tres motivos ricos en aminoácidos básicos que pudieran ser reconocidos como señales de localización nucleolar (NoLS), se evaluó el efecto de delecionar éstos sobre la localización de p23. Los resultados confirmaron que las regiones flanqueadas por los aminoácidos 50-86 y 100-158 (la primera de ellas conteniendo el dedo de Zn y ambas con motivos básicos) forman la NoLS. Para diseccionar mejor estas señales se han obtenido 10 mutantes de sustitución por alanina de los aminoácidos básicos y de los que forman el dedo de zinc. En todos los casos, excepto en la sustitución del aminoácido H75, se perdió el patrón de localización nucleolar y en tres de ellos se observó además la presencia de grandes agregados nucleares que colocalizan con la fibrilarina (indicando por lo tanto una redistribución de esta proteína característica del nucleolo y cuerpos de Cajal). Actualmente estamos examinando si la localización de cada uno de los mutantes de sustitución de p23 está correlacionada con su actividad supresora y su capacidad de exacerbar la patogenicidad al ser expresada como un RNA subgenómico de PVX en *N. benthamiana*, puesto que en trabajos anteriores hemos observado que la expresión de p23 acentúa notablemente la patogenicidad de PVX, posiblemente por un efecto sinérgico con el supresor de silenciamiento de este virus.

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DEL DETERMINANTE GENÉTICO DEL VIRUS DEL BRONCEADO DEL TOMATE RESPONSABLE DE SUPERAR LA RESISTENCIA MEDIADA POR EL GEN SW-5

Peiró, A.¹, Cañizares, M.C.², López, C.³, Aramburu, J.⁴, Rubio, L.⁵, Prins, M.⁶, Resende, R.O.⁷, Moriones, E.², Sánchez-Navarro, J.A.¹

¹Instituto de Biología Molecular y Celular de plantas (CSIC-UPV). 46022 Valencia. E-mail: jesanche@ibmcp.upv.es. ²Instituto de Hortofruticultura Subtropical y Mediterránea "La Mayora" (IHSM-UMA-CSIC). 29750 Algarrobo-Costa, Málaga. ³Instituto de Conservación y Mejora de la Agrodiversidad Valenciana, (COMAV-UPV). 46022 Valencia. ⁴ Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentaries (IRTA). 08348 Barcelona. ⁵Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA). 46113 Moncada, Valencia. ⁶Laboratory of Virology, Wageningen University. 6709 PD Wageningen, The Netherlands. ⁷Departamento de Biologia Celular, Universidade de Brasília, 70910-900 Brasília, Distrito Federal, Brazil.

La introducción de cultivos resistentes al virus del bronceado del tomate (TSWV), basados en los genes Sw-5 y Tsw, se ha visto comprometida en los últimos años por la aparición de aislados que superan la resistencia. Recientemente, se ha comprobado mediante la comparación de secuencias de nucleótidos que la superación de la resistencia conferida por el gen Sw-5 podría estar asociada a la proteína de movimiento NSm de TSWV (López y col., 2011). Sin embargo, la ausencia de clones infectivos para TSWV ha condicionado la caracterización molecular del componente viral responsable de superar la resistencia. La proteína NSm pertenece a la familia 30K o grupo de 18 géneros virales cuyas proteínas de movimiento (MP) están relacionadas con la MP del virus del mosaico del tabaco (Melcher, 2000). La puesta a punto del sistema modelo basado en el virus del mosaico de la alfalfa (AMV) que permite el intercambio funcional de MPs de la familia 30K (Sánchez-Navarro y col., 2006), ha permitido caracterizar y/o comparar molecularmente las MPs de diferentes aislados del TSWV. En el presente trabajo hemos analizado tres genes NSm correspondientes al aislado silvestre (Gr1NL2-HM015513-) y a dos aislados que superan la resistencia mediada por Sw-5 (GRAU-FM163370- y Llo2TL3- HM015518-). Los resultados obtenidos han puesto de manifiesto que los tres genes NSm analizados son funcionalmente intercambiables por el gen de la MP de AMV. El análisis de la infectividad de las diferentes variantes químicas de AMV en tabaco y tomate, con o sin el gen Sw-5, ha permitido concluir que el gen NSm es el responsable de superar la resistencia mediada por el gen Sw-5. La expresión transitoria de los tres genes NSm en plantas de *Nicotiana benthamiana* que expresan constitutivamente el gen Sw-5, permitió reproducir la respuesta hipersensible solo con el gen NSm del aislado silvestre. La utilización de una variante del RNA 3 de AMV que expresa la GFP ha permitido comprobar que los foci de infección obtenidos con la quimera que contiene el gen NSm silvestre son significativamente mayores, sugiriendo que la incorporación de las mutaciones en el gen NSm que superan la resistencia implica un coste en el ciclo viral.

SIM-58

ESTUDIO DE LA FUNCIÓN DE GENES DE CÍTRICOS UTILIZANDO UN VECTOR VIRAL BASADO EN EL GENOMA DEL MANCHADO FOLIAR DE LOS CÍTRICOS

Agüero, J., Velázquez, K., Vives, M.C., Pina, J.A., Navarro, L., Moreno, P., Guerri, J.

Centro de Protección Vegetal y Biotecnología. IVIA. Apartado oficial 46113, Moncada, Valencia. jguerri@ivia.es

La mejora genética de cítricos por métodos clásicos es muy complicada debido a su compleja biología reproductiva, su elevada heterozigosis, su dilatado período juvenil (hasta 6-8 años). Aunque se dispone de la secuencia completa del genoma de un naranjo dulce y un clementino se necesita información sobre los genes responsables de cada proceso. Los vectores permiten ensayar la función de numerosos genes en un tiempo breve y por lo tanto son una herramienta más práctica para este fin que la mutagénesis o la transformación genética, especialmente en el caso de los cítricos donde la transformación de plantas adultas es muy difícil. En el laboratorio hemos desarrollado vectores virales basados en el genoma del virus del manchado foliar de los cítricos (CLBV) que permiten la expresión o el silenciamiento de genes en cítricos. Para ello se ha introducido un punto de corte único en dos zonas del genoma: en el extremo 3' no codificante (vector *clbv3'*) o en la zona intergénica entre los genes que codifican las proteínas de movimiento (MP) y de la cápsida (CP) (vector *clbvIN*). Para expresar secuencias foráneas hemos duplicado la secuencia del promotor del ARN subgenómico de la CP en los dos puntos de corte indicados (vectores *clbv3'pr* y *clbvINpr*, respectivamente). La utilidad de estos vectores para estudiar la función de genes de cítricos mediante el silenciamiento de los mismos se ha determinado clonando en dichos vectores fragmentos de los genes *fitoeno desaturasa*, *magnesio quelatasa* o *actina*. Estas construcciones se inocularon en plantas de distintas especies de cítricos y todas ellas mostraron el fenotipo de silenciamiento y una disminución del ARN mensajero de los genes silenciados. Dicho fenotipo se observó en sucesivas brotaciones durante al menos dos años y medio, lo que demuestra la eficiencia y estabilidad de los vectores desarrollados. La estabilidad de los insertos clonados en las distintas construcciones se confirmó mediante RT-PCR con iniciadores flanqueantes del punto de inserción en el genoma del virus. Por otro lado, la eficiencia de los vectores desarrollados para expresar genes de interés agronómico se ensayó clonando en dichos vectores el gen de floración *FLOWERING LOCUS T*. La inoculación de esta construcción en cítricos juveniles de semilla indujo la floración de las plantas a los 4 meses de la inoculación. Este resultado es especialmente interesante ya que el acortamiento del periodo juvenil de los cítricos mediante la inducción temprana de la floración puede ser una herramienta importante en la mejora genética del cultivo.

SAHH, UNA PROTEÍNA DE PLANTA QUE INTERACCIONA CON LA PROTEÍNA DE LA CÁPSIDA DE UN CRINIVIRUS, ESTÁ INVOLUCRADA TANTO EN SILENCIAMIENTO DE RNA COMO EN SU SUPRESIÓN

Cañizares, M.C.¹, Lozano-Durán, R.², Canto, T.³, Bejarano, E.R.², Bisaro, D.M.⁴, Navas-Castillo, J.¹, Moriones, E.¹

¹*Instituto de Hortofruticultura Subtropical y Mediterránea 'La Mayora', Universidad de Málaga-Consejo Superior de Investigaciones Científicas (IHSM-UMA-CSIC), Estación Experimental 'La Mayora', 29750 Algarrobo-Costa, Málaga. E-mail: carmen.canizares@eelm.csic.es.*

²*IHSM-UMA-CSIC, Departamento de Biología Celular, Genética y Fisiología, Universidad de Málaga, Campus Teatinos, 29071 Málaga.*

³*Centro de Investigaciones Biológicas (CIB-CSIC), Departamento de Biología de Plantas, Ramiro de Maeztu 9, 28040 Madrid.*

⁴*Department of Molecular Genetics, Plant Biotechnology Center, and Center for RNA Biology, The Ohio State University, Columbus, Ohio, USA.*

En eucariotas el silenciamiento de RNA es un mecanismo específico de secuencia implicado en regulación de la expresión génica, que también funciona como defensa antiviral. Este proceso se inicia a partir de la presencia de RNA de doble hebra (dsRNA) que es procesado en pequeños RNAs (sRNAs). Los sRNAs son metilados por la RNA metiltransferasa HEN1 dependiente de S-adenosil metionina (SAM) protegiéndolos de la degradación. Este proceso es amplificado por RNA polimerasas dependientes de RNA (RDRs) del huésped generando más dsRNA que será procesado a su vez generando más sRNAs secundarios. Para contrarrestar una respuesta de la planta basada en el silenciamiento de RNA, los virus codifican proteínas con actividad supresora. La proteína de la cápsida (CP) del crinivirus tomato chlorosis virus, uno de los supresores de silenciamiento de este virus, interacciona con la proteína S-adenosil homocisteína hidrolasa (SAHH) de *Nicotiana benthamiana*. En el presente trabajo hemos estudiado el papel de esta proteína tanto en silenciamiento de RNA como en la capacidad de CP de bloquear dicho silenciamiento. La presencia de SAHH, esencial para mantener el ciclo de metilación y la actividad metiltransferasa dependiente de SAM en plantas, es importante para la capacidad de supresión de silenciamiento de RNA no sólo por la proteína CP del crinivirus si no también por la proteína supresora HCPro del potyvirus Potato virus Y (PVY). También, en ensayos de silenciamiento de RNA a nivel local hemos comprobado que existe una relación directa entre presencia de SAHH e incremento de la acumulación de sRNAs secundarios generados por la acción de RDR6. Nuestros resultados muestran que aunque por una parte la disminución inducida de la expresión de SAHH suprime el silenciamiento de RNA a nivel local, por otra favorece la propagación del silenciamiento sistémico.

Sesión simultánea 9
Etiología, diagnóstico y epidemiología III

SIM-60

PROGRESOS Y RETOS EN LA SISTEMÁTICA DEL MILDIU DE LA ADORMIDERA: IMPLICACIONES PARA EL DESARROLLO DE VARIETADES RESISTENTES

Montes-Borrego, M.¹, Voglmayr, H.², Cantalapiedra, C.¹, Landa, B.B.¹

¹Instituto de Agricultura Sostenible, CSIC, Apdo. 4084, 14080-Córdoba. ²Dep. Systematic Evolutionary Botany, U. of Vienna, Austria. mmontes@ias.csic.es

El Mildiu (*Peronospora arborescens* y *P. cristata*) de la adormidera (*Papaver somniferum*) es una de las enfermedades más limitantes de este cultivo en España y otras partes del mundo. En los últimos años diversos estudios han permitido conocer aspectos claves sobre la etiología, biología y epidemiología de la enfermedad que hasta entonces eran desconocidas, y que han permitido el desarrollo de estrategias eficientes de manejo integrado. Los principales avances incluyen la certificación de semilla en lotes comerciales y la caracterización de infecciones sistémicas asintomáticas mediante detección molecular del patógeno (PCT/ES2011/070771), el establecimiento del papel de las semillas infestadas y las oosporas en restos de cosecha como fuentes de inóculo primario, y la caracterización de fuentes de resistencia en entradas procedentes de diversas zonas del mundo que se están utilizando en un programa de mejora para el desarrollo de resistencia.

En la actualidad el concepto tradicional en Mildius de patosistemas basados en “una familia del huésped-una especie de Mildiu” ha sido remplazado por la aproximación del concepto filogenético de especies. Nuestros trabajos iniciales mostraron evidencias de la posible existencia de cierta especiación en *P. arborescens* asociadas a especies silvestres y cultivadas de *Papaver* spp. Por ello, para poder desarrollar un correcto programa de mejora de la resistencia a Mildiu, nos planteamos conocer la diversidad del patógeno presente en diversas poblaciones de *Papaver* spp. silvestres y en entradas de *P. somniferum* incluidas en nuestro plan de mejora. El análisis filogenético de la región ITS del ADNr y de la citocromo oxidasa I (cox1) y II (cox2) del ADNmt indican que el Mildiu en *Papaver* spp. es causado por un complejo de especies crípticas, y que cox1 y cox2 son mejores marcadores de ‘barcoding’ para inferir cambios y adaptaciones en las poblaciones de este oomyceto. Los resultados corroboraron que el Mildiu en la adormidera cultivada, *P. somniferum*, es causado por *P. arborescens* y *P. cristata* y que las poblaciones de *P. arborescens* infectando a *P. somniferum* son filogenéticamente diferentes de las que infectan *P. rhoeas* y *P. dubium*. Además, se ha identificado una nueva especie de *Peronospora* que infecta únicamente a *P. hybridum* y está alejada filogenéticamente de *P. arborescens* y *P. cristata*, lo cual sugiere que las *Papaver* spp. silvestres desempeñan un escaso papel como fuente de inóculo.

Financiado por Incentivos a Proyectos de Excelencia (P10-AGR-6497), CICE-Junta de Andalucía y cofinanciado por fondos FEDER (EU).

SIM-61

DIAGNOSTICO Y DIVERSIDAD DE LOS AISLADOS DE *Fusarium* CAUSANTES DE LA MALFORMACION DEL MANGO EN LA AXARQUIA

Crespo, M.¹, Cazorla, F.M.¹, Freeman, S.³, Arrebola, E.², Torés, J.A.², de Vicente, A.¹

¹Instituto de Hortofruticultura Subtropical y Mediterránea "La Mayora", Universidad de Málaga (IHSM-UMA-CSIC), Departamento de Microbiología, Facultad de Ciencias, Universidad de Málaga, Campus Teatinos, 29071 Málaga. E-mail: mcrespo@uma.es

²IHSM La Mayora-UMA-CSIC. Estación Experimental La Mayora, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Algarrobo-Costa 29750 Málaga.

³Department of Plant Pathology and Weed Research , ARO, The Volcani Center, P.O. Box 6, Bet Dagan 50250, Israel

La Malformación del Mango (MMD) es una de las enfermedades más importantes que afectan a este cultivo. Varias especies del género *Fusarium* se han descrito como agentes causales de la enfermedad a nivel mundial, como son *Fusarium mangiferae*, *F. sterilihyphosum*, *F. proliferatum* y *F. mexicanum*. La MMD es una enfermedad de reciente introducción en el cultivo de mango de la costa andaluza. Durante tres años consecutivos (2009-2011) se realizaron prospecciones en fincas de varias localidades de la Axarquía (Málaga), de las que se aislaron un total de 99 aislados, de los cuales aproximadamente la mitad fueron identificados como *F. mangiferae* en base a características morfológicas y a la amplificación por PCR de un fragmento específico de 608 pb. En cuanto a la identificación de los restantes aislados, una modificación del protocolo de PCR puesto a punto en nuestro laboratorio, ha permitido diferenciar y diagnosticar casi la totalidad del resto de aislados de la Axarquía como *F. sterilihyphosum*.

Aislados de ambas especies, *F. mangiferae* y *F. sterilihyphosum* han confirmado su papel como agentes causales de esta enfermedad en España, cumpliendo los postulados de Koch en plantas de mango de dos años inoculadas experimentalmente.

Para estudiar la heterogeneidad de las poblaciones de *Fusarium* patógenas de mango de la Axarquía se han determinado los Grupos de Compatibilidad Vegetativa (VCG) en aislados de ambas especies. Los resultados indican que la población de aislados de *F. sterilihyphosum* parece clonal y todos los aislados estudiados pertenecen a un único grupo de compatibilidad vegetativa, mientras que en el caso de la población de *F. mangiferae* aparecen dos grupos de compatibilidad vegetativa, lo que sugiere al menos dos entradas diferentes del patógeno. Para completar este estudio de diversidad se está realizando un análisis genético multilocus sequence typing (MLST) estudiando varios locus como el CYP51, el factor de elongación 1 α y la β -tubulina.

Este proyecto ha sido financiado por ayudas CICE-Junta de Andalucía, Proyecto de Excelencia P07-AGR-02471, cofinanciado con fondos FEDER (UE). Asimismo ha recibido ayudas de un convenio con SAT-2803 TROPS, Reyes Gutiérrez S.L. y Viveros Brokaw S.L.

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR Y MORFOLÓGICA DE *Diplodia seriata* Y ESTUDIO DE LA COMPATIBILIDAD VEGETATIVA

Elena, G.¹; Luque, J.¹; Garcia-Figueres, F.²; Reigada, S.²

¹Patología Vegetal, IRTA. Ctra. de Cabrils km 2, 08348 Cabrils. E-mail: jordi.luque@irta.cat, georgina.elena@irta.cat; ²Laboratori de Sanitat Vegetal, DAAM Generalitat de Catalunya. Ctra. de Cabrils km 2, 08348 Cabrils. E-mail: fgarciafigueres@gencat.cat

Diplodia seriata es uno de los principales hongos causantes de la enfermedad del brazo muerto en la vid. En este trabajo se ha realizado una caracterización molecular y morfológica de una serie de aislados, así como el estudio de la compatibilidad vegetativa. Para ello se utilizaron 87 aislados de esta especie, representantes de diferentes zonas geográficas y de distintos hospedadores. La caracterización molecular se realizó mediante ISSR (Inter-Simple Sequence Repeat); para ello, se emplearon 18 cebadores distintos en la amplificación del ADN de los aislados. Finalmente, de los cebadores ensayados se utilizaron cuatro por su capacidad para producir patrones de bandas polimórficas y reproducibles. La matriz de presencia/ausencia de bandas de los aislados se analizó mediante el programa NTSYS 2.0 para determinar así la semejanza genética entre aislados. Para la caracterización morfológica se midió la longitud y la anchura de 50 conidios de cada aislado y se calculó la relación entre ambas (ratio L/A). La compatibilidad vegetativa se estudió a partir de aislados representativos de los distintos grupos resultantes del análisis cladístico. Por parejas, los aislados se enfrentaron entre sí en placas de PDA y se determinó su compatibilidad vegetativa. Los cuatro cebadores empleados en el análisis ISSR produjeron 123 bandas, entre 500 y 2000 pb aproximadamente, de las cuales 122 fueron polimórficas (99%). Cuatro de los aislados eran claramente disímiles del resto, presentando un coeficiente de similitud inferior al 50% y, además, tres de estos presentaron dimensiones de conidios particularmente diferenciadas. El 90% de los aislados encontrados sobre *Vitis vinifera* quedaron agrupados en un único grupo y con un coeficiente de similitud por encima del 70%; y los cinco subgrupos incluidos dentro de él mostraron conidios con dimensiones similares. Aislados encontrados en diferentes huéspedes quedaron agrupados en clados no tan bien definidos. Estos resultados ponen de manifiesto que, a distintos niveles, *D. seriata* presenta una gran variabilidad intraespecífica.

Financiado por el proyecto INIA RTA2010-00009-C03 y FEDER. Georgina Elena recibe financiación de INIA para la realización de su tesis doctoral.

EL DECAIMIENTO DE *Quercus* spp. ASOCIADO A *Phytophthora* spp. EN LA COMUNIDAD VALENCIANA

Pérez-Sierra, A.¹, López-García, C.¹, Puértolas, A.¹, León, M.¹, García-Jiménez, J.¹, Jung, T.^{2,3}, Abad-Campos, P.¹

¹Instituto Agroforestal Mediterráneo, Universidad Politécnica de Valencia, Camino de Vera s/n, 46022 Valencia, España. E-mail: aperesi@eaf.upv.es

²Phytophthora Research and Consultancy, Thomastrasse 75, 83098 Brannenburg, Alemania.

³IBB/CGB Plant and Animal Genomic Group, Lab. de Biotecnología Molecular e Fitopatología, University of Algarve, Campus de Gambelas, 8005-139 Faro, Portugal.

El decaimiento de *Quercus* spp. en el suroeste de la Península ha sido asociado a *Phytophthora cinnamomi* desde los años 80. En la Comunidad Valenciana no existe ningún estudio que determine la incidencia de *Phytophthora* en el decaimiento de *Quercus* spp. Por tanto, el objetivo de este estudio fue investigar la presencia de *Phytophthora* spp. en ecosistemas naturales en la Comunidad Valenciana. Se seleccionaron tres zonas de muestreo: el Parque Natural de la Font Roja (Alicante), Sierra del Negrete (Valencia) y Bovalar de Culla (Castellón). En todos los casos se muestrearon árboles de *Q. ilex* y *Q. faginea* asintomáticos y sintomáticos. Los síntomas aéreos observados fueron clareo de copa, muerte regresiva de ramas y muerte de árboles. Los síntomas radiculares observados fueron pérdida de raíces laterales, pérdida de raíces finas y chancros. Se realizaron aislamientos de raíces en medio PARPBH y de suelo mediante la utilización de trampas vegetales. Los cultivos de *Phytophthora* fueron identificados en base a su morfología y mediante la amplificación y secuenciación de la región ITS del ADNr con los cebadores ITS4 e ITS6. Se detectaron seis especies de *Phytophthora*: *P. cryptogea*, *P. gonapodyides*, *P. megasperma*, *P. quercina*, *P. psychrophila* y *P. syringae*. No se detectó la presencia de *P. cinnamomi*. Se realizaron test de patogenicidad con las especies detectadas y se inocularon plántulas de *Q. ilex* y *Q. faginea* de una savia. Se incluyó un aislado de *P. cinnamomi* como control positivo. *P. cinnamomi* y *P. megasperma* fueron las especies que causaron mayor pérdida de masa radicular, siendo *Q. ilex* la especie más afectada. Esta es la primera detección de *P. quercina* and *P. psychrophila* on *Quercus faginea*. Se trata de la primera detección de *P. quercina* en España y la primera detección de *P. psychrophila* en la Península.

Este trabajo ha sido financiado por el Proyecto AGL2011-30438-C02-01 del Ministerio de Ciencia e Innovación y cofinanciado con fondos FEDER (EU).

SIM-64

EVALUACIÓN DE MODELOS DE PREDICCIÓN DE LA MANCHA MARRÓN DE LAS MANDARINAS CAUSADA POR *Alternaria alternata*: ANÁLISIS MEDIANTE CURVAS ROC

Bassimba, D.D.M., Mira, J.L., Vicent, A.

Centro de Protección Vegetal y Biotecnología. Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA). Apdo. Oficial, Moncada 46113, Valencia. Email: avicent@ivia.es

La mancha marrón causada por un patotipo de *Alternaria alternata* (Fr.) Keissl. afecta selectivamente a algunas variedades de mandarina como Fortune y Nova. En general, la eficacia de los tratamientos fungicidas es baja, debido principalmente a la falta de sincronización entre los momentos de aplicación y los períodos de infección. Con el objetivo de desarrollar un sistema de predicción de los períodos de infección, se estudió la eficiencia infectiva del patógeno bajo condiciones controladas de temperatura y humectación. Se ensayaron diferentes combinaciones de temperatura (10-35°C) y duraciones de humectación (8-48h). Las inoculaciones se realizaron en las variedades Fortune y Nova, representativas de los diferentes grados de sensibilidad a la enfermedad. Los resultados de incidencia y severidad obtenidos en las inoculaciones se utilizaron como variable respuesta, y la temperatura y humectación como variables explicativas. Sobre estos datos se aplicó un modelo polinómico que integraba parámetros relativos a la temperatura, la humectación, y su interacción. Se ajustó también un modelo genérico de infección no lineal con cinco parámetros: temperatura mínima (T_{min}), óptima (T_{opt}), máxima (T_{max}), duración de la humectación mínima (W_{min}) y máxima (W_{max}) necesaria para obtener un determinado nivel de intensidad de enfermedad. Los dos modelos obtenidos se evaluaron con datos independientes obtenidos en exposiciones semanales de plantas trampa realizadas en las parcelas experimentales del IVIA durante 2011 y 2012. Los valores de sensibilidad y especificidad de los dos modelos se analizaron mediante curvas ROC (Receiver Operating Characteristic), para ajustar objetivamente el umbral de decisión en función de la calidad de predicción obtenida. En nuestro caso, el umbral de decisión elegido fue el nivel de intensidad de la enfermedad calculado a partir del cual se consideró la posibilidad de infecciones en cada una de las variedades estudiadas. El análisis de curvas ROC permitió integrar en los modelos el impacto económico de las predicciones incorrectas, y determinar así un umbral de decisión para minimizarla. Esta metodología supone una ventaja respecto a otras técnicas de selección de umbrales empleadas en los modelos de predicción de enfermedades.

Trabajo financiado por el Proyecto INIA RTA2010-00105-00-00.

SIM-65

***Prolasioptera berlesiana*: VECTOR DE *Botryosphaeria dothidea* AGENTE CAUSAL DEL ESCUDETE DEL OLIVO**

Aldebis, H.K.¹, Eldesouki-Arafat, I.¹, Moral, J.², López-Escudero, F.J.², Trapero, A.², Vargas-Osuna, E.¹

¹Dpto. Ciencias y Recursos Agrícolas y Forestales, Universidad de Córdoba. Campus de Rabanales, Edificio C4, 14071 Córdoba, España.

²Dpto. de Agronomía, ETSIAM, Universidad de Córdoba, Campus de Rabanales, Edificio C4, 14071 Córdoba, España.

El Escudete del olivo causado por el hongo *Botryosphaeria dothidea* es una grave enfermedad de la aceituna de mesa. Entre los potenciales vectores del Escudete destacan la Mosca del olivo (*Bactrocera oleae*) y el mosquito de la aceituna (*Prolasioptera berlesiana*) depredador de huevos de la mosca. En el presente trabajo se estudió la relación entre estos tres agentes.

Para ello se evaluó periódicamente la presencia de Escudete, picada de mosca (con o sin larva) y presencia del mosquito en aceitunas de los cvs. 'Gordal Sevillana', 'Picudo' y 'Hojiblanca' en un olivar comercial durante 2009-2011. En condiciones de laboratorio, se comprobó la presencia del hongo en larvas y adultos del mosquito y mosca, mediante aislamientos en agar-patata-dextrosa (PDA), observaciones microscópicas y técnicas moleculares.

Se ha podido demostrar que la herida de la mosca (con o sin larva) es necesaria para la penetración del mosquito en la aceituna, existiendo una correlación perfecta entre presencia de la larva del mosquito en el fruto y el síntoma de Escudete. No obstante, también se detectaron síntomas de Escudete en un 27,4% de aceitunas que mostraban únicamente picada de mosca sin mosquito, aunque ello puede deberse a que el mosquito abandonase la herida antes del muestreo ya que completa su ciclo de biológico en unas 24 h.

Los montajes al microscopio han permitido demostrar que la hembra del mosquito posee un "bolsillo" en el abdomen que le permite el transporte y diseminación de conidios del hongo en su interior. Así, las larvas del mosquito pueden completar su desarrollo en el interior de la aceituna a expensas del micelio de *B. dothidea* y en ausencia de la mosca ya que, en numerosas ocasiones, la mosca realiza picadas falsas en las que no deposita ningún huevo. Además, no se observó asociación entre otro tipo de heridas en la aceituna con la presencia del mosquito y el hongo causante del Escudete.

Aunque el patógeno también fue aislado de adultos de mosca ocasionalmente, estos resultados permiten identificar al mosquito *P. berlesiana* como el principal agente vector del hongo *B. dothidea*.

**IDENTIFICACIÓN MEDIANTE TERMOGRAFÍA Y FLUORESCENCIA DE
IMAGEN DE “MARCAS DE IDENTIDAD” DE ENFERMEDADES
BACTERIANAS DE PLANTAS**

Pérez-Bueno, M.L.¹, Pineda, M.¹, Granum, E.¹, López-Solanilla, E.³,
Rodríguez-Palenzuela, P.³, Ramos, C.², Barón, M.¹

¹*Estación Experimental del Zaidín, CSIC, Profesor Albareda, 1, 18008 Granada. Email: mbaron@eez.csic.es*

²*Centro de Biotecnología y Genómica de Plantas (CBGP), Universidad Politécnica de Madrid-Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria, Campus de Montegancedo, 28223 Pozuelo de Alarcón (Madrid)*

³*Area de Genética, Universidad de Málaga, Instituto de Hortofruticultura Subtropical y Mediterránea “La Mayora” (IHSM-UMA-CSIC), Campus de Teatinos, 29071 Málaga.*

Las técnicas de captura de imágenes foliares de la fluorescencia roja emitida por la clorofila y azul-verde procedente de metabolitos secundarios de interés en defensa frente a estrés vegetal, son junto con la termografía de imagen, que visualiza cambios de temperatura, una poderosa herramienta para el diagnóstico y seguimiento de las infecciones por patógenos vegetales. Nos ofrecen patrones espacio-temporales del funcionamiento del aparato fotosintético, el metabolismo secundario y la transpiración, ante el ataque del patógeno y durante el desarrollo de la enfermedad. El objetivo de este trabajo es identificar mediante estas técnicas de imagen “marcas de identidad” de enfermedades vegetales (“disease signatures”) en forma de patrones foliares termales y de fluorescencia que posibiliten la detección, diagnóstico pre-sintomático, diferenciación y evaluación de enfermedades como la podredumbre blanda por bacterias del género *Dickeya* y la grasa de la judía por *Pseudomonas syringae* pv *phaseolicola* (Pph). Del mismo modo, se ha comparado la respuesta de *Phaseolus vulgaris* a Pph con la reacción hipersensible causada por *P. syringae* pv. *tomato* (Pst) DC3000 en el mismo huésped.

Este trabajo ha sido financiado por Incentivos a Proyecto de Excelencia de la Junta de Andalucía (P08-CVI-03475) y el proyecto MCINN-AGL2008-00214 cofinanciado con fondos FEDER.

Sesión simultánea 10
Control III

SIM-67

“PROFILE KIT” EN FRESAS: UNA NUEVA HERRAMIENTA PARA MONITORIZAR PROBLEMAS DE RESISTENCIA A FUNGICIDAS EN *Botrytis cinerea*

Fernández-Ortuño, D., Grabke, A., Schnabel, G.

Department of Entomology, Soils and Plant Sciences. Clemson University, 29634 Clemson, South Carolina, USA. E-mail: dortun@_clemson.edu.

España es en la actualidad el primer país del mundo exportador de fresas y el segundo en producción, sólo por detrás de Estados Unidos. Una de las enfermedades más comunes que afecta a este cultivo es la podredumbre gris causada por el hongo *Botrytis cinerea*. Este patógeno es capaz de afectar el 95% de los frutos 48 horas después de ser cosechados. La principal estrategia para controlar esta enfermedad es a través del uso de diferentes clases de fungicidas. Sin embargo, *B. cinerea* está catalogado como un hongo con alto riesgo para desarrollar resistencias a fungicidas al poco tiempo de ser registrados para su uso. Este hecho ha sido ampliamente confirmado en nuestro laboratorio, donde 217 aislados de *B. cinerea*, tomados desde 11 plantaciones comerciales de fresa en Carolina del Norte y del Sur (USA), han sido estudiados mediante ensayos *in vitro* de sensibilidad a 7 clases de fungicidas registrados para controlar esta enfermedad en el sureste de Estados Unidos. Más del 60% de los aislados estudiados mostraron resistencia a boscalida, piraclostrobina y/o metil tiofanato. Moderados niveles de resistencia fueron observados para ciprodinil (>40%) y fenhexamida (<20%); cuando ninguno de los aislados fue resistente a fludioxonil o iprodiona. La resistencia a boscalina, fenhexamida, piraclostrobina y metil tiofanato fue siempre correlacionada con mutaciones puntuales en los correspondientes genes dianas (*sdhB*, *erg27*, *cytb* y β -*tubulina*). Este escenario confirma la absoluta ineficacia de ciertas clases de fungicidas en el control de la podredumbre gris y justifica la implementación de programas de monitorización de resistencia a fungicidas en *B. cinerea*. En la Universidad de Clemson hemos desarrollado “Profile kit”, un sistema para conocer *in vivo* y en menos de 72 horas, a través del uso de placas de 24 pocillos con medio agarizado que incluyen diversas clases de fungicidas, si en una determinada plantación de fresas existen problemas de resistencia a ciertos compuestos químicos. Dando, a través de una aplicación web, recomendaciones al agricultor, que directamente conocerá la problemática y alternativas químicas para su plantación. Mediante este programa se pretende reducir el riesgo de resistencia a fungicidas en *B. cinerea*, optimizando y extendiendo la efectividad de aquellos fungicidas registrados para el control de la podredumbre gris en fresas tanto en Estados Unidos, como en España.

SIM-68

SUPERVIVENCIA DE *Phytophthora capsici* A DISTINTOS TRATAMIENTOS DE BIOSOLARIZACIÓN EN CONDICIONES CONTROLADAS DE LABORATORIO

Larregla, S.¹; Núñez-Zofío, M.¹; Perez, E.¹; Núñez-Zofío, M.¹; Guerrero, M.M.²; Lacasa, C.M.²; Martínez, V.³; Ros, C.²; Martínez, M.A.⁴; Lacasa, A.²

¹Neiker-Tecnalia, c/ Berreaga, 1, Derio (Vizcaya) slarregla@neiker.net

²IMIDA, Mayor s/n, 30150 La Alberca (Murcia) alfredo.lacasa@carm.es

³Programa Colaboración FECOAM- CAA, c/ Caballero, 13, 30003 Murcia

⁴ETSIA, UPCT, Paseo Alfonso XIII, s/n, 30202 Cartagena (Murcia)

Para la desinfección del suelo de los invernaderos de pimiento de la Región de Murcia, se utiliza la biosolarización como forma de control de los patógenos edáficos, siendo *Phytophthora capsici* y *P. parasitica* los principales problemas fúngicos. En el País Vasco ha comenzado a experimentarse con esta práctica para tratar de adaptarla a las diferentes condiciones climáticas y ciclo de cultivo frente a los hongos *P. capsici*, *P. cryptogea* y *Verticillium dahliae*. Se ha evaluado el efecto en la supervivencia de las oosporas de *P. capsici* de diferentes regímenes térmicos (Murcia Agosto, Bizkaia Agosto y Bizkaia Septiembre), enmiendas orgánicas (pellets de *Brassica carinata*, estiércol fresco, estiércol semicompostado, suelo natural y suelo estéril; estos dos últimos como controles de contraste) y aireación (frasco de cristal con cierre hermético ó aireado) en condiciones controladas de laboratorio que simulan las que podrían tener lugar al practicarse la solarización y/o biosolarización en cada zona geográfica y época. El suelo inoculado enmendado permaneció dentro de frascos de cristal durante 6 semanas en estufas de precisión programadas siguiendo ciclos de 24 horas. Se encontraron diferencias entre regímenes térmicos, tanto en la viabilidad de las oosporas, estimada mediante el método de plasmólisis, como en su infectividad sobre plantas de pimiento, proporcionando los mayores niveles de eficacia el régimen de temperatura más elevado (Murcia Agosto). También se encontraron diferencias entre enmiendas dentro de cada régimen térmico, siendo por lo general menor la supervivencia en el suelo mezclado con las enmiendas que en el suelo no enmendado. La eficacia desinfectante se mostró relacionada con las temperaturas registradas en los distintos regímenes térmicos.

**EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD DE INMUNOMODULACIÓN DE
DIFERENTES scFv ESPECÍFICOS DE *Plum pox virus***

Gil, M.¹, Esteban, O.,^{1†}, García J.A.², Peña, L.¹, Cambra, M.¹

¹*Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA), Ctra Moncada a Náquera Km 5, 46113 Moncada, Valencia. E-mail: mcambra@ivia.es*

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

[†]*Instituto de Bioengiería de Cataluña (IBEC), Baldiri i Reixac 15-21, 08028 Barcelona.*

La expresión constitutiva de fragmentos de anticuerpo recombinantes en formato de cadena simple de fragmentos variables (scFv) específicos de diferentes proteínas virales en plantas transgénicas ha demostrado que puede inmunomodular o interferir con la infección viral. Por lo tanto, puede ser una interesante herramienta tanto para la obtención plantas resistentes a virus como para estudiar la función de dichas proteínas virales.

El éxito de dicha estrategia depende de la eficiencia de la expresión y acumulación del scFv en el compartimento celular seleccionado, el antígeno, o incluso el epítipo escogido como diana y también de la afinidad que tenga el anticuerpo por dicho antígeno. En la mayoría de trabajos publicados hasta ahora, se han obtenido resultados únicamente de protección parcial, ya que, en estos momentos la única forma de comprobar la efectividad de un determinado scFv es mediante su expresión en plantas.

La expresión transitoria mediada por agroinfiltración es un método alternativo a la transformación estable para evaluar la estabilidad y nivel de acumulación de scFvs en células vegetales y combinada con la agroinoculación del virus marcado con GFP, permite evaluar su capacidad de interferencia con la infección viral. Además, resulta un sistema más rápido, menos costoso y que permite evaluar combinaciones de scFv específicos de diferentes proteínas de forma más sencilla.

Se realizaron experimentos de agroinfiltración con co-cultivos de *A. tumefaciens* portador de un clon agroinfectivo de *Plum pox virus* (PPV) fusionado a la proteína verde fluorescente (GFP) (PPV-GFP) y de diferentes construcciones de scFv específicos de la proteína NIb replicasa (scFv2A) o de proteína de la capsida (scFv5B) del virus. Se evaluó el nivel de infección mediante ELISA-DASI y se cuantificó el número y área de los focos fluorescentes producidos por la infección de PPV-GFP en las hojas agroinfiltradas. Se observaron diferentes grados de reducción del número de foci, del tamaño medio de los mismos y del área fluorescente en las hojas agroinfiltradas según el scFv agroinfiltrado. La mejor protección se consiguió cuando se agroinfiltraron conjuntamente las construcciones scFv5B-KDEL y scFv2A.

INTERFERENCIA DE GENES DEL VECTOR PARA EL BLOQUEO DE LA TRANSMISIÓN DE VIRUS DE PLANTAS: ADMINISTRACIÓN DE RNAs DE DOBLE CADENA POR DIETA ARTIFICIAL

Vilaplana, L.I.¹, Urizarna, M.¹, Mingot, A.¹, López-Abella, D.², López-Moya, J.J.¹

¹*Centre de Recerca en Agrigénomica, CRAG, CSIC-IRTA-UAB-UB, edifici CRAG Campus UAB Bellaterra, Cerdanyola del Vallès, 08193 Barcelona.*

Email: lluisa.vilaplana@cragenomica.es

²*Centro de Investigaciones Biológicas, CIB, CSIC, Ramiro de Maeztu 9, 28040 Madrid.*

La técnica del RNA de interferencia (RNAi) es una herramienta muy útil para conocer la función de genes, dado que permite producir fenotipos de pérdida de función gracias a la disminución dirigida de los niveles de expresión de transcritos con homología al gen que se desea interferir. En nuestro caso, hemos usado este sistema para evaluar la implicación de determinados genes del insecto vector en el proceso de transmisión viral de potyvirus. La puesta a punto del procedimiento de RNAi se está realizando con el pulgón *Acyrtosiphon pisum*, un organismo modelo fácil de criar en el laboratorio, capaz de transmitir ciertos potyvirus y del que se conoce la secuencia completa de su genoma.

Para escoger candidatos a ser silenciados, se eligieron genes conocidos por afectar al desarrollo de otros insectos, así como productos capaces de interactuar con el factor de transmisión de potyvirus, y que potencialmente podrían ser necesarios durante el proceso. Una vez escogidos los genes, un primer punto clave en la experimentación propuesta es la selección de una vía adecuada para la administración de las dobles cadenas de RNA (dsRNAs) específicas. Entre los diferentes procedimientos ensayados, la alimentación en una dieta artificial conteniendo dsRNAs nos está permitiendo analizar variables encaminadas a conseguir un ensayo robusto. Para optimizar nuestro sistema de interferencia, ha sido necesario caracterizar en detalle el ciclo biológico de nuestro insecto modelo, así como analizar la expresión a lo largo de su desarrollo de los genes que se querían silenciar, buscando determinar el momento óptimo para la administración del dsRNA. Igualmente es posible seleccionar la dosis necesaria y la duración del tratamiento para reducir de forma cuantificable los niveles del transcrito diana. Los datos obtenidos hasta el momento indican que la dieta artificial permite completar el ciclo vital del insecto hasta producir descendencia, y que el éxito en la interferencia depende en gran medida del perfil (constante o puntual) de expresión del gen que se busca silenciar, de sus niveles de acumulación, y posiblemente también de su función.

Financiación del proyecto AGL2010-14949 (PN de I+D+i) y fondos para grupos de recerca 2009SGR-09626 de la Generalitat de Catalunya.

SIM-71

RELACIÓN ENTRE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA Y LA DISTRIBUCIÓN DE GENES BIOSINTÉTICOS DE CICLOLIPOPÉPTIDOS Y SU PRODUCCIÓN, EN *Bacillus* spp. AISLADOS DE PLANTAS

Mora, I., Cabrefiga, J., Montesinos, E.

Instituto de Tecnología Agroalimentària-XaRTA-CIDSAV, Universitat de Girona. E-mail: isabel.mora@udg.edu

El género *Bacillus* presenta numerosas características que lo hacen un buen candidato para la obtención de cepas activas en el biocontrol de bacterias y hongos fitopatógenos, entre las que destaca su capacidad de síntesis de péptidos antimicrobianos (AMPs), principalmente ciclolipopéptidos. La producción simultánea de varios tipos de AMPs se ha mostrado como una característica importante en diversas cepas comerciales en la eficiencia del control de enfermedades causadas por hongos.

El objetivo del presente trabajo ha sido el estudio de la distribución de cuatro genes involucrados en la síntesis de los ciclolipopéptidos surfactina (*srfA*), bacilomicina (*bmyB*), fengicina (*fenD*) e iturina (*ituC*) en una extensa colección de cepas de *Bacillus* spp. aisladas de diversos ambientes y plantas huésped, y que incluyen suelo, rizosfera y parte aérea de las plantas. La presencia de dichos genes se ha relacionado con su capacidad para producir los correspondientes AMPs y con su actividad antibacteriana frente a bacterias fitopatógenas representativas.

Se constituyó una colección de 184 aislados procedentes de la zona Mediterránea de la Península Ibérica, para los que se determinó la presencia de los 4 genes biosintéticos mediante PCR. La mayoría de las cepas presentó entre 2 y 4 genes biosintéticos, siendo los más frecuentes *srfA*, *bmyB* y *fenD* (entre 40 y 60%). La presencia de estos genes biosintéticos se relacionó con la producción de los correspondientes productos de expresión, mediante su producción en diversos medios de cultivo. Los AMPs se obtuvieron de los cultivos mediante diversos procedimientos de extracción, purificación mediante HPLC en fase reversa, y detección/cuantificación por espectrometría de masas (MALDI-TOFF y ESI-MS). Paralelamente se estudió la actividad antagonista de las cepas contra ocho bacterias fitopatógenas de importancia agronómica. Se observó que la proporción de cepas con alta actividad antibacteriana se incrementaba al aumentar el número de marcadores de AMPs por cepa, siendo prevalentes los genes *srfA*, *bmyB* o *fenD* en cepas de *Bacillus* altamente antagonistas que en cepas con baja actividad o inactivas. Finalmente, tras la realización de ensayos en planta y en campo, se ha confirmado que diversas cepas multiproductoras de AMPs son altamente efectivas en el control de bacteriosis representativas como el fuego bacteriano, la mancha negra del tomate, la necrosis de flores del peral y la mancha bacteriana del pimiento.

Investigación subvencionada por AGL2009-13255-C02-01

PAPEL DE LA SURFACTINA EN LA FORMACIÓN DE BIOPELÍCULAS Y LA CAPACIDAD DE CONTROL BIOLÓGICO DE *Bacillus*

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

Instituto de Hortofruticultura Subtropical y Mediterránea "La Mayora" (IHSM-UMA-CSIC). Campus de Teatinos, 29071 Málaga. E-mail: hzerriouh@uma.es

La capacidad de biocontrol de la mayoría de las especies de *Bacillus* ha sido directamente relacionada con la producción de moléculas que inhiben el crecimiento de los patógenos. A modo ilustrativo, entre el 4 y el 8 % de los genomas de *B. subtilis* y *B. amyloliquefaciens* está dedicado a la síntesis de antibióticos, lo que les confiere la capacidad de producir más de dos docenas de antibióticos con estructuras muy variadas. Entre los antibióticos producidos por *Bacillus*, los lipopéptidos han recibido una especial atención por su amplio rango de acción, patógenos fúngicos y bacterianos responsables de causar enfermedades en raíces, partes aéreas y en post-cosecha. El principal mecanismo de acción de los lipopéptidos es la antibiosis, aunque también pueden inducir los mecanismos de defensa de la planta (resistencia sistémica inducida) y mediar la eficiente colonización y permanencia de las bacterias en las superficies de las plantas.

En trabajos anteriores demostramos que dos cepas de *B. subtilis* UMAF6614 y UMAF6639 producían lipopeptidos pertenecientes a las familias de las fengicinas, iturinas y surfactinas, y confirmamos la implicación de fengicinas e iturinas en la capacidad de control de oídio de cucurbitáceas (*Podosphaera fusca*), mancha bacteriana (*Xanthomonas campestris* pv. *cucurbitae*) y podredumbre blanda (*Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*). En estos estudios, las surfactinas no mostraron actividades antifúngica o antibacteriana, sin embargo, debido a su implicación en la movilidad bacteriana, en este trabajo evaluamos el papel de las surfactinas en la colonización y formación de biofilms, dos aspectos esenciales en la capacidad de biocontrol. Mutantes defectivos en la producción de surfactina mostraron movilidad reducida (swarming y swimming) y perdieron la capacidad de formar biopelículas en cultivos estáticos y crecer formando colonias rugosas en medio sólido, ambas propiedades asociadas a la formación de biofilms. En ensayos de biocontrol en hojas, estos mutantes perdieron parcialmente la capacidad de control. Nuestros resultados resaltan que las surfactinas son esenciales para la eficiente colonización y formación de biofilms sobre hojas de melón, ambas características deseables en un agente de biocontrol eficiente.

Este trabajo ha sido financiado por ayudas del Plan Nacional de I+D+I del Ministerio de Ciencia e Innovación (AGL2010-21848-CO2-01), cofinanciado con fondos FEDER (EU).

SIM-73

EL PROGRAMA DE MEJORA DEL OLIVO POR RESISTENCIA A LA VERTICILOSIS

Trapero C., Muñoz-Díez C., Rallo, L., López-Escudero, F.J., Barranco, D.

Departamento de Agronomía, Universidad de Córdoba, Campus de Rabanales, Edif. C-4, 14071, Córdoba. E-mail: g32trrac@uco.es

La Verticilosis del olivo (*Olea europea*), causada por el hongo *Verticillium dahliae*, es la enfermedad más importante que afecta a este cultivo actualmente en España y en otros países productores. Dada la dificultad de su control, el uso de variedades resistentes a la enfermedad es una de las medidas más eficaces. Ambas causas han motivado que la obtención de material vegetal resistente a la verticilosis del olivo se haya incorporado como un nuevo objetivo en el programa de mejora en olivo de la Universidad de Córdoba. Además, la amplia variabilidad genética existente en la especie *Olea europea*, así como la existencia de otras especies del mismo género, puede ser de gran utilidad en esta búsqueda de resistencia. Durante los últimos 4 años se ha desarrollado un método eficaz para la inoculación y selección de plántulas de semilla de olivo por su resistencia a *V. dahliae* en condiciones controladas, consistente en la inoculación en los tallos herbáceos de las plántulas de suspensiones de concentraciones elevadas de conidias del patógeno. Mediante esta metodología se han evaluado más de 8000 genotipos hasta la fecha, de los cuales más de 500 se han seleccionado por presentar resistencia en estas condiciones experimentales y se encuentran actualmente en la fase de evaluación en campo, en parcelas con un elevado nivel de inóculo. Los genotipos evaluados se han obtenido principalmente mediante cruzamientos entre variedades, básicamente cultivares principales con características agronómicas y de rendimiento y calidad de aceite muy mejoradas; y polinización libre de poblaciones silvestres y otras especies del género *Olea*, tales como *O. cuspidata* u *O. ferruginea*. Además, los resultados obtenidos hasta la fecha están aportando información muy valiosa acerca de la herencia de la resistencia, que pueden conducir a la identificación de los parentales más adecuados para realizar nuevos cruzamientos. La evaluación y selección de genotipos de olivo en campo probablemente proporcionará patrones o variedades resistentes a la verticilosis en los próximos años.

Trabajo financiado por CICE-Junta de Andalucía (P08-AGR-03635); y AGL 2011-30137 del Ministerio de Ciencia e Innovación, cofinanciado por fondos FEDER de la UE y mediante un acuerdo entre la Universidad de Córdoba, CITOLIVA y la Interprofesional del Aceite de Oliva Español (UG 400545).

Sesión simultánea 11
Interacciones planta-virus II

¿SON LAS INFECCIONES VIRALES UN FACTOR EN LA EVOLUCIÓN DE LAS PLANTAS?

Montes, N.¹, Fraile, A.¹, Alonso-Blanco, C.², García-Arenal, F.¹

¹*Centro de Biotecnología y Genómica de Plantas (UPM-INIA), and E.T.S.I. Agrónomos, Campus de Montegancedo, Universidad Politécnica de Madrid, Pozuelo de Alarcón (Madrid). Email: fernando.garciaarenal@upm.es*

²*Departamento de Genética Molecular de Plantas, Centro Nacional de Biotecnología CNB-CSIC, Campus Universidad Autónoma, Cantoblanco (Madrid), Spain*

Es ampliamente aceptada la idea de que las infecciones virales reducen la eficacia biológica de las plantas y que, en consecuencia, las plantas desarrollan defensas frente a los virus de forma que plantas y virus coevolucionan. Esta idea se apoya en evidencias provenientes de ecosistemas agrícolas. Sin embargo, los efectos de las infecciones virales perjudiciales para la producción agrícola no tienen por qué serlo para la eficacia biológica de las plantas. Demostrar disminuciones de eficacia biológica en plantas infectadas puede ser complicado, pero se puede aproximar demostrando coevolución planta-virus. Puesto que en los agroecosistemas la población viral evoluciona en respuesta a la manipulación humana de la planta huésped, la coevolución planta-virus debe analizarse en un patosistema silvestre en el que se pueda analizar la evolución del huésped en respuesta a la selección ejercida por el virus y viceversa. Para este análisis hemos elegido poblaciones silvestres de *Arabidopsis thaliana* con las que analizar si se dan las siguientes condiciones necesarias para que haya coevolución: a) que el resultado de la interacción virus-planta dependa de la combinación de sus genotipos, b) que exista variación genética en los caracteres que determinan la interacción y c) que haya efectos recíprocos de estos caracteres en la eficacia biológica del virus y la planta.

El análisis de la incidencia de virus en seis poblaciones silvestres de *arabidopsis* localizadas en un transecto N-S de 300 Km en el centro de la Península Ibérica, mostró que el virus predominante es el virus del mosaico del pepino (CMV). La incidencia de CMV puede alcanzar valores elevados de hasta un 70%, y es máxima en estados tempranos del ciclo vital de las plantas. Estos datos sugieren un efecto negativo de la infección viral en la eficacia biológica de *arabidopsis*. Experimentos en condiciones controladas indican que la virulencia de CMV y las defensas de resistencia y tolerancia en la planta, dependen de los genotipos implicados en la interacción y que hay variación heredable en los caracteres relevantes de la interacción. Para analizar si la infección por CMV es un factor implicado en la evolución de las poblaciones de *arabidopsis*, se caracterizó la respuesta de individuos elegidos al azar en doce poblaciones que representan la distribución de *arabidopsis* en la Península Ibérica y su variación genética. En estos individuos se cuantificó la multiplicación de dos aislados de CMV, como indicativo de resistencia/susceptibilidad, y el efecto de la infección viral en el crecimiento, desarrollo y producción de descendencia. De esta forma se determinó la estructura genética del huésped respecto a caracteres relevantes en la interacción (resistencia y tolerancia). La comparación con la estructura genética para marcadores neutrales indica que hay selección para la defensa a CMV.

Estos resultados son compatibles con la hipótesis de coevolución y son los primeros, que sepamos, que apoyen un papel de los virus en la evolución de las plantas.

LA ACTIVIDAD SUPRESORA DEL FACTOR HCPRO DEL VIRUS Y DE LA PATATA DEPENDE DE LA PRESENCIA AGUAS ARRIBA DE LA PROTEÍNA P1 DURANTE SU TRADUCCIÓN

Tena, F.¹, González, I.¹, Doblas, P.¹, Sahana, N.², Praveen, S.², Canto, T.¹

¹*Departamento de Biología Medioambiental, Centro de Investigaciones Biológicas (CIB-CSIC), Ramiro de Maeztu, 9, 28040 Madrid. E-mail: tomas.canto@cib.csic.es*

²*Indian Agricultural Research Institute. Delhi 110-012, India*

El genoma de los potyvirus consiste en un RNA de tipo mensajero que codifica una poliproteína que se procesa durante la traducción, para generar los productos génicos virales. El primer gen 5' en el mRNA viral corresponde a P1, que es seguido por HCPPro. La actividad serín proteasa de P1 la separa de HCPPro co-traduccionalmente, mientras que la actividad cisteín proteasa de HCPPro la separa del resto de la poliproteína.

En potyvirus como *Tobacco etch virus* o *Plum pox virus* se había observado que en tándem P1-HCPPro incrementaba la patogenicidad derivada de HCPPro o su actividad supresora, cuando se comparaba con HCPPro expresado sólo (Verchot y Carrington, 1995a,b. J. Virol. 69, 1582; 3668; Valli et al., 2006. J. Virol. 80, 10055, respectivamente). Sin embargo, la naturaleza de este fenómeno permanece sin aclarar.

En experimentos de agroinfiltración, hemos caracterizado la capacidad del HCPPro del *Virus Y de la patata* (PVY) para suprimir el silenciamiento local de un gen marcador GFP cuando se expresa de una secuencia P1-HCPPro y cuando se expresa de una secuencia HCPPro sola. Hemos encontrado que HCPPro expresado de P1-HCPPro incrementa la acumulación de GFP, mientras que HCPPro expresado de la secuencia HCPPro apenas lo hace, incluso cuando P1 es expresada en trans. Por tanto, la expresión aguas arriba de P1 parece necesaria para que PVY HCPPro tenga actividad supresora local.

La acumulación de HCPPro en estos ensayos fue mayor cuando se expresaba de P1-HCPPro que cuando lo hacía de HCPPro, debido a que la falta de actividad supresora en el segundo caso permitía el silenciamiento de su propio mRNA. En presencia de supresores heterólogos (P19) los niveles de mRNA derivados de ambas secuencias se aproximaron, pero no así los de proteína. Esto sugiere que HCPPro expresado de P1-HCPPro tiene una conformación distinta a HCPPro expresado solo. Para estudiar esta diferencia, hemos purificado ambas versiones de HCPPro de planta, y analizado sus estados macromoleculares y actividades *in vitro*.

Para visualizar HCPPro y sus interacciones *in vivo* hemos realizado marcajes fluorescentes teniendo en cuenta la necesidad del factor P1 aguas arriba para que adquiera actividad biológica. El marcaje en el extremos carboxilo no fué posible, bien porque la actividad proteasa seccionaba el tag, o porque la proteína de fusión carecía de actividad. El marcaje en el extremo amino, en presencia o ausencia de P1 aguas arriba, afectó en mayor o menor medida a la actividad de HCPPro, dependiendo del tag. Una construcción marcada con la mitad amino de la proteína YFP presentó actividad supresora en ausencia de P1.

Nuestro trabajo muestra que la presencia de P1 aguas arriba es necesaria para la adquisición de actividad biológica como supresor del HCPPro de PVY. Esta propiedad no es específica de P1. Nuestros resultados tienen relevancia en estudios funcionales de HCPPro ya que tanto el marcaje como el contexto de expresión (+P1 aguas arriba) condicionan su actividad biológica.

SIM-76

LA PROTEÍNA DE MOVIMIENTO DEL VIRUS DEL MOSAICO DEL PEPINO (CMV) DETERMINA LA VIRULENCIA EN LA ACESIÓN DE MELÓN "SONWANG CHARMÍ", PI161375

Guiu, C.¹, Díaz-Pendón, J.A.², Martín-Hernández, A.M.¹

¹CRAG –Centro de Investigación en Agrigenómica (CSIC-IRTA-UAB-UB), Campus UAB, Bellaterra (Cerdanyola del Vallés), 08193 Barcelona, Spain. E-mail: celia.guiu@cragenomica.es. ²Instituto de Hortofruticultura Subtropical y Mediterránea 'La Mayora', (IHSM-UMA-CSIC), Estación Experimental 'La Mayora', 29750 Algarrobo-Costa, Málaga, Spain.

El virus del mosaico del pepino (*Cucumber Mosaic Virus*, CMV), miembro tipo del grupo de los cucumovirus, perteneciente a la familia Bromoviridae, es uno de los virus más extendidos, siendo capaz de infectar más de 1000 especies causando grandes pérdidas económicas. El genoma de CMV está formado por tres moléculas de RNA monocatenario de sentido mensajero. Hasta ahora, en melón solo se han descrito dos fuentes de resistencia frente a CMV, Freeman's Cucumber y la accesión Sonwang Charmi, PI161375.

Usando una colección de líneas casi isogénicas (NILs) entre la variedad española "Piel de Sapo" y PI161375, se describió el gen recesivo, *cmv1*, que confiere resistencia total a las cepas LS, P9 y P104.82, pero no a FNY, M6 y TL. Las cepas que no son capaces de infectar sistémicamente las plantas de la línea portadora del gen *cmv1* probablemente no puedan interaccionar con *cmv1*, en cambio las cepas que son capaces de interaccionar con *cmv1* son capaces de sobrepasar esta resistencia. Así, establecemos dos grupos de cepas que difieren en su determinante de virulencia.

Estudios combinando los tres RNAs de las cepas FNY y LS mostraron que el determinante de virulencia para *cmv1* estaba en el RNA3. El RNA3 está compuesto por tres regiones no traducidas (UTR) y dos genes, que codifican para la proteína de movimiento y la de la cápsida.

Virus quiméricos entre FNY y LS mostraron que el determinante de virulencia es la proteína de movimiento (MP). Actualmente, estamos tratando de identificar el aminoácido que confiere virulencia o avirulencia frente a *cmv1*.

El trabajo actual también trata de analizar los mecanismos asociados con la resistencia conferida por *cmv1*. Hemos demostrado que la cepa LS es capaz de acumularse en los cotiledones de la línea resistente. Además, hemos empezado a estudiar el movimiento a corta distancia usando improntas de hoja inoculada, observando que el virus puede moverse célula a célula hasta el sistema vascular. Estos datos indican que la falta de infección sistémica de la cepa LS podría deberse a falta de movimiento a larga distancia.

OVER-ACCUMULATION OF ALFALFA MOSAIC VIRUS COAT PROTEIN IN THE NUCLEOPLASM INDUCES CELL DEATH

Aparicio, F., Prada, C., Pallás, V.

Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas (CSIC-UPV). Valencia
faparici@ibmcp.upv.es; vpallas@ibmcp.upv.es.

Alfalfa mosaic virus (AMV) has a very broad dicotyledonous host range infecting over 600 plant species being mainly transmitted by seed, pollen and aphids. The AMV genome consists in three plus single-stranded RNAs. RNAs 1 and 2 encode the replicase proteins P1 and P2, respectively, whereas RNA 3 encodes the movement protein and the coat protein (CP). CP is translated from a subgenomic RNA 4. AMV and viruses of the genus *Illavirus* show the phenomenon termed “genome activation”, e.g. these viruses require binding of a few molecules of CP to the 3'-end non-translated region (3'-NTR) of the viral RNAs to initiate infection.

In addition to virion formation, the CP of AMV and probably of most *Ilarviruses* is involved in the regulation of replication and translation of viral RNAs, and in cell-to-cell and systemic movement of the virus (*Bol, 2005 Annu Rev Phytopathol* 43, 39–62). This multifunctional role suggests that this viral protein will interact, recruit and divert different host factors/sub-cellular structures involved in the diverse steps of the viral cycle. However, most of these roles are not well, if not completely, understood. We are interested in the identification and characterization of mechanisms and host factors that AMV CP could be diverting to fulfil viral requirement.

Within the last few years, a large body of evidence has revealed that many viruses require a nuclear step to fulfil their life-cycles. In this way we recently determined motifs responsible for trafficking of the AMV CP into and out of the nucleus. Thus, AMV CP contains an N-terminal lysine-rich nucleolar localization signal (NoLS) and a C-terminal Leucine-rich domain which might function as a nuclear export signal (NES). Moreover, we showed that NLoS represents a multifunctional domain within the AMV CP and that viral expression is carefully modulated by a cytoplasmic/nuclear balance of CP accumulation (*Herranz et al., 2012, MPMI, in press*).

In this work, we analyzed the implication of the NES in the AMV cycle. We found that, as in the case of the NLoS, this motif also represents a multifunctional domain. Moreover, we have found that over-accumulation of the AMV CP in the nucleoplasm causes necrosis of the infected tissues. This cell death seems to be induced by the modulation, through its mRNA stabilization, of the expression of a subunit from the Anaphase-Promoting Complex. Experiments are in progress to dissect how this complex is involved in the development of the necrotic response.

SIM-78

ESTUDIO CELULAR DE LOS PROCESOS TEMPRANOS QUE TIENEN LUGAR EN COTILEDONES DE MELON INFECTADOS POR MNSV

Sánchez-Pina, M.A., Gómez Aix, C., Aranda, M.A.

CEBAS-CSIC, Departamento de Biología del Estrés y Patología Vegetal. Campus de Espinardo, 30100 Espinardo-Murcia. E-mail: spina@cebas.csic.es

El Virus de las manchas necróticas del melón (*Melon necrotic spot virus*, MNSV; género *Carmovirus*) es endémico en los cultivos de cucurbitáceas. Su genoma es de RNA monocatenario de sentido positivo de 4.3 kb, con cinco marcos de lectura abierta, con RNAs genómicos y subgenómicos que no tienen ni 5'-cap ni 3'-poly(A). Uno de los primeros procesos que deben ocurrir durante el ciclo celular del virus es la traducción de sus RNAs. El entorno celular en el que ocurre la traducción viral no es demasiado conocido. Se sabe que, en general, la formación de los complejos de replicación viral está asociada con membranas intracelulares y que éstos contienen proteínas tanto virales como del huésped, así como los RNAs virales. Nuestro interés es conocer dónde ocurren los procesos tempranos, a nivel celular, durante la infección de melón por MNSV. Para ello inoculamos mecánicamente cotiledones de melón y tomamos muestras a 3-5 dpi de las lesiones recién formadas, las fijamos y procesamos a baja temperatura (PLT) para evitar el desplazamiento de las moléculas y localizamos mediante hibridación in situ e inmunocitoquímica RNAs y proteínas virales (CP, p-29 y p-89) y marcadores de la infección (dsRNA), así como factores de traducción (eIF4E, PABP). Primeramente hemos puesto a punto el procesamiento de las muestras, así como la localización de las proteínas y RNAs de interés mediante el marcaje indirecto con revelado colorigénico o fluorescente. Nuestros resultados preliminares indican que todas las moléculas estudiadas son citoplásmicas, aunque pudiera haber diferencias en cuanto al tipo de células en el que se localizan preferentemente distintos factores virales. El dsRNA y la eIF4E se encuentran en todos los tipos celulares, pero de forma heterogénea. Además hemos realizado un estudio preliminar de la ultraestructura celular en tejido infectado para identificar estructuras de novo o cambios estructurales en orgánulos a consecuencia de la infección viral, habiendo observado la presencia de vesículas, así como estructuras membranosas heterogéneas del tamaño de los cloroplastos en el citoplasma de las células infectadas.

Trabajo financiado por el proyecto AGL2009-07552/AGR.

LA LOCALIZACIÓN SUBCELULAR Y LA CAPACIDAD SUPRESORA DE LA PROTEÍNA DE LA CÁPSIDA p25 DIFIERE ENTRE AISLADOS DEL VIRUS DE LA TRISTEZA DE LOS CÍTRICOS

Navarro-López, J.¹, Ruiz-Ruiz, S.^{1,2}, Flores, R.², Moreno, P.¹, Ambrós, S.¹

¹Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA), Centro CPVyB, Moncada, 46113-Valencia. ²Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas (IBMCP), CPI-UPV, 46022-Valencia.

El virus de la tristeza de los cítricos (CTV) sólo infecta de forma natural algunas especies de cítricos, aunque clones agroinfectiosos del aislado T36 infectan sistémicamente la especie no-huésped *Nicotiana benthamiana*. Clones equivalentes del aislado T318A se replican en *N. benthamiana* pero no producen invasión sistémica, mientras que otros aislados (p.e. T385) ni siquiera se replican en esta especie. La proteína mayoritaria de la cápsida (p25) de CTV actúa como supresor intercelular del silenciamiento mediado por RNA en *N. benthamiana*. Para saber si esta proteína puede estar implicada en la interacción variable con el huésped, se ha estudiado la localización subcelular de p25 de distintos aislados de CTV y sus capacidades supresora y patogénica. La expresión transitoria por agroinfiltración en *N. benthamiana* y cítricos, de las fusiones p25-GFP/RFP (proteína fluorescente verde/roja) y su co-localización con marcadores adecuados, mostró que p25 de T36 y T385 se localizan principalmente en el núcleo, mientras que la de T318A se detecta en la membrana nuclear y citoplasmática, pero no en el núcleo. Para identificar las posibles señales de localización nuclear (NLS) se expresaron proteínas quiméricas (intercambiando tres regiones de p25), mutantes de delección y de sustitución. El fragmento aminoacídico 1-31, que contiene un motivo rico en aminoácidos básicos, parece estar implicado en la localización nuclear de p25 de T36 y T385, y extranuclear de T318A. Sin embargo, la delección o sustitución de esos aminoácidos por Ala o Asn no cambió la localización nuclear de estas proteínas. Se están ensayando mutantes de delección y sustitución de las regiones central y terminal de la proteína para delimitar la posible señal NLS. En la posición 31 de la proteína existe un polimorfismo de secuencia entre aislados de CTV. Sorprendentemente, un único cambio Leu31Val en p25 de T318A dio lugar a su localización nuclear, mientras que el cambio complementario Val31Leu en p25 de T36 o de T385 la eliminó. Así, la Leu31 está implicada en la localización extranuclear de p25 de T318A (en *N. benthamiana* y en cítricos) y formaría parte de una señal de exportación nuclear (NES) que seguiría el consenso de una señal rica en Leucinas tipo LNLHIDPTLI. Por otra parte, se ha estudiado la capacidad de supresión del silenciamiento intercelular de p25 de los tres aislados mediante ensayos de expresión transitoria en plantas de *N. benthamiana* línea 16c. Los resultados iniciales sugieren una actividad supresora más intensa para p25 de T36 seguida de las de T318A y T385. Sin embargo, la expresión de p25 de T36 y T318A en *N. benthamiana* como un RNA subgenómico del virus X de la patata no dio lugar en ningún caso a un aumento en la intensidad de los síntomas, al contrario de lo que sucede con p23, un supresor intracelular del silenciamiento codificado por CTV.

SIM-80

LA PROTEÍNA P14 DEL VIRUS B DE LA VID: LOCALIZACIÓN SUBCELULAR Y EFECTO PATOGENICO Y SUPRESOR DEL SILENCIAMIENTO

Davino S., Ruiz-Ruiz, S., Flores, R.

Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas (UPV-CSIC), 46022 Valencia, España

Las plantas y otros organismos eucarióticos disponen de un mecanismo de defensa frente a infecciones virales basado en el silenciamiento mediado por RNA. Para contrarrestar esta barrera, los virus han desarrollado diferentes estrategias, entre ellas la expresión de proteínas supresoras que inhiben dicho silenciamiento a distintos niveles. Los virus A y B de la vid (*Grapevine virus A* y *Grapevine virus B*, GVA y GVB, respectivamente, ambos del género *Vitivirus*) contienen una única molécula de RNA genómico de simple cadena y polaridad positiva encapsidada en partículas filamentosas. Resultados previos indican que estos dos virus codifican proteínas (p14 en GVB) con un característico dominio estructural denominado dedo de Zn, precedido por una región rica en aminoácidos básicos, presente también en proteínas supresoras del silenciamiento como p23 del virus de la tristeza de los cítricos. Puesto que el patrón específico de localización subcelular de GVB-p14 podría aportar información acerca de su función, el correspondiente gen se clonó bajo el control del promotor 35S y se fusionó al que codifica la proteína fluorescente verde (GFP). La expresión transitoria (vía agroinfiltración) de la construcción resultante en *Nicotiana benthamiana*, seguida de examen con microscopía confocal, mostró la presencia de p14-GFP en el núcleo celular formando grandes agregados no nucleolares que, sin embargo, colocalizan con una proteína marcadora del nucleolo (la fibrilarina). Estos resultados sugieren que GVB-p14 tiene una señal de localización nuclear (NLS) y que su expresión causa una redistribución de la fibrilarina. Las NLS son motivos de secuencia ricos en aminoácidos básicos que median el transporte al núcleo uniéndose a receptores conocidos como importinas que se encuentran en los poros nucleares. GVB-p14 contiene una región rica en aminoácidos básicos que precede a un dominio de dedo de Zn. Para examinar su papel en la localización de GVB-p14 hemos efectuado experimentos de mutación puntual alterando estas regiones aminoacídicas. Asimismo estamos analizando la actividad supresora del silenciamiento de GVB-p14, y su efecto patogénico en *N. benthamiana* al expresarla como un RNA subgenómico del virus X de la patata. Resultados preliminares indican que GVB-p14 presenta ambas propiedades.

SIM-81

GEMINIVIRUS REP PROTEIN INTERFERES WITH THE PLANT DNA METHYLATION MACHINERY AND SUPPRESSES TRANSCRIPTIONAL GENE SILENCING

Rodríguez-Negrete, E., Lozano-Durán, R., Piedra-Aguilera, A., Cruzado, L., Bejarano, E.R., Castillo, A.G.

Instituto de Hortofruticultura Subtropical y Mediterránea "La Mayora", Universidad de Málaga-Consejo Superior de Investigaciones Científicas (IHSM-UMA-CSIC). Dept. Genética. Campus Teatinos. 29071 Málaga, Spain. ara@uma.es

The apparent simplicity of viruses hides the complexity of their interactions with their hosts. Viruses are masters at circumventing host defenses and manipulating the cellular environment for their own benefit. Cytosine methylation is an epigenetic mark that promotes gene silencing and plays an important role in genome defense against transposons and invading DNA viruses. Previous data showed that the largest known *family* of single-stranded DNA viruses, *Geminiviridae*, prevents methylation-mediated transcriptionally gene silencing (TGS) by interfering with the proper functioning of the plant methylation cycle. In addition, Geminiviral replication is impaired by DNA methylation and *Arabidopsis* mutants affected in cytosine methylation are hypersusceptible to geminivirus infection. This implies that plants might use methylation as a defense against geminiviruses and that the viral genome is a target for plant DNA methyltransferases. Our study shows a novel counter-defense strategy used by geminiviruses, that reduces the expression of the plant maintenance DNA methyltransferases, *MET1* and *CMT3*, in both, locally and systemically infected tissues. Furthermore, we demonstrated that the virus-mediated repression of these two maintenance DNA methyltransferases is widely spread among different geminivirus species. Additionally, we identified Rep as the geminiviral protein responsible for the repression of *MET1* and *CMT3*, and another viral protein, C4, as an ancillary player in *MET1* downregulation. The presence of Rep, suppresses TGS of an *Arabidopsis* transgene and of host loci whose expression is strongly controlled by CG methylation. Additionally, bisulfite sequencing analyses showed that the expression of Rep caused a substantial reduction in the levels of DNA methylation at CG sites. Our findings suggest that Rep, the only viral protein essential for geminiviral replication, displays TGS suppressor activity through a mechanism distinct from the one thus far described for geminiviruses.

RESÚMENES DE PANELES

PANELES DE CONTROL (PAN-1 A PAN-75)

PAN-1

PROTECCIÓN DEL ÁCIDO SALICÍLICO CONTRA LA INFECCIÓN DEL VIRUS DEL MOSAICO ENANIZANTE DEL MAÍZ (*Maize dwarf mosaic virus*, MDMV)

Cueto-Ginzo, A., Serrano, L., Sin, E., Rodríguez, R., Falcioni, T., Medina, V., Achón, M. A.

*Grup de recerca INPLAMICVEC (Interacció Planta-Microorganisme-Vector).
Dept. Producció Vegetal i Ciència Forestal de la Universitat de Lleida.
Alcalde Rovira Roure 191. 25198 Lleida (Spain)*

La resistencia sistémica adquirida (SAR) es un mecanismo de defensa en plantas contra un amplio espectro de patógenos. Esta resistencia implica la producción por la planta de una o varias señales que activan los mecanismos de resistencia, siendo el ácido salicílico (SA) una de estas señales.

En este estudio se ha analizado la posible utilización del SA en contra de la infección del virus del mosaico enanizante del maíz (MDMV), virus endémico del Valle del Ebro. Para ello se han aplicado dos dosis de SA (5mM y 25mM) a plantas inoculadas y no inoculadas con MDMV, y analizado el efecto sobre la infección del virus y los distintos parámetros de crecimiento de la planta.

El tratamiento con SA incrementa las tasas fotosintéticas y el crecimiento de la planta tanto en las plantas inoculadas como las no inoculadas, siendo mayor en las no inoculadas. El tratamiento con SA produce un retraso en la aparición de síntomas y reduce la infección viral entre 11-23 %, y la dosis de 25mM también la carga viral. Además este tratamiento incrementa un 40% la altura de las plantas inoculadas con MDMV respecto a las no tratadas, e induce un mayor volumen radicular, con raíces más gruesas cuando se utiliza la dosis más elevada.

Los análisis de proteómica diferencial (en curso) contribuirán a determinar las proteínas y vías metabólicas implicadas en estas respuestas.

Este trabajo ha sido financiado por el proyecto del Ministerio de Ciencia e Innovación (MICINN), actual Ministerio de Economía y Competitividad (MEC) (AGL AGL2010-15691) y por el programa IMPULS de la Universitat de Lleida (UdL)

PAN-2

EVALUACIÓN DE *Pseudomonas fluorescens* PICF7 COMO AGENTE DE BIOCONTROL DE *Plasmopara halstedii* EN GIRASOL

Maldonado-González, M.M.¹, García-Carneros, A.¹, Prieto, P.², Lucena-Lucena, N.¹, Molinero-Ruiz, L.¹, Mercado-Blanco J.¹

¹Departamento de Protección y ²Departamento de Mejora Genética Vegetal, Instituto de Agricultura Sostenible, CSIC, Avd. Menéndez Pidal s/n, Campus Alameda del Obispo, Apdo. 4084, 14080 Córdoba; E-Mail: mercedesm@ias.csic.es.

Uno de los patógenos más importantes que limitan la producción del girasol es el oomiceto de suelo *Plasmopara halstedii* Farl. Berl. & de Toni, agente causal del mildiu del girasol (MG). Si bien se dispone de medidas efectivas para el control de esta enfermedad (p.e., tratamiento con mefenoxam y/o uso de híbridos de girasol resistentes) la adaptabilidad del patógeno hace que el MG continúe siendo una importante amenaza. La posibilidad de controlar la enfermedad mediante agentes de control biológico (ACBs) ha sido hasta ahora una estrategia escasamente investigada. Estudios previos han demostrado que *Pseudomonas fluorescens* PICF7 (originaria de raíces de olivo cv. Picual) es un ACB efectivo contra la verticilosis del olivo, enfermedad causada por el hongo fitopatógeno *Verticillium dahliae* Kleb. Asimismo, la cepa PICF7 no sólo es una colonizadora eficaz de raíces de olivo, donde es capaz de establecerse de forma endofítica, sino que además coloniza los sistemas radicales de otras especies, incluyendo la planta modelo *Arabidopsis thaliana*. Considerando estos antecedentes, los objetivos de este estudio fueron elucidar si *P. fluorescens* PICF7: (1) coloniza y persiste en raíces de girasol; (2) promueve el crecimiento de plantas cuyas semillas han sido previamente bacterizadas; y (3) podría ser utilizado como ACB frente a MG. Semillas híbridas de girasol susceptibles a *P. halstedii* se germinaron y sumergieron en una suspensión bacteriana de PICF7, PICF7Rf (mutante espontáneo resistente a rifampicina) o en MgSO₄ 10 mM (tratamiento control). A continuación, semillas de cada tratamiento se sumergieron en una suspensión de zoosporas de *P. halstedii*. Para comprobar la capacidad colonizadora de PICF7, incluido su posible endofitismo, se utilizó un derivado autofluorescente marcado con EGFP, y el proceso de colonización se observó mediante microscopía confocal. Los resultados obtenidos demuestran que la cepa PICF7 es capaz de colonizar, incluso de forma endofítica, raíces de girasol desde momentos muy tempranos después de la bacterización de las semillas. Sin embargo, no se observó estimulación del crecimiento de la parte aérea ni control significativo de la enfermedad bajo las condiciones experimentales utilizadas en este estudio.

Financiado por los proyectos AGL2009-07275 y AGL2010-17909 (MICINN), y P07-CVI-02624 (Junta de Andalucía), cofinanciados por FEDER de la UE.

PAN-3

RESPUESTA DE TRES ESPECIES DE PLANTAS AROMÁTICAS A *Rosellinia necatrix* MODULADA POR LA MICORRIZACIÓN CON *Glomus intraradices*

Calvet, C.¹, García-Figueres, E.², Prat, M.¹, Reigada, S.², Camprubí, A.¹

¹IRTA, Departament de Protecció Vegetal Sostenible, Centre de Cabrils, Ctra. de Cabrils Km 2, 08348 Cabrils, Barcelona.

²Laboratori de Sanitat Vegetal, Centre de Cabrils, Ctra. de Cabrils Km 2, 08348 Cabrils, Barcelona.

Plantas de *Rosmarinus officinalis* L., *Salvia officinalis* L. y *Lavandula angustifolia* L. micorrizadas en vivero con el hongo formador de micorrizas *Glomus intraradices* Schenck & Smith (BEG 72) se trasplantaron tras tres meses de crecimiento a un sustrato infectado con un aislado de *Rosellinia necatrix* Prill. de patogenicidad conocida. En ese sustrato las plántulas crecieron durante dos meses en contenedores de 3 L de capacidad bajo umbráculo y se fertilizaron periódicamente. Al final de ese periodo, coincidiendo con la aparición de síntomas de decaimiento, se midieron parámetros de crecimiento y se estimaron los síntomas de necrosis en cuello y raíz. Paralelamente se evaluó la micorrización en las raíces.

Las plántulas de lavanda y de romero respondieron de forma similar, con una estimulación del crecimiento debido a *G. intraradices* muy significativa y con una menor incidencia del hongo patógeno en el sistema radical en plantas micorrizadas. En *S. officinalis* sólo el patógeno tuvo un efecto significativo sobre el desarrollo aéreo y radical, no observándose respuesta a la micorrización.

Los resultados señalan el efecto beneficioso que puede ejercer el hongo micorrícico permitiendo a la planta mantenerse en crecimiento a pesar de la infección por el patógeno y la importancia del huésped en la visualización de este efecto.

PAN-4

LOS GENES *dar* ESTAN IMPLICADOS EN LA CAPACIDAD DE BIOCONTROL DE *Pseudomonas fluorescens* PCL1606

Calderón, C. E., Bonilla, N., Carrión, V. J., de Vicente, A.¹, Cazorla, F.M.

Departamento de Microbiología, Universidad de Málaga, Instituto de Hortofruticultura Subtropical y Mediterránea "La Mayora" (IHSM-UMA-CSIC) Campus de Teatinos, 29071. Málaga. E-mail: claudia@uma.es.

Pseudomonas fluorescens PCL1606 es una rizobacteria con capacidad de biocontrol frente a *Rosellinia necatrix*, agente causal de la podredumbre radicular blanca y *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycorpersici*, que causa la podredumbre de cuello y raíces de las plantas de tomate. Esta bacteria se caracteriza por la producción del antibiótico antifúngico 2-hexil, 5-propil resorcinol (HPR).

Para determinar las bases genéticas de la producción de HPR en *P. fluorescens* PCL1606, se rastreó una genoteca genómica de *P. fluorescens* PCL1606 empleando como sonda los genes *dar* descritos previamente como responsables de la producción de HPR en *P. aurantica* BL915. Tras el análisis, se aisló el plásmido pCGNOV-1, que contenía un clon genómico con la presencia de cinco genes homólogos a los genes *dar*, dispuestos en el mismo orden que en *P. aurantica* BL915, aunque con ligeras diferencias en la secuencia.

Para determinar el papel de cada uno de los genes homólogos a los genes *dar* en la producción de HPR y su capacidad de biocontrol, se llevó a cabo la construcción de una colección de mutantes dirigidos en la producción de HPR por inserción. Además se obtuvieron los correspondientes complementantes de los mutantes defectivos. Sobre estos mutantes y sus respectivos complementantes, se realizó una caracterización fenotípica de las propiedades relacionadas con el biocontrol, entre ellas la capacidad de antagonismo frente a *Rosellinia necatrix* y *Fusarium oxysporum*, la producción de antibióticos y ensayos de control biológico en los sistemas experimentales aguacate-*Rosellinia* y tomate-*Fusarium*. Los resultados obtenidos muestran que los genes *darA*, *darB* pierden la capacidad de producir HPR. Esta propiedad queda restaurada al complementar cada uno de los mutantes con sus respectivos genes. Estos genes *darA* y *darB* junto con el gen *darR*, están involucrados en la capacidad de biocontrol de la cepa silvestre *P. fluorescens* PCL1606.

En conclusión, la capacidad de biocontrol de la cepa *P. fluorescens* PCL1606 depende de la producción de HPR, llevada a cabo por los genes *dar*.

Esta investigación ha sido apoyada por el Proyecto GL2011-30345-C02-01 (MICINN, España). CE Calderón recibió el apoyo de una beca de FPI, MICINN, España.

PAN-5

Arabidopsis thaliana* COMO MODELO PARA ELUCIDAR LOS MECANISMOS DE BIOCONTROL DE *Pseudomonas fluorescens* PICF7 FRENTE A *Verticillium dahliae

Maldonado-González, M.M.¹, Bakker, P.A.H.M.², Mercado-Blanco, J.¹

¹*Departamento de Protección de Cultivos, Instituto de Agricultura Sostenible, CSIC, Avd. Menéndez Pidal s/n, Campus Alameda del Obispo, Apdo. 4084, 14080 Córdoba; E-Mail: mercedesm@ias.csic.es.*

²*Plant-Microbe Interactions, Institute of Environmental Biology, Utrecht University, Padualaan 8, 3584 CH Utrecht, Países Bajos.*

Las verticilosis (*Verticillium dahliae* Kleb.) son enfermedades que afectan a un amplio número de cultivos y que, para un manejo efectivo, necesitan de estrategias de control integrado. Entre las medidas a implementar para confrontar la Verticilosis del olivo (VO), el uso de agentes de control biológico (ACBs) constituye una interesante alternativa. *Pseudomonas fluorescens* PICF7 es un ACB con demostrada capacidad para inhibir el crecimiento de *V. dahliae* *in vitro*, de colonizar endofíticamente raíces de olivo y de controlar la VO causada por el patotipo defoliante (D) en plántones de olivo. Sin embargo, los mecanismos responsables del control efectivo de la VO por PICF7 son aún desconocidos y complicados de elucidar, entre otras causas por la propia naturaleza de la planta huésped. El presente estudio propone el uso de la planta modelo *Arabidopsis thaliana* para facilitar la identificación de los posibles mecanismos que la cepa PICF7 despliega en el control de *V. dahliae*. Para ello se fijaron los siguientes objetivos: 1) determinar si la cepa PICF7 coloniza y persiste en la rizosfera de diferentes accesiones de *A. thaliana*; 2) evaluar si los patotipos D y no defoliante (ND) de *V. dahliae* causan enfermedad en *A. thaliana* Col-0; 3) examinar si PICF7 controla la enfermedad en diferentes accesiones y mutantes de *A. thaliana*; y 4) comprobar si mutantes de PICF7 defectivos en motilidad, antagonismo frente a *V. dahliae* y producción de sideróforos han perdido la capacidad de controlar al patógeno. Se han efectuado diversos bioensayos que han permitido concluir que: 1) los patotipos D y ND de *V. dahliae* provocan enfermedad en plantas Col-0; 2) la cepa PICF7 coloniza y persiste en la rizosfera de diferentes accesiones y mutantes de *A. thaliana*; 3) PICF7 es capaz de controlar la enfermedad causada por el patotipo D; y 4) mutantes de PICF7 defectivos en motilidad ("swimming"), en producción de sideróforos, o disminuidos en la capacidad de antagonizar al patógeno, fueron menos efectivos en controlar al patógeno en *A. thaliana*. La planta modelo *A. thaliana* es útil, por tanto, para revelar características de PICF7 asociadas al biocontrol de *V. dahliae*.

Financiado por los proyectos AGL2009-07275 (MICINN) y P07-CVI-02624 (Junta de Andalucía), cofinanciados por FEDER de la UE.

PAN-6

DE LA RAÍZ AL TALLO: INTERACCIÓN *Pseudomonas fluorescens* PICF7-*Pseudomonas savastanoi* NCPPB 3335 EN TUMORES DE OLIVO

Maldonado-González, M.M.¹, Prieto, P²., Ramos, C.³, Mercado-Blanco, J.¹

¹Departamento de Protección de Cultivos y ²Mejora Genética Vegetal, Instituto de Agricultura Sostenible, CSIC, Avd. Menéndez Pidal s/n, Apdo. 4084, 14080 Córdoba; E-Mail: mercedesm@ias.csic.es.

³Instituto de Hortofruticultura Subtropical y Mediterránea "La Mayora", Universidad de Málaga-CSIC, Área de Genética, Facultad de Ciencias, Campus Teatinos, 29010 Málaga.

Pseudomonas savastanoi pv. *savastanoi* (Psv) es el agente causal de la tuberculosis del olivo, enfermedad caracterizada por la formación de tumores en los troncos y ramas de los árboles infectados. Debido a la dificultad de controlar la enfermedad mediante bactericidas químicos o la utilización de cultivares resistentes, el uso de agentes de control biológico (ACBs) aparece como una alternativa interesante y poco explorada. El objetivo de este trabajo fue evaluar si la bacteria endofita *Pseudomonas fluorescens* PICF7, habitante natural de la raíz de olivo, ACB efectivo frente a la verticilosis y antagonista *in vitro* frente a Psv, podría ser una opción a explorar en el control de la tuberculosis. Plantas de olivo micropropagadas *in vitro* se inocularon en el tallo con Psv NCPPB 3335, PICF7, o una mezcla de ambas. Para los ensayos de microscopía (confocal y epifluorescencia), destinados a localizar *in situ* ambas poblaciones bacterianas, se utilizaron derivados del ACB y del patógeno marcados con proteínas autofluorescentes. Los resultados mostraron que la cepa PICF7 es capaz de establecerse y permanecer en tejidos aéreos durante periodos prolongados (hasta dos meses). Por otro lado, cuando PICF7 se coinocula con Psv, el desarrollo del tumor se ve alterado, produciéndose un retraso temporal de la hiperplasia y originándose tumores de menor tamaño y diferentes a nivel macroscópico de los inducidos por Psv. Estos fenómenos se correlacionaron con una disminución drástica de la población de Psv en los días posteriores a la inoculación. El examen microscópico reveló un cambio en la ubicación del patógeno. Así, en ausencia del ACB, Psv se localizó mayoritariamente en la superficie del tumor, mientras que en presencia de aquél lo hacía principalmente en cavidades internas, siendo PICF7 quien ocupaba la superficie. Estos resultados sugieren que, en las condiciones ensayadas, PICF7 interfiere en la ubicación del patógeno y en el desarrollo normal de la enfermedad. La capacidad de PICF7 para reducir los síntomas en plantas adultas lignificadas está siendo evaluada en la actualidad.

Financiado por AGL2009-07275, AGL2011-30343-C02-01 (MICINN/MINECO), P07-CVI-02624 y P08-CVI-03475 (Junta de Andalucía), cofinanciados por FEDER de la UE.

PAN-7

EFICACIA POTENCIAL DE PRODUCTOS QUÍMICOS PARA REDUCIR LAS INFESTACIONES DEL AGUA POR CONIDIAS DE DISTINTOS GRUPOS DE VIRULENCIA DE *Verticillium dahliae* SOBRE OLIVO

Santos Rufo, A., Rodríguez Jurado, D.

IFAPA Centro "Alameda del Obispo", Apdo. 3092, 14080 Córdoba.
dolores.rodriguez.jurado@juntadeandalucia.es

Las aguas de riego de los cultivos en Andalucía son un vehículo de dispersión de aislados de *Verticillium dahliae* con virulencia diferencial sobre olivo y otros huéspedes del hongo. Erradicar o reducir los niveles de inóculo del patógeno en las aguas de riego es una prioridad que debe ser contemplada en el manejo integrado de las Verticilosis. Una manera de abordar esta necesidad es mediante la aplicación al agua de riego de productos químicos comercializados que, por estar autorizados para ser incorporados al agua en otros ámbitos, pudieran ser en el futuro registrados para las aguas de riego. Se planteó evaluar la eficacia *in vitro* de dos productos comercializados basados en los agentes oxidantes hipoclorito sódico (hp) y peróxido de hidrógeno (px) para reducir la viabilidad de *V. dahliae* en el agua como primera aproximación a la prioridad antes indicada. Para ello, en unos experimentos (eficacia supresiva) el agua estéril infestada con conidias de cada uno de 6 grupos de virulencia de *V. dahliae* sobre olivo se mezcló con 5 concentraciones de cada producto (3 autorizadas) o con agua estéril (control) y se incubó durante 30 días, en otros experimentos (persistencia supresiva) el agua estéril (control) o tratada con las 5 concentraciones de cada producto se incubó y periódicamente durante 30 días se infestó con conidias de cada uno de los 6 aislados del hongo. Tres repeticiones por tratamiento experimental se incubaron a 24°C bajo luz, extrayendo y diluyendo convenientemente alícuotas de cada repetición en 4 tiempos durante los experimentos. La viabilidad del inóculo se determinó sobre medio de cultivo y comparó aplicando el test de Dunnett. Ambos productos presentaron una elevada eficacia supresiva, y solo el producto biodegradable constituido por px mostró además una elevada persistencia supresiva. El tratamiento del agua con el producto a base de px redujo significativamente en el 73,4% ó más la viabilidad de los 6 aislados a todas las concentraciones y tiempos estudiados en todos los experimentos. Por el contrario, la persistencia supresiva del producto conteniendo hp solo fue significativamente efectiva para todos los aislados a una concentración autorizada hasta los 5 días de incubación, la cual redujo la viabilidad entre el 34,9 y 75,4%.

Financiado por el proyecto PEI.PEI2011.1 del IFAPA parcialmente financiado con recursos del FEDER.

PAN-8

VARIACIÓN EN EL PATRON DE LAS POBLACIONES FÚNGICAS DE DOS SUELOS AGRÍCOLAS A LO LARGO DEL CICLO DE CULTIVO DEL TOMATE TRAS LA APLICACIÓN DE *Penicillium oxalicum*

Vázquez, G.¹, Melgarejo, P.¹, Herranz, Y.¹, Mallorquí, M.², Martínez-Alonso, M.², Gaju, N.², Larena, I.¹

¹Departamento de Protección Vegetal, CIT-INIA, Carretera de La Coruña 7,500, 28040 Madrid. ²Departamento de Genética y Microbiología. Facultad de Biociencias. UAB. 08193 Bellaterra, Barcelona. E-mail: ilarena@inia.es

Penicillium oxalicum (PO) ha demostrado ser un eficaz agente de control biológico (ACB) frente a diferentes enfermedades de plantas hortícolas. Pero su introducción en el patosistema puede afectar no sólo al patógeno que pretende controlar (organismo diana) sino también a otros microorganismos no dianas presentes en ese ambiente. Por tanto, es necesario a la hora de registrar y comercializar un ACB valorar su efecto sobre los microorganismos presentes en el ecosistema donde es aplicado.

Se realizaron dos ensayos en dos parcelas comerciales de cultivo de tomate en Madrid, cuyos suelos presentan diferentes propiedades físico-químicas, para analizar las variaciones en las poblaciones fúngicas del suelo tras la aplicación de *Penicillium oxalicum* (PO). Se trasplantaron plantas de tomate tratadas 7 días antes con conidias de PO en el semillero y plantas no tratadas que actuaban como control. Se tomaron muestras de suelo en superficie (entre 0 y 5 cm) y profundidad (entre 6 y 10 cm) a los 0, 75, 180 y 365 días desde el trasplante. Tras la extracción de ADN y nested PCR con cebadores específicos de hongos de cada muestra, los productos de PCR fueron visualizados en geles de poliacrilamida en gradiente desnaturalizante (DGGE) teñidos con bromuro de etidio. Los patrones resultantes nos mostraron la diversidad de la comunidad fúngica del suelo y su respuesta a la introducción del agente de control biológico. A partir de los perfiles de bandas se elaboró una matriz binaria y un dendrograma. Las bandas más características fueron secuenciadas y comparadas con las secuencias depositadas en el GenBank para identificar los hongos más abundantes en cada tipo de suelo.

Las muestras en ambos tipos de suelo se agruparon en tres cluster en función de la fecha de muestreo. El análisis de la varianza molecular (AMOVA) mostró que no hubo diferencias significativas entre los tratamientos (suelos tratados con PO y no tratados) ni entre las muestras tomadas en superficie y profundidad pero sí entre las fechas de muestreo.

En ambos suelos, la estructura de las comunidades fúngicas evolucionó con el tiempo independientemente de la introducción del ACB. En conclusión, la aplicación de *Penicillium oxalicum* no tiene un efecto negativo sobre las poblaciones fúngicas de suelo.

Este trabajo se ha realizado en el marco de los proyectos RTA 2007-00067 y RTA 2010-00093.

PAN-9

MÉTODO DE CUANTIFICACIÓN DEL AGENTE DE BIOCONTROL *Penicillium oxalicum* CEPA 212 EN DIFERENTES TIPOS DE SUELO

Vázquez, G., Herranz, Y., De Cal, A., Melgarejo, P., Larena, I.

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

Fusarium oxysporum f. sp. *lycopercisi* (FOL) es el hongo causante de la marchitez vascular del tomate. La cepa 212 de *Penicillium oxalicum* (PO212) ha demostrado ser un agente de control biológico (ACB) eficaz frente a la Fusariosis vascular del tomate causada por FOL.

El registro y comercialización de un microorganismo como biofungicida requiere hacer una rigurosa evaluación del riesgo tal y como viene definido por el reglamento europeo 1107/2009 concerniente a la introducción de los productos de protección vegetal en el Mercado. Hitos básicos en esta evaluación son la dispersión y comportamiento del biofungicida en el ambiente donde va a ser liberado, lo que implica el desarrollo de un método de seguimiento de su supervivencia y dispersión en el ambiente donde va a ser aplicado.

Con el objetivo de adecuar nuestra materia activa a los principios específicos requeridos por la Unión Europea para su aplicación y comercialización nuestro trabajo se centró en el estudio de la supervivencia y dispersión de PO212 en diferentes suelos: turba estéril en invernadero y suelos naturales en ensayos de campo en dos años consecutivos durante el ciclo de cultivo del tomate. Se desarrolló un método de cuantificación del ACB a lo largo del tiempo que nos permitió por un lado, cuantificar la viabilidad de *Penicillium* spp (UFCs por g de suelo) en medio semi-selectivo y por otro lado, cuantificar la biomasa de PO212 (ng de biomasa seca por g de suelo) mediante PCR en tiempo real. Se tomaron 4 tipos de muestras en suelo: dos en vertical desde la superficie y dos en horizontal desde la planta. PO212 mostró una movilidad en superficie y profundidad muy limitada en todos los tipos de suelo estudiados ($10\text{-}10^3$ ng biomasa seca/g suelo seco), persistiendo en los mismos durante al menos 120 días en invernadero y 365 días en campo, aunque a unos niveles muy bajos (0,45 -61,2 ng biomasa seca/g de suelo seco en invernadero ó 2,71-367,2 ng biomasa fresa/g de suelo seco en campo). Por otra parte, no se observó un aumento significativo de UFC por gramo de suelo seco de *Penicillium* spp. en los suelos de campo estudiados después de la aplicación de PO212. Estos valores fueron similares a los de cepas indígenas de *Penicillium* spp. presentes en esos suelos naturales antes de la aplicación de la ACB ($10^2\text{-}10^3$ UFC por gramo de suelo seco).

En conclusión, los datos presentados aquí muestran que la liberación de PO212 no tendrá un impacto negativo en el ambiente tras su liberación en el suelo ya que aunque persiste a bajos niveles, no proliferan en él. Por lo tanto, PO212 se podrá utilizar como un ACB eficaz y seguro frente a patógenos vegetales de suelo. Esta investigación ha sido financiada por los proyectos RTA2007-00067 y RTA 2010-00093 (Plan Nacional de I+D, Ministerio de Ciencia e Innovación).

PAN-10

MÉTODO DE TRANSFORMACIÓN DE *Penicillium oxalicum*, UN EFICAZ AGENTE DE BIOCONTROL

Martínez, F.¹, Herranz, Y.¹, Villarino, M.², Espeso, E. A.², Melgarejo, P.¹, Larena, I.¹

La cepa 212 de *Penicillium oxalicum* (PO212) ha demostrado ser un agente de control biológico (ACB) eficaz frente a la Fusariosis vascular del tomate causada por FOL, cuando éste es aplicado como conidias en el sustrato de semillero. En el desarrollo eficiente de un ACB es importante conocer las interacciones entre el ACB, el huésped y el patógeno contra el que va dirigido. El uso de cepas del ACB marcadas con proteínas de fluorescencia verde o roja (GFP o RFP) puede ser una herramienta muy útil para este fin.

En este trabajo iniciamos un método de transformación y de selección de cepas recombinantes de PO212 basado en los protocolos ya establecidos en *Aspergillus* y otras especies de *Penicillium*. Como marcadores genéticos de selección se realizó una aproximación para generar mutantes auxótrofos en las rutas de asimilación del nitrato y de biosíntesis de pirimidinas. En el primer caso aislando específicamente mutaciones en el gen homólogo a *niaD*, que codifica para la nitrato reductasa, y en el segundo en el gen homólogo *pyrG*, que codifica para orotidina 5'-monofosfato descarboxilasa (OMPdecase).

Ha sido imposible el aislamiento de mutantes *niaD*- utilizando el anión clorato como agente mutagénico y selectivo dado que la cepa PO212 mostró ser resistente a elevadas concentraciones de clorato.

Más fructífero ha sido el segundo abordaje utilizando como agente el ácido 5-ortofluoroorótico (5-FOA). Se han aislado varias cepas mutantes con un fenotipo de auxotrofia de pirimidinas que son fácilmente suplementadas con una mezcla de uracilo y uridina. Habiendo puesto a punto el protocolo de producción de protoplastos, hemos demostrado que dichas mutaciones *pyr*- mapean en el gen homólogo *pyrG*. Por otro lado hemos descubierto que los plásmidos autorreplicativos, de la serie pRG3-AMA, pueden ser mantenidos en PO212 lo que nos permitirá en el futuro abordar tanto trabajos de etiquetado de proteínas con pequeños epítopos o proteínas fluorescentes así como la identificación de genes involucrados en biocontrol.

Es la primera vez que se describe la transformación de la cepa de biocontrol 212 de *Penicillium oxalicum*, que nos permitirá obtener importantes avances en el conocimiento de la interacción del ACB con el huésped en ausencia y presencia del patógeno.

Esta investigación ha sido financiada por el proyecto RTA 2010-00093 (Plan Nacional de I+D, Ministerio de Ciencia e Innovación).

PAN-11

EVALUACIÓN DE GENOTIPOS DE OLIVO PARA RESISTENCIA A LA VERTICILOSIS

Arias Calderón, R., León, L., Bejarano Alcázar, J., de la Rosa, R., Belaj, A., Rodríguez Jurado, D.

IFAPA Centro "Alameda del Obispo", Apdo. 3092, 14080 Córdoba.
dolores.rodriguez.jurado@juntadeandalucia.es

La Verticilosis del olivo, causada por el hongo de suelo *Verticillium dahliae* Kleb., es el problema fitosanitario más importante del olivar en la actualidad debido a la extensión de la enfermedad, la gravedad de sus ataques, en particular en Andalucía, y la eficacia incompleta de las medidas de control estudiadas. Para el manejo de la enfermedad es necesario combinar eficientemente distintas medidas de lucha, entre las cuales la utilización de la resistencia es interesante por el control que podría proporcionar a bajo coste sin ocasionar un deterioro medioambiental. En este trabajo se ha evaluado el nivel de resistencia de 9 genotipos procedentes de cruzamientos de olivo cultivado y 28 genotipos de olivo silvestre a un aislado monoconídico de *V. dahliae* obtenido de olivo, caracterizado en estudios previos como altamente virulento dentro del patotipo defoliante de *V. dahliae*. Cinco a veinte plantas de cada genotipo procedente de cruzamientos o silvestre, según el experimento, se inocularon por inmersión radical en una suspensión de conidias del patógeno o se sumergieron en agua estéril (controles). Todos los experimentos incluyeron plantas controles de dos niveles de resistencia conocidos, Picual (susceptible) y Frantoio (resistente). Las plantas crecieron bajo condiciones ambientales controladas de $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 16 semanas tras la inoculación. La reacción a la inoculación se evaluó periódicamente asignando a la parte aérea de cada planta un valor de severidad comprendido entre 0 y 4 (0= ausencia de síntomas; 4= planta muerta). El diagnóstico de la enfermedad en las plantas con síntomas y la ocurrencia de posibles infecciones en ausencia de síntomas se consideraron realizando aislamientos de las plantas al finalizar los experimentos. Uno de los genotipos procedentes de cruzamientos de olivo cultivado (procedente de Frantoio en polinización libre) no expresó síntomas durante el periodo experimental, aunque fue colonizado vascularmente. Dos de los genotipos de olivo silvestre manifestaron síntomas de severidad similar o ligeramente inferior a la mostrada por Frantoio pero fueron vascularmente infectados. El nivel de resistencia de estos genotipos a la Verticilosis se confirmará en el futuro bajo condiciones controladas y en campo.

Financiado por los proyectos RTA2010-00036 y RF2009-00005 del INIA y PEI.PEI2011.1 del IFAPA parcialmente financiados por recursos del FEDER.

PAN-12

CONTROL INTEGRADO FRENTE A ENFERMEDADES FUNGICAS DEL SUELO EN VIVEROS DE FRESA

De Cal, A.¹, Martínez-Treceño, A.², Morales-Clemente, M. T.¹, Vázquez, G.¹, Melgarejo, P.¹

¹Departamento de Protección Vegetal. SGIT-INIA, 28040 Madrid. ²Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, Madrid. Email: cal@inia.es

España es el principal productor de plantas de fresa de la UE, se producen más de 550 millones de plantas en 1,100 ha situadas principalmente en las zonas altas de Castilla-León. En el año 2000 se estimaba un consumo de bromuro de metilo (BM) en viveros de fresa de aproximadamente 240 t, donde se utilizaba como único fumigante de suelos en el sector viverista de fresa, por ser muy eficaz en el control de patógenos de suelo (*Phytophthora cactorum*, *Verticillium* sp., *Rhizoctonia* sp., etc.). Desde se fueron asumiendo tasas de reducción real en el uso de BM hasta su completa desaparición en 2009. Desde entonces otras alternativas químicas como el 1,3, Dicloropropeno y Cloropicrina (DD:PIC) o el metamsodio aplicado con Rotary Spader han ido sustituyendo al BM, aunque tanto DD como PIC están sujetos a una próxima prohibición de uso por parte de las autoridades europeas.

Se persigue la caracterización y puesta a punto de alternativas con posibilidades de ser autorizadas en el futuro por la Unión Europea. El objetivo de este trabajo es evaluar diferentes productos químicos en combinación con el agente de biocontrol *Penicillium oxalicum* como alternativa al BM o DD:PIC, frente a las enfermedades de suelo en viveros de fresa. Se realizaron 6 ensayos (2006-2011) en parcelas diferentes no bromuradas con anterioridad, en colaboración con Viveros California SAT y Viveros Río Eresma SA. Los fumigantes (DD:PIC, metamsodio, dazomet) se aplicaron en Marzo y *P. oxalicum* (10^7 conidias/ml) se aplicó en forma de baño de raíz durante 30 min antes de la plantación en el mes de Abril. Las plantas fueron cosechadas en Octubre. El diseño experimental anual de las parcelas en cada vivero fue en bloques al azar con 4 repeticiones/tratamiento. La parcela elemental tenía una anchura de 2,75 m (con doble fila de planta madre) y una longitud de 30 m (82,5 m²). Se estimó la población fúngica total del suelo (unidades formadoras de colonias (ufc)/g suelo seco) antes y después del tratamiento por dilución de la solución del suelo en placas con agar patata dextrosa y en medios específicos de *Pythiaceae*, *Verticillium* y *Fusarium*. Se analizó la sanidad de 360 plantas madre ('Camarosa') procedentes de California (USA), antes de plantar y la incidencia de plantas enfermas a lo largo del cultivo.

P. oxalicum en combinación con metamsodio aplicado con Rotary Spader o dazomet reducen la incidencia de las enfermedades causadas por *P. cactorum* y *V. dahliae*, incidiendo sobre el desarrollo de la planta en las fases de crecimiento.

PAN-13

ECOFISIOLOGIA DE TRES AGENTES DE BIOCONTROL EN LA FILOSFERA Y RIZOSFERA DE UN ECOSISTEMA NATURAL

Larena, I., Herranz, Y., Morales-Clemente, M.T., Castillo, R., Melgarejo, P.,
De Cal, A.

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

Penicillium frequentans, *Epicoccum nigrum* y *Penicillium oxalicum* han sido descritos como agentes de biocontrol frente a la podredumbre parda del melocotonero, la marchitez vascular en hortalizas o frente a oidio en plantas de fresa. También se ha demostrado su capacidad para ser producidos y formulados a escala semi-industrial. Sin embargo, para implementar su aplicación práctica y que sus resultados sean comparables a los productos químicos de síntesis, se ha de incrementar su eficacia y evitar problemas de reproducibilidad. Considerando por tanto la combinación de distintas cepas como una de las vías prácticas para la mejora de la materia activa de los biofungicidas diseñados, se estudia la distribución de diferentes aislados a lo largo del año de acuerdo a la climatología y al estado fenológico de las especies vegetales.

Para ello se realizan tres muestreos (primavera-verano-otoño) durante el año 2011 en una finca de la provincia de Madrid de 5 ha., que se subdivide en 5 zonas (2 agrícolas, 2 forestales, 1 jardín). En cada zona y fecha se recogen 5 muestras de suelo (a distintas profundidades), 3 brotes y 5 hojas (desde plantas perennes y caducas), 2 raspados de madera, 5 malas hierbas y 5 muestras de hojarasca. Los brotes, hojas y madera se sembraron en agar patata dextrosa con estreptomycin (PDAs) y se incubaron a 20-25°C durante 4-7 días, periodo tras el cual se identificaron las posibles colonias que pudieran corresponderse con aislados de *P. frequentans*, *P. oxalicum* y *E. nigrum*. Por otra parte diez gramos de cada suelo hortícola, hojarasca y malas hierbas se agitaron en 150 ml de agua destilada estéril durante 30 minutos. Alícuotas de la solución se sembraron en PDAs y se incubaron a 20-25°C durante 4-7 días, periodo tras el cual se identificaron las posibles colonias que pudieran corresponderse con aislados de *P. frequentans*, *P. oxalicum* y *E. nigrum*. Posteriormente, se caracterizó su eficacia frente a enfermedades en aquellos aislados identificados mediante métodos morfológicos y moleculares. Se analizaron los resultados mediante métodos multivariantes.

Se han obtenido 120 aislados de *E. nigrum*, 55 de *P. oxalicum* y 9 de *P. frequentans*, que se distribuyeron principalmente sobre la filosfera de especies caducifolias y suelo con elevado contenido de materia orgánica. Por otra parte la población se hace significativamente superior a temperaturas superiores a 20°C. Se seleccionaron los aislados por su eficacia frente a las enfermedades.

PAN-14

COMPORTAMIENTO DE VARIEDADES COMERCIALES DE FRESA FRENTE A ENFERMEDADES EN VIVEROS

Redondo, C.¹, Larenas, J.¹, López-Aranda, J.M.², Soria, C.², Martínez-Trecheño, A.³, Melgarejo, P.¹, De Cal, A.¹

¹Departamento de Protección Vegetal. INIA. Carretera de La Coruña Km 7,5. 28040 Madrid. ²CIFA Málaga, IFAPA Junta de Andalucía, Churriana, Málaga. ³Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, Madrid.

'Marina', 'Medina', 'Amiga', 'Aguedilla', 'Fuentepina', 'SantaClara' y 'Fontanilla' son variedades de fresa obtenida en el Convenio INIA-IFAPA-IVIA- FNM S.A. y Asociación Española de Viveristas de Plantas de Fresa, durante los últimos años. Dichas variedades poseen muy buenas características agronómicas: alta producción precoz y total, alta capacidad de adaptación a diferentes ambientes de cultivo y alta conservación post-cosecha. Paralelamente se ha estudiado su comportamiento frente a las principales enfermedades que las plantas de fresa presentan en su fase de vivero: *Phytophthora cactorum*, *Verticillium dahliae*, y *V. albo-atrum* y *Podosphaera aphanis*. Para ello se realizaron al menos 2 ensayos en cámara de cultivo (22°C, 80% humedad, 16 horas fotoperiodo) para cada patógeno, en los cuales se evaluaba la resistencia de las plantas de cada variedad y se comparaba con otras variedades comerciales como 'Camarosa', 'Elsanta', 'Pandora' o 'Ventana'. En los ensayos de resistencia de *P. cactorum* y *Verticillium* las plantas se mantenían en solución nutritiva durante 30-45 días después de la inoculación con una suspensión de zoosporas (10^4 zoosporas/ml) o microconidias (10^7 microconidias/ml) respectivamente. Se evaluaba la gravedad de la enfermedad a lo largo del ensayo. En estas mismas plantas se evaluó también la resistencia a *P. aphanis*, ya que las plantas venían infectadas del vivero. Por otra parte, la resistencia o susceptibilidad a *P. aphanis* se evaluó en viveros comerciales, en un ensayo de bloques al azar, con 4 bloques por cultivar y 9 plantas porvariedad y bloque, cada 15 días desde que aparecían los primeros síntomas.

La variedad 'Medina' resultó ser más resistente a *P. cactorum* y *Verticillium* que la variedad 'Camarosa', mientras que 'Marina' era más susceptible a ambos patógenos. La variedad 'Aguedilla' resultó ser igual de resistente que la variedad 'Camarosa' a los tres patógenos ensayados, seguidas de 'Fontanilla' y 'Fuentepina' sólo susceptibles a *P. cactorum* y *P. aphanis* respectivamente.

PAN-15

EL EFECTO DE LA TEMPERATURA EN LA EFICACIA DE LA RESISTENCIA A TSWV EN PIMIENTO

Aramburu, J.¹, Galipienso, L.,¹ López, C.², Soler S.²

¹*Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentariès (IRTA), 08348 Cabriels, Barcelona.*

²*Instituto de Conservación y Mejora de la Agrodiversidad Valenciana-Universitat Politècnica de València COMAV-UPV, 46022 Valencia.*

El pimiento es uno de los cultivos hortícolas más afectados por el virus del bronceado del tomate (*Tomato spotted wilt virus*, TSWV). La resistencia natural proporcionada por el gen *Tsw* que desencadena una respuesta hipersensible se ha mostrado como la más eficaz para controlar la enfermedad. Sin embargo, se ha visto muy afectada, fundamentalmente, por dos hechos; (i) la aparición de variantes virales capaces de sobrepasar dicha resistencia y (ii) la pérdida de eficacia de la resistencia con las temperaturas elevadas. No obstante, la importancia relativa que representa este último aspecto en la epidemiología de la enfermedad no se ha cuantificado adecuadamente. Para evaluar esta situación se han realizado ensayos, en cámaras de cultivo con temperaturas controladas, para establecer las condiciones de tiempo mínimo de inactivación de la respuesta hipersensible necesario para permitir que un aislado, que a priori no es capaz de sobrepasar la resistencia, pueda provocar infección sistémica. Los resultados obtenidos apuntan a que en las condiciones más desfavorables que se puedan producir en cultivos bajo invernadero en épocas de verano, la respuesta hipersensible es lo suficientemente eficaz como para impedir que este tipo de variantes del TSWV infecten las plantas sistémicamente. Este resultado no justifica la presencia de este tipo de variantes en pimientos resistentes cultivados en lugares donde no se alcanzan temperaturas elevadas. Los efectos de sinergismo producidos por variantes virales que si sobrepasan la resistencia, expuestos en otro trabajo presentado en este congreso, podrían explicar esta situación.

PAN-16

EL CAPSINOIDE VANILLILNONANOATO PROTEGE AL PIMIENTO FRENTE A *Phytophthora capsici* Y *Botrytis cinerea*

García, T.^{1,2}, Veloso, J.^{1,3}, Díaz, J.^{1,4}

¹Departamento de Biología Animal, Biología Vegetal e Ecología, Universidade da Coruña. Campus da Zapateira s/n 15071 A Coruña, España

²taniaglbio@gmail.com; ³javier.veloso@gmail.com; ⁴josefv@udc.es

En Galicia, uno de los patógenos más destructivos del pimiento es el hemibiotrofo *Phytophthora capsici* Leon. Por otro lado, *Botrytis cinerea* Pers.: Fr. también ataca al pimiento y es el necrotrófo modelo en los estudios de patogénesis y resistencia. La pungencia del fruto del pimiento es debida a la acumulación de capscina y otros compuestos similares denominados capsicinoides. Estos metabolitos presentan diversas propiedades, entre ellas está la protección frente a patógenos como *Fusarium* o *Verticillium*, pero su carácter pungente limita su aplicación. En algunos cultivares de pimiento, como el CH-19 Sweet, se han encontrado análogos no pungentes de los capsicinoides, denominados capsinoides. Con objeto de estudiar el efecto de estos análogos en la resistencia de las plantas y su efecto sobre los patógenos *P. capsici* y *B. cinerea* se escogió el vanillilnonanoato. Para comprobar si confiere protección frente a patógenos, el compuesto se aplicó en los cotiledones de las plantas de pimiento antes de la inoculación. Más tarde se inocularon las plantas con uno u otro patógeno y se realizó un seguimiento de los síntomas a nivel sistémico. Además de la severidad, se cuantificó por qPCR la biomasa del patógeno presente en la planta. También se han estudiado por qPCR los cambios en la expresión génica relacionada con la defensa de la planta provocados a nivel sistémico por el vanillilnonanoato, tanto antes como después de la inoculación. Los genes elegidos fueron *CASC1* (que codifica para una sesquiterpeno ciclasa, responsable de la biosíntesis de la fitoalexina capsidiol), *CABPR1* (una proteína PR), *CAACO* (implicada en la biosíntesis de etileno) y la *CAPAL* (implicada en la biosíntesis de compuestos fenólicos). Finalmente, se ha estudiado el efecto del vanillilnonanoato sobre la germinación de las esporas de *P. capsici* y *B. cinerea*.

Este trabajo ha sido financiado por fondos de la Xunta de Galicia otorgados al proyecto "Análisis de los capsinoides en cultivares de pimiento de Galicia y caracterización de sus propiedades para la protección vegetal" (10MRU103009PR)

PAN-17

IDENTIFICACIÓN DE GENES DEL AGENTE DE BIOCONTROL *Pseudomonas pseudoalcaligenes* AVO110 IMPLICADOS EN LA MICOFAGIA DE *Rosellinia necatrix*

Crespo-Gómez J.I.^{1,2}, Pliego C.², de Vicente A.¹, Calderón, C.E.¹, Ramos C.², Cazorla F.M.¹

¹Departamento de Microbiología y ²Área de Genética, Universidad de Málaga. Instituto de Hortofruticultura Subtropical y Mediterránea "La Mayora" (IHSM-UMA-CSIC), Campus de Teatinos s/n, 29071-Málaga. ¹E-mail: cazorla@uma.es, ²E-mail: crr@uma.es.

P. pseudoalcaligenes AVO110, es un agente de biocontrol seleccionado frente a la podredumbre blanca radicular del aguacate causada por *R. necatrix*. Esta bacteria coloniza las hifas de *R. necatrix* de forma competitiva, alimentándose de los metabolitos exudados por el hongo durante su crecimiento. Estos fenotipos son característicos de la micofagia bacteriana de tipo biotrófico extracelular pasivo. Con el objetivo de identificar genes de *P. pseudoalcaligenes* AVO110 implicados en su comportamiento micofágico frente a *R. necatrix*, se está llevando a cabo una estrategia de genómica funcional denominada *Signature Tagged Mutagenesis* (STM). Mediante esta estrategia se analiza la capacidad de mutantes de AVO110, generados por la inserción del transposón mini-Tn5km2, de multiplicarse y sobrevivir durante 48 horas en medio BM-RE, un medio mínimo que contiene compuestos exudados por las hifas de *R. necatrix*. A partir de 3408 mutantes de esta cepa y tras dos rondas consecutivas e independientes de STM, se han seleccionado un total de 95 mutantes portadores de una única copia del transposón, a los que se les está analizando su competitividad y capacidad de multiplicarse y sobrevivir en medio rico LB y en BM-RE con respecto a la cepa silvestre. Hasta la fecha, se han seleccionado un total de 17 mutantes denominados mutantes GAM (*Growth Attenuated Mutants*), cuya competitividad se encuentra reducida exclusivamente en medio BM-RE. Las funciones afectadas están relacionadas con el metabolismo energético (GAM-5, GAM-13, GAM-14, GAM-15), glucídico (GAM-10), lipídico (GAM-1, GAM-11, GAM-17) y aminoacídico (GAM-4, GAM-9). También se han identificado genes reguladores, alterados en los mutantes GAM-8, GAM-12, GAM-16 y GAM-3, que codifican, respectivamente, una proteína sensora histidina quinasa, un regulador transcripcional LysR, la proteína RecB y una proteína relacionada con el metabolismo del segundo mensajero di-c-GMP, implicado en la regulación de procesos relacionados con el biocontrol, como la formación de *biofilms* y la colonización de raíces. Por último, el mutante GAM-2 se encuentra afectado en una enterotoxina con posible función defensiva, mientras que GAM-6 y GAM-7 lo están en proteínas hipotéticas.

Este trabajo ha sido financiado por el MINECO (AGL-2011-30354-C02-01), cofinanciado por el Fondo Social Europeo.

EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD DE BIOCONTROL DE *Trichoderma* spp. FRENTE A AISLAMIENTOS DE *Sclerotinia sclerotiorum* PROCEDENTES DE IGP “ALUBIA DE LA BAÑEZA-LEÓN”

Mayo, S.¹, González, O.¹, Rodríguez, A.¹, Campelo, M.P.¹ Lorenzana, A.¹, Gutiérrez, S.², Casquero, P.A.¹

¹Departamento de Ingeniería y Ciencias Agrarias. Instituto de Recursos Naturales.

²Departamento de Biología Molecular, Universidad de León. Avda. de Portugal, 41; 24071 – León (España). E-mail: smayp@unileon.es; pacasl@unileon.es

La judía grano (*Phaseolus vulgaris* L.) es la leguminosa grano dedicada al consumo humano más importante a nivel mundial. Desde el año 2002, se ha detectado, de forma relativamente frecuente, la aparición de ataques de podredumbre blanca causada por *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary.

Trichoderma (Teleomorfo: *Hypocrea*) es un invasor oportunista secundario, de rápido crecimiento, que produce gran cantidad de esporas, de enzimas capaces de degradar la pared celular y de sustancias antibióticas. Sus principales métodos de control de patógenos son el micoparasitismo, la síntesis de antibióticos y la competencia directa.

Se emplearon 1 aislamiento de *S. sclerotiorum* y 23 aislamientos de *Trichoderma* spp. originarios de la zona de producción de la I.G.P. de la “Alubia de La Bañeza – León” que no habían sido sometidos a ningún tipo de manipulación genética. Se realizaron dos ensayos, mediante membranas y por cultivos duales. En el primero se cubrió toda la superficie del medio PDA con una membrana de celofán. Sobre ésta se sembraron discos de micelio de 6 mm de diámetro de las diferentes cepas de *Trichoderma* spp., incubándose a 25 °C durante 48 h. Después se retiraron las membranas y se sembraron discos de micelio de *S. sclerotiorum* del mismo diámetro, incubándose a 25 °C. Finalmente, se midió el diámetro de los discos de micelio cada 24 h durante 3 días consecutivos calculando el porcentaje de inhibición. En el caso de cultivos duales se enfrentaron un disco de 6 mm de micelio del patógeno frente a otro de los *Trichoderma* separados 5,5 cm y se incubaron durante 5 días a 25 °C.

En el ensayo de membranas se obtuvo una media de porcentaje de inhibición del patógeno de los 23 aislamientos de *Trichoderma* de 68,98 %, con una variación que va desde el 37,80 % hasta el 87,17 %. En el ensayo de cultivos duales, se observó que todos los aislamientos de *Trichoderma* fueron capaces de controlar *in vitro* a *S. sclerotiorum*, salvo un aislamiento que permaneció separado.

Se ha comprobado que los aislamientos de *Trichoderma* son capaces de controlar, en condiciones *in vitro*, aunque con diferencias en los porcentajes de inhibición, al aislamiento de *S. sclerotiorum*. La actividad antagónica de *in vitro* de los aislamientos de *Trichoderma* constituye un indicativo inicial de su actividad biológica contra hongos fitopatógenos.

PAN-19

EVALUACIÓN DE LA RESISTENCIA DE CULTIVARES DE FRESA A *Macrophomina phaseolina*, AGENTE CAUSAL DE PODREDUMBRE CARBONOSA

Chamorro, M., Romero, F., de los Santos, B.

Centro IFAPA Las Torres-Tomejil, Ctra Sevilla-Cazalla km 12,2 Alcalá del Río (Sevilla) C.P.: 41200.

manuel.chamorro.rodriguez.ext@juntadeandalucia.es

La podredumbre carbonosa, causada por *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goidanich, es una enfermedad emergente en las zonas de cultivo que han abandonado las fumigaciones de suelo con bromuro de metilo, o que están en el periodo de transición en la aplicación de alternativas. Aunque ya era conocida en algunas zonas productoras de fresa (Illinois (EEUU), Australia, Egipto o Francia), desde el año 2005 se considera una amenaza para el cultivo en los EEUU (Florida y California), así como en otros países, como Francia o Israel. En la provincia de Huelva la enfermedad fue detectada en 2006. El objetivo de este trabajo fue evaluar la respuesta de alguno de los cultivares más utilizados en la provincia de Huelva a dos aislados del patógeno, uno de suelo y otro de planta sintomática. Para ello, plantas de fresa se sembraron en maceta a finales de octubre. Cuatro semanas después se realizó la inoculación mediante riego de las macetas con una suspensión de esclerocios de cada uno de los aislados de *M. phaseolina*. Se realizaron observaciones semanales, para comprobar el estado y las necesidades hídricas de las plantas. Se determinó la susceptibilidad mediante una escala de severidad de 0 (planta sana) a 8 (planta muerta un mes después de la inoculación). Las diferencias observadas se debieron al cultivar, no siendo significativa la interacción entre cultivar y aislado. Sólo 'Splendor' resultó resistente al patógeno, mientras que 'Camarosa', 'Fortuna', 'Candongá' y 'Benicia', fueron susceptibles.

PAN-20

EFICACIA DE *Trichoderma harzianum* (CEPA T-22) SOBRE LAS NECROSIS DE LA BASE DEL TALLO DE LA JUDÍA OCASIONADAS POR *Pythium solare*

Galeano M.¹, Gómez, J.², Moreno, J.¹, Belda, J.E.¹

¹Dpto. I+D de Koppert España, S.L. Pol. Industrial Ciudad del Transporte del Poniente, parcela P 14, Nave 3. 04745 La Mojonera, Almería. E-mail: mgaleano@koppert.es.

²IFAPA. Centro La Mojonera. Camino de San Nicolás 1. 04745. La Mojonera, Almería.

La judía (*Phaseolus vulgaris*) es extensamente cultivada en España. La judía verde, para su consumo en fresco, es ampliamente cultivada en Andalucía, sobre todo en la zona costera de las provincias de Málaga, Granada y Almería. *Pythium solare* causa una grave enfermedad sobre las plantas adultas que se manifiesta por unas necrosis alargadas en las bases de los tallo y que suele provocar la marchitez y muerte de las plantas, e importantes pérdidas de producción. Dentro de un proyecto de investigación cuya finalidad es evaluar la eficacia del hongo antagonista *Trichoderma harzianum* frente a varios hongos de suelo patógenos de cultivos hortícolas en invernadero, se realizó un experimento sobre judía del cultivar Emerite, en el que se ensayaron diferentes formulados de *T. harzianum*. Las aplicaciones se realizaron en la siembra y dos días antes de la inoculación artificial con *P. solare*. Las plantas se inocularon 30 días después de la siembra, que se realizó en el mes de abril de 2011, con un triturado del hongo crecido en placas de Petri con medio de cultivo PDA. El experimento se llevó a cabo en cultivo sin suelo, usando como sustrato perlita, en las instalaciones autorizadas de Koppert España, S.L. Con diseño en cuatro bloques completos al azar y con parcelas elementales de 12 plantas, se aplicaron seis tratamientos: Formulado granulado de la cepa T-22 de *T. harzianum* (Trianum G), formulado experimental a base de *T. harzianum*, combinación Trianum G con formulado experimental, fungicida usado habitualmente para el control de la enfermedad, testigo no tratado e inoculado con *P. solare*, y por último, testigo no inoculado.

Treinta y ocho días después de la inoculación se evaluó la incidencia de la enfermedad y el índice de severidad. Los resultados obtenidos indicaron una eficacia del 72,9% con Trianum G, aplicado en el momento de la siembra directa de la judía, sobre el hongo patógeno. La incidencia de la enfermedad en los dos tratamientos con el formulado granulado de Trianum G fue menor que en el tratamiento con el fungicida de referencia.

PAN-21

ANTAGONISMO *IN VITRO* DE LA CEPA T-22 DE *Trichoderma harzianum* SOBRE HONGOS PATÓGENOS DE HORTALIZAS EN EL SUDESTE ESPAÑOL

Galeano, M.¹, Gómez, J.², Rodríguez, M. V.¹, Belda, J. E.¹

¹Dpto. I+D de Koppert España, S.L. Pol. Industrial Ciudad del Transporte del Poniente, parcela P 14, Nave 3. 04745 La Mojonera, Almería. E-mail: mgaleano@koppert.es.

²IFAPA. Centro La Mojonera. Camino de San Nicolás 1. 04745. La Mojonera, Almería.

Varias especies de hortalizas son ampliamente cultivadas en los invernaderos de la zona costera del sudeste de España, y al menos catorce aislados patógenos de suelo le causan, de forma puntual o sistemática, enfermedades que merman la cantidad y la calidad de su producción.

Con idea de seleccionar algunos de éstos que fueran en mayor medida inhibidos por *Trichoderma harzianum* Rifai, para realizar posteriores experimentos de evaluación de eficacia en invernadero. Se evaluó el efecto antagonista de la cepa T-22 de *T. harzianum* (base del producto comercial Triatum), mediante la técnica de enfrentamiento de cultivos duales en placa de Petri propuesta por Bell *et al.* (1982) y Howell (2003), frente a un aislado de cada uno de los patógenos siguientes: *Pythium aphanidermatum*, *Pythium irregulare*, *Pythium myriotylum*, *Pythium solare*, *Pythium ultimum*, *Phytophthora capsici*, *Phytophthora parasitica*, *F. oxysporum* f. sp. *melonis*, *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis*, *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*, *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum*, *Fusarium solani* f. sp. *cucurbitae* y *Chalara elegans*.

Se determinó la competencia de nutrientes y espacio, el micoparasitismo y el porcentaje de inhibición del crecimiento radial (PICR). También se valoró el nivel de antagonismo según la escala de Bell *et al.*, (*loc cit.*).

De los resultados obtenidos se desprende que la cepa T-22 de *T. harzianum* sobrepasó con creces en crecimiento a todos los aislados patógenos, salvo a *P. aphanidermatum* y *P. ultimum*. El índice PICR resultó con valores comprendidos entre el 41,7 % para *F. oxysporum* f. sp. *melonis* y el 87,9 % para *P. solare*. La cepa T-22 fue altamente antagonista (clase 1 y 2) contra *P. aphanidermatum*, *P. irregulare*, *P. solare*, *P. ultimum*, *P. capsici*, *P. parasitica*, *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*, *F. oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*, *F. oxysporum* f. sp. *cucumerinum*, *F. solani* f. sp. *cucurbitae* y *Chalara elegans* en condiciones de laboratorio.

**IDENTIFICACIÓN DE NUEVOS PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS
CAPACES DE BLOQUEAR LA FORMACIÓN DE APRESORIO DEL
HONGO FITOPATÓGENO *Magnaporthe oryzae***

Rebollar, A., López-García, B.

*Centro de Investigación en Agrigenómica (CRAG), CSIC-IRTA-UAB-UB.
Campus UAB, Bellaterra-Cerdanyola del Vallès (08193), Barcelona. E-mail:
aaron.rebollar@cragenomica.es*

La piriculariosis causada por el hongo *M. oryzae* constituye una de las enfermedades más devastadoras y persistentes en el cultivo del arroz, siendo la forma más efectiva de control la utilización de fungicidas. Sin embargo, la creciente aparición de aislados resistentes entre las poblaciones de hongos, el limitado espectro de acción y el posible efecto negativo a largo plazo sobre la salud humana y el medioambiente ha propiciado la búsqueda de estrategias alternativas de control y/o agentes antifúngicos más seguros que puedan sustituir la actual utilización de fungicidas. Los péptidos antimicrobianos (AMP) están ampliamente distribuidos en la naturaleza formando parte de los mecanismos de defensa innata en todos los organismos. Estos péptidos representan una alternativa al uso de antibióticos en el control de las infecciones producidas por patógenos, relevante en cuanto al efecto rápido y eficaz del AMP frente microorganismos, la limitada aparición de resistencias y la baja toxicidad en células de mamíferos. El diseño racional de AMP de pequeño tamaño surge como una alternativa atractiva con el fin de mejorar las propiedades antimicrobianas y/o disminuir la toxicidad inespecífica de algunos péptidos.

En este trabajo hemos analizado una biblioteca combinatoria de hexapéptidos sintetizados con D-aminoácidos [1], con el objetivo de identificar nuevos péptidos capaces de bloquear la formación de apresorio de *M. oryzae*, un proceso esencial para la internalización del hongo en el tejido vegetal y posterior desarrollo de la infección. Se han optimizado las condiciones experimentales para evaluar la formación de apresorio *in vitro* y ensayar las diferentes mezclas que componen la biblioteca. Considerando los resultados obtenidos a partir del ensayo de la biblioteca y el diseño racional, hemos seleccionado una serie de péptidos y se ha evaluado su capacidad en inhibir la formación del apresorio. Además, hemos evaluado la actividad antimicrobiana de algunos de los péptidos seleccionados frente a diferentes microorganismos así como su capacidad de permeabilización.

[1] B.López-García, E.Pérez-Payá, J.F.Marcos, Identification of novel hexapeptides bioactive against phytopathogenic fungi through screening of a synthetic peptide combinatorial library, Appl. Environ. Microbiol. 68 (2002) 2453-2460.

**IDENTIFICACIÓN DE UNA FUENTE DE TOLERANCIA AL ToMV EN
*Solanum lycopersicoides***

Soler, S.¹, Belmonte, I.¹, Aramburu, J.², Galipienso, L.², López, C.¹, Díez, M.J.¹

¹*Instituto de Conservación y Mejora de la Agrodiversidad Valenciana-Universitat Politècnica de València COMAV-UPV, 46022 Valencia.*

²*Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentariès (IRTA), 08348 Cabrils, Barcelona.*
salsoal@btc.upv.es

La búsqueda de fuentes de resistencia ha constituido una labor muy importante de la mejora genética del tomate en las últimas décadas; especialmente en el caso de las enfermedades causadas por el virus del mosaico del tomate (*Tomato mosaic virus*, ToMV), el virus del bronceado del tomate (*Tomato spotted wilt virus*, TSWV) y el virus del mosaico del pepino dulce (*Pepino mosaic virus*, PepMV). El uso del gen *Tm1* procedente de *Solanum habrochaites* y *Tm2* y *Tm2²* procedentes de *S. peruvianum*, en el caso del ToMV, y del gen *Sw5* procedente de *S. peruvianum* en el caso del TSWV, está posibilitando, en el momento actual, el cultivo del tomate sin excesivos problemas. No obstante, en las dos virosis se ha citado la existencia de aislados que superan la resistencia conferida por estos genes y, no se han identificado nuevas fuentes de resistencia. Con el PepMV se han realizado varios cribados de germoplasma, pero no se han encontrado fuentes de resistencia de utilidad en distintas especies del género *Solanum* (*Solanum pimpinellifolium*, *S. habrochaites*, *S. peruvianum*, *S. chilense*, *S. pennellii*, *S. parviflorum* y *S. cheesmaniae*). En este contexto, nuestro grupo decidió probar otras especies relacionadas como *Solanum lycopersicoides*. Esta ha sido utilizada para la mejora genética de la resistencia a enfermedades del tomate como la ocasionada por *Botrytis cinerea*. Además se ha podido cruzar con el tomate cultivado y derivar una colección de líneas de introgresión. Hasta el momento, y siguiendo un sistema de inoculación mecánica, se han cribado 43 de estas líneas frente a las tres virosis citadas. Todas las líneas mostraron un 100% de plantas con infección sistémica y síntomas acusados en el caso del TSWV y el PepMV. Si se ha podido identificar las líneas LA-3883 y LA-3886 que presentan tolerancia a los aislados del ToMV que superan la resistencia del gen *Tm2²*, ambas portadoras de un fragmento solapante del cromosoma 7 de *S. lycopersicoides*. Las plantas de estas líneas muestran niveles de acumulación viral comparables a los controles susceptibles, pero presentan síntomas muy leves o casi imperceptibles. En la actualidad, se está procediendo a la reproducción de las líneas y a la construcción de híbridos F1 con materiales de tomate susceptibles al ToMV, con el fin de obtener información sobre el control genético de la citada tolerancia

PAN-24

ANTIMICROBIANOS DERIVADOS DE PÉPTIDOS LINEALES Y ANÁLOGOS DE BACTERIOCINAS Y CICLOLIPOPÉPTIDOS PARA EL CONTROL DE HONGOS Y BACTERIAS FITOPATÓGENOS

Badosa, E.¹, Güell, I.², Ng-Choi, I.², Cabrefiga, J.¹, Talleda, M.², Vilà, S.², Cano, L.², Micaló, L.², Soler, M.², Cerezo, V.², Ferre, R.², Feliu, L.², Planas, M.², Bardají, E.², Montesinos, E.¹

¹*Institut de Tecnologia Agroalimentària-CIDSAV-XaRTA, Universitat de Girona. E-mail: emilio.montesinos@udg.edu*

²*LIPPSO, Departamento de Química, Universitat de Girona*

Con la finalidad de obtener péptidos antimicrobianos (PAMs) sintéticos que aporten nuevas propiedades antibacterianas y antifúngicas se han generado, por un lado, secuencias basadas en la modificación de péptidos lineales anteriormente descritos (CECMEL11) y, por otro lado, se han preparado análogos de bacteriocinas, así como ciclolipopéptidos derivados de péptidos cíclicos diseñados *de novo*.

Las modificaciones de los PAMs lineales se han basado en la substitución de uno o más L-aminoácidos por el correspondiente D-isómero y en la modificación de un residuo de Phe o Lys con un anillo de triazol. Paralelamente, se han diseñado derivados que incorporan en su secuencia un residuo de 5-arilhistidina. Los análogos de bacteriocinas se han diseñado a partir de la estructura de diversas plantaricinas producidas por bacterias del ácido láctico. Los ciclolipopéptidos se han diseñado por incorporación de una o más cadenas de ácido graso a residuos de Lys de un ciclodecapéptido antimicrobiano *lead*.

En todos los casos se han puesto a punto métodos específicos de síntesis en fase sólida y los productos obtenidos se han purificado mediante RP-HPLC y caracterizado mediante MALDI-TOF. La actividad antimicrobiana de los compuestos ha sido evaluada *in vitro*, determinando la CMI utilizando como patógenos indicadores las bacterias fitopatógenas *Erwinia amylovora*, *Pseudomonas syringae* y *Xanthomonas vesicatoria* y los hongos *Penicillium expansum* y *Fusarium oxysporum*.

Los péptidos con una actividad antibacteriana significativa también han sido evaluados respecto a su actividad citotóxica mediante el análisis de la hemólisis y fitotoxicidad. De cada familia de péptidos se han obtenido secuencias que presentan elevada actividad antibacteriana y baja toxicidad. Actualmente, se está determinando la eficacia de dichos compuestos en el control de infecciones en plantas huésped susceptibles a los patógenos indicadores en condiciones de ambiente controlado (fitotrón, invernadero).

Este trabajo ha sido financiado, en parte, por los proyectos AGL2009-13255-C02-01/AGR y AGL2009-13255-C02-02/AGR del MICINN.

PAN-25

ANÁLISIS GENÓMICO DE DOS CEPAS DE *Bacillus* CON CAPACIDAD DE BIOCONTROL FRENTE A OÍDIO DE CUCURBITÁCEAS

Magno, M.C.¹, Arrebola, E.¹, Zeriouh, H.¹, García-Gutiérrez, L.¹, Romero, D.¹, de Vicente, A.¹, Ramos, C.¹, Rodríguez-Palenzuela, P.², Pérez-García, A.¹

¹*Instituto de Hortofruticultura Subtropical y Mediterránea "La Mayora" (IHSM-UMA-CSIC). Campus Universitario de Teatinos, 29071 Málaga.*

E-mail: conchitamagno@uma.es

²*Centro de Biotecnología y Genómica de Plantas (UPM-INIA), Campus de Montegancedo, 28223 Pozuelo de Alarcón (Madrid).*

El cultivo de cucurbitáceas es uno de los más importantes en el sector hortofrutícola nacional, concentrándose en Andalucía más del 50 por ciento de la producción. El hongo fitopatógeno que provoca más daños a estos cultivos es *Podosphaera fusca*, también conocido como oídio de las cucurbitáceas. Con objeto de controlar la enfermedad mediante métodos eficientes y respetuosos con el medioambiente, se han estudiado diversas cepas bacterianas como antagonistas naturales frente a *P. fusca*. En trabajos previos de nuestro grupo, se seleccionaron las cepas de *Bacillus* spp. UMAF6614 y UMAF6639, las cuales mostraron los mejores resultados en cuanto a capacidad antagonista frente a *P. fusca*, siendo la producción de lipopéptidos de las familias de las fengicinas e iturinas uno de los mecanismos de acción determinantes en el proceso de biocontrol. El principal objetivo de este trabajo ha sido la secuenciación del genoma de estas dos cepas para posteriormente realizar un análisis comparativo en busca de regiones específicas y genes implicados en la actividad de biocontrol. Además, se ha llevado a cabo un análisis filogenético usando diferentes genes *housekeeping*, lo que nos ha permitido identificar estas dos cepas a nivel de especie con una mayor precisión. Tras realizar un análisis comparativo con cepas filogenéticamente cercanas, se han identificado las regiones comunes y específicas de estas dos cepas, lo que ha permitido desarrollar un método rápido y eficaz para la detección de las mismas mediante PCR. Por último, se ha realizado una búsqueda de posibles genes implicados en los procesos de biocontrol, ya sea mediante mecanismos de interacción con la planta o de acción antagonista directa sobre el patógeno.

Este trabajo ha sido financiado por ayudas del Plan Nacional de I+D+I del Ministerio de Ciencia e Innovación (AGL2010-21848-CO2-01) e Incentivos a Proyectos de Excelencia de la Junta de Andalucía (P10-AGR-5797), cofinanciados con fondos FEDER (EU).

PAN-26

PAPEL DE LOS TRANSPORTADORES ABC EN LA RESISTENCIA A FUNGICIDAS EN *Podosphaera fusca*

Bellón-Gómez, D.¹, Deising, H. B.², Pérez-García, A.¹, Torés J. A.¹

¹Instituto de Hortofruticultura Subtropical y Mediterránea "La Mayora" (IHSM-UMA-CSIC). 29750 Algarrobo-Costa (Málaga). E-mail: davinia@eelm.csic.es

²Faculty of Agriculture, Martin Luther University Halle-Wittenberg, D-06099 Halle (Saale), Germany

El oídio de las cucurbitáceas, *Podosphaera fusca*, es uno de los principales problemas que afectan a estos cultivos en todo el mundo. Al tratarse de un hongo de desarrollo ectoparásito como la mayoría de los oídios, el uso de fungicidas es la principal estrategia de control. Desgraciadamente, el empleo excesivo de fungicidas conlleva el importante problema de desarrollo de resistencias. En trabajos previos de nuestro grupo se describieron importantes niveles de resistencia a fungicidas QoI (inhibidores de la respiración) y DMI (inhibidores de la biosíntesis del ergosterol) en la mitad sur de España, por lo que se decidió estudiar las bases moleculares de la resistencia a estos fungicidas en este importante patógeno.

El estudio de los transportadores de membrana está ganado considerable atención entre la comunidad científica especializada en resistencia a fungicidas. Para determinar el papel de estos transportadores en la resistencia a fungicidas en *P. fusca*, se realizó una visualización histoquímica de la actividad de estos transportadores mediante microscopía de fluorescencia. Se seleccionaron un conjunto de cepas que presentaban distintos niveles de sensibilidad a fungicidas QoI y DMI. Estos aislados fueron tratados con distintas concentraciones de fungicidas para inducir la expresión (o no) de estos transportadores. Posteriormente se incubaron con sustratos adecuados emisores de fluorescencia, así como distintos protonóforos, para conocer la naturaleza bioenergética de los transportadores implicados. Los resultados obtenidos sugieren que los transportadores ABC (ATP-binding cassette) podrían estar relacionados con la resistencia a estos fungicidas en *P. fusca*. Actualmente, se está llevando a cabo una cuantificación de la expresión de genes de transportadores ABC de *P. fusca*, para correlacionar la expresión de estos transportadores con la resistencia a estas familias de fungicidas.

Este trabajo ha sido financiado por ayudas del Plan Nacional de I+D+I del Ministerio de Ciencia e Innovación (AGL2010-21848-CO2-01), cofinanciado con fondos FEDER (EU).

PAN-27

DIEZ AÑOS SIN RESISTENCIA A MICLOBUTANIL EN OÍDIO DE CUCURBITÁCEAS EN ESPAÑA

Bellón-Gómez, D.¹, Abad, R.², Pérez-García, A.¹, Torés, J. A.¹

¹Instituto de Hortofruticultura Subtropical y Mediterránea "La Mayora" (IHSM-CSIC) ²Dow AgroSciences Ibérica S.A. Ribera del Loira 4-6 28042 Madrid
E-mail: davinia@eelm.csic.es

Podosphaera fusca es el agente causal del oídio de cucurbitáceas, uno de los mayores problemas que afectan a su cultivo en todo el mundo. El método habitual de control es el empleo de fungicidas durante el ciclo de cultivo, lo que lleva aparejado, en un plazo más o menos largo, la aparición de resistencia a las diferentes materias activas que se emplean. Un grupo importante de fungicidas, tal vez los más empleados en todo el mundo, son los llamados DMI (DeMethylation Inhibitors), que actúan impidiendo la síntesis del ergosterol, un esteroide estructural de la membrana fúngica. El empleo continuo de este tipo de productos no causa una resistencia absoluta, sino que se notan los efectos de modo paulatino: de un año a otro; por ejemplo es necesario aumentar el número de aplicaciones o las dosis utilizadas. Si la materia activa deja de emplearse durante una temporada, el nivel de resistencia disminuye. No suelen observarse resistencias cruzadas entre fungicidas con este mecanismo de acción, solo si pertenecen al mismo grupo químico y hay cierta similitud estructural.

Una de estas materias activas es el miclobutanil. Nuestro grupo estudió la resistencia a este compuesto de 275 cepas de *P. fusca* tomadas en diferentes áreas de cultivo de cucurbitáceas entre los años 2002-2004, más 25 cepas de los años 1988-2000 de Almería y Málaga. Se determinó la concentración mínima inhibitoria (CMI) que osciló entre 1 y 50 µg/ml, y dado que la dosis de empleo autorizada en campo es de 96 µg/ml se concluyó que no había resistencia a esta materia activa. Años después, nos interesaba saber si la sensibilidad a este compuesto había cambiado. Se tomaron 40 muestras de *P. fusca*, procedentes de Murcia, Ciudad Real, Badajoz y Almería, de los años 2010 y 2011 y comprobamos que no ha habido alteración. La CMI más elevada continúa siendo de 50 µg/ml, por lo que el fungicida sigue siendo eficaz en las mismas zonas en las que se sigue utilizando. Esto indica que es una materia activa útil y eficaz para el control de esta enfermedad, pero debe usarse con cuidado, siempre en mezclas y/o alternándolo con otras materias activas y limitando el número de aplicaciones para que siga siendo útil en la lucha contra el oídio de cucurbitáceas.

Este trabajo ha ido financiado por un contrato de apoyo tecnológico Dow AgroSciences/CSIC (Ref. CSIC: 20100640) y por el Programa Nacional de Recursos y Tecnologías Agroalimentarias, proyecto AGL 2010-21848.

PAN-28

ESCLARECIMIENTO DEL MECANISMO DE ACCIÓN DE LOS FUNGICIDAS DE LA FAMILIA DE LOS BENZIMIDAZOLES

Vela, D., Romero, D., de Vicente, A., Torés, J.A., Pérez-García, A.

Instituto de Hortofruticultura Subtropical y Mediterránea "La Mayora" (IHSM-UMA-CSIC). Campus Universitario de Teatinos, 29071 Málaga.

E-mail: dvela@uma.es

Los oídios (Erysiphales) son probablemente el principal problema fitosanitario de origen fúngico al que se enfrenta la agricultura actual. El control de estas enfermedades se lleva a cabo mediante el empleo continuado de fungicidas como método principal, en combinación con el empleo de variedades de hospedadores resistentes y, recientemente, con el uso de agentes de control biológico. Aunque es el método más efectivo contra estos patógenos, el empleo de fungicidas presenta un problema fundamental, la aparición de resistencia tras un uso intensivo y en ocasiones indebido de los mismos. Una de las familias de fungicidas más ampliamente utilizadas para el control de los oídios, ha sido la de los metil benzimidazol carbamatos (MBC), entre los que se encuentran fungicidas como metiltiofanato y carbendazima. Estos fungicidas inhiben la división celular mediante la inhibición de la polimerización de la tubulina, el componente fundamental de los microtúbulos. El mecanismo de resistencia más común frente a este tipo de fungicidas se debe al cambio Glu₁₉₈→Ala₁₉₈.

El objetivo de este trabajo es esclarecer las bases moleculares de la resistencia a benzimidazoles en *Podosphaera fusca*, el principal agente causal del oídio de las cucurbitáceas en España. Para ello, se está llevando a cabo la producción *in vitro* y la purificación de las dos subunidades proteicas que componen el dímero de tubulina, α - y β -tubulina, y la realización de ensayos de polimerización tanto en presencia como en ausencia de fungicida. Junto a esto, se está evaluando la capacidad del fungicida de inducir cambios conformacionales en el dímero de tubulina que podrían conducir a una incompleta inhibición de la formación de microtúbulos o a la formación de estructuras de tubulina aberrantes incompatibles con la vida. En paralelo, se está llevando a cabo un análisis computacional mediante la creación de un modelo de *docking* entre el dímero de tubulina y el fungicida, así como el cálculo de dinámica molecular para obtener un modelo de tubulina cuya configuración sea próxima a la real.

Este trabajo ha sido financiado por ayudas del Plan Nacional de I+D+I del Ministerio de Ciencia e Innovación (AGL2010-21848-CO2-01), cofinanciado con fondos FEDER (EU).

PAN-29

EFICACIA DEL CONTROL QUÍMICO EN EL CHANCRO DEL CASTAÑO

Trapiello, E.¹, González-Varela, G.¹, Campelo, M.P.², González, A. J.¹

¹Servicio Regional de Investigación y Desarrollo Agroalimentario (SERIDA), Ctra. de Oviedo, s/n, 33300 Villaviciosa, Asturias. E-mail; anagf@serida.org

²Departamento de Ingeniería y Ciencias Agrarias, E.S.T.I.Agraria, Universidad de León, Avda. de Portugal, 41, 24071 León.

El castaño (*Castanea sativa* Mill), frondosa muy extendida en Asturias, se encuentra seriamente afectado por el hongo *Cryphonectria parasitica* (Murrill) Barr, agente causal del chancro, principal enfermedad de la región que limita la producción de madera y fruto, ocasionando graves pérdidas económicas.

En estudios previos se había ensayado *in vitro* una serie de productos fitosanitarios algunos de los cuales resultaron ser muy eficaces en el control del crecimiento del hongo. Con objeto de estudiar la efectividad del control químico para frenar la enfermedad *in vivo* se realizó un ensayo en invernadero durante cuatro años. Se utilizaron 126 plantas de castaño y la cepa de *C. parasitica* LPPAF-187. Los productos ensayados fueron tres, epoxiconazol, carbendazima y carbendazima más flutriafol, que se aplicaron de tres modos diferentes, i) preventivo-curativo mediante pulverización, ii) curativo mediante pulverización y iii) curativo localizado, aplicado mediante rodillo sobre la lesión. La eficacia de las tres materias activas utilizadas y la influencia de la forma de aplicación de las mismas fueron evaluadas mediante el análisis estadístico de los parámetros: a) tamaño de la lesión, b) esporulación y c) mortalidad de las plantas. Como controles se mantuvieron plantas no inoculadas y no tratadas así como plantas inoculadas y no tratadas. Se realizaron dos repeticiones durante dos años consecutivos aunque las observaciones corresponden a cuatro años.

Los resultados mostraron diferencias significativas entre plantas control y tratadas en todos los casos, presentando estas últimas diferencias en función del producto y del modo de aplicación del mismo. Respecto al tipo de aplicación, fue el tratamiento localizado el que presentó mejores resultados a corto plazo, mientras que a medio-largo plazo fue la pulverización. En cuanto a los productos, el epoxiconazol resultó ser el tratamiento fitosanitario más eficaz teniendo en cuenta los tres parámetros estudiados.

Como conclusión, podemos afirmar que las plantas tratadas presentan un menor avance de la enfermedad respecto al control. La alternativa más eficaz resultó ser el epoxiconazol aplicado mediante pulverización, tratamiento que consideramos una medida de posible aplicación para el control del chancro en plantas que presenten condiciones similares a las del presente estudio.

Este trabajo ha sido financiado por la Caja Rural de Asturias y la Dirección General de Desarrollo Rural y Política Forestal del Gobierno del Principado de Asturias.

PAN-30

EFFECTO DE *Fusarium circinatum* SOBRE LA GERMINACIÓN Y LA SUPERVIVENCIA DE DIFERENTES CONÍFERAS

Martínez-Álvarez, P.¹, Blanco, J.², de Vallejo, M.², Diez, J.J.¹

¹Instituto Universitario de Investigación en Gestión Forestal Sostenible, Universidad de Valladolid - INIA. Avenida de Madrid 57, 34004 Palencia.

E-mail: pmtnez@pvs.uva.es

²Sección de Producción y Mejora Forestal, Servicio de Montes, Dirección General de Montes y Conservación de la Naturaleza. Gobierno de Cantabria. Calle Rodríguez, nº 5, 1º. 39.071 Santander.

Desde que en el año 2004 se detectara de manera oficial el patógeno *Fusarium circinatum* en España, el establecimiento de plantaciones de *Pinus radiata* en la Cornisa Cantábrica ha descendido de forma acusada. El Real Decreto 637/2006 prohíbe la siembra o plantación de especies sensibles a la enfermedad (las pertenecientes al género *Pinus* y *Pseudotsuga menziesii*) en las zonas demarcadas, con lo que se reducen las alternativas de los propietarios forestales en las áreas afectadas. El objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto del patógeno *F. circinatum* sobre diferentes especies de coníferas con la finalidad de encontrar una alternativa al cultivo de *Pinus radiata* en la Cornisa Cantábrica. Para el ensayo se sembraron en bandejas de vivero 224 semillas de cada una de las once especies de coníferas empleadas. La mitad de esas semillas fueron inoculadas con el patógeno mediante la adicción al sustrato de un millón de esporas, mientras que la otra mitad se utilizó como control. La germinación y la mortalidad de las plántulas se anotaron semanalmente. El análisis de los datos confirmó que *P. radiata* es la especie más susceptible a la enfermedad de entre las ensayadas, mientras que *Chamaecyparis lawsoniana* y *Sequoiadendron giganteum* no mostraron síntoma alguno causado por *F. circinatum*.

**CONTROL BIOLÓGICO DE *Gremmeniella abietina* CON HONGOS
ENDÓFITOS EN PLÁNTULAS DE PINO CARRASCO**

Romeralo, C.¹, Botella, L.¹, Santamaría, O.², Diez, J. J.¹

¹Instituto Universitario de Gestión Forestal Sostenible, Universidad de Valladolid-INIA, Avda. Madrid 44, Edificio E, 34004 Palencia. E-mail: carmen.romeralo@pvs.uva.es

²Dpto. Ingeniería del Medio Agronómico y Forestal. Escuela de Ingenierías Agrarias (Universidad de Extremadura). Ctra. de Cáceres, s/n. 06007 Badajoz, España.

Gremmeniella abietina (Lagerb.) Morelet es un hongo ascomicete haploide responsable de la destrucción de muchas plantaciones de coníferas en el hemisferio norte. En nuestro país, *G. abietina* se ha aislado, hasta el momento, de masas reforestadas de *P. halepensis* en Castilla y León. El control biológico está siendo considerado como un método alternativo para el control de las enfermedades forestales. Desde que el uso de productos químicos se ha reducido debido a su peligroso efecto en el medio ambiente, se espera que los antagonistas de origen biológico se conviertan en una parte importante de las medidas de control empleadas contra patógenos vegetales.

Los hongos endófitos, que están presentes en todas las plantas, incluyen a cualquier organismo que vive dentro del tejido vegetal ya sea neutral, beneficioso o perjudicial para la planta. Estos hongos han sido previamente usados como agentes de biocontrol porque pueden inhibir o reducir el crecimiento del patógeno. Por ello, el principal objetivo de este experimento fue evaluar el efecto de varios hongos endófitos sobre plántulas de pino carrasco infectadas con *G. abietina*. Para llevar a cabo el experimento, se inocularon plántulas de 2 savias de pino carrasco con seis aislados diferentes de *G. abietina* y con cinco especies de endófitos obtenidos previamente de árboles adultos de pino carrasco. En cada plántula, el patógeno se inoculó a 10 cm del ápice y el endófito a 8 cm. Cada combinación aislado*endófito así como los respectivos controles se realizó 8 veces, y todo el experimento fue completamente repetido a las 3 semanas. En total, 672 plántulas fueron inoculadas. Cuatro meses después de realizar las inoculaciones, se empezaron a observar en las plántulas síntomas de debilitamiento, por lo que se cortaron, se agruparon por combinaciones y se transportaron al laboratorio. Una vez allí, con ayuda de un bisturí estéril, las plántulas se abrieron por la mitad para la medición del tejido necrótico ya que se sabe que es un buen indicador de la severidad de la enfermedad. La variable respuesta tomada fue la longitud relativa de la necrosis (longitud del tejido necrótico/longitud total de la plántula). Por último, para confirmar que las necrosis estaban siendo producidas por *G. abietina* se cortaron pequeñas muestras del tallo a 1,5 cm del punto de inoculación del patógeno y se colocaron en placas con medio de cultivo específico para *G. abietina*. Los resultados nos están permitiendo conocer las posibilidades de los endófitos en el control de esta enfermedad en vivero.

El trabajo ha sido financiado por el proyecto "Control biológico de *Gremmeniella abietina* en España (AGL2008-03622).

PAN-32

EFICACIA DE LA BIOSOLARIZACIÓN CON PELLETS DE *Brassica carinata* PARA EL CONTROL DE *Meloidogyne incognita* EN PIMIENTO DE INVERNADERO

Guerrero, M.M., Martínez, V., Lacasa, C.M., Hernández, A., Lacasa, A., Ros, C.

Biotecnología y Protección de Cultivos, IMIDA, C/ Mayor s/n 30150 La Alberca, Murcia. mariam.guerrero@carm.es

El pimiento es un monocultivo en la mayor parte de los invernaderos del Campo de Cartagena (Murcia). *Phytophthora spp.* y *Meloidogyne incognita* son los principales patógenos edáficos, requiriendo de la desinfección anual del suelo para su control. La biosolarización con estiércoles frescos o semicompostados, iniciada antes de finales de agosto, se muestra como una alternativa a la desinfección química, aplicándose en más del 25 % de la superficie cultivada de pimiento. Las *Brassic*as en verde o los coproductos industriales de algunas, se han referenciado como biofumigantes eficaces frente a hongos del suelo y nematodos fitoparásitos. El ciclo habitual de cultivo del pimiento en los invernaderos de la comarca cartagenera se extiende entre mediados de noviembre-principios de diciembre y mediados de septiembre- principios de octubre. Algunos agricultores se muestran reacios a adelantar a mediados de agosto el final del cultivo para aplicar con garantías la biosolarización. Por ello, se han evaluado los efectos desinfectantes de los pellets de *B. carinata* solos o con estiércol fresco de ovino, frente a *M. incognita* en dos fechas (mediados de agosto y principios de octubre) de inicio de la biosolarización. Los tratamientos se repitieron tres años consecutivos en el mismo suelo para valorar la estabilidad de la eficacia, teniendo como referencia suelo desinfectado con bromuro de metilo y suelo no desinfectado. Al reiterar la desinfección se mejoró el control del nematodo para los tratamientos iniciados en agosto que al tercer año se aproximaron al del bromuro de metilo, no encontrándose diferencias entre enmiendas. No se encontraron diferencias entre los tratamientos iniciados en octubre y el control no desinfectado para la incidencia de *M. incognita*. La producción comercial en los tratamientos de agosto fue similar a la de bromuro de metilo, no ocurriendo lo mismo para los de octubre. Estos mejoraron en más de un 20% la producción del control no desinfectado.

El trabajo se ha financiado por el proyecto INIA RTA 2008-0058-CO3 cofinanciado con fondos FEDER. A. Hernández disfruta de una beca de formación del IMIDA.

PAN-33

COMPORTAMIENTO DE DIVERSOS FUNGICIDAS FRENTE AL MOTEADO DEL NÍSPERO (*Fusicladium eriobotryae*) EN ENSAYOS *IN VITRO* E *IN VIVO*

González-Domínguez, E., Rodríguez-Reina, J. M., Armengol, J., García-Jiménez J.

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

E-mail: elgondo1@upvnet.upv.es

El moteado del níspero causado por *Fusicladium eriobotryae* es la principal enfermedad de este cultivo. La estrategia de control en la zona de Alicante en los últimos años se basa en la utilización de productos cúpricos, ditiocarbamatos y triazoles. Ante los riesgos de aparición de resistencias en estos últimos, en el presente trabajo se evaluó la eficacia de dos materias activas con modos de acción diferentes: piraclostrobin (QoI) y boscalida (SDHI). En primer lugar, se estudió el efecto de estos fungicidas sobre la inhibición del crecimiento micelial. Para ello, placas toxicadas con cada uno de los fungicidas a las concentraciones de 0,1, 1, 10 y 100 mg/l de materia activa se incubaron durante un mes a 25°C, evaluándose el porcentaje de crecimiento respecto al control. Asimismo, se estudió el efecto sobre la germinación de conidios. En este caso, suspensiones de 5×10^4 conidios/ml se toxicaron con los fungicidas a las mismas concentraciones y se incubaron a 20°C durante 48 horas, evaluándose el porcentaje de germinación respecto al control. En ambos experimentos los valores de la Dosis Efectiva 50 para los dos fungicidas fueron inferiores a 0,5 ppm, por lo que se mostraron altamente efectivos en el control *in vitro* del hongo. Posteriormente, se realizó un ensayo en planta para comparar su efectividad frente a los fungicidas utilizados habitualmente para el control de la enfermedad, y su posible efecto protector o curativo. Las materias activas evaluadas fueron: oxiclورو de cobre, mancozeb, difenoconazol, boscalida y piraclostrobin. Para ello, plantas de un año de edad con cuatro hojas fueron tratadas 7, 3 y 1 día antes de la infección, el mismo día de la infección, y 1, 3 y 7 días después de la infección. Para la infección, las plantas fueron pulverizadas con una suspensión de 5×10^5 conidios/ml y embolsadas durante una semana. La evaluación del porcentaje de superficie foliar afectada se realizó a los 45 días de incubación en una cámara de cultivo (20°C; 60%HR: 12 horas luz/ 12 horas oscuridad). Las materias activas más efectivas fueron difenoconazol y piraclostrobin, con severidades inferiores al 5% en todos los casos. El cobre fue el fungicida menos efectivo, con severidades del 20% aplicado 7 días antes y del 40% aplicado 7 días después.

El presente trabajo ha sido financiado por la Cooperativa Agrícola de Callosa d'En Sarrià.

PAN-34

FACTORES QUE AFECTAN A LA VIABILIDAD DEL MATERIAL DE PROPAGACIÓN DE VID TRATADO POR TERMOTERAPIA CON AGUA CALIENTE

Gramaje, D.¹, Armengol, J.²

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

²*Instituto Agroforestal Mediterráneo, UPV, Camino de Vera s/n, 46022-Valencia. E-mail: dgramaje@ias.csic.es*

Los tratamientos por termoterapia con agua caliente a 53°C durante 30 minutos han sido citados como un método potencialmente efectivo para el control de las enfermedades de Petri y Pie Negro en material de propagación de vid en España. No obstante, existe cierta confusión en los viveros de vid sobre la eficacia y seguridad de estos tratamientos. Existen algunos trabajos de investigación que indican una alta mortalidad de plantas debido a tratamientos por termoterapia tanto en varetas antes de la fase de formación del callo como en plantas injertadas preparadas para su venta. Este hecho ha dado lugar a reticencias por parte de los viveristas al uso de este tratamiento. Con el objetivo de determinar el protocolo de termoterapia con agua caliente más adecuado, en este trabajo se evaluaron de los efectos de tres factores: el tratamiento a 53°C durante 30 minutos, la hidratación del material vegetal (hidratación después del tratamiento por termoterapia o no hidratación), y la conservación en cámara de frío (0, 1, 2 y 4 semanas antes de la plantación), sobre la brotación, la longitud y el peso de los sarmientos en plantas injertadas. Para ello, ocho grupos de 10 plantas (cultivar Tempranillo injertado sobre patrón 110 Richter) se trataron para cada combinación de factor de estudio, y otros ocho grupos de 10 plantas no tratadas se prepararon como control (sin tratamiento con agua caliente). Las plantas tratadas se plantaron inmediatamente en dos campos. Al final de un ciclo de crecimiento, se evaluaron la brotación, y la longitud y peso de los sarmientos. En general, se observó poca variabilidad en los porcentajes de brotación entre tratamientos. Se observó una reducción significativa de la longitud y peso de los sarmientos de todos los tratamientos respecto al control. Las plantas no hidratadas después de los tratamientos por termoterapia, y que fueron conservadas en cámaras de frío durante 4 semanas antes de la plantación, mostraron una reducción significativa en las tres variables evaluadas. Estos resultados indican que, después del tratamiento por termoterapia con agua caliente, períodos largos de conservación en frío podrían ser perjudiciales para el desarrollo del material de propagación de vid, principalmente cuando las plantas no han sido previamente hidratadas.

Financiado por el proyecto RTA2010-00009-C03-03 (INIA), cofinanciado con fondos FEDER (EU)

EVALUACIÓN DE LA SUPRESIVIDAD FRENTE A VERTICILOSIS DE COMPOSTS DE ALPERUJO FORMULADOS COMO SUSTRATOS

Avilés, M.¹, Gata, A.¹, Castillo, S.¹, Castaño, R.¹, Mulero, A.¹, Segarra, G.², Trillas, M.I.², Borrero, C.¹

¹Dpto. Ciencias Agroforestales, E.T.S.I.A. Universidad de Sevilla. Ctra. Utrera km 1, 41013, Sevilla. mail:aviles@us.es

²Dpto. Biología Vegetal, Universidad de Barcelona. Avda. Diagonal 645, 08028, Barcelona.

Algunos trabajos han informado del efecto supresivo de ciertos composts de alperujo frente a determinadas verticilosis. No obstante, dada la variabilidad tanto del material fresco de partida como de los procesos de compostaje realizados, es de esperar diferencias entre ellos. Con el doble objetivo de confirmar la presencia de fenómenos supresivos y de conocer su variabilidad, hemos seleccionado cuatro composts de alperujo comerciales. Así, hemos utilizado composts de almazaras situadas en: Baena (Córdoba), Bobadilla (Málaga), Cazorla (Jaén) y Tabernas (Almería). Todos ellos fueron formulados para sustrato hortícola con turba rubia (1:2 v/v, compost de alperujo/turba). Se realizaron dos bioensayos en condiciones controladas con un diseño de bloques al azar con 3 bloques y cinco macetas por tratamiento y bloque. El patosistema utilizado fue *Verticillium dahliae*/algodonero. El inóculo empleado fue $5 \cdot 10^6$ conidias/cc sustrato de un aislado del patotipo defoliante. La severidad se evaluó semanalmente desde inicio de síntomas. Al inicio de cada bioensayo se evaluaron distintas actividades microbianas, pH y conductividad eléctrica. Al final se cuantificó la densidad de microesclerocios en los sustratos. Además, se midió el índice de germinación y la capacidad de inhibición del crecimiento radial de *V. dahliae* de los distintos sustratos. Sólo el sustrato formulado con compost de Cazorla presentó supresividad respecto a la turba. Además, esta supresividad se correspondió con la menor densidad de microesclerocios. Este sustrato presenta los mayores valores respecto a los otros de pH, índice de germinación y actividades microbianas: esterasa, lipasa y valina-arilamidasa. Sin embargo, no presenta diferencias relevantes en su composición nutritiva respecto al resto. Además, hemos comprobado que no presenta fungitoxicidad “*in vitro*” frente al hongo. Todo ello apunta a las características microbianas como las responsables del comportamiento supresivo. Este trabajo ha sido financiado por el proyecto AGL2010-21982 del Ministerio de Ciencia e Innovación, cofinanciado por fondos FEDER de la UE.

**INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA EN EL EFECTO BIOFUMIGANTE
DE ESPECIES DE *Brassicaceae*: INACTIVACIÓN *IN VITRO* DE
Phytophthora nicotianae Y *Fusarium oxysporum***

Picón-Toro, J., Morales-Rodríguez, M.C., Palo, C., Palo, E., García-Gallego, A., Rodríguez-Molina, M.C.

Centro de Investigación Agraria "Finca La Orden-Valdesequera", Gobierno de Extremadura. Finca La Orden. 06187 Guadajira (Badajoz). E-mail: julia.picon@juntaextremadura.net.

El pimiento para pimentón y el tabaco son dos cultivos representativos y de gran importancia socioeconómica para Extremadura. A estos cultivos les afectan dos enfermedades fúngicas de origen edáfico: la Tristeza del pimiento, causada por *Phytophthora nicotianae*, y la Fusariosis Vascular del tabaco, causada por *Fusarium oxysporum* f. sp. *batatas*. El objetivo de este trabajo fue estudiar la inactivación del inóculo de estos dos patógenos por el efecto de los productos volátiles liberados por distintas especies de *Brassicaceae* combinado con diferentes temperaturas.

Se han ensayado como biofumigantes las especies *Brassica nigra*, *Capsella bursa-pastoris* y *Sinapis alba*, a dos temperaturas constantes, 20 °C y 25 °C. La inactivación se evaluó en tierra inoculada con triturado miceliar en el caso de *P. nicotianae* y con inóculo talco en el caso de *F. oxysporum*. La tierra inoculada se dispuso en bolsas de agril que se introdujeron en tarros de vidrio herméticos en cuyo fondo se dispusieron 10 g de material biofumigante y se prepararon también testigos sin biofumigante. Los tarros se incubaron a las temperaturas correspondientes durante 14 días. El inóculo viable de *P. nicotianae* después del periodo de incubación se cuantificó en medio PARP, y el de *F. oxysporum* en medio Komada. El porcentaje de inactivación se calculó con respecto a la densidad final de inóculo en los testigos y los datos se analizaron mediante ANOVA.

Las tres especies de *Brassicaceae* ensayadas produjeron inactivación del inóculo de *P. nicotianae* y de *F. oxysporum* tanto a 20 °C como a 25 °C. Los porcentajes de inactivación del inóculo difirieron significativamente en función de la especie fúngica, el biofumigante y la temperatura. El orden de eficacia de los biofumigantes, de mayor a menor inactivación, fue el mismo para *P. nicotianae* a las dos temperaturas ensayadas: *C. bursa-pastoris* = *B. nigra* > *S. alba*. En el caso de *F. oxysporum*, a 20 °C se diferenciaron 3 grupos homogéneos, siendo el orden de eficacia, *C. bursa-pastoris* > *S. alba* > *B. nigra*, mientras que a 25 °C, *C. bursa-pastoris* fue la especie que causó mayor inactivación.

Se observaron diferencias de susceptibilidad entre las dos especies fúngicas, ya que *F. oxysporum* se mostró más susceptible que *P. nicotianae* a las dos temperaturas ensayadas.

Financiación: proyecto RTA 2008-00058-C03-02, Grupo GR10130 del Gobierno de Extremadura, fondos FEDER y Fondo Social Europeo.

PAN-37

INHIBICIÓN DEL CRECIMIENTO MICELIAR DE *Phytophthora nicotianae* Y *Fusarium oxysporum* POR ESPECIES DE *Brassicaceae*

Picón-Toro, J., Morales-Rodríguez, M.C., Palo, C., Palo, E., García-Gallego, A., Rodríguez-Molina, M.C.

Centro de Investigación Agraria "Finca La Orden-Valdesequera", Gobierno de Extremadura. Finca La Orden. 06187 Guadajira (Badajoz). E-mail: julia.picon@juntaextremadura.net.

Phytophthora nicotianae es el principal agente causal de la Tristeza del pimiento para pimentón en Cáceres, y *Fusarium oxysporum* f. sp. *batatas* es el patógeno implicado en la Fusariosis Vascular del tabaco en esta provincia. La biofumigación con crucíferas se presenta como una posible alternativa a los tratamientos químicos para el control de estas enfermedades. La eficacia de esta biofumigación depende, entre otros factores, de la especie de crucífera empleada como biofumigante y del patógeno que se pretende controlar.

Se ha ensayado *in vitro* el efecto de 5 especies de *Brassicaceae* (*Brassica napus* var. *oleifera*, *B. oleracea* var. *italica*, *B. nigra*, *Capsella bursa-pastoris* y *Sinapis alba*) en la inhibición del crecimiento miceliar de aislados de *P. nicotianae* y de *F. oxysporum* f. sp. *batatas*. Para ello se emplearon 320 g de material biofumigante troceado que se dispusieron en el fondo de una bandeja de plástico (55 x 35 x 8 cm), y sobre esta capa de material vegetal se dispuso una rejilla de plástico encima de la cual se colocaron las placas de Petri con medio PDA en las que se habían sembrado discos de los distintos aislados. Se destaparon las placas, las bandejas se sellaron con plástico y se incubaron durante 72 h a 25 °C. Pasado el tiempo de incubación se realizaron dos medidas diametrales de cada colonia. Se prepararon 3 repeticiones por especie biofumigante y testigo. El porcentaje de inhibición se calculó con respecto al crecimiento medio del testigo y los datos se analizaron mediante ANOVA.

Las 5 especies de *Brassicaceae* ensayadas inhibieron el crecimiento miceliar de las dos especies fúngicas. En las dos especies fúngicas se diferenciaron significativamente varios grupos homogéneos entre las especies biofumigantes. En *P. nicotianae*, el orden de las especies de mayor a menor inhibición fue *C. bursa-pastoris* = *B. napus* > *S. alba* = *B. nigra* > *B. oleracea*, y en el caso de *F. oxysporum*, *C. bursa-pastoris* = *S. alba* > *B. napus* = *B. nigra* > *B. oleracea*.

Para todas las especies biofumigantes ensayadas, *P. nicotianae* presentó un porcentaje de inhibición significativamente mayor que *F. oxysporum*.

Financiación: proyecto RTA 2008-00058-C03-02, Grupo GR10130 del Gobierno de Extremadura, fondos FEDER y Fondo Social Europeo.

PAN-38

COMPORTAMIENTO PRODUCTIVO DE LOTES DE PATATA DE REEMPLEO CON NIVELES CONOCIDOS DE PVY Y PLRV

García-Calvo, L.¹, Pesqueira, A.M²., González-Núñez P.¹, Cabaleiro, C.²

¹*Centro Tecnológico da Carne, Parque Tecnológico de Galicia, Av Galicia nº 4, 32900 San Cibrao das Viñas, Ourense.*

²*Escola Politécnica Superior, USC, Campus Universitario s/n 27002 Lugo; e-mail: cristina.cabaleiro@usc.es*

Los virus en patata, sobre todo PVY y PLRV, reducen el vigor de las plantas y la posibilidad de utilizar los tubérculos como semilla; el empleo de patata certificada garantiza que el nivel de virosis graves y otros patógenos está por debajo del umbral económico de daños. A pesar de ello, muchos agricultores reemplazan para la siembra partidas de patata de consumo o dedican cierta superficie a la producción de su propia siembra para disminuir costes de producción (en A Limia: 0,14 frente a 0,11€·kg⁻¹) o porque, cuando una variedad deja de estar protegida disminuye la cantidad de patata certificada disponible en el mercado o su calidad. Además, de algunas variedades tradicionales, como la Fina de Carballo, de uso minoritario pero muy valoradas en el mercado local (hasta 0,8-1 €·kg⁻¹ al productor), no se dispone de material certificado.

En 2008 y 2011 se establecieron parcelas de ensayo en fincas de agricultores y del Centro Tecnológico da Carne (CTC) sembradas con lotes de tubérculos de las variedades mayoritarias Agria y Kennebec que habían sido enviados por agricultores para valorar su calidad de cara al reemplazo. Ese material se analizó para PVY y PLRV, se valoraron *de visu* los síntomas/signos de patógenos y otros daños y se calificaron según dos escalas: una de 3 puntos para estado general de tubérculos y otra de 5 puntos de “recomendación de siembra” en función, entre otros, del nivel de virosis, ambas tomando como base a lo recomendado en Reglamento Técnico de Control y Certificación de la Patata de siembra. En 2009 y 2010 se establecieron ensayos para determinar los daños producidos por niveles altos de PVY y PLRV en la variedad Fina de Carballo.

Aunque casi siempre hay un efecto significativo del nivel de virosis en la producción bruta y comercial de tubérculos de patata, la variabilidad es muy alta y éste no se manifiesta hasta niveles relativamente altos; la variedad Kennebec tiene un mejor comportamiento que la Agria. La escala de recomendación de siembra utilizada permite descartar los lotes que podrían producir mayores pérdidas de producción (recomendación de “no sembrar”) pero en los lotes en los que se recomienda tratar o seleccionar tubérculos no se detectan diferencias significativas frente a la patata certificada en los niveles de producción alcanzados por los lotes de reemplazo. La variedad Fina de Carballo presenta una excelente tolerancia al PVY y, en menor medida, a PLRV, sin que se produzcan descensos significativos de producción incluso en lotes con el 60 y el 100%, en ninguno de los años evaluados.

PAN-39
TOLERANCIA DE *Vitis vinifera* cv MENCIA FRENTE A GLRaV EN
VIÑEDOS TRADICIONALES

Pesqueira, A.M., Cabaleiro, C.

Escola Politécnica Superior, USC, Campus Universitario s/n 27002 Lugo; e-mail: cristina.cabaleiro@usc.es

El cultivar Mencía de *Vitis vinifera* es la uva tinta de vinificación más extendida en la viticultura gallega y, posiblemente, una de las más antiguas. Fue introducida por los romanos y ha sobrevivido a múltiples cambios por su capacidad de adaptación a viticulturas tan diversas como son las de la Ribeira Sacra, Valdeorras o Monterrei en Galicia, además de Castilla y León.

Desde el año 2006 se ha trabajado en muchos aspectos del cultivo de esta variedad en diversas zonas vitícolas gallegas. Se ha comprobado que los tres principales virus del enrollado (*Grapevine Leafroll associated Virus* 1, 2, y 3) tienen una prevalencia del 92% en los viñedos de Mencía e incidencias entre el 14 y el 72%. A lo largo de varios años, en parcelas de la Ribeira Sacra lucense se observó que los síntomas de enrollado en Mencía sobre 1103P eran escasos y poco consistentes, al contrario de lo que ocurría con otras variedades o en Mencía injertada sobre 110R, en la que en 2009 se vieron síntomas claros y definidos. Los daños medidos en campo también eran muy variables de unas parcelas a otras, con cosechas un 30-50% inferiores en parcelas de sobre 110R y sin diferencias apreciables sobre 1103P. Este posible efecto de los sistemas de cultivo en síntomas y daños llevó a estudiar la Mencía en diferentes localizaciones, patrones y condiciones en 2010 y 2011. En 2012 se dispone de datos de 958 plantas para evaluar el efecto de distintos factores.

Los análisis de las cosechas en los años 2009-2011 en 6 localizaciones con 6 patrones (1103P, 110R, 41B, SO4, 161.49C y *V. rupestris*), muestran solo diferencias puntuales en la cantidad y/o algún factor de calidad de mosto. Patrones como 161.49C, 41B y SO4, como regla general, no dan lugar a aparición de síntomas ni daños. Sobre 1103P normalmente no hay daños pero en un viñedo en el que el manejo es muy uniforme buscando la máxima calidad, los mostos de cepas con GLRaV tienen menor grado, mayor acidez y menor contenido en polifenoles, muestren o no síntomas de enrollado. Las cepas con GLRaV sobre *V. rupestris* tienen síntomas claros y consistentes y producen menos kilos de uva, como ocurre con 110R, que es, con diferencia, el portainjerto en el que los GLRaV producen un mayor efecto negativo sobre la producción y características del mosto en distintos años y localizaciones.

A nivel global, y pese a las diferencias puntuales observadas se puede decir que el cv Mencía con toda su diversidad parece mostrar una tolerancia notable a esta enfermedad en un cultivo tradicional, lo que le ha permitido sobrevivir y consolidarse como variedad tinta mayoritaria en Galicia. Los GLRaV son patógenos de calidad y sus daños son más evidentes cuando ésta es el principal objetivo y repercute en la remuneración de la producción.

PAN-40

CONTROL DE PODREDUMBRES FÚNGICAS EN MANZANA, FRESÓN Y UVA DE MESA MEDIANTE PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS SINTÉTICOS

Francés, J., Badosa, E., Montesinos, E.

Laboratorio de Patología Vegetal, Instituto de Tecnología Agroalimentaria-CIDSAV-XaRTA- Universidad de Girona. E-mail:jesus.frances@udg.edu

Los péptidos antimicrobianos ofrecen expectativas interesantes en el control de podredumbres causadas por hongos en postcosecha, ya que son necesarias nuevas materias activas no tóxicas y eficaces.

El presente trabajo tuvo como objetivo evaluar la efectividad de péptidos líder antifúngicos de la quimioteca CECMEL11, una colección de undecapéptidos diseñados mediante química combinatoria consistentes en híbridos de cecropina A (2-8)-melitina (6-9).

Se determinó la actividad antifúngica y esporicida de los péptidos BP15 (KKLFKKILKVL) y BP21 (Ac-FKLFKKILKVL), frente a *Penicillium expansum*, *Colletotrichum acutatum* y *Botrytis cinerea* y su capacidad de inhibición de infecciones en material vegetal en manzana, fresón y uva, respectivamente.

Se observó que los péptidos BP15 y BP21 fueron significativamente activos en la inhibición del crecimiento de los tres hongos fitopatógenos. La concentración mínima inhibitoria (CMI) del BP15 fue entre 12,5-25 μ M para *P. expansum*, 25-50 μ M para *C. acutatum*, y menos de 12,5 μ M para *B. cinerea*. En el caso del péptido BP21, las CMIs fueron de menos de 12,5 μ M para *P. expansum*, entre 50-100 μ M para *C. acutatum*, y 25-50 μ M para *B. cinerea*. Además, los péptidos BP15 y BP21 presentaron actividad esporicida frente a conidias no germinadas de los tres hongos estudiados, pero mostrando una sensibilidad diferente para cada uno de ellos.

La eficacia de inhibición de podredumbres en frutos, se mostró para BP15 en el rango del 39-62% en manzanas; 71-92% en fresa, y 36-60% en uva. En BP21 las eficacias variaron entre el 20-42% en manzanas, 67-75% en fresa y 8-26% en uva. El producto químico de referencia presentó diferencias significativas con el péptido BP21, en dos de los tres patosistemas ensayados, y obtuvo porcentajes de incidencia y diámetros medios de la lesión significativamente similares a los obtenidos con el péptido BP15. En el 83% de los ensayos realizados, BP15 mostró una eficacia de control similar a la del fungicida comercial de referencia. El péptido BP15 fue significativamente más eficaz que BP21 en todos los ensayos de los tres patosistemas estudiados.

PAN-41

BLOQUEO DE LA EXPRESIÓN DE GENES DE INSECTO POTENCIALMENTE IMPLICADOS EN TRANSMISIÓN DE VIROSIS ENTRE PLANTAS: USO DE VECTORES VIRALES

Urizarna, M., Mingot, A., Vilaplana, L.I., López-Moya, J.J.

*Centre de Recerca en Agrigenòmica, CRAG, CSIC-IRTA-UAB-UB, edifici
CRAG Campus UAB Bellaterra, Cerdanyola del Vallès, 08193 Barcelona.
Email: maria.urizarna@cragenomica.es*

La mayoría de virus que infectan plantas son transmitidos por organismos vectores, fundamentalmente insectos. Aunque en muchos patosistemas los mecanismos moleculares que gobiernan el proceso de transmisión de virus son todavía poco conocidos, la disponibilidad de secuencias genómicas de insectos vectores abre la puerta al diseño de sistemas de interferencia específicamente dirigidos a bloquear la expresión génica de factores esenciales durante la transmisión. En el caso de los potyvirus transmitidos por pulgones, la existencia de un factor auxiliar de origen viral, la proteína HCPro, puede servir para identificar productos del vector implicados en la retención reversible de las partículas virales en el estilete del insecto. Mediante una aproximación proteómica se ha ampliado la lista de proteínas de *Myzus persicae* capaces de interaccionar con la proteína HCPro del virus del grabado del tabaco, *Tobacco etch virus* (TEV). Después de su identificación en las bases de datos de secuencias genómicas de pulgones, la comprobación de su potencial funcionalidad en la transmisión del virus se está abordando mediante interferencia de RNA (RNAi). Para ello se han clonado fragmentos de los genes seleccionados, y se han ensayado procedimientos de aportación al insecto mediante la expresión en tejido vegetal sobre el que se alimentan los pulgones. La expresión en planta puede hacerse transitoriamente mediante la infiltración de cultivos de *Agrobacterium tumefaciens*, o empleando vectores virales, por ejemplo basados en el virus del cascabeleo del tabaco, *Tobacco rattle virus* (TRV). Los vectores virales de TRV nos han permitido expresar fragmentos escogidos de genes de *M. persicae*, sin que se observe pérdida del inserto durante la duración de los ensayos. El seguimiento de la expresión se realizó por RT-PCR en tiempo real en pulgones individuales alimentados sobre plantas previamente inoculadas con las variantes de TRV que contenían secuencias homólogas de los genes escogidos. Si se confirma para alguno de los candidatos un papel funcional en transmisión, y que su interferencia afecta al proceso, la estrategia de RNAi podría utilizarse para diseñar plantas con expresión estable de secuencias del insecto vector que pudieran bloquear la diseminación del virus.

Financiado por el Plan Nacional de I+D+i, proyecto AGL2010-14949, y por fondos de la Generalitat de Catalunya 2009SGR-09626.

PAN-42

NUEVOS PATRONES DE AGUACATE DE RAZA ANTILLANA TOLERANTE-RESISTENTES A LA PODREDUMBRE DE RAÍZ (*Phytophthora cinnamomi* Rands) PARA SU DESARROLLO COMERCIAL EN PAÍSES PRODUCTORES

Gallo Llobet, L.¹, Domínguez Correa, P.¹, Siverio de la Rosa, F.², Rodríguez Padrón, C.¹, Rodríguez Pérez, A.³

¹Dpto. Protección Vegetal. Instituto Canario de Investigaciones Agrarias (ICIA). Apdo. 60, 38200 La Laguna, Tenerife. España. lgallo@icia.es

²Sección de Laboratorio de Sanidad Vegetal. Carretera del Boquerón s/n. Valle de Guerra. 38270 La Laguna, Tenerife. España.

³Dpto. Microbiología y Biología Celular. Facultad de Farmacia. Universidad de La Laguna. 38207 La Laguna, Tenerife. España.

Phytophthora cinnamomi supone la principal limitación en el cultivo del aguacate a nivel mundial. El control más eficaz de esta enfermedad a largo plazo es la utilización de patrones tolerante-resistentes. Durante los últimos 30 años el Instituto Canario de Investigaciones Agrarias (ICIA) ha desarrollado un programa de selección de polinización abierta con el objetivo de seleccionar patrones de aguacate tolerante-resistentes a *P. cinnamomi*. La selección se llevó a cabo utilizando plántulas de semillas de ecotipos locales de aguacates antillanos en: a) tanque con solución nutritiva inoculada con *P. cinnamomi*, b) tierra infestada de forma natural (terrinas y campo). Las plantas que superaron dicho test se sembraron en una parcela con alto grado de infección (cepas de *P. cinnamomi* nº 294; 295 y 296, micoteca de la Universidad de California Riverside). Las plantas con mejor comportamiento frente a la infección se clonaron por el método de Frolich y Platt y se reevaluaron en campo infestado, injertadas y no injertadas con la variedad Hass, usando como control los patrones 'Duke 7' y 'Thomas' (tolerantes a *P. cinnamomi*) y 'Topa-Topa' y 'Edranol' (susceptibles a *P. cinnamomi*). Después de varios años de evaluación se han seleccionado y patentado cuatro patrones tolerante-resistentes a *P. cinnamomi*, uno a nivel internacional bajo el nombre 'JULIAN' y tres a nivel nacional (España): 'GALLO 2', 'GALLO 3' y 'GALLO 4'. Todos ellos se testaron para Sunblotch y están libres de dicho viroide. Parte de este material vegetal ha sido enviado para su evaluación a Australia (Sunshine Horticultural Services) y a México (Fundación Sánchez Colín).

PAN-43

CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA DE PATRONES DE AGUACATE ANTILLANO TORERANTE-RESISTENTES A *Phytophthora cinnamomi* Rands PARA SU REGISTRO COMERCIAL

Gallo Llobet, L.¹, García Luque, M.¹, Domínguez Correa, P.¹, Rodríguez Pérez, A.², Rodríguez Padrón, C.¹, Marrero Domínguez, A.³

¹Dpto. Protección Vegetal. Instituto Canario de Investigaciones Agrarias (ICIA). Apdo. 60, 38200 La Laguna, Tenerife. España. lgallo@icia.es

²Dpto. Microbiología y Biología Celular. Facultad de Farmacia. Universidad de La Laguna. 38207 La Laguna, Tenerife. España.

³Dpto. Ingeniería, Producción y Economía Agrarias. Universidad de La Laguna. 38071 La Laguna, Tenerife. España.

Durante los últimos 30 años en el Instituto Canario de Investigaciones Agrarias (ICIA) se ha establecido y desarrollado un programa de selección de patrones de aguacate de raza antillana tolerante-resistentes a *Phytophthora cinnamomi* Rands. Este programa ha dado como resultado un conjunto de patrones de gran interés de los que se han estudiado sus características agronómicas, incluyendo su compatibilidad con variedades comerciales, producción y tolerancia a la salinidad. De este material vegetal se han seleccionaron cuatro patrones para ser registrados como nuevas obtenciones vegetales de ámbito nacional: 'GALLO2', 'GALLO3' y 'GALLO4' e internacional: 'JULIAN'. Estos patrones se caracterizaron siguiendo los descriptores de IPGR para árbol, hoja, flor, fruto y semilla, así como su susceptibilidad a la salinidad y al estrés biótico causado por *P. cinnamomi*. Todos ellos muestran los caracteres típicos de la raza Antillana, como son la rugosidad del tronco, hojas con escasa pubescencia en la superficie inferior, ausencia de olor a anís en la hoja, de bajo a moderado contenido en aceite del fruto y un tamaño de semilla de mediano a grande. En este trabajo se presenta una descripción completa de las características morfológicas de los cuatro patrones bajo registro. El portainjerto 'JULIAN' presenta una elevada tolerancia al estrés biótico producido por *P. cinnamomi* y al estrés abiótico producido por la salinidad.

PAN-44

USO DE PCR EN TIEMPO REAL PARA EVALUAR LA EFICACIA DE PRODUCTOS NATURALES EN EL CONTROL DE *Colletotrichum acutatum* EN FRESA

Aguado, A., Pastrana, A.M., De los Santos, B., Romero, F., Capote, N.

IFAPA Las Torres-Tomejil. Carretera Sevilla-Cazalla Km 12,2. 41200 Alcalá del Río, Sevilla E-mail: marian.capote@juntadeandalucia.es

La antracnosis de la fresa, causada por el hongo fitopatógeno *Colletotrichum acutatum* J.H. Simmonds, está presente en la mayoría de las áreas donde se cultiva. El uso de fitosanitarios químicos para el control de ésta y otras enfermedades de la fresa se está reduciendo progresiva y drásticamente por normativa europea. Por este motivo, es urgente desarrollar alternativas no químicas que sean eficaces en el control de estas enfermedades, a la vez que respetuosas con el medio ambiente y la salud humana. Este estudio trata de evaluar el efecto de dos productos naturales sobre el control de *Colletotrichum acutatum* en plantas de fresa. El primer producto natural ensayado está basado en extractos de alga (*Ascophyllum nodosum*) y canela (*Cinnamomum* sp.) y tiene acción biofungicida *in vitro*. El segundo producto natural está basado en quitosán, con demostrada acción inductora de defensas. Las plantas de fresa crecidas en macetas en condiciones controladas se trataron con: 1) el producto natural biofungicida al 0,5%; 2) el producto natural inductor de defensas al 0,25%; 3) el fungicida químico Clortalonil al 0,3% como control positivo; y 4) agua destilada como control negativo. 24 horas después de la aplicación de estos productos, las plantas se inocularon con una suspensión de 10^5 conidias/ml de *C. acutatum*. Se usaron plantas no tratadas y no inoculadas como control de infección natural. Se tomaron muestras de las plantas a las 0h, 24h, 72h, 7d y 15d después de la inoculación y se determinó la cantidad de hongo presente en las mismas mediante PCR en tiempo real usando extractos crudos de plantas. Para la normalización de las muestras se usó una región conservada del gen citocromo oxidasa (cox) de plantas. Los resultados demostraron la eficacia de los productos naturales ensayados, especialmente el inductor de defensas basado en quitosán, en el control del desarrollo del hongo en la planta hasta 15 días después de la inoculación. Este ensayo muestra la eficacia de la técnica PCR en tiempo real en la detección, identificación y cuantificación del patógeno fúngico *C. acutatum* directamente desde el material vegetal, sin necesidad de extracción de ADN, permitiendo un seguimiento rápido y eficaz de la evolución del agente causal de la antracnosis en plantas de fresa tratadas con distintos fitosanitarios. La alta sensibilidad de esta técnica permite además la detección del patógeno incluso antes de que aparezcan los síntomas.

PAN-45

OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES DE PRODUCCIÓN Y ANÁLISIS DE CICLOLIPEPTIDOS CON ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA EN CEPAS DE *Bacillus* spp.

Mora, I., Cabrefiga, J., Montesinos, E.

Instituto de Tecnologia Agroalimentària-XaRTA-CIDSAV, Universitat de Girona. E-mail: isabel.mora@udg.edu

Diversas cepas de *Bacillus* han sido utilizadas para el control biológico de numerosas enfermedades tanto del sistema radical como de la parte aérea de plantas. En la mayor parte de las cepas comerciales la eficiencia está ligada a la capacidad de producción simultánea de compuestos antimicrobianos, principalmente péptidos antimicrobianos (ciclolipopéptidos y bacteriocinas). El análisis de los genes relacionados con la biosíntesis de los productos se efectúa de forma rutinaria mediante PCR. Sin embargo el análisis de los productos de expresión requiere poner a punto tanto las condiciones óptimas de crecimiento (medios de cultivo) como los procedimientos de extracción y análisis químico, que permitan la prospección masiva de cepas en colecciones extensas de aislados.

El objetivo del presente trabajo fue la optimización de las condiciones de fermentación de cepas de *Bacillus* para obtener una elevada producción de metabolitos con actividad antibacteriana (principalmente ciclolipopéptidos antimicrobianos), optimizar las condiciones de extracción, purificación mediante RP-HPLC, y análisis mediante espectrometría de masas (MALDI-TOFF y ESI-MS).

Para ello se comparó la actividad de extractos de cultivo procedentes de fermentaciones de diversas cepas con o sin actividad antibacteriana en diferentes medios de cultivo, temperaturas, y en diversas fases de la curva de crecimiento. Para determinar dicha actividad se utilizaron *Erwinia amylovora*, *Pseudomonas syringae* pv. tomato y *Xanthomonas axonopodis* pv. vesicatoria como indicadores de bacterias fitopatógenas. Se observó que las mejores condiciones de fermentación eran 28°C durante 48 horas independientemente del medio de cultivo empleado. Paralelamente, se analizó la producción de metabolitos de los diferentes extractos mediante HPLC observándose que determinadas fracciones estaban relacionadas con la actividad antimicrobiana.

Las fracciones más representativas se analizaron mediante espectrometría de masas (MALDI-TOFF y ESI-MS), confirmando la presencia de surfactina, bacilomicina, fengicina e iturina en los extractos con actividad antibacteriana, dependiendo de la cepa y de las condiciones de fermentación.

La puesta a punto de la presente metodología ha permitido estudiar la capacidad de producción de diversos AMPs en una extensa colección de cepas de *Bacillus*, y seleccionar las mejores candidatas a agente de biocontrol así como estudiar su distribución en muestras naturales.

Investigación subvencionada por AGL2009-13255-C02-01

**EVALUACIÓN DE LA SUPRESIVIDAD INDUCIDA FRENTE A
VERTICILOSIS POR LA ENMIENDA CON COMPOST DE ALPERUJO**

Avilés, M.¹, Gata, A.¹, Castillo, S.¹, Borrero, C.¹, Castaño, R.¹, Segarra, G.²,
López-Escudero F.J.³, Trillas, M.I.²

¹Dpto. Ciencias Agroforestales, E.T.S.I.A., Universidad de Sevilla. Ctra. Utrera km 1, 41013, Sevilla. mail:aviles@us.es.

²Dpto. Biología Vegetal, Universidad de Barcelona. Avda. Diagonal 645, 08028, Barcelona.

³Dpto. Agronomía, E.T.S.I.A.M., Universidad de Córdoba, Campus Universitario de Rabanales, Edificio Celestino Mutis (C4), 14071, Córdoba.

La Verticilosis del olivo, causada por *Verticillium dahliae* es la principal amenaza fitosanitaria en este cultivo en España. Los métodos de control disponibles son parcialmente efectivos, lo que obliga a un uso integrado de los mismos. En este sentido, numerosos estudios han demostrado la eficacia de la aplicación al suelo de residuos orgánicos en la reducción de las enfermedades de las plantas. En este trabajo se evalúa la posibilidad inducir supresividad en los suelos mediante la enmienda con composts de alperujo. Para ello, se han realizado dos bioensayos frente a la Verticilosis del algodón en dos suelos distintos (Utrera, Sevilla y Almodóvar del Río, Córdoba) con infestación natural de *Verticillium dahliae*. El compost de alperujo (La Reja S.L., Bobadilla, Málaga) se aplicó a 0, 10 y 20% (v/v). El diseño experimental fue de bloques al azar con 4 repeticiones y 5 contenedores por tratamiento y bloque. Los bioensayos se realizaron en condiciones controladas con 25 °C día (16 h) y 22 °C noche (8 h). Los resultados mostraron que no hay efecto del tipo de suelo pero si de la dosis de enmienda. La mayor dosis de enmienda muestra reducción de la severidad de la enfermedad en comparación con el suelo no enmendado, reducción de aproximadamente el 30%. No obstante, no se aprecia efecto en la densidad final de microesclerocios dentro de cada uno de los suelos. Estos resultados señalan a esta enmienda como supresiva, efecto dependiente de la dosis. Ambos suelos con la mayor dosis de enmienda presentan la mayor biomasa microbiana y las mayores actividades fosfatasa y arilsulfatasa, además, del mayor pH y la menor conductividad eléctrica. Todo ello parece apuntar a la promoción de procesos de competencia microbiana como justificante de la supresividad inducida.

Este trabajo ha sido financiado por el proyecto AGL2010-21982 y AGL 2011-30137 del Ministerio de Ciencia e Innovación, cofinanciado por fondos FEDER de la UE.

PAN-47

CONTROL DE TRES AISLADOS DE *Phytophthora cinnamomi* MEDIANTE BIOFUMIGANTES NATURALES

Brun Esquiliche, P., Basallote Ureba, M. J., Romero Muñoz, F., Barrau García, C.

IFAPA Las Torres-Tomejil. Alcalá del Río, 41.200 Sevilla. E-mail: carmen.barrau@juntadeandalucia.es

Phytophthora cinnamomi Rands., ha sido descrita como agente causal de la podredumbre radical de encinas, *Quercus ilex* ssp *ballota*. Este trabajo estudia el efecto biofumigante de tres especies de *Brassica* (*B. juncea*, *B. carinata* y *B. nigra*), como fuente potencial de material biofumigante, con efecto biocida sobre patógenos edáficos para el control de aislados de *P. cinnamomi*.

Los glucosinolatos (GLs) son compuestos hidrosolubles, almacenados en vacuolas acuosas de los tejidos vegetales. El daño tisular produce, como respuesta de defensa de la planta, la rotura de las vacuolas y exposición de los GLs a la acción de la enzima mirosinasa, localizada en idioblastos del tejido parenquimático y responsable de su hidrólisis. En la que se originan compuestos volátiles con capacidad biocida tales como isotiocianatos, tiocianatos, nitrilos...

En el ensayo se evaluaron cuatro dosis del material vegetal triturado: 5, 10, 20 y 30 gramos a razón de cuatro repeticiones por tratamiento. Discos de 8 mm tomados del margen de la colonia de un cultivo activo del hongo fueron sembrados en placas Petri con medio de cultivo fresco, que se sellaron sobre vasos de precipitado de 600 ml con el material vegetal triturado correspondiente a cada dosis. Se incluyeron controles sin biofumigante. Se incubaron en cámara de cultivo en oscuridad y temperatura de 20±2°C. Diariamente se midió el crecimiento radial de la colonia, hasta que el control había ocupado la totalidad de la placa a fin de determinar la dosis mínima efectiva de biofumigante en la supresión del crecimiento del hongo y su fungotoxicidad.

Los resultados mostraron el efecto biofumigante de las tres especies de *Brassica* frente a los aislados de *P. cinnamomi*. Siendo *B. juncea* y *B. nigra* las especies con mayor efecto supresivo, inhibiendo el crecimiento de los tres aislados de *P. cinnamomi* al 100 %. Mientras que *B. carinata*, si bien inhibió el crecimiento de los aislados, mostró mayor variabilidad de inhibición con la dosis y en el tiempo.

Este trabajo ha sido desarrollado dentro del marco de los objetivos de los Proyectos INIA RTA2010-00067-00-00 y TRANSFORMA 2010.5.

INFLUENCIA DEL FOTOPERIODO EN ESTUDIOS DE EVALUACIÓN DE RESISTENCIA DE CULTIVARES DE OLIVO A LA VERTICILIOSIS

García-Ruiz G.M.¹, Trapero C.², Del Río C.¹, López-Escudero F.J.²

¹IFAPA, Centro Alameda del Obispo, 14080 Córdoba.

²Departamento de Agronomía, Universidad de Córdoba, Campus Universitario de Rabanales, Edificio Celestino Mutis (C4), 14071 Córdoba

Se ha evaluado la resistencia de 48 cultivares de olivo al patotipo defoliante de *Verticillium dahliae* Kleb. en condiciones de fotoperiodo natural (FN) y fotoperiodo continuo (FC) de 24 horas en invernadero, mediante inoculación por inmersión radicular en una suspensión de 10^7 conidias/ml del hongo. La severidad de los síntomas se evaluó semanalmente con una escala de 0-4. Al final del experimento se estimó el área bajo la curva de progreso de la enfermedad (ABCPEP), la severidad media final (SMF) y el porcentaje de plantas muertas (PPM). Se evaluó periódicamente la brotación de las plantas y la recuperación de la enfermedad en plantas con síntomas pasajeros. Respecto al control susceptible 'Picual', 4 cvs fueron extremadamente susceptibles (valores medios de ABCPEP, SMF y PPM de 65.5%, 3.7 y 87.5%, respectivamente), 21 fueron susceptibles (28.5%, 1.7 y 21.4%) y 8, moderadamente susceptibles (14.5%, 1.0 y 3.1%). Por su parte, 15 cvs mostraron una resistencia similar o superior al control moderadamente resistente 'Frantoio'. Doce de ellos se consideraron resistentes (9.1%, 0.7 y 0%) y 3, altamente resistentes (1.4%, 0.2 y 0%). Estos últimos se podrían utilizar como genitores para programas de mejora o como patrones resistentes, aunque será necesario confirmar su nivel de resistencia en nuevas condiciones experimentales de inoculación. Por otra parte, se observó mayor temperatura nocturna en el tratamiento FC, debido a la iluminación adicional durante 24 h que ocasionó mayor acumulación total de horas a temperaturas comprendidas entre 20° y 24°C (rango óptimo para la enfermedad). Este hecho produjo un acortamiento del período de incubación de tres semanas respecto al tratamiento FN. Así mismo, en FC, el desarrollo de la enfermedad en cultivares con niveles de susceptibilidad intermedios fue mayor, mientras que en los extremadamente susceptibles o resistentes no hubo diferencias con el FN. En FC las plantas testigo mostraron mayor brotación y crecimiento que las inoculadas. Analizando ambas condiciones de fotoperiodo, las plantas inoculadas con síntomas no crecieron o lo hicieron mucho menos que los testigos, mientras que las plantas inoculadas asintomáticas crecieron de manera similar a los testigos. En resumen, el fotoperíodo continuo en invernadero favoreció el desarrollo de la Verticilosis del olivo, resultando en un adelanto de la aparición de los síntomas y un desarrollo de la enfermedad más rápido con respecto al fotoperiodo natural.

Trabajo financiado por: FEDER-INIA (RFP 2009-00008 y RTA 2010-00013-C02-01); CICE-Junta de Andalucía (P08-AGR-03635); y AGL 2011-30137 del Ministerio de Ciencia e Innovación, cofinanciado por fondos FEDER de la UE.

PAN-49

EFICACIA Y ESTRATÉGIAS DE APLICACIÓN DE PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS PARA EL CONTROL DE *Stemphylium vesicarium* EN PERAL

Puig, M., Ruz, L., Moragrega, C., Montesinos, E., Llorente, I.

Institut de Tecnologia Agroalimentària-CIDSAV-XaRTA, Universitat de Girona, C/ Maria Aurèlia Capmany 61, 17071, Girona
e_mail: mireia.puig@udg.edu

La estemfiliosis o mancha marrón del peral es una de las principales enfermedades fúngicas que afectan al cultivo del peral en Europa y es responsable de importantes pérdidas económicas. El agente causante de la mancha marrón del peral es *Stemphylium vesicarium*. Actualmente el control de la enfermedad se realiza mediante la aplicación de fungicidas, sistemática o guiada mediante el modelo predictivo BSPcast, combinado con métodos de reducción del inóculo en el suelo. Debido a las características de esta enfermedad y a la reducción en el número de fungicidas autorizados, el número de materias activas eficaces en su control es muy limitado.

Los péptidos antimicrobianos pueden ser una alternativa o complemento a las materias activas actualmente utilizadas ya que presentan actividad contra otros hongos y bacterias fitopatógenos en diversos patosistemas. Concretamente, los péptidos antimicrobianos lineales son biodegradables, de escasa toxicidad y baja probabilidad de selección de microorganismos resistentes.

En este trabajo se ha determinado la eficacia en el control de *S. vesicarium* en peral de 13 péptidos antimicrobianos de la quimioteca CECMEL11. Dichos péptidos son híbridos de un fragmento de cecropina A y melitina. Primeramente, se analizó la actividad *in vitro* determinando la concentración mínima inhibitoria (CMI) y *ex vivo* mediante un ensayo de inhibición de infección en hojas de peral. Se observó que la mayoría de péptidos reducían o inhibían la capacidad germinativa de conidias de *S. vesicarium* (CMI < 50 µM). Posteriormente, en el ensayo de infección en material vegetal se determinó la eficacia de control en función del momento de aplicación con respecto a la inoculación del patógeno, con el objetivo de definir una estrategia de aplicación preventiva o curativa. Varios péptidos se mostraron muy eficaces en el control de las infecciones y algunos presentaron además actividad curativa.

Financiado por el proyecto AGL2009-09829/AGR del MEC y BR 10/17 de la Universitat de Girona.

PAN-50

EVALUACIÓN DE LA EFICACIA DEL MODELO RIMPRO EN LA DETERMINACIÓN DE EMISIÓN DE INÓCULO Y CONTROL DEL MOTEADO DEL MANZANO (*Venturia inaequalis* (Cke.) Wint.)

Vilardell, P.¹, Vilajeliu, M.¹, Batllori, L.², Agustí, E.³, Llorente, I.³

¹IRTA-Mas Badia. Mas Badia s/n 17134 La Tallada d'Empordà (Girona).

²Servei de Sanitat Vegetal Generalitat de Catalunya- DAR (Girona).

³Institut de Tecnologia Agroalimentària. Universitat de Girona. C/ Maria Aurèlia Capmany 61, 17071, Girona. isidre.llorente@udg.edu

El moteado del manzano es una de las enfermedades más importantes del cultivo del manzano. En los últimos 35 años el control de dicha enfermedad se ha realizado en Girona mediante aplicaciones de fungicidas guiadas con el modelo Mills. Desde el año 2004 se han realizado varios ensayos en campo con el objetivo de evaluar el modelo predictivo RIMpro, que puede ser una alternativa ventajosa a Mills, bajo las condiciones climáticas de Girona. Durante varios años se ha realizado un seguimiento de las emisiones de esporas de *V. inaequalis* mediante un captador volumétrico tipo Burkard y se ha comparado la dinámica de emisión con las predicciones del modelo RIMpro, observándose, en general, un buen ajuste. Paralelamente se han realizado ensayos de campo para determinar la eficacia de control de las infecciones primarias mediante la aplicación de fungicidas según el riesgo predicho por uno y otro modelo. El control de la enfermedad ha sido elevado en ambos casos, y, en algunos años, la utilización del modelo RIMpro ha permitido reducir de forma significativa el número de aplicaciones de fungicidas.

PAN-51

SELECCIÓN DE ACBs CONTRA LA FUSARIOSIS VASCULAR DEL TOMATE Y EVALUACIÓN DE DOS AGENTES SELECCIONADOS EN TRES SUSTRATOS HORTÍCOLAS

Castaño, R.¹, Borrero, C.¹, Trillas, M.I.², Avilés, M.¹

¹Dpto. Ciencias Agroforestales, E.T.S.I.A. Universidad de Sevilla. Ctra. Utrera km 1, 41013, Sevilla. mail:aviles@us.es

²Dpto. Biología Vegetal, Universidad de Barcelona. Avda. Diagonal 645, 08028, Barcelona.

Entre las principales prácticas de control biológico se encuentran el uso de sustratos supresivos y la aplicación de Agentes de Control Biológico (ACBs). A partir de una colección de 584 aislados potenciales ACBs, obtenidos de rizosfera de plantas sanas en situaciones de supresividad a las Fusariosis vasculares de clavel y tomate (FVT), los objetivos de este estudio fueron (i) seleccionar aislados contra FVT y (ii) evaluar, en condiciones de invernadero, la eficacia de los ACBs seleccionados usando tres sustratos con diferentes grados de supresividad a la FVT: compost de orujo de vid (OV) altamente supresivo, compost de corcho (CC) con supresividad intermedia y fibra de coco (FC) como sustrato conductivo.

Se realizaron ensayos en cámara de cultivo para seleccionar ACBs con macetas de tomate cultivadas en FC a las que se les inoculaban grupos de 4 aislados para ver su efecto frente a la FVT y posteriormente los aislados de los grupos eficaces se volvieron a evaluar individualmente. Dos de los mejores aislados seleccionados fueron identificados, secuenciando el gen *Transcription Elongation Factor 1- α* (TEF1- α), como *Fusarium solani* (aislado 305) y *Streptomyces* sp. (aislado A19). El diseño del posterior ensayo en invernadero fue de bloques al azar con tres repeticiones, cada repetición consistió en dos bolsas de cultivo (30 L) con 6 plantas de tomate cv. 'Roma'. Los tratamientos fueron: 3 sustratos x 2 [inoculado o no con *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* (Fol)] x 3 (inoculado con A19, 305 o no inoculado), en total 18 tratamientos. Se midieron severidad, densidad de inóculo del patógeno y de los ACBs al inicio y al final del ensayo y producción total de tomate. Los resultados mostraron que la FVT se redujo y que la producción total se mejoró cuando ambos ACBs fueron aplicados al medio conductivo (FC), con severidades equivalentes a la del CC natural. En el CC, sólo el aislado A19 mejoró este compost a niveles de OV. En OV, ninguno de los dos ACB mejoró su alta supresividad natural. Por tanto, la supresividad a la FVT dependió de la naturaleza de los sustratos y de los ACBs aplicados.

Este trabajo ha sido financiado por el proyecto AGL2008-05414-C03-01/AGR del Ministerio de Ciencia e Innovación y P06-AGR-02313 de la Consejería de Innovación, Ciencia y Empresa, Junta de Andalucía.

**COMPOST DE ALPERUJO EN LA INDUCCIÓN DE RESISTENCIA
SISTÉMICA EN PLANTAS DE *Solanum lycopersicum* FRENTE A
*Botrytis cinerea***

Fernández, E.¹, Segarra, G.¹, Avilés, M.², Trillas, M. I.¹

¹Dpt. de Biología Vegetal, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona
Avda. Diagonal 643. 08028 Barcelona. E-mail:
efernago13@alumnes.ub.edu.

²Dpto. Ciencias Agroforestales, E.T.S.I.A. Universidad de Sevilla. Ctra.
Utrera km 1, 41013, Sevilla.

El alperujo es un residuo de la industria agroalimentaria del aceite de oliva que debidamente compostado se puede utilizar en agricultura, como fertilizante, sustrato o enmienda y como alternativa o reducción del uso de fitosanitarios químicos (supresividad natural). Este último aspecto ha sido muy estudiado frente a enfermedades edáficas, menos en enfermedades foliares y aún menos en los fenómenos de inducción en planta de resistencia sistémica. Los estudios de resistencia sistémica se llevan a cabo por separación espacial o temporal de los microorganismos beneficiosos (presentes en el compost) y los patógenos. Los objetivos de este estudio fueron i) caracterizar los composts de alperujo (cuatro industriales y uno procedente de la Universidad de Sevilla, US) y ii) evaluar la inducción de resistencia sistémica de los compost utilizados como sustrato de cultivo en plantas de tomate (*Solanum lycopersicum*), frente a la enfermedad foliar producida por *Botrytis cinerea*. Como controles se utilizaron la perlita (sustrato inerte) y la perlita inoculada con el agente de control biológico *Trichoderma asperellum*, cepa T34. El pH, la conductividad eléctrica y los estudios de germinación y crecimiento mostraron la necesidad de formulación (dilución con perlita) de los cuatro composts industriales. De entre los composts se seleccionaron el compost 1 (compost: perlita, 2:1, v/v) y el compost US, en función de sus buenas propiedades para la germinación y el crecimiento. La enfermedad se evaluó por incidencia (escala 0-1) y por severidad (escala 0-4). En los resultados por severidad se observaron diferencias significativas entre todos los tratamientos y todos los días de evaluación. La severidad más elevada se observó en el tratamiento perlita, seguido de perlita + T34, de compost US y del compost 1, respectivamente. Los resultados por incidencia siguieron un patrón muy parecido al anterior. En conclusión el compost 1 formulado con perlita, el compost US y la perlita + T34 producen un efecto supresor de la enfermedad producida por *B. cinerea* en hojas de tomate debido a la inducción de resistencia sistémica.

Este trabajo ha sido financiado por el Proyecto AGR2010-21982, cofinanciado por fondos FEDER de la UE.

ANÁLISIS GENÉTICO DEL QUIMIOTACTISMO EN EL AGENTE DE BIOCONTROL *Rhizobium rhizogenes* K84

Peñalver, R.¹, Bernet, G.²

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

²Biotechvana, Parque Tecnológico de Valencia, Paterna, Valencia

Los tumores de plantas causados por *Agrobacterium* spp. pueden ser controlados mediante la aplicación preventiva en las raíces del agente de biocontrol *R. rhizogenes* K84. A parte de su eficacia como agente de biocontrol en diferentes huéspedes, la cepa K84 coloniza y sobrevive eficazmente en las raíces. En este estudio hemos analizado *in silico* la capacidad de quimiotactismo en la cepa K84, como un factor clave para colonizar y vivir en la rizosfera. El genoma de *R. rhizogenes* K84 contiene los genes correspondientes del núcleo de la cascada de regulación del quimiotactismo (genes *che*). La presencia de más de un homólogo para algunos de estos genes, concretamente tres proteínas CheR, cuatro CheW y dos CheY, indica la posibilidad de más de una ruta de señalización. Los genes cromosómicos *che* muestran una alta similitud con los ortólogos de la especie filogenéticamente más relacionada *R. leguminosarum*. El genoma de K84 contiene 21 *methyl-accepting quimiotaxis proteins* o MCPs. Esta capacidad de quimiotactismo está distribuida por igual entre el cromosoma (10 MCPs) y el megareplicón (10 MCPs). Sólo una MCP se encuentra codificada en plásmidos. El 71% de las MCPs muestran la topología más común la. Sin embargo, la cepa K84 posee cuatro MCPs con la topología menos común IVa, que además contienen, en la región de unión al ligando, los dominios receptores PAS o Sensor_globin and Hemo, los cuales podrían estar implicados en aerotaxis (oxígeno) y/o fototaxis (luz). Curiosamente, dos proteínas reguladoras CheR de la cascada de señalización contienen también este tipo de dominios, por lo que podrían estar implicadas en la regulación de dichos tactismos. Se han encontrado también posibles receptores de etileno y de intermediarios del ciclo de los ácidos tricarbónicos, quimiotactismos que podrían ser también importantes para la colonización de las raíces. Los genes de las MCPs de la cepa K84 muestran una alta similitud con ortólogos de la familia *Rhizobiaceae*. Tres MCPs de K84 no muestran una similitud significativa en las bases de datos, por lo que hasta la fecha, parecen exclusivas de esta cepa. El alto número de genes *che* y MCPs en el genoma de la cepa K84, podría reflejar la compleja capacidad de navegación de este agente rizosférico de biocontrol hacia exudados de las raíces de gran número de especies vegetales.

Este trabajo ha sido financiado por el proyecto RTA10-96 cofinanciado por el fondo social europeo.

PAN-54

FORMULACIÓN DEL AGENTE DE BIOCONTROL *Bacillus subtilis* CPA-8 POR ATOMIZACIÓN

Yáñez-Mendizábal, V.¹, Viñas, I.², Usall, J.¹, Torres, R.¹, Abadías, M.¹, Solsona, C.¹, Teixidó, N.¹

¹IRTA Postcollita-XaRTA, Av. Rovira Roure 191, 25198 Lleida. neus.teixido@irta.cat

²Universitat de Lleida, Av Rovira Roure 191, 25198 Lleida

Uno de los obstáculos para la comercialización de agentes de biocontrol (ABCs) es conseguir un producto formulado estable, efectivo y fácilmente manipulable. La atomización es un método económico que permite conseguir grandes cantidades de producto, pero tiene como inconveniente las altas temperaturas que utiliza. El hecho de que *Bacillus subtilis* sea capaz de producir endosporas con alta resistencia a la temperatura lo convierte en un microorganismo adecuado para ser atomizado con posibilidades de éxito.

El objetivo de este trabajo fue preparar formulaciones comercialmente aceptables de *B. subtilis* CPA-8 mediante atomización que mantengan una buena vida útil y eficacia de control de la podredumbre marrón del melocotón causada por *Monilinia* spp. Cultivos de la cepa CPA-8 de 24 y 72 horas fueron atomizados usando leche desnatada al 10%, leche desnatada al 10%-MgSO₄ 10%, MgSO₄ al 10% y MgSO₄ al 20% como aditivos-protectores. En los formulados de *B. subtilis* CPA-8 obtenidos se evaluó la recuperación de polvo, la humedad relativa y la supervivencia de la bacteria. Todos los aditivos-protectores proveyeron una buena recuperación de polvo (28-38%) y contenido de humedad (6-13%). Las formulaciones provenientes de cultivos de 72 h de edad mostraron una mayor supervivencia (28-32%) y concentraciones finales alrededor de $1.6-3.3 \times 10^9$ UFC g⁻¹ comparadas con las viabilidades bajas de los atomizados de 24 h, inferiores al 1%. Diferentes rehidratantes como el agua o tampón fosfato proporcionaron una buena recuperación de células de la cepa CPA-8 en las formulaciones, iguales a las obtenidas en leche desnatada o sacarosa al 10%. Las formulaciones en MgSO₄ 10 y 20% demostraron una actividad antifúngica *in vitro* alta contra *Monilinia fructicola* con reducciones de la germinación de conidias alrededor del 5%. Las formulaciones almacenadas a 5 y 25 °C demostraron que la viabilidad se mantenía o disminuía ligeramente entorno a 0.2-0.3-log durante 6 meses de almacenamiento. Además, estas formulaciones demostraron ser eficaces para controlar la podredumbre marrón en nectarinas y melocotones con reducciones de la enfermedad entre el 90 y 100%. Los resultados demostraron que la atomización podría ser un método de secado adecuado para obtener formulaciones estables y eficaces de *B. subtilis* CPA-8.

Este trabajo ha sido financiado por el proyecto Europeo REDBIO, el Proyecto Ecológico de la UdL y por el MAEC-AECID (Beca Pre-doctoral V. Yáñez)

**TOLERANCIA A *Rosellinia necatrix* DE PLANTAS DE FRESA
TRANSFORMADAS CON EL GEN *ATNPR1***

Ruano-Rosa, D.¹, Barceló Muñoz, M.², Palomo Ríos, E.³, Blanco Portales, R.⁴, Muñoz Blanco, J.⁴, Mercado, J. A.³, Pliego- Alfaro, F.³, López-Herrera, C. J.¹

¹*Instituto de Agricultura Sostenible, CSIC. Alameda del Obispo s/n 14004. Córdoba, España. E-mail: lherrera@ias.csic.es*

²*IFAPA- Churriana. Málaga. Cortijo de la Cruz s/n. 29140 Churriana. Málaga*

³*Instituto de Hortofruticultura Subtropical y Mediterránea "La Mayora" Universidad de Málaga-Consejo Superior de Investigaciones Científicas (IHSM-UMA-CSIC), Dept. Biología Vegetal, Campus Teatinos, 29071 Málaga*

⁴*Dpto. Bioquímica y Biología Molecular, Campus de Rabanales, Universidad de Córdoba, Córdoba*

En este trabajo hemos evaluado la tolerancia a *R. necatrix* de 15 líneas transgénicas de fresa transformadas mediante *Agrobacterium tumefaciens* AGL1 portando el plásmido PK7WG2NPR1, que contenía el gen *AtNPR1* y el marcador de la neomicina fosfotransferasa (*nptII*). Se utilizaron plantas de 6 meses de edad que fueron inoculadas a la dosis 1 g/L de trigo colonizado por el patógeno ajustada en ensayos anteriores y aplicado al sustrato de cada maceta. Las plantas fueron incubadas en cámara de ambiente controlado a 22-24 C, fotoperiodo de 12 horas y 120 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de irradiancia. Se realizaron lecturas continuas de síntomas según una escala previamente establecida de 1= planta sana, 5= planta muerta, hasta que todas las plantas testigo habían muerto y se calculó el área bajo la curva del progreso epidémico de la enfermedad estandarizado (ABCPES)

Tres de las líneas presentaron un ABCPES significativamente diferente del control inoculado (todas las plantas muertas al final del experimento) con porcentaje de plantas vivas del orden del 40-80 %, y con índices de severidad de 2-4. Otras nueve líneas presentaron un comportamiento similar al control inoculado, mientras que las tres restantes mostraron una mayor incidencia de la enfermedad que éste. En la actualidad se continúa la evaluación de otras líneas transgénicas y posteriormente se realizará la caracterización molecular y agronómica de aquéllas que muestren mayor tolerancia a *R. necatrix*

Esta investigación ha sido financiada por los proyectos AGL2008-05453-CO2 -01 y 02; y ayudas a los Grupos PAIDI AGR-226 y AGR-235, cofinanciados con fondos FEDER (EU).

EFFECTO SOBRE *Rosellinia necatrix* DE METABOLITOS SECUNDARIOS PRODUCIDOS POR *Trichoderma* spp.

Arjona Girona, I.¹, Ruano-Rosa, D.¹, Vinale, F.², López Herrera, C.J.¹

¹*Instituto de Agricultura Sostenible, CSIC. Alameda del Obispo s/n 14004. Córdoba, España. E-mail: lherrera@ias.csic.es*

²*Dipartimento di Arboricoltura Botanica e Patologia Vegetale, Università degli Studi di Napoli "Federico II", Portici, 80055 Napoli, Italia*

A partir de filtrados de *Trichoderma* se obtuvo por extracción con acetato de etilo distintos posibles metabolitos secundarios producidos por el hongo. La purificación posterior, utilizando técnicas de cromatografías líquidas de, vacío y presión atmosférica, y de capa fina (TLC), con soporte de gel de sílice; y la caracterización química mediante resonancia magnética nuclear (NMR), y espectrofotometría de masas, identificaron cinco compuestos pertenecientes al grupo lactonas: 6PP (6 pentyl- α -pyrone), Harzianolide (4-Hexa-2,4-dienyl-3-(2-hydroxy-propyl)-5H-furan-2-one)), T39-Butenolide, Dihidroharzianolide y Cerinolactona (3-hydroxy-5-(6-isopropyl-3-methylene-3,4,4a,5,6,7,8,8a-octahydronaphthalen -2-yl) dihydrofuran-2-one).

Se ensayaron *in vitro* la acción de estas lactonas a concentraciones de 0, 1, 5, 10 y 20 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ disueltas en acetato de etilo, sobre 9 diferentes aislados *R. necatrix*, agente causal de la podredumbre blanca de este cultivo y representantes de distintos grupos de virulencia. Los metabolitos 6PP, Harzianolide y Cerinolactona presentaron acción antifúngica a dosis de 10 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ sobre todos los aislados ensayados para cada metabolito. 6PP fue el metabolito más efectivo con porcentajes de inhibición del 40 y 100% a dosis de 10 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ y 20 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, respectivamente. En menor grado, Harzianolide con un 5 al 34% a dosis de 10 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$; y Cerinolactona, una nueva lactona recientemente descubierta por nuestro equipo, con 2 al 21% a dosis de 10 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. Los metabolitos Dihidroharzianolide y T-39 Butenolide no resultaron buenos candidatos para ser utilizados como productos antifungicos, puesto que solo presentaron inhibición sobre algunos de los aislados estudiados. Paralelamente se comprobó que el disolvente utilizado, acetato de etilo, no afectó al crecimiento de *R. necatrix*.

Se puede concluir que la inhibición de *R. necatrix* por estos aislados de *Trichoderma* puede ser debida a la antibiosis de sus metabolitos, 6PP procedente de *T. atroviride*; Harzianolide de *T. harzianum* y *cerinum*; y Cerinolactona de *T. cerinum*.

Actualmente se están ensayando *in vivo* estos metabolitos, sobre plantas de aguacate inoculadas con el patógeno, para valorar su efecto de control de la enfermedad.

Este trabajo ha sido financiado por el proyecto AGL2008-05453-CO2-02/AGR y ayudas al Grupo PAIDI AGR-235, cofinanciados con fondos FEDER (EU).

EFFECTO DE MÉTODOS DE RIEGO Y DESHOJE SOBRE LA SEVERIDAD DE SIGATOKA NEGRA (*Mycosphaerella fijiensis*) DEL BANANO EN EL TRÓPICO SECO DE MÉXICO

Orozco-Santos, M.¹, Manzo-Sánchez, G.², García-Mariscal, K.¹, Velázquez-Monreal, J. J.¹, Robles-González, M. M.¹, Nieto-Ángel, D.³

¹*Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Campo Experimental Tecomán. Tecomán, Colima, México 28100. E-mail: orozco.mario@inifap.gob.mx*

²*Universidad de Colima, FCBA. Tecomán, Colima, México 28100.*

³*Colegio de Postgraduados. Instituto de Fitosanidad. Texcoco, México 56230*

La sigatoka negra (*Mycosphaerella fijiensis* Morelet) es la enfermedad más importante que afecta los bananos comerciales en la región trópico seco de México (estados de Colima, Michoacán, Jalisco y Nayarit). Actualmente, su combate depende principalmente de la aplicación de fungicidas. Las prácticas culturales ayudan a reducir la fuente de inóculo del patógeno, evitan un ambiente propicio para la enfermedad y proporcionan condiciones favorables para el cultivo. Los métodos de riego tienen una marcada influencia en el desarrollo de la sigatoka negra y la principal práctica para reducir la fuente de inóculo es la remoción de hojas afectadas. Este estudio se realizó para evaluar métodos de riego y manejo de hojarasca (fuente de inóculo) sobre la severidad de la enfermedad en banano Gran Enano (*Musa AAA*). Se evaluaron cuatro métodos de riego: subfoliar, microaspersión, goteo y rodado o inundación; así como cuatro tipos de manejo de hojas enfermas: 1) hojas colocadas sobre el suelo y dispersas al azar, 2) hojas colocadas sobre el suelo y acomodadas en hileras, 3) hojas colocadas sobre el suelo en minicomposteo (formando pequeños montones) y 4) hojas colocadas sobre el suelo en hileras y aplicadas mensualmente con urea al 10%. La severidad de la enfermedad fue evaluada semanalmente con la escala de Stover modificada. Los sistemas de riego subfoliar registraron el mayor daño de la enfermedad [Promedio ponderado de infección (PPI) = 2.462 a 2.800] y el menor número de hojas funcionales al momento de la floración (5.6 a 5.9 hojas) y cosecha (1.0 a 1.9 hojas). El sistema de microaspersión registró una severidad de 2.432, un promedio de 9.2 hojas a la floración y 5.0 hojas a la cosecha. Los métodos de riego por goteo e inundación presentaron el menor daño de sigatoka negra (PPI = 1.114 y 1.500) y mayor proporción de follaje sano a floración (11.1 y 10.5 hojas) y cosecha (8.0 y 7.8 hojas). Por otra parte, todos los tratamientos con manejo de hojarasca (en hileras o minicomposteo) y tratadas con urea mostraron menor severidad (PPI de 0.150 a 0.450) con relación al testigo (PPI de 0.40 a 0.72). La aplicación de urea redujo la biomasa y aceleró la descomposición de las hojas. Asimismo, abatió hasta en un 43% la producción de pseudotecios y 90% la expulsión de ascoporas en comparación al testigo.

Parte de este trabajo fue financiado por FORDECYT-CONACYT, contrato No. 116886.

ESTUDIO DE TRAZABILIDAD DEL AGENTE DE BIOCONTROL *Pantoea agglomerans* CPA-2 APLICADO EN PRECOSECHA DE NARANJA EMPLEANDO MARCADORES MOLECULARES

Soto-Muñoz, L.¹, Teixidó, N.², Lamarca, N.², Viñas, I.¹, Yáñez-Mendizabal, V.², Torres, R.²

¹Universidad de Lleida. Postcollita-XaRTA, Av. Rovira Roure, 191, 25198 Lleida.

²IRTA. Postcollita-XaRTA, Av. Rovira Roure, 191, 25198 Lleida. E-mail: rosario.torres@irta.cat

El control biológico supone una alternativa adecuada al uso de fungicidas químicos de síntesis para el control de patógenos. *Pantoea agglomerans* CPA-2, es un agente de biocontrol eficaz contra enfermedades de postcosecha en frutas de pepita y cítricos. Para implementar su uso como estrategia de control práctico es esencial estudiar la dispersión y persistencia en su aplicación en campo. Para esto, es necesario contar con un método de detección rápido y fiable del agente de biocontrol. En este estudio, el objetivo fue evaluar la persistencia y dispersión de células formuladas de CPA-2 en su aplicación en campo. Para ello, árboles de naranjos cv. Valencia Late fueron tratados por pulverización con el formulado de CPA-2 en las condiciones habituales utilizadas en campo. Para estudiar la trazabilidad y dispersión, se evaluaron los árboles tratados y los alrededores de la zona de aplicación, muestreando superficies cercanas o que estuvieran en contacto con el agente de biocontrol, tales como tierra, hojas y hierba, los operarios y utensilios de aplicación a diferentes tiempos del tratamiento. Todo ello corroboró la presencia y/o ausencia de CPA-2 por PCR a tiempo final utilizando marcadores específicos para CPA-2. Por otro lado, se evaluó la dinámica poblacional de CPA-2 en la superficie de la naranja por métodos microbiológicos y por PCR a tiempo real (qPCR). Para ello, se desarrollaron un par de cebadores y una sonda TaqMan[®]MGB a partir de una secuencia conocida de CPA-2. Los resultados muestran una baja dispersión del agente de biocontrol en su entorno de aplicación. Y nos dan idea de la persistencia de CPA-2, en las diferentes zonas de muestreo. Además puede concluirse que PCR a tiempo real podría ser una herramienta prometedora para cuantificar de forma rápida la población viable de CPA-2 en experimentos de media o gran escala.

(Este trabajo ha sido financiado por el proyecto RTA2009-0053-00-00 INIA y con la beca pre-doctoral CONACYT (Soto-Muñoz, L.)

**EVALUACIÓN DE ENMIENDAS ORGÁNICAS Y MICROORGANISMOS
PARA EL CONTROL DE *Verticillium dahliae***

Varo, A., Raya, M.C., Roca, L. F., Trapero, A

Dpto. Agronomía, Patología Agroforestal, Universidad de Córdoba. Campus de Rabanales, Edificio C-4, 14071, Córdoba. E-mail: ag3rocal@uco.es

Uno de los retos más importantes de la olivicultura actual es el control de la Verticilosis causada por el hongo *Verticillium dahliae* Kleb. Este hongo tiene la capacidad de formar estructuras de resistencia (microesclerocios) que permanecen viables en el suelo durante largo tiempo, lo que ha contribuido al notable incremento de esta enfermedad en los últimos años. La falta de productos químicos eficaces, tanto para el tratamiento del suelo como de las plantas afectadas, motiva la búsqueda de métodos alternativos de control. El objetivo del presente trabajo fue evaluar distintas enmiendas orgánicas de origen vegetal (compost de alpeorujo y otros restos vegetales), animal (estiércoles y purines) y residuos industriales, así como, varias suspensiones de microorganismos (mezcla de diversos hongos y bacterias) y extractos de todos ellos, para el control de *V. dahliae*.

Para ello, se realizaron dos experimentos *in vitro*. En el primero se evaluó el efecto biofumigante sobre el crecimiento micelial utilizando placas de PDA con crecimiento activo de 4 aislados de *V. dahliae*. Se midió el crecimiento micelial de las colonias durante 10 días. En el segundo experimento se evaluó el efecto sobre los microesclerocios de un suelo naturalmente infestado con *V. dahliae* (≈55 microesclerocios/g suelo). Los productos sólidos se mezclaron con el suelo en proporción 1:1 y posteriormente, se añadió agua hasta que el suelo quedó a capacidad de campo. Los productos líquidos se añadieron directamente al suelo. Los recipientes se incubaron a 24 °C durante 48 h. Posteriormente, se analizó el nivel de inóculo en suelo mediante el método de tamizado húmedo en medio APSM.

La gallinaza y una de las mezclas de microorganismos redujeron el crecimiento micelial de todos los aislados en un 100% y 90%, respectivamente. Estos mismos productos, así como un residuo de industrias lácteas, también redujeron la viabilidad de los microesclerocios del suelo en un 100%, mientras que el compost de orujo de vid lo hizo en un 90% y los compost de alperujo y corcho entre el 40 y 80%. La reducción de la dosis de estos productos hasta el 10% mostró menor eficacia sobre los microesclerocios (siendo mayor en la gallinaza), a pesar de aumentar el tiempo de incubación hasta 8, 16 y 21 días.

Actualmente, dosis seleccionadas de estos productos están siendo evaluadas en aplicaciones a macetas con plántones de olivo del cultivar susceptible Picual creciendo en un suelo infestado por *V. dahliae*.

**EVALUACIÓN DEL EFECTO CURATIVO E INDUCTOR DE RESISTENCIA
DEL COBRE PARA EL CONTROL DEL REPILO DEL OLIVO**

Roca, L.F., Trapero, A.

Dpto. Agronomía (Patología Agroforestal), Universidad de Córdoba. Campus de Rabanales, Edificio C-4, 14071, Córdoba. E-mail: ag3rocal@uco.es

Los fungicidas cúpricos son los productos más utilizados en el control de las enfermedades foliares del olivo, entre las que destaca por su importancia el Repilo causado por el hongo *Fusicladium oleagineum*. Los productos cúpricos son eminentemente protectores, inhibiendo la germinación de las esporas causantes de las infecciones. No obstante, se ha comprobado que algunas sales de cobre son capaces de activar la transcripción de genes relacionados con la defensa de la planta frente a la infección por *F. oleagineum*. Por ello, se planteó el presente trabajo cuyo objetivo fue evaluar el efecto curativo e inductor de resistencia de dos sales de cobre en plantones de olivo inoculados artificialmente, en comparación con el efecto preventivo de las mismas. Se emplearon un oxiclورو de cobre comercial y sulfato de cobre puro, ambos a una dosis de 2000 mg de cobre por litro. Para evaluar el efecto preventivo y curativo, los productos se aplicaron 4 días antes y 4, 7 y 12 días después de la inoculación. Para evaluar el efecto inductor de resistencia los productos se aplicaron en la mitad inferior de los plantones, procediendo posteriormente a la inoculación completa de éstos, evaluándose la enfermedad en las hojas que no recibieron tratamiento fungicida. Los momentos de aplicación fueron los mismos que en el caso anterior. La inoculación se llevó a cabo mediante pulverización de los plantones con una suspensión conidial del patógeno conteniendo $1,5 \times 10^5$ conidios/ml. Las plantas inoculadas se mantuvieron en cámara de ambiente controlado al 100% de humedad relativa y a una temperatura media de 15°C durante 48 h. Posteriormente fueron trasladadas a un umbráculo hasta la aparición de los síntomas. La evaluación de la enfermedad se realizó atendiendo a la incidencia y severidad de la misma, a partir de las cuales se calculó un índice de enfermedad porcentual. Ambos productos mostraron un notable efecto protector, reduciendo el Índice de enfermedad respecto al testigo en un 99% (sulfato de cobre) y 82% (oxiclورو de cobre). También se observó un efecto curativo de dichos productos. El oxiclورو de cobre redujo el Índice de enfermedad en un 41% en los tratamientos realizados 4 y 7 días después de la inoculación. El sulfato de cobre logró reducir el Índice de enfermedad en más de un 85% en los tratamientos realizados 4 y 7 días después de la inoculación y en un 62% cuando se aplicó 12 días después de ésta. No se observó efecto inductor de resistencia para ninguno de los dos productos evaluados.

ACTIVIDAD *IN VITRO* DE SAPONINAS EXTRAÍDAS DE *Asparagus* spp. FRENTE A *Fusarium oxysporum* f. sp. *asparagi*

Molinero-Ruíz, L.¹, González-Domínguez, E.², Guillén-Bejarano, R.³, Basallote-Ureba, M. J.²

¹*Departamento de Protección de Cultivos, IAS, CSIC, 14080 Córdoba*

²*Área de Protección de Cultivos, IFAPA Las Torres-Tomejil, Apdo. Oficial Alcalá del Río, Sevilla; e-mail:mjbasallote@juntadeandalucia.es*

³*Departamento de Biotecnología de Alimentos, IG, CSIC, 41012 Sevilla*

La Fusariosis, asociada principalmente con *Fusarium oxysporum* f.sp. *asparagi* (Foa), es una de las enfermedades más importantes del cultivo del espárrago. Las medidas disponibles para su control son escasas y poco eficaces. Saponinas extraídas de turiones de espárrago han mostrado actividad antifúngica frente a fitopatógenos de suelo. El objetivo de este trabajo ha sido determinar el efecto de extractos de saponinas (ES) procedentes de espárragos trigueros cultivados ('Morado de Huétor') y silvestres ('Castilblanco') sobre el crecimiento miceliar de Foa. Las saponinas fueron extraídas con etanol del 80% de turiones de ambos tipos de espárrago. Los extractos se utilizaron para enmendar medio de cultivo APD en el que se sembró un aislado de Foa patógeno de espárrago. Los tratamientos incluyeron un testigo no enmendado, un tratamiento fungicida (control positivo) y diferentes dosis (mg/ml) de los ES investigados. Se dispusieron 5 placas/tratamiento. Los experimentos se llevaron a cabo en condiciones controladas favorables para el desarrollo de Foa. Con los ES procedentes de 'Morado de Huétor', se obtuvieron inhibiciones significativas (> 45%) del crecimiento miceliar de Foa a partir de 0,96 mg/ml, con valores máximos a dosis de 1.44 mg/ml o superiores. En el caso de los ES procedentes de espárrago de 'Castilblanco', el crecimiento miceliar fue significativamente reducido con 0,54 mg/ml, siendo esta reducción máxima a la dosis de 0.72 mg/ml (70%). Nuestros resultados muestran la capacidad inhibidora *in vitro* de los ES investigados frente Foa. Sin embargo, ninguna de las dosis evaluadas tuvo efecto sobre la esporulación del patógeno. La actividad antifúngica de los ES se redujo tras varios meses de almacenamiento a 4°C. En futuras investigaciones estudiaremos la efectividad de estos extractos y/o sus fracciones, frente a otras especies y/o formas especiales de *Fusarium*, así como sus efectos sobre las plantas.

Financiado por el proyecto P07-AGR-02364 (CICE, Junta de Andalucía).

BIOFUMIGACIÓN DE SUELO MODERADAMENTE INFESTADO POR *Fusarium oxysporum* f.sp. *dianthi*, PARA EL CULTIVO DEL CLAVEL

Vela, M.D.¹, Melero-Vara, J.M.², López-Herrera, C.J.², Talavera, M.³, Basallote-Ureba, M.J.⁴

¹IFAPA Centro Chipiona. Camino de Esparragosa s/n. 11550 Chipiona.

E-mail: mdolores.vela@juntadeandalucia.es

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

³IFAPA Centro Camino del Purchil, Apdo. 2027, 18004 Granada.

⁴IFAPA Centro Las Torres-Tomejil, Apdo. Oficial, 41200 Alcalá del Río.

En un invernadero de plástico se realizaron dos experimentos: 1: (2006-08) y 2: (2008-09), previa infestación artificial con *F. oxysporum* f.sp. *dianthi*, para evaluar los efectos de tratamientos del suelo con enmiendas orgánicas (EO), acompañados o no de cubierta del suelo húmedo con plástico VIF (2-4 semanas en mayo), frente a los testigos sin EO, con o sin VIF. La gallinaza fresca de pollo (G) se aplicó a 5 kg m⁻² en ambos experimentos, y el pellet de gallinaza (PG) a 1,5 y 3 kg m⁻², para los experimentos 1 y 2 respectivamente. Posteriormente, en julio de 2006 y 2008 se plantó clavel 'Master'. En el experimento 1 se redujeron significativamente las epidemias sólo en G+VIF (14% de plantas muertas), y con valores intermedios (48%) para PG+VIF, resultando en aumentos del rendimiento del 48 y 13%, respectivamente. En el experimento 2, se repitió la tendencia, con un drástico control de la enfermedad en G+VIF (2,3% de plantas muertas) y un valor intermedio para P+VIF (43%), y los consiguientes aumentos en los rendimientos del 88 y 52 %, respectivamente. Esto sugiere aumentar la dosis de PG y la necesidad de la cubierta plástica para retener los gases tóxicos generados por las EO.

En un tercer experimento (2010-12) se repitieron en las mismas parcelas los tratamientos G y PG, pero utilizando respectivamente 2,5 y 1,5 kg m⁻², y polietileno (PE) en lugar de VIF, con un testigo sin EO ni PE. Además, se evaluaron los aportes al suelo de Pellet de brassica (PB) (0,3 kg m⁻²), y los compost de alpeorujo (CA) (2,5 kg m⁻²) y de orujo de vid (COV) (1,5 kg m⁻²), todos ellos con cubierta de PE. Los tratamientos se aplicaron a final de junio, y la plantación de clavel 'Master' se realizó a mediados de agosto. Todos los tratamientos resultaron muy efectivos con una reducción de más del 98% en los niveles de enfermedad y alcanzando producciones de 4.1 a 4.6 veces la del testigo no tratado.

Financiado por los Proyectos INIA RTA 2006-00011, y P06-AGR-02313 de la J.A., el Convenio INIA-Junta de Andalucía CC09-074, e incentivos al grupo PAIDI AGR217 y fondos FEDER procedentes de la UE.

CARACTERIZACION DE AISLADOS DE *Fusarium* PATÓGENOS DE ESPÁRRAGO Y MANEJO DE LA PODREDUMBRE DE RAICES Y CUELLO CON ENMIENDAS ORGANICAS DE SUELO

Borrego-Benjumea, A.¹, Basallote-Ureba, M.J.², Melero-Vara, J. M.¹, Pervaiz Abbasi³.

¹IAS, CSIC, Apdo. 4084, 14080 Córdoba. E-mail: aborrebe@ias.csic.es

²IFAPA Las Torres-Tomejil, Apdo. Oficial, 41200 Alcalá del Río (Sevilla).

³SCPFRC, AAFC, 1391 Sandford Street, London, ON, N5V 4T (Canadá).

La Podredumbre de raíces y cuello (PRC) en espárrago tiene una etiología compleja, con varios *Fusarium* spp. patógenos de suelo asociados. Para identificar estas especies, muestreos en plantaciones de espárrago en Ontario (Canadá) permitieron la recuperar 23 aislados, morfológicamente identificados como *F. oxysporum* y *F. solani*. Para confirmar su identidad, se realizaron análisis de PCR con cebadores especies-específicos y también PCR con inter-secuencias simples repetidas (ISSR). *F. oxysporum* se aisló con mayor frecuencia (82,6%) que *F. solani*. La evaluación de patogenicidad *in vitro* mostró un amplio rango de virulencia: 7,5-92,5%. Tres aislados de *F. oxysporum* (Fo3, Fo4 y Fo5) y uno de *F. solani* (Fs12) causaron síntomas graves en espárrago. Se evaluó el efecto de enmiendas orgánicas (EO) residuales de las industrias agrícola y pesquera (pellet de gallinaza (PE) al 0,5 y el 1%, compost de alpeorujo (CA) al 3 y 6%, y emulsión de pescado (EP) al 0,5%), sobre la supresión de PRC en suelos infestados con Fo5, usando el cv. susceptible Mary Washington. Hubo interacción significativa entre tratamientos, en severidad y peso de la planta. En el control infestado hubo mayor severidad y menor peso que en las EO. Suelos con PE-1%, CA-6% y EP-0,5%, redujeron el efecto de Fo5 en la severidad de raíces en 58, 48 y 44%, respectivamente, mientras que en el control infestado la severidad fue del 66%. El peso fresco de la planta en suelos enmendados con PE-1% y CA-6% fue 2,6 y 1,6 veces mayor que en el control infestado. Por el método de las UFC, se cuantificaron poblaciones de Fo5 y de bacterias totales tras 1, 3, 7 y 14 días de incubación del suelo. En suelos con EO, disminuyó gradualmente la población de Fo5 mientras que aumentaba la de bacterias, lo que fue especialmente notable con PE-1%. El pH del suelo fue constante (7,1) durante el período de incubación en suelo infestado sin enmendar, mientras que, con el tratamiento PE-1%, el pH aumentó desde el día 1 hasta el 14 (alcanzando un 7,6). En resumen, PE-1% promueve la supresividad de PRC y el crecimiento de la planta, posiblemente al disminuir la población de patógenos y mejorar la actividad microbiana en el suelo.

Financiado por los Proyectos INIA RTA 2006-00045, y P06-AGR-02313, e incentivos al grupo PAIDI AGR217, cofinanciados con fondos FEDER (UE).

PAN-64

EFFECTO DE TRATAMIENTOS DE TERMOTERAPIA EN LA ERRADICACIÓN DE *Verticillium dahliae* EN PLANTONES DE OLIVO

Morello, P¹., Codes, M¹., Trapero, A¹., Barranco, D¹., Rayo, L¹., Moral, J².

¹Dpto. Agronomía, Universidad de Córdoba. Campus de Rabanales, Edif. Celestino Mutis, 14071 Córdoba.

²Dpto. Mejora Vegetal, Instituto de Agricultura Sostenible (IAS)-CSIC, 14080 Córdoba. E-mail: jmoral@ias.csic.es

La Verticilosis causada por *Verticillium dahliae*, es la enfermedad más grave del olivo. La prevalencia e incidencia de esta enfermedad ha aumentado sustancialmente debido, entre otras causas, a la utilización de material de propagación infectado. El objetivo del presente trabajo es desarrollar un método efectivo de termoterapia para la erradicación de *V. dahliae* en plantones de olivo.

Inicialmente se estudió el efecto combinado temperatura-tiempo en el desarrollo micelial del patógeno. Para ello, cultivos puros en patata dextrosa agar (PDA) de ambos patotipos del patógeno (defoliante y no defoliante) se incubaron a temperaturas comprendidas entre 40 y 55°C y tiempos de exposición entre 15 min y 24 h. De forma similar, ramitas infectadas y estaquillas de propagación sanas se sumergieron en un baño con agua a temperaturas comprendidas entre 40 y 60°C durante 1, 2 y 4 h. Por último, plantones sanos (control) e inoculados del cv. Picual (susceptible) fueron expuestos a temperaturas comprendidas entre 40 y 52°C durante periodos de 3 a 24 h en condiciones de saturación de humedad. En todos los casos se diagnosticó la presencia y viabilidad del patógeno en el material vegetal mediante aislamiento en medio de cultivo y PCR a tiempo real.

Temperaturas $\geq 40^\circ\text{C}$ aplicadas durante al menos 8 h resultaron fungicidas para el micelio del patógeno. En las ramitas infectadas, temperaturas $\geq 42^\circ\text{C}$ durante al menos 2 h permitieron la erradicación del patógeno del interior de éstas aunque afectaron marcadamente a su capacidad de propagación (porcentaje de enraizamiento). En cambio, los plantones enraizados del cv. Picual toleraron tratamientos térmicos superiores a las estaquillas no enraizadas y a los tolerados por el patógeno en el interior del material vegetal infectado. Así, tratamientos $\geq 42^\circ\text{C}$ durante 6 h permitieron eliminar el patógeno de plantones artificialmente inoculados sin ver afectada su viabilidad.

Actualmente se está ajustando la temperatura-tiempo de exposición para el tratamiento de plantones inoculados utilizando diversos cultivares y estudiando la tolerancia térmica de los cultivares de mayor importancia viverística.

El método de saneamiento desarrollado está previsto que se incluya como de uso obligado en la introducción de material vegetal en la Colección de Olivo de la Universidad de Córdoba y en el Repositorio de Aislamiento de Variedades Comerciales de olivo de España, productor de material inicial en el programa de certificación varietal.

PAN-65

EVALUACIÓN DE FUNGICIDAS PARA EL CONTROL DE *Neofusicoccum mediterraneum*, AGENTE CAUSAL DEL CHANCRO DE RAMAS DEL OLIVO.

Pérez-Rodríguez, M., Palma. M. J., Roca, L.F., Moral, J., Trapero, A.

Dpto de Agronomía (Patología Agroforestal), Universidad de Córdoba, Campus Universitario Rabanales, Edificio Celestino Mutis, 14071, Córdoba, España. E-mail: trapero@uco.es

El Chancro de ramas del olivo causado por el hongo *Neofusicoccum mediterraneum* es una enfermedad emergente en el cv. Gordal sevillana. Los principales síntomas de esta enfermedad son la desecación y la muerte de ramillas asociadas a chancros deprimidos. El control de las enfermedades aéreas del olivo está basado principalmente en la utilización de fungicidas cúpricos aunque éstos se han mostrado poco efectivos en el control del Chancro. En el presente trabajo se realizaron experimentos para desarrollar un método eficaz de inoculación y evaluar distintos fungicidas para el control de *N. mediterraneum* en condiciones controladas, semicontroladas y de infección natural.

Las evaluaciones se realizaron en: ramas cortadas de 200 mm de longitud y 10 mm de diámetro, plantones de olivo de 1,50 m de altura y olivos de 50 años de edad del cv Gordal sevillana. En el ensayo de ramas cortadas se evaluaron dos métodos de inoculación (disco de micelio y suspensión de conidios) y el fungicida oxiclورو de cobre (Cuprosan) respecto al control. Los plantones fueron inoculados mediante un disco de micelio evaluando el efecto de los fungicidas: Cuprosan, Trifloxistrobin (Flint) y la mezcla de Boscalid + Piraclostrobin (Bellis). En el ensayo realizado en campo se evaluó la eficacia de los fungicidas Flint y Cuprosan respecto al control sin tratar. Los fungicidas se aplicaron en marzo, abril, mayo y octubre utilizando la dosis comercialmente recomendada de cada producto.

El disco de micelio permitió reproducir la enfermedad con un periodo de latencia mucho más corto que la suspensión de conidios. En el ensayo de ramas cortadas, el fungicida Cuprosan no permitió un adecuado control de la enfermedad. Cuando se inocularon plantones de olivo, la mezcla comercial Bellis fue la más eficaz, seguido de los fungicidas Flint y Cuprosan, que no se diferenciaron entre sí. En condiciones de infección natural en campo, ninguno de los fungicidas evaluados consiguió un control adecuado de la enfermedad. Este hecho, junto al momento de máximo desarrollo de la enfermedad (mayo-junio), sugiere que el periodo óptimo de aplicación de estos fungicidas sería a finales de invierno o principios de primavera cuando todavía no se han desarrollado síntomas nuevos de la enfermedad. Este trabajo aborda por primera vez el control de esta enfermedad emergente del olivar de mesa de Andalucía.

**RUTAS DE SEÑALIZACIÓN Y DETERMINANTES BACTERIANOS
IMPLICADOS EN LA RESISTENCIA SISTÉMICA INDUCIDA POR *Bacillus subtilis* UMAF6639**

García-Gutiérrez, L.¹, Zeriouh, H.¹, Romero, D.¹, Cubero, J.², de Vicente, A.¹, Pérez-García, A.¹.

¹*Instituto de Hortofruticultura Subtropical y Mediterránea "La Mayora" (IHSM-UMA-CSIC), Campus de Teatinos, 29071 Málaga. E-mail: lauragg@uma.es*

²*Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA), 28040 Madrid*

El cultivo de cucurbitáceas es de gran importancia en España, destacando el cultivo de melón. Una de las principales enfermedades que afectan a los cultivos de cucurbitáceas es el oídio causado por *Podosphaera fusca*. En trabajos anteriores, la cepa *Bacillus subtilis* UMAF6639, fue descrita como bacteria inductora de ISR en melón frente a oídio y *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans*. Además, UMAF6639 fue capaz de inducir ISR en *Arabidopsis thaliana* frente a otra especie de oídio *Golovinomyces orontii*. El objetivo de este trabajo fue identificar las rutas de señalización inducidas en *Arabidopsis* y melón por UMAF6639 frente a las especies de oídio mencionadas. Los estudios de expresión mediante RT-qPCR de varios genes de defensa marcadores como *LOX2* (lipoxigenasa), *PR-1* y *PR-9* (peroxidasa), sugieren que las defensas activadas por UMAF6639 en melón son dependientes de JA y SA. Además, las plantas tratadas con UMAF6639 presentan una mayor producción de especies reactivas de oxígeno y de reforzamientos de paredes celulares (depósitos de calosa y lignina) en hojas con respecto a plantas no inducidas. Estos resultados se completaron con ensayos de ISR en mutantes de *Arabidopsis* defectivos en la biosíntesis y percepción de las hormonas JA, ET y SA. Estos ensayos indicaron que UMAF6639 activaba defensas en *Arabidopsis* frente a oídio dependientes de ET y SA, pero a diferencia de melón no eran dependientes de JA. En este trabajo, también estudiamos el papel de los lipopéptidos como determinantes bacterianos implicados en la inducción de resistencia en melón. Para ello, utilizamos mutantes defectivos en la producción de los tres lipopéptidos producidos por UMAF6639: fengicina, iturina y surfactina, así como surfactina comercial. Los resultados indicaron que surfactina era un determinante principal en la inducción de resistencia en melón frente al oídio.

Este trabajo ha sido subvencionado por el Plan Nacional de I+D+I del Ministerio de Ciencia e Innovación (AGL2010-21848-CO2-01), cofinanciado con fondos FEDER (EU).

PAN-67

CONTROL DE LA PRODUCCIÓN DE INÓCULO DE *Stemphylium vesicarium* Y *Pleospora allii* EN PERAL MEDIANTE CEPAS SELECCIONADAS DE *Bacillus* sp.

Ruz, L., Puig, M., Agustí, E., Moragrega, C., Montesinos, E., Llorente, I.

Institut de Tecnologia Agroalimentària-CIDSAV, Universitat de Girona, C/ Maria Aurèlia Capmany 61, 17071, Girona. e-mail: isidre.llorente@udg.edu

La estemfiliosis o mancha marrón es una enfermedad fúngica de gran importancia económica en el cultivo del peral en diversas zonas frutícolas Europeas. El agente causante es el hongo deuteromiceto *Stemphylium vesicarium* y su teleomorfo corresponde a *Pleospora allii*. Actualmente el control de la enfermedad se basa en estrategias que integran medidas sanitarias y agentes de biocontrol (*Trichoderma* sp.) para la reducción del inóculo invernal, así como en la utilización del modelo BSPcast para guiar los tratamientos fungicidas durante el periodo vegetativo del peral. La producción de inóculo del patógeno, tanto en su forma sexual (*P. allii*) como asexual (*S. vesicarium*), se realiza mayoritariamente sobre restos vegetales (principalmente frutos u hojas infectados) en el suelo de las plantaciones y a lo largo del año. Con el objetivo de incrementar la eficacia de control de dicho inóculo en el presente trabajo se propone la utilización de nuevos agentes de biocontrol basados en bacterias Grampositivas que forman parte de la microbiota del suelo. Para ello, se han evaluado 27 cepas de una colección de *Bacillus* spp. de las que previamente se había determinado su potencial antifúngico y antibacteriano frente a diferentes bacterias y hongos fitopatógenos, así como la presencia de genes implicados en la síntesis de ciclolipopéptidos antimicrobianos. Dichas cepas se han evaluado *in vitro* y en hojas de peral frente a *S. vesicarium* y *P. allii*, determinando la capacidad de control del patógeno y su efecto en la producción de micelio, esporulación y producción de peritecas. Además se han estudiado diferentes estrategias de aplicación (preventivas o curativas). A partir de los resultados obtenidos se han seleccionado dos cepas de *Bacillus* que se han utilizado en ensayos en fincas experimentales de peral para determinar la capacidad de control del inóculo.

Financiado por el proyecto AGL2009-09829.

PAN-68

EL GENOMA DE *Rhizobium rhizogenes* K84 POSEE UN REMARCABLE ALTO NÚMERO DE GENES DE SECRECIÓN

De Paz, H.D., Peñalver, R.

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

El cepa de *R. rhizogenes* K84 es un eficaz agente de control biológico de los tumores de plantas causados por *Agrobacterium* spp., además coloniza y sobrevive eficazmente en las raíces de un gran número de especies vegetales. En este estudio hemos analizado *in silico* los genes y sistemas de secreción de macromoléculas presentes en el genoma de K84, como posibles factores clave para colonizar y competir en la rizosfera. Sorprendentemente, la cepa K84 posee un remarcable alto número de genes de secreción en comparación con otros organismos de la familia *Rhizobiaceae* (> 130 genes). Estos genes codifican diversos sistemas de secreción tipo I (T1SS), tipo T2SS y T5SS, que deben estar implicados en el transporte de al menos cuatro proteínas tipo *rhizobiocin/RTX toxin and hemolysin-type calcium binding proteins*, las cuales podrían actuar como toxinas y/o adhesinas. Curiosamente, también posee un T3SS completo, que tiene mucha similitud con el T3SS del plásmido simbionte p42d de *R. etli* CFN42. Además, se han identificado tres posibles efectores de este sistema tipo HopAN1. El genoma de *R. rhizogenes* K84 posee también tres sistemas T4SS completos, y como cabría esperar, dos de ellos presentes en plásmidos. Sin embargo, presenta también un T4SS en el cromosoma, el cual contiene en sus extremos gran cantidad de genes de elementos móviles, y codifica además genes de adhesinas y EPSs. Este T4SS se encuentra en una isla genómica de K84 que puede haber adquirido por transferencia horizontal probablemente desde un plásmido Ti de *Agrobacterium* sp. de tipo nopalina. En conjunto, estos sistemas de secreción podrían, no sólo mediar la interacción con la planta, sino también con otros organismos en la rizosfera.

Este trabajo ha sido financiado por el proyecto RTA10-96 cofinanciado por el fondo social europeo.

APROVECHAMIENTO Y BIODEGRADACIÓN DE RESIDUOS DE INDUSTRIAS OLEÍCOLAS EN PROTECCIÓN DE LA MADERA

Llinares, F.¹, Jiménez, P.¹, Troya, M.T.², Raposo, R.², Elvira-Recuenco, M.², Campos, J.M.³, García, M.A.³, Martínez, A.³

¹Dpto. de Biología, Facultad de Farmacia, Universidad San Pablo, Urbanización Montepíncipe, Boadilla del Monte, Madrid

²Dpto. Productos Forestales, CIFOR-INIA, Apdo. 8111, 28080-Madrid. E-mail: troya@inia.es

³Egmasa, Johan G. Gutemberg nº1, Isla de la Cartuja, 41092 Sevilla

La industrialización de los aceites producen una gran cantidad de residuos (alpechines, alperujos,...), que tienen una composición rica en sustancias polifenólicas que pueden ser aprovechadas como biocidas frente a hongos que alteran la madera. Sin embargo, también tienen un alto poder contaminante que incluyen sustancias tóxicas para la salud y nocivas para el medio ambiente. Por esta razón, la Ley de residuos obliga a los productores a eliminar (o transformar) los residuos oleosos, bien a través de un gestor autorizado, bien a través de un tratamiento.

Se ha descubierto que hay algunas bacterias capaces de degradar residuos tóxicos. El objetivo de este trabajo ha sido, por una parte estudiar la posible eficacia fungicida de los residuos de industrias oleícolas, y por otra, realizar un ensayo de biodegradación con dos cepas de microorganismos *Pseudomonas* sp. CECT 707 y *Bacillus amyloliquefaciens* CECT 7313, de patente española que presentan gran capacidad para metabolizar contaminantes tóxicos polifenólicos.

Los resultados obtenidos han mostrado que algunos alpechines tienen actividad frente a los hongos xilófagos y cromógenos estudiados, y que las cepas de *Pseudomonas* sp. y *B. amyloliquefaciens* pueden sobrevivir en los residuos utilizados, manifestándose por el crecimiento bacteriano al igual que por la reducción detectada en el contenido de fenoles totales en todas las muestras de residuos. Además, se ha observado que la Demanda Biológica de Oxígeno disminuye tras la incubación en todos los residuos de alpechines y de las muestras oleosas ensayadas.

En conclusión, se puede decir que algunos alpechines tienen capacidad biocida por lo que podrían ser desarrollados en la industria de la protección de la madera, y que los residuos oleícolas no aprovechables podrían ser biodegradados mediante las citadas cepas bacterianas.

**EFFECTO DE LA APLICACION DE HONGOS ENTOMOPATÓGENOS
SOBRE EL DESARROLLO DE LA VERTICILOSIS EN CONDICIONES
CONTROLADAS**

Lozano-Tovar, M.D.^{1,2}, Quesada-Moraga, E.² Varo, A.¹, Trapero A.¹

¹Laboratorio de Patología Agroforestal, Dpto. de Agronomía. ²Laboratorio de Entomología Agrícola, Dpto. de Ciencias y Recursos Agrícolas y Forestales. Universidad de Córdoba, Campus de Rabanales, Edif. C4, 14071-Córdoba. e-mail: z82lotom@uco.es.

La aplicación de hongos entomopatógenos al suelo en la base del árbol para el control de larvas de tercera edad próximas a pupación y pupas de la mosca del olivo (*Bactrocera oleae*) podría afectar a otras comunidades de microorganismos presentes en el suelo, en particular los hongos fitopatógenos como *Verticillium dahliae*, lo que supondría una aplicación novedosa dentro del escenario del Control Integrado de Plagas y Enfermedades en Olivar. Para evaluar dicho efecto, se ha puesto a punto un método de infestación de suelo, para lo cual se evaluaron diferentes concentraciones de inóculo seco y fresco de *V. dahliae* (aislados V004 y V117) preparado en el medio arena: harina de maíz: agua (9:1:2, AMA). Se usó suelo artificial (arena: limo: turba) en proporción 1:1:1. Las evaluaciones se realizaron sobre algodón, berenjena y olivo. Para algodón y berenjena se utilizaron niveles de infestación de suelo entre 0.3% y 15% de inóculo bajo dos ambientes (cámara y umbráculo). Para olivos de la variedad Picual se utilizaron niveles entre 5-50% utilizando el aislado V177. Los entomopatógenos *Beauveria bassiana* (C17) y *Metarhizium anisopliae* (EAMa 01/58-Su) fueron aplicados al suelo en una concentración de 1×10^7 conidios/ml en el momento del trasplante. La severidad de los síntomas en las plantas cultivadas en estos suelos se evaluó semanalmente mediante una escala de 0-4. Los valores del área bajo la curva de progreso de la enfermedad mostraron que la infección fue más severa y consistente a partir del 5% de densidad de inóculo, mientras que para densidades más elevadas apenas hubo diferencias significativas entre ellas y entre los dos ambientes ensayados (cámara de cultivo y umbráculo). En olivo, los síntomas se desarrollaron más tarde y más lentamente, aunque también fueron graves para las diferentes densidades de inóculo. Los dos aislados de *V. dahliae* invadieron los tejidos de las plantas de berenjena algodón y olivo. Las plantas tratadas con *B. bassiana* (C17) han registrado reducciones de la severidad de la Verticilosis entre un 19 y 46% mientras que con el aislado *M. anisopliae* las reducciones alcanzaron valores del 26%. Mediante la siembra de tejidos de peciolo de las hojas de las plantas de algodón se detectó la presencia de *B. bassiana* como endófito. Teniendo en cuenta estos resultados y los obtenidos en investigaciones anteriores *in vitro* frente a *V. dahliae* se ha iniciado la evaluación de los extractos de los hongos entomopatógenos en el control de la enfermedad en plantas de olivo.

PAN-71

ENMIENDAS ORGÁNICAS PARA EL CONTROL DE *Rosellinia necatrix* EN AGUACATE

Bonilla, N.¹, Cazorla, F.M.¹, Landa, B.B.², Hermoso, J.M.³, González-Fernández, J.³, Martínez-Alonso, M.⁴, Gaju, N.⁴, de Vicente, A.¹

¹Departamento de Microbiología, Universidad de Málaga, (IHSM-UMA), Facultad de Ciencias, 29071 Málaga. e-mail: bonilla@uma.es

²IAS Córdoba (CSIC). Finca Alameda del Obispo 14080 Córdoba.

³E.E. "La Mayora" (IHSM-CSIC) 29750 Algarrobo Costa, Málaga.

⁴Departamento de Genética y Microbiología, Universidad Autónoma de Barcelona, Campus de la UAB, 08193 Bellaterra, Barcelona

La aplicación de enmiendas orgánicas es una práctica agrícola muy extendida en el cultivo ecológico del aguacate. En este trabajo se ha descrito el efecto supresivo de varios tratamientos orgánicos sobre la podredumbre blanca del aguacate, producida por *Rosellinia necatrix*. Los suelos modificados utilizados en los ensayos de supresividad se analizaron y compararon en base a sus características microbiológicas y enzimáticas para determinar los cambios producidos por las enmiendas y su posible relación con el efecto supresivo. Los recuentos de microorganismos cultivables mostraron mayores niveles poblacionales de varios grupos bacterianos en los tratamientos orgánicos. Los perfiles obtenidos mediante PCR-DGGE mostraron variaciones tanto en la composición de las comunidades bacterianas de suelo y rizosfera dependiendo del tratamiento orgánico aplicado. Sin embargo, cambios más pronunciados en las comunidades microbianas no se relacionaron con un mayor efecto supresivo. Los perfiles fisiológicos de los suelos y la rizosfera mostraron cambios independientes de los cambios estructurales detectados por la PCR-DGGE. Además se observó una estimulación de la actividad hidrolítica en los suelos con enmiendas orgánicas. Algunas de estas enzimas, relacionadas con la degradación de quitina, podrían estar particularmente implicadas en el control del hongo *R. necatrix*. Los resultados de este estudio sugieren que el efecto supresivo de las enmiendas no está relacionado con cambios masivos en las comunidades microbianas de los suelos, y que es más probable que el efecto se deba a cambios puntuales en poblaciones microbianas o actividades enzimáticas clave.

Este trabajo ha sido financiado por el Plan Nacional I+D+I del MCI (AGL08-5453-C02-01) cofinanciado con fondos FEDER (EU) y el Plan Estratégico BIOÁNDALUS, CICE-Junta de Andalucía (BIOÁNDALUS 08/1/11.1).

PAN-72

INCREMENTO DE LA TOLERANCIA AL FITOPLASMA *Candidatus Phytoplasma prunorum* EN CIRUELOS MICORRIZADOS

Batlle, A., Laviña, A., Sabaté, J., Camprubí, A., Calvet, C.

Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentàries (IRTA). Ctra Cabrils Km 2. 08348 CABRILS (Barcelona). assumpcio.batlle@irta.es

El ciruelo japonés (*Prunus salicina* L.) es afectado severamente por el fitoplasma *Candidatus Phytoplasma prunorum* causante de los European stone fruit yellows (ESFY). Este fitoplasma pertenece al grupo Apple proliferation o 16Sr-X y es transmitido por la psylla, *Cacopsylla pruni*. El control de las enfermedades producidas por fitoplasmas se focaliza principalmente en el control del vector. Otras estrategias se basan en la mejora genética para la obtención de variedades tolerantes y/o resistentes. Sin embargo alternativas adicionales que modifiquen la fisiología de la planta pueden incrementar la tolerancia a la enfermedad.

En este trabajo se ha evaluado el efecto de la micorrización en ciruelo japonés inoculado con el fitoplasma Ca.P.prunorum.

Para el ensayo se utilizaron 40 plantas de un año de *Prunus salicina* cv *Angeleno* injertadas en GF 677 y procedentes de cultivo "in vitro": Se utilizaron 10 plantas por tratamiento, combinando micorrización e infección con el fitoplasma. Para la micorrización se utilizaron 10 gr de un inóculo del hongo micorrízico arbuscular *Glomus intraradices*, Schenck and Smith (BEG 72), el cual se aplicó en la base del contenedor cuando las plantas se trasplantaron.

Las plantas no micorrizadas e inoculadas con el fitoplasma presentaron un alto porcentaje de muerte prematura (30%). Mientras que todas las plantas micorrizadas e inoculadas con el fitoplasma sobrevivieron.

El desarrollo vegetativo de las plantas no micorrizadas fue menor que el de las plantas micorrizadas cuando ambas estaban infectadas por el fitoplasma. Después de un año de crecimiento las plantas micorrizadas e infectadas con el fitoplasma no difirieron en cuanto a crecimiento del control sano no micorrizado y no presentaron síntomas a pesar de la presencia de la enfermedad, mientras que las plantas infectadas y no micorrizadas presentaban síntomas severos de la enfermedad. Estos resultados indican que una micorrización temprana incrementa la tolerancia a Ca.P.prunorum (ESFY) en *Prunus salicina* inoculado en el patrón GF-677.

Trabajo financiado por el proyecto INIA RTA 2009-070-00

IDENTIFICACIÓN DE UNA FUENTE DE TOLERANCIA AL ToMV EN UNA COLECCIÓN DE LÍNEAS DE INTROGRESIÓN DERIVADA DE *Solanum lycopersicoides* LA2951

Soler, S.¹, Belmonte, I.¹, Aramburu, J.², Galipienso, L.², López, C.¹, Sifres, A.¹, Pérez-de-Castro, A.¹, Díez, M.J.¹

¹*Institut de Conservació i Millora de la Agrodiversitat Valenciana-Universitat Politècnica de València COMAV-UPV, 46022 Valencia.*

²*Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentariè (IRTA), 08348 Cabrils, Barcelona. salsoal@btc.upv.es*

La búsqueda de fuentes de resistencia ha constituido una labor muy importante de la mejora genética del tomate en las últimas décadas, especialmente en el caso de las enfermedades causadas por virus, y en particular el virus del mosaico del tomate (*Tomato mosaic virus*, ToMV), el virus del bronceado del tomate (*Tomato spotted wilt virus*, TSWV) y el virus del mosaico del pepino dulce (*Pepino mosaic virus*, PepMV). El uso del gen *Tm1* procedente de *Solanum habrochaites*, de los genes *Tm2* y *Tm2²* procedentes de *S. peruvianum*, que confieren resistencia al ToMV, y del gen *Sw5* procedente de *S. peruvianum* efectivo contra el TSWV, está posibilitando, en el momento actual, el cultivo del tomate sin excesivos problemas. No obstante, para las dos virosis se han citado aislados que superan la resistencia conferida por estos genes y, no se han identificado nuevas fuentes de resistencia. Con el PepMV se han realizado varios cribados de germoplasma, pero no se han encontrado fuentes de resistencia de utilidad en distintas especies del género *Solanum* (*Solanum pimpinellifolium*, *S. habrochaites*, *S. peruvianum*, *S. chilense*, *S. pennellii*, *S. neorickii* y *S. cheesmaniae*). En este contexto, nuestro grupo decidió probar el conjunto de líneas de introgresión de la entrada LA2951 de *S. lycopersicoides* en el fondo genético del tomate cultivado. Esta entrada ha sido utilizada para la mejora genética de la resistencia a enfermedades del tomate como la ocasionada por *Botrytis cinerea*. En este trabajo se presentan los resultados de un ensayo de inoculación de un conjunto de 43 de estas líneas de líneas de introgresión. Las inoculaciones de TSWV, ToMV y PepMV se realizaron mecánicamente. Todas las líneas mostraron un 100% de plantas con infección sistémica y síntomas acusados en el caso del TSWV y el PepMV. Las líneas LA-3883 y LA-3886, ambas portadoras de un fragmento solapante del cromosoma 7 de *S. lycopersicoides*, presentaron tolerancia a los aislados del ToMV que superan la resistencia del gen *Tm2²*. Las plantas de estas líneas mostraron niveles de acumulación viral comparables a los controles susceptibles, pero presentaron síntomas muy leves o casi imperceptibles. En la actualidad, se está procediendo a la reproducción de las líneas y a la construcción de híbridos F1 con materiales de tomate susceptibles al ToMV, con el fin de obtener información sobre la naturaleza genética de la citada tolerancia.

PAN-74

EVALUACIÓN DEL PRODUCTO ARMUROS[®] COMO INDUCTOR DE DEFENSAS EN MELÓN FRENTE A OÍDIO DE CUCURBITÁCEAS

Botta, A.¹, García-Gutiérrez, L.², Pérez-García, A.²

¹BIOIBERICA S.A., Polígono Industrial "Mas Puigvert", Crta. N-II Km 680.6, 08389 Palafolls (Barcelona). E-mail: abotta@bioiberica.com.

²Instituto de Hortofruticultura Subtropical y Mediterránea "La Mayora" (IHSM-UMA-CSIC), Campus de Teatinos, 29071 Málaga.

Los cultivos de cucurbitáceas son de gran importancia económica para España, destacando especialmente los de melón. Una de las principales enfermedades que afectan a estos cultivos es el oídio causado por *Podosphaera fusca*. A pesar de se han desarrollado algunas variedades resistentes, la aplicación de fungicidas continúa siendo la principal herramienta de lucha contra la enfermedad. Desafortunadamente, el impacto del control químico ha sido mucho más atenuado de lo esperado por la facilidad con la que *P. fusca* desarrolla resistencia, haciendo ineficaces a muchos fungicidas sistémicos. Una de las estrategias más interesantes para el control de enfermedades de plantas se basa en el uso de los denominados inductores de resistencia. El objetivo del presente estudio consistió en evaluar el papel del producto Armurox[®] de BIOIBERICA S.A. como posible inductor de defensas en plantas, empleando para ello el patosistema modelo melón-oídio de cucurbitáceas. Tras la aplicación de Armurox[®] y la posterior inoculación de *P. fusca*, se observó una drástica reducción de la severidad de la enfermedad que estaba directamente relacionada con un menor desarrollo del patógeno que en muchos casos se quedaría detenido en el estadio de primer tubo germinativo y probablemente primer haustorio. Además, en las plantas tratadas con Armurox[®], especialmente en las tratadas radicularmente, tras la inoculación del patógeno se observó la activación de mecanismos de defensa como el reforzamiento de paredes celulares, la producción de especies reactivas de oxígeno y un incremento en la expresión de genes de proteínas PR, de manera similar a lo observado en la resistencia de tipo post-haustorial descrita en cucurbitáceas en respuesta a *P. fusca*. Los resultados de este estudio sugieren que el principal mecanismo de acción de Armurox[®] sería como inductor de defensas de la planta.

PAN-75

DESARROLLO DE UN BIOENSAYO CON AGENTES DE CONTROL BIOLÓGICO FRENTE A *Diplodia seriata* Y *Phaeomoniella chlamydospora*

Elena, G.¹; Luque, J.¹; Usall, J.²; Teixidó, N.²

¹Patología Vegetal, IRTA. Ctra. de Cabrils km 2, 08348 Cabrils. E-mail: jordi.luque@irta.cat, georgina.elena@irta.cat; ²IRTA, Postcollita-XaRTA. Avda. Alcalde Rovira i Roure 191, 25198 Lleida. E-mail: josep.usall@irta.cat, neus.teixido@irta.cat

Se presenta una técnica desarrollada para evaluar “*in vitro*” posibles agentes de control biológico (ACBs) frente a los hongos patógenos de la madera de la vid *Diplodia seriata* y *Phaeomoniella chlamydospora*. Los agentes de control biológico ensayados fueron *Candida sake* CPA-1, *Pseudomonas graminis* CPA-7 y una bacteria no identificada (Vi_19_1). Se cortaron segmentos de sarmientos previamente descortezados, de unos 5 cm de longitud, y se esterilizaron en superficie con etanol 70° (4 minutos). Se insertaron en posición vertical sobre medio agar-agua (150 ml) contenido en frascos de 750 ml. Las secciones de corte de los sarmientos se inocularon separadamente con los distintos ACBs (50 µL por sarmiento, con suspensiones de $1 \cdot 10^8$ conidios/ml para CPA-1 y $2 \cdot 10^8$ conidios/ml para el resto de ACBs), y 24 horas más tarde se inocularon, también separadamente, con suspensiones de conidios de los patógenos (50 µL por sarmiento, con una suspensión de $2 \cdot 10^4$ conidios/ml). Se incluyeron tres grupos de tratamiento control, consistentes en: 1) sarmientos inoculados con patógeno y sin ACB, 2) con ACB y sin patógeno, y 3) únicamente tratados con agua destilada estéril. Después de dos semanas en incubación a 25 °C y luz ambiente se procedió al reaislamiento de los microorganismos. Todos los ACBs se reaislaron en el 100 % de los sarmientos inoculados tanto con *D. seriata* como con *P. chlamydospora*. El grado de efectividad de estos ACBs frente a ambos patógenos fue variable, siendo Vi_19_1 el más efectivo contra *D. seriata* (el patógeno se reaisló en un 56 % de los sarmientos) y *C. sake* el más efectivo contra *P. chlamydospora* (el patógeno no se pudo reaislar en ninguno de los casos). Los resultados obtenidos muestran que este bioensayo permite hacer una selección preliminar rápida, y a pequeña escala, de potenciales ACBs, para que éstos posteriormente puedan ser ensayados en campo frente a los patógenos de interés.

Financiado por el proyecto INIA RTA2010-00009-C03 y FEDER. Georgina Elena recibe financiación de INIA para la realización de su tesis doctoral.

PANELES DE EPIDEMIOLOGÍA (PAN-76-PAN-113)

**SITUACIÓN DE "LA PODREDUMBRE DEL CUELLO Y DE LAS RAÍCES"
DEL TOMATE CAUSADA POR *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*", EN LOS INVERNADEROS DE ALMERÍA**

Aguilar M.I.², Pérez, A.¹, Gómez, J.¹

¹IFAPA. Centro La Mojonera. Camino de San Nicolás 1. 04745. La Mojonera, Almería. E-mail: juliom.gomez@juntadeandalucia.es

²Laboratorio de Producción y Sanidad Vegetal. Camino de San Nicolás 1. 04745. La Mojonera, Almería.

En la zona litoral del sudeste de Andalucía, existe una superficie de cultivo de tomate próxima a las 11250 ha. La enfermedad causada por *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* (Forl), que se manifiesta por una marchitez, con o sin previo amarilleo de las hojas y muerte de las plantas, era poco importante y se encontraba generalmente localizada en el levante almeriense. Los síntomas solían comenzar, al coincidir la maduración de los primeros frutos con el descenso de las temperaturas, que suele ocurrir en esa zona a mediados de noviembre. Sin embargo recientemente, los daños causados por Forl parecen haber aumentado considerablemente, extendiéndose a otras zonas y produciendo graves pérdidas incluso en condiciones más cálidas. El objetivo del estudio fue evaluar el poder patógeno de varios aislados de *F. oxysporum* (Fo) y estudiar su comportamiento frente a cultivares de tomate con diferentes genes de resistencia frente a Fo.

Para ello se realizaron tres experimentos en cultivo sin suelo. En el primero se inocularon sobre el cv. Raf siete aislados de Fo. En el segundo se inocularon cinco aislados patógenos, sobre los cvs. siguientes: Marmande (sin genes frente a Fo), Raf (Fol 1), cv. Daniela (Fol 1 y 2) y sobre el cv. Rambo (Fol 1 y 2 y Forl). En el tercero se inocularon dos aislados obtenidos de una variedad presuntamente resistente a Forl, sobre los cvs. Raf y Rambo. Durante éstos se realizaron observaciones semanales de los síntomas aparecidos en las plantas. Los resultados obtenidos en el primero indicaron la patogenia de seis de los aislados inoculados, que causaron síntomas al 58,3-100%, y la muerte al 8.3-100% de las plantas. En el segundo, las primeras plantas marchitas en los cvs. Marmande y Raf, se observaron a los 35 días de la inoculación, en el cv. Daniela 28 días más tarde. Los cinco aislados inoculados causaron la muerte a todas las plantas inoculadas de los cultivares Marmande y Raf, mientras que en Daniela la mortandad osciló entre el 10.0 al 93.3%. En las plantas del cv. Rambo no se observaron síntomas. En el tercero, los tres aislados inoculados causaron la muerte a un alto porcentaje de las plantas inoculadas del cv. Raf, mientras que no lo hicieron sobre el cv. Rambo. En los tres experimentos, las plantas no inoculadas no mostraron síntomas. Los resultados obtenidos indican la extensión de la enfermedad al poniente almeriense

PAN-77

EVALUANDO LA INFLUENCIA DEL RIEGO POR GOTEO SOBRE EL DESARROLLO DE LA VERTICILOSIS DEL OLIVO EN CONDICIONES DE AMBIENTE NATURAL

Santos Rufo, A., Vega, V., Hidalgo, J., Hidalgo, J.C., Rodríguez Jurado, D.

IFAPA Centro “Alameda del Obispo”, Apdo. 3092, 14080 Córdoba.
dolores.rodriguez.jurado@juntadeandalucia.es

La prevalencia e incidencia de la Verticilosis del olivo (VO) son mayores en plantaciones de olivar en regadío que en secano en Andalucía lo cual sugiere que el agua de riego es un factor de riesgo para el desarrollo de la VO. Es generalmente aceptado, aunque con excepciones, que al aumentar la cantidad de agua y los eventos de riego se incrementen la incidencia y/o severidad de las Verticilosis en otros cultivos huéspedes del hongo. Alcanzar este conocimiento en relación a la VO es imprescindible para que en un escenario de control integrado de la enfermedad el manejo del riego pueda contribuir a paliar el incremento del hongo en el suelo y reducir la incidencia y/o la severidad de la enfermedad. Nos hemos propuesto por ello valorar los efectos del contenido de agua en el suelo y la frecuencia de riego sobre el progreso de la VO y la dinámica temporal del hongo en el suelo en un contexto cultivar-aislado con garantías para el desarrollo de la enfermedad: plantaciones jóvenes intensivas de un cultivar susceptible establecidas en suelo infestado por el más alto grado de virulencia de *V. dahliae* sobre olivo. Para abordar aquellos objetivos se ha dispuesto un experimento en la finca experimental del IFAPA “Alameda del Obispo” en Córdoba con plántones de olivo ‘Picual’ creciendo en macetas de gran volumen sobre una mezcla de suelo infestado o no infestado (control) con propágulos de un aislado defoliante de *V. dahliae* perteneciente al grupo de mayor virulencia del patógeno sobre olivo. Un sistema de riego superficial por goteo con 4 emisores por plantón proporciona dos rangos de contenido de agua en el suelo (fijados al inicio del experimento, alto y bajo) y tres frecuencias de riego (diaria, semanal y una combinación de ellas). El suelo en la maceta se ha protegido de la lluvia y se registra tanto el estado de humedad del suelo como la temperatura de éste y del aire. El experimento tiene un diseño en split plot de tratamientos en bloques al azar con 24 plantas por tratamiento. Se llevan a cabo periódicamente evaluaciones de la severidad de síntomas diagnosticados en la parte aérea de cada planta y estimaciones de la densidad de inóculo del hongo en el suelo. Los datos de estas variables y la incidencia de enfermedad correspondientes a la estación de primavera serán analizados y los resultados presentados.

Financiado por los proyectos RTA2011-00019-00-00 del INIA y PP.TRA.TRA2010.10 del IFAPA parcialmente financiados por el FEDER.

PAN-78

ESTUDIO DE LA VARIABILIDAD INTERESPECÍFICA CON MARCADORES MORFOLÓGICOS Y PATOLÓGICOS ENTRE AISLADOS Y ESPECIES DE *Monilinia* spp.

Villarino, M., Larena, I., Morales, M. T., Castillo, R., Melgarejo, P., De Cal, A.

Departamento de Protección Vegetal, INIA, Carretera de La Coruña km 7, 28040 Madrid. Email: cal@inia.es

Monilinia laxa, *M. fructigena* y *M. fruticola* son los hongos que causan la podredumbre parda y el momificado de los frutos en los frutales de hueso y pepita. Es difícil identificar cada una de las tres especies sólo por sus características morfológicas o por la sintomatología que producen. Se han puesto a punto varios protocolos de identificación de *Monilinia* spp. basados en características culturales, patológicas y morfológicas sin considerar la variabilidad existente entre cada una de las especies.

Por ello se ha llevado a cabo un estudio poblacional mediante los datos morfológicos, culturales y patológicos de 60 aislados de *Monilinia* spp. (20 aislados de cada especie: 45 procedentes de España y 15 aislados de otras regiones del mundo), en relación al porcentaje de germinación de las conidias, longitud de tubos germinativos de las mismas; la presencia/ausencia de borde lobulado, anillos concéntricos, estroma, esclerocios, color, capacidad de crecimiento y esporulación de la colonia; tamaño de lesión, conidias por lesión, porcentaje de infección en el fruto. La germinación y la longitud de los tubos germinativos de las conidias de las tres especies de *Monilinia* se evaluaron mediante bioensayo con 3 repeticiones por aislado. Los caracteres culturales de cada uno de los aislados se evaluaron en placas de Petri conteniendo agar patata dextros (APD), se inoculaban en el punto central de cada placa un trozo de micelio en activo crecimiento. Se inoculaban 5 placas por cada aislado. Para comparar la capacidad de infección de los aislados de cada una de las tres especies, se realizaron dos ensayos sobre melocotones esterilizados superficialmente (nectarinas de la variedad 'Big Top') que eran inoculados artificialmente con una suspensión de conidias (10^4 conidia ml^{-1}) en agua de cada aislado. Todos los ensayos se repitieron al menos dos veces. Los datos de cada uno de los caracteres fueron analizados mediante un análisis de la varianza. Posteriormente se elaboró una matriz de similitud binaria con los datos generados por los caracteres significativos y se construyó un dendrograma mediante el método de agrupamiento UPGMA.

El análisis de los porcentajes de germinación de las conidias, longitud de tubos germinativos de las mismas; la presencia/ausencia esclerocios, capacidad de crecimiento y esporulación de la colonia; tamaño de lesión, conidias por lesión, y porcentaje de infección en el frutos revela que hay una aparente relación entre el agrupamiento de los aislados de cada especie de *Monilinia* y sus características morfológicas, culturales y patológicas.

PAN-79

LA SUSCEPTIBILIDAD DE LAS HERIDAS DE PODA DE LA VID A LA INFECCIÓN POR ASCOSPORAS DE *Eutypa lata* SIGUE UN MODELO DE DECAIMIENTO EXPONENCIAL

Muruamendiaraz, A., Legorburu, F.J.

NEIKER-Tecnalía, Instituto Vasco de Investigación y Desarrollo Agrario, Apartado 46, 01080 VITORIA/GASTEIZ. E-mail: jlegorburu@neiker.net

Las heridas de poda de la vid son la principal puerta de entrada para muchas enfermedades de madera. Su susceptibilidad a la infección fúngica disminuye tanto con el paso del invierno como con el tiempo transcurrido desde la poda. Se dispuso un experimento en dos viñas de Tempranillo en Rioja Alavesa (Laguardía y Labastida) a lo largo de dos campañas. Las cepas se prepodaron a principios, mediados, y finales del invierno. Las heridas se inocularon con ascosporas de *Eutypa lata* (*Diatrypaceae*) el día de la poda y también a la semana y dos, tres y cuatro semanas. Dos semanas después de las inoculaciones, se tomaron muestras de sarmiento y se realizaron aislamientos en agar de patata-dextrosa con estreptomycin. La disminución de susceptibilidad, tanto a lo largo del invierno, como con el tiempo transcurrido desde la poda, responden a modelos de decaimiento exponencial y son independientes entre sí. Se obtienen así tasas de decaimiento de susceptibilidad, que permiten comparar diferentes experimentos entre sí. Así, en nuestro caso, se encontraron diferencias significativas entre campañas, pero no entre viñas. Por otro lado, los residuos del modelo pueden ser utilizados para cuantificar el efecto de otros factores que afectan a la susceptibilidad de las heridas o a la presión infectiva del patógeno, tales como las condiciones meteorológicas. Como inconveniente, la transformada logarítmica necesaria para el ajuste del modelo impide la incorporación de la infección natural de fondo como efecto aditivo. Este trabajo fue parcialmente financiado por el proyecto INIA RTA2010-00009-C03 y fondos FEDER.

PAN-80

LOS PARASITOIDES MODIFICAN EL GRADO DE DISPERSION Y LA DISTRIBUCION ESPACIAL DE VIRUS TRANSMITIDOS POR PULGONES EN PEPINO

Dáder, B., Moreno, A., Fereres, A.

Departamento de Protección Vegetal, Instituto de Ciencias Agrarias, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, C/Serrano 115 dpdo., 28006 Madrid, España. E-mail: amoreno@ica.csic.es

Dos de las principales virosis que afectan al cultivo de pepino (*Cucumis sativus* L.) son el *Virus del mosaico del pepino* (CMV, Cucumovirus) y el *Virus del amarilleo de las cucurbitáceas* (CABYV, Luteovirus), transmitidos muy eficazmente de manera no persistente y persistente, respectivamente, por el vector *Aphis gossypii* Glover. Actualmente, pese al continuo incremento de la superficie de cultivo agrícola bajo sistemas de Manejo Integrado de Plagas (MIP), los daños originados por virosis siguen siendo importantes. El uso de enemigos naturales como estrategia de control de plagas podría inducir a que los vectores de virus modificaran su comportamiento y, con ello, el grado de dispersión y los patrones de distribución espacio-temporal de las virosis que transmiten.

Con objeto de estudiar el impacto del parasitoide *Aphidius colemani* Viereck, una de las especies más comercializadas para el control de pulgones en hortícolas, se realizaron ensayos de invernadero en jaulones de 1 m³. En el centro de dichos jaulones se situó una planta infectada con CMV o CABYV, según tratamiento, rodeada de 48 plántulas de pepino sanas. Sobre la planta fuente de virus se liberaron 100 pulgones adultos alados y 5 parejas de parasitoides adultos por jaulón. En los jaulones testigo, se procedió de igual manera pero en ausencia de parasitoides (n=3). Se evaluó la posición y densidad de pulgones adultos y ninfas, así como la infección viral a corto plazo (2 días con CMV y 7 días con CABYV) y a largo plazo (7 días con CMV y 14 días con CABYV). El análisis espacial de los datos se realizó empleando el procedimiento SADIE, estudiando los patrones de distribución del vector y las virosis así como las posibles asociaciones entre ambos agentes.

Los resultados indican una mayor dispersión de pulgones en presencia del enemigo natural en un primer momento, para posteriormente a largo plazo ocupar más plantas receptoras en ausencia de éste. La incidencia de ambas virosis a corto plazo fue mayor en presencia del parasitoide, si bien la transmisión de CABYV se redujo significativamente a largo plazo. Este trabajo indica que la presencia del parasitoide puede incrementar el riesgo de dispersión de virus especialmente en el caso de CMV.

PAN-81

INCIDENCIA DE *Lecanicillium fungicola* EN DOS MEZCLAS DE COBERTURA UTILIZADAS PARA EL CULTIVO DE CHAMPIÑÓN

Navarro, M.J.¹, Carrasco, J.¹, Santos, M.², Dianez, F.², Gea, F.J.¹

¹Centro de Investigación, Experimentación y Servicios del Champiñón (CIES), Quintanar del Rey, 16220 Cuenca. E-mail: fjgea.cies@dipucuenca.es

²Departamento de Producción Vegetal, Escuela Politécnica Superior, Universidad de Almería, 04120 Almería.

La mezcla de cobertura es una capa nutricionalmente inerte que se aplica sobre la superficie del compost colonizado por el micelio del champiñón (*Agaricus bisporus*). Esta capa sirve de soporte para la fructificación de los champiñones. Las mezclas de cobertura habitualmente utilizadas en los cultivos de champiñón de Castilla-La Mancha se elaboran a partir de suelo mineral, pero recientemente se están introduciendo mezclas basadas en turbas. Este cambio tiene implicaciones tanto en el manejo del cultivo como en aspectos relacionados con el control de enfermedades, tal es el caso de la mole seca, causada por el hongo *Lecanicillium fungicola*.

En este estudio se ha evaluado el comportamiento de estas dos mezclas de cobertura ante una infección artificial con *L. fungicola*, valorando tanto la incidencia de mole seca (porcentaje de champiñones enfermos con respecto al número total de carpóforos recolectados), como la pérdida de rendimiento ocasionada por el patógeno. Para ello, se han desarrollado dos ciclos de cultivo infectados artificialmente con *L. fungicola* ($1,15 \times 10^8$ conidios m⁻²), en los que se ha registrado diariamente el número y peso de los champiñones recolectados (sanos y enfermos). Se ha calculado también la eficiencia biológica (EB) (kg de champiñón producido por cada 100 kg de sustrato de cultivo), con el fin de valorar la productividad obtenida con cada cobertura.

Los resultados indican que la EB es significativamente superior para la cobertura de turba, mientras que la incidencia de la enfermedad es estadísticamente comparable en ambos tipos de cobertura. En cuanto al rendimiento, el peso de champiñones enfermos es significativamente superior sobre la mezcla de turba, mientras que el peso de champiñones sanos es similar en ambos casos. Por tanto, cuando no hay infección, la mayor EB obtenida con la cobertura de turba proporciona un mayor rendimiento del cultivo, lo que puede compensar el mayor coste económico de este tipo de coberturas. Sin embargo, en condiciones de contaminación por *L. fungicola*, la rentabilidad del cultivo se ve reducida por el mayor número de champiñones enfermos recolectados.

Este trabajo ha sido financiado por el INIA y con fondos FEDER (Proyecto RTA2010-00011-C02-01).

ANÁLISIS DE *Pseudomonas syringae* PROCEDENTES DE CULTIVOS DE JUDÍA GRANJA ASTURIANA Y MALAS HIERBAS

Fernández, A.M.¹, Rodicio, M.R.², González, A.J.¹

¹Laboratorio de Fitopatología, Servicio Regional de Investigación y Desarrollo Agroalimentario (SERIDA), carretera de Oviedo s/n, 33300 Villaviciosa, Asturias. España. e.mail: anamaf@serida.org

²Área de Microbiología, Departamento de Biología Funcional, Universidad de Oviedo, Julián Clavería 6, 33006 Oviedo, Asturias, España.

La especie *Pseudomonas syringae* engloba alrededor de 50 patovares que han sido clasificados en cinco filogrupos mediante estudios filogenéticos basados en MLST (Multilocus Sequence Typing)(Hwang *et al* 2005). Siguiendo esta clasificación, el presente trabajo analiza una población de 30 aislamientos procedentes de malas hierbas (12) y de judía tipo granja asturiana (18) con el fin de valorar la importancia de la población de *P. syringae* en las malas hierbas y su posible papel como reservorios u hospedadores alternativos. Para ello se realizó un estudio filogenético basado en los genes *rpoD*, *gyrB* y *gltA* (MLST), se analizó la presencia de toxinas y la producción de exopolisacáridos y se comprobó la patogenicidad en judía de cada aislamiento. Al comparar los tres genes con las secuencias de las bases de datos disponibles, todos los aislamientos quedaron incluidos en el filogrupo 2. Este filogrupo, en el que encontramos la mayor diversidad de hospedadores, con cepas tanto patógenas de especies hortícolas, cereales y leñosas como cepas no patógenas, se divide en tres subgrupos, 2a, 2b y 2c. La principal diferencia entre ellos es que los subgrupos 2a y 2b contienen cepas patógenas mientras que el 2c comprende cepas no patógenas que no poseen el cluster *hrp-hrc* que codifica para el sistema de secreción de tipo 3 (SST3). En el presente estudio, el subgrupo 2b fue el mayoritario con un 67% de los aislamientos de malas hierbas y un 61 % de los de judía. Los subgrupos 2c y 2a presentaron porcentajes inferiores, del 25% y 8% en malas hierbas y del 28% y 11% en judía, respectivamente. Las cepas del subgrupo 2b contenían genes para la producción de syringomicina, syringopeptina y levano y produjeron lesiones sin desencadenar respuesta de hipersensibilidad (RH) en vainas de judía. Las cepas del subgrupo 2a fueron negativas para los genes de toxinas y levano, y desencadenaron la RH en las vainas. Las cepas del subgrupo 2c tampoco produjeron toxinas ni levano, pero a diferencia de las anteriores, no provocaron ninguna respuesta en las vainas, posiblemente debido a la falta de SST3. Para concluir, en la población de *P. syringae* aislada de malas hierbas, encontramos un alto porcentaje de cepas patógenas y, debido al amplio rango de hospedador del filogrupo 2 al que pertenecen, consideramos que las malas hierbas podrían ser importantes como reservorio manteniendo el inóculo hasta el siguiente ciclo de cultivo.

PAN-83

VARIACIÓN GENÓMICA EN *Pseudomonas viridiflava*, PATÓGENO EMERGENTE EN CULTIVOS ASTURIANOS

San José, M.¹, Fernández, A.M.², González, A.J.², Rodicio, M.R.¹

¹Área de Microbiología, Departamento de Biología Funcional, Universidad de Oviedo, Julián Clavería 6, 33006 Oviedo, Asturias.

²Laboratorio de Fitopatología, Servicio Regional de Investigación y Desarrollo Agroalimentario (SERIDA), carretera de Oviedo s/n, 33300 Villaviciosa, Asturias.

Pseudomonas viridiflava causa daños importantes en cultivos asturianos desde 1999. Para su seguimiento epidemiológico se analizaron 108 aislamientos recuperados a partir de plantas sintomáticas de diferentes especies (kiwi, judía, lechuga, arándano, grosella y las especies ornamentales *Hebe* spp. y *Chaenomeles* sp.). Los aislamientos fueron caracterizados bioquímicamente, sometidos a macrorrestricción genómica con la endonucleasa PmeI seguida por electroforesis en campo pulsante (PFGE), MLST (Multilocus Sequence Typing) y ribotipia mediante restricción-hibridación. Asimismo se estudió la distribución de islas de patogenicidad y contenido plasmídico. En la muestra, se confirmó el mantenimiento del polimorfismo en las islas de patogenicidad descritas en esta especie (T-PAI y S-PAI; Araki *et al.*, 2006), y se encontró una diferencia significativa en el porcentaje de aislamientos portadores de T-PAI recuperados a partir de kiwi y de judía, siendo mayor en esta última. Aunque los perfiles bioquímicos y de macrorrestricción genómica resultaron altamente diversos, el MLST y la ribotipia probaron ser de utilidad para identificar y distinguir los clados genómicos (A y B) descritos en *P. viridiflava* (Goss *et al.*, 2005). El clado A resultó ser el prevalente en la región, encontrándose un único aislamiento perteneciente al clado B. En particular, un grupo de ribotipos dentro del clado A incluyó exclusivamente aislamientos portadores de la menos frecuente T-PAI, en su mayoría procedentes de judía. Este hecho podría apoyar la hipótesis de la existencia de una mejor adaptación de los aislamientos portadores del sistema de secreción tipo III codificado por T-PAI a judía que al resto de hospedadores. Un número limitado de aislamientos (7,4%) fueron portadores de plásmidos, sugiriendo la existencia de barrera(s) a la transferencia horizontal. En total se identificaron seis plásmidos diferentes, y la secuenciación completa de dos de ellos reveló su relación con los plásmidos de la familia pPT23A de *P. syringae*.

CARACTERIZACIÓN DE AISLAMIENTOS LOCALES DE *Fusarium* PRESENTES EN VARIEDADES DE SEMILLA DE ALUBIA DE LEÓN

Campelo, M.P.¹, Reinoso, B.¹, Lorenzana, A.¹, González, A.J.²

¹*Departamento de Ingeniería y Ciencias Agrarias, E.S.T.I. Agraria, Universidad de León, Avda. de Portugal, 41, 24071 León, Correo-e: mpcamr@unileon.es*

²*Servicio Regional de Investigación y Desarrollo Agroalimentario (SERIDA), Ctra. de Oviedo, s/n, 33300 Villaviciosa, Asturias.*

El cultivo de alubia (*Phaseolus vulgaris* L.) en León se ve afectado por numerosas micosis transmitidas por semilla, siendo de las más frecuentes las denominadas fusariosis radicular y vascular, producidas por *Fusarium solani* (Mart.) Sacc. (Fs) y *F. oxysporum* Schlecht. (Fo), respectivamente. En estudios previos, realizados para conocer la micoflora presente en semillas de variedades locales de judía, se obtuvieron aislamientos de estas especies y se estudió su virulencia de respecto a dichas variedades. En este trabajo se presentan los resultados de los experimentos realizados para caracterizar fenotípicamente 94 aislamientos de Fs y 47 de Fo, obtenidos en 77 lotes de semilla de 12 variedades. Se estudiaron características culturales macroscópicas (color del micelio aéreo, del reverso de la colonia, del pigmento difusible en agar y de los esporodoquios) y microscópicas (presencia y abundancia de macroconidios, microconidios, clamidosporas, y forma de los conidióforos) sobre cultivos en medio APD incubados en bancada a 18-25° C durante 15 días. Además, se evaluó en el medio AA la velocidad de crecimiento radial durante 16 días en condiciones de oscuridad a 25° C y 30° C. De los resultados cabe destacar que se identificaron 15 morfotipos de Fs y 14 morfotipos de Fo, observándose de forma predominante para ambas especies las características más habitualmente descritas en la bibliografía: (i) en Fs: color blanco del micelio aéreo (71%), color crema del reverso de la colonia (65%), monofiálidas largas (100%) y presencia de clamidosporas (51%), y (ii) en Fo: color malva del micelio aéreo (70%) y del reverso de la colonia (81%), gran abundancia de microconidios (72%) y de clamidosporas (70%), y presencia de monofiálidas cortas (57%). Los colores del pigmento difusible en agar y de los esporodoquios fueron violeta y crema, respectivamente, en el 23% y el 31% de las colonias de Fs, y rojo y azul en el 38% y el 28% de las de Fo. Los 141 aislamientos ensayados mostraron crecimiento activo con tendencia logarítmica para las dos temperaturas ensayadas; el desarrollo inicial fue más rápido a 30° C, sin embargo, al final de ensayo se cuantificó una merma en el diámetro medio a dicha temperatura respecto del registrado a 25° C que alcanzó el 9% en Fs y el 11% en Fo. Los datos obtenidos permiten profundizar en el conocimiento de la flora fusárica asociada a semilla de variedades de alubia de León en aspectos relacionados con sus capacidades colonizadora y de supervivencia.

PAN-85

RESUCITACIÓN DE *Ralstonia solanacearum* FILOTIPO II TRAS SU ENTRADA EN EL ESTADO VIABLE NO CULTIVABLE INDUCIDO POR BAJA TEMPERATURA

Álvarez, B.¹, López, M.M.¹, Biosca, E.G.²

¹Centro de Protección Vegetal y Biotecnología. Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA). Carretera de Moncada a Náquera km 4,5. 46113 Moncada. Valencia. E-mail: mlopez@ivia.es

²Departamento de Microbiología y Ecología. Universidad de Valencia. Av. Dr Moliner 50. 46100 Burjassot. Valencia. E-mail: elena.biosca@uv.es

La marchitez bacteriana causada por *Ralstonia solanacearum* produce grandes pérdidas económicas a nivel mundial. En la Unión Europea es un patógeno de cuarentena y constituye una seria amenaza para las solanáceas. Los cursos de agua tienen un papel en su diseminación y persistencia en el medio ambiente, donde las bajas temperaturas de otoño e invierno inducen la entrada en el estado viable no cultivable (VNC). Este estado podría revertir a cultivable, mediante resucitación, con las temperaturas más elevadas de primavera y verano. Para determinar los factores que favorecen este proceso, se realizaron ensayos con dos cepas de *R. solanacearum* filotipo (ft) II que previamente habían entrado en el estado VNC inducido por baja temperatura, en microcosmos de agua medioambiental estéril, inoculados por separado con cada cepa a 10^6 ufc/ml e incubados a 4°C, con controles a 24°C. El seguimiento de las poblaciones se hizo por recuentos de células totales, viables y cultivables. Los ensayos de resucitación consistieron en la exposición de diluciones decimales seriadas de células VNC a temperatura favorable (28°C) en: a) medio líquido, con nutrientes y aireación, b) en agua medioambiental estéril, y c) *in planta*, tras inoculación directa de las diluciones. Periódicamente se realizaron ensayos de cultivabilidad y poder patógeno en tomate. En medio nutritivo líquido, las células en estado VNC de *R. solanacearum* ft II volvieron a ser cultivables y patógenas hasta la dilución 10^{-6} de la suspensión inicial que no contenía células cultivables a tiempo cero, y disminuyeron progresivamente hasta la dilución 10^{-4} tras un mes en estado VNC. En agua medioambiental, las células VNC fueron cultivables y patógenas a partir de las 48 h de la subida de temperatura, y se recuperó hasta la dilución 10^{-4} tras una semana en estado VNC y hasta 10^{-1} después de 5 semanas en este estado. Tras inoculación por tallo de células VNC, se observó marchitez en plantas en las que se introdujo hasta la dilución 10^{-3} un mes después de la inducción del estado VNC. La resucitación observada en todas estas condiciones, tan sólo eliminando el factor inductor del estrés, que fue la baja temperatura, resalta la necesidad de conocer el riesgo epidemiológico real de la presencia de células en estado VNC de *R. solanacearum* ft II en aguas medioambientales.

PAN-86

IDENTIFICACIÓN, INCIDENCIA Y PATOGENICIDAD DE *Cladobotryum mycophilum*, AGENTE CAUSAL DE LA TELARAÑA EN CULTIVOS DE CHAMPIÑÓN

Carrasco, J.¹, Navarro, M.J.¹, Santos, M.², Gea, F.J.¹

¹Centro de Investigación, Experimentación y Servicios del Champiñón (CIES), 16220 Quintanar del Rey, Cuenca. E-mail: carrasco.jaime@inia.es

²Departamento de Producción Vegetal, Escuela Politécnica Superior, Universidad de Almería, Carretera Sacramento s/n, La Cañada de San Urbano. 04120 Almería.

Entre los años 2008-2011 se ha detectado una fuerte presencia de la enfermedad conocida como telaraña en los cultivos de champiñón (*Agaricus bisporus*) de Castilla-La Mancha. La enfermedad se caracteriza por la aparición de un micelio denso, de color blanco, sobre la superficie de la mezcla de cobertura y de los cuerpos fructíferos. Los champiñones adquieren una coloración amarillo pálido, después rosa y se pudren. En ocasiones, da lugar a la aparición de dos tipos de manchas en los sombreros de los champiñones, unas de color marrón oscuro con bordes mal definidos y otras de color marrón claro. Las prospecciones realizadas a lo largo de 2011 mostraron que la enfermedad estaba presente en más del 50% de las explotaciones visitadas durante la 3ª y 4ª floradas, y que la superficie afectada aumentaba con la edad del ciclo de cultivo. La identificación del agente causal se realizó mediante la amplificación de la región ITS del ADN ribosómico con los iniciadores ITS1F/ITS4 y posterior secuenciación del amplímero de un aislado (GenBank Accession No. JQ004732), que mostró la más alta similaridad (99 y 100%) con 4 secuencias del ITS de *Cladobotryum mycophilum* (teleomorfo *Hypomyces odoratus*). La identificación microscópica destacó la presencia de conidios cilíndricos, 15-28 x 8-11 µm, con 0-3 septos. Se llevaron a cabo dos ensayos de patogenicidad (A y B) en cámaras de cultivo, usando 24 bloques de sustrato fase III para *A. bisporus* y cuatro mezclas de cobertura distintas: tres a base de turba y una con suelo mineral. La mitad de los bloques se infectaron con una solución conidial de *C. mycophilum* (10^6 conidios/m²) y la otra mitad se utilizó como control. Los primeros síntomas de telaraña aparecieron 25 días después de la inoculación, entre la 2ª y 3ª florada (ensayo A), y después de 11 días, entre 1ª y 2ª flor, en el ensayo B. El patógeno *C. mycophilum* se reaisló de todas la coberturas infectadas, mientras que los bloques control no manifestaron la enfermedad. En los bloques infectados se registró un descenso de rendimiento del 12,6% en el ensayo A y del 15% en el ensayo B.

Este trabajo ha sido financiado por el INIA y con fondos FEDER (Proyecto RTA2010-00011-C02-01).

***Fusicladium eriobotryae*: EFECTO DE LA TEMPERATURA Y EL PERÍODO DE HUMECTACIÓN SOBRE EL CRECIMIENTO MICELIAR, LA GERMINACIÓN DE CONIDIOS Y EL DESARROLLO DE INFECCIONES EN PLANTA DE NÍSPERO**

González-Domínguez, E., Martorell-Reig, A., Armengol, J., García-Jiménez, J.

Instituto Agroforestal Mediterráneo. Universidad Politécnica de Valencia, Camino de Vera s/n 46022, Valencia. Email: elgondo1@upvnet.upv.es

El moteado del níspero causado por el hongo *Fusicladium eriobotryae* es la principal enfermedad que afecta a este cultivo. Sin embargo, no existen estudios específicos acerca de su epidemiología. Por ello, se han realizado tres experimentos para conocer el efecto de la temperatura y la humectación sobre el crecimiento y la germinación de conidios de *F. eriobotryae* y su influencia en el desarrollo de infecciones en planta. En primer lugar, se evaluó el efecto de la temperatura (5, 10, 15, 20, 25, 30 y 35 °C) sobre el crecimiento miceliar de seis aislados de *F. eriobotryae*. Además, se estudió la germinación de los conidios de tres de estos aislados bajo diferentes condiciones de temperatura (5, 10, 15, 20, 25 y 30°C) y períodos de humectación (6, 12, 18, 24, 36 y 48 horas). Todos los aislados de *F. eriobotryae* fueron capaces de crecer a temperaturas comprendidas entre 5 y 25°C. Los aislados incubados durante un mes a 35°C murieron. Las temperaturas óptimas de crecimiento para todos los aislados se encontraron alrededor de los 20°C. Los conidios de *F. eriobotryae* fueron capaces de germinar a temperaturas comprendidas entre 5 y 30°C, alcanzándose el máximo porcentaje de germinación (58%) a 20°C tras 18 horas de humectación. En el caso de 5, 10 y 30°C la germinación no fue superior al 15% en ninguno de los casos, mientras que a 15 y 25°C se alcanzaron porcentajes cercanos al 50% tras 24 horas de humectación. Asimismo, se estudió el efecto de la temperatura y la duración del período de humectación en la severidad de las infecciones causadas por *F. eriobotryae* sobre plantas de níspero. Plantas de 6 meses de edad fueron inoculadas por pulverización con una suspensión de conidios (5×10^5 conidios/ml). Una vez inoculadas, las plantas fueron embolsadas e incubadas en fitotrón a cuatro temperaturas (10, 15, 20 y 25°C) y siete períodos de humectación (6, 12, 18, 24, 36, 48 y 60 horas), tras lo cual se mantuvieron en una cámara de incubación a condiciones óptimas (20°C; 60% HR; 12 horas de luz/12 horas de oscuridad) durante un mes. En cada una de las plantas se evaluó la severidad (porcentaje de superficie foliar afectada por planta). Las infecciones se desarrollaron sólo a 10, 15 y 20°C, alcanzándose las mayores severidades a 20°C, donde el porcentaje de superficie foliar afectada fue del 28% a las 24 horas y del 50% a las 60 horas. Estos resultados servirán para elaborar un modelo epidemiológico del moteado del níspero.

Proyecto financiado por la Cooperativa Agrícola de Callosa d'En Sarrià.

PAN-88

HONGOS DE LA MADERA ASOCIADOS AL DECAIMIENTO Y MUERTE DE ALMENDROS EN LA ISLA DE MALLORCA: NUEVAS PERSPECTIVAS EN LA EPIDEMIOLOGÍA DE HONGOS DE LA MADERA

Gramaje, D.¹, Agustí-Brisach, C.¹, Pérez-Sierra, A.¹, Moralejo, E.², Olmo, D.³, Mostert, L.⁴, Damm, U.⁵, Armengol, J.¹

¹Instituto Agroforestal Mediterráneo, UPV, Camino de Vera s/n, 46022-Valencia. ²Departamento de Biología (Área Botánica), Universitat de les Illes Balears, Carretera Valldemossa km 7,5, 07122 Palma de Mallorca.

³Laboratori de Sanitat Vegetal, Millora Agrària, Conselleria d'Agricultura, Medi Ambient i Territori, Govern Balear, C/d'Eusebi Estada 145, 07008 Palma de Mallorca.

⁴Department of Plant Pathology, University of Stellenbosch, Private Bag X1, Stellenbosch 7602, South Africa.

⁵CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre, Uppsalaalaan 8, 3584 CT Utrecht, The Netherlands.

E-mail: jarmengo@eaf.upv.es

Durante los años 2008 a 2010 se realizaron prospecciones en campos de almendro en la isla de Mallorca con síntomas de decaimiento y muerte de árboles. Se recogieron y procesaron muestras de ramas de almendro con necrosis interna y oscurecimiento vascular. Se realizaron aislamientos del material vegetal en medio MEAS. Las colonias obtenidas fueron identificadas mediante el estudio de sus caracteres morfológicos, crecimiento y aspecto en medio de cultivo, y mediante comparaciones de secuencias de los genes de la actina (ACT), b-tubulina (BT) y gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH), el factor de elongación y la región ITS. Los hongos encontrados fueron: *Botryosphaeria dothidea*, *Diplodia olivarum*, *D. seriata*, *Eutypa lata*, *Neofusicoccum australe*, *N. parvum*, *Phaeoacremonium iranianaum* y *Phomopsis amygdali*. La especie más frecuente fue *N. parvum*, seguida de *E. lata*, *D. olivarum* y *N. australe*. Este trabajo representa la primera cita de *D. olivarum* y *Pm. iranianaum* afectando a almendro. Además, el análisis del conjunto de datos de las secuencias multigénicas, junto con el estudio morfológico de los aislados, permitieron la identificación y descripción de dos nuevas especies fúngicas desconocidas hasta la fecha: *Collophora hispanica* sp. nov. y *Phaeoacremonium amygdalinum* sp. nov. Los resultados de este estudio muestran la diversidad de patógenos fúngicos asociados al decaimiento de madera en almendros en Mallorca. La mayoría de las especies aisladas han sido descritas como patógenas en otras especies del género *Prunus* y en otros cultivos como la vid, olivo y frutales de pepita. Por tanto, el almendro podría servir como fuente potencial de inóculo de hongos de la madera, lo cual tiene una gran implicación en su epidemiología y control.

PAN-89
GRUPOS DE APAREAMIENTO Y DIVERSIDAD GÉNÉTICA Y DE
VIRULENCIA DE *Togninia Minima* EN ESPAÑA

Gramaje, D.¹, Armengol, J.², Ridgway, H. J.³

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

²Instituto Agroforestal Mediterráneo, UPV, Camino de Vera s/n, 46022-Valencia.

³Plant Pathology Research Group, Faculty of Agriculture and Life Sciences, Lincoln University, PO Box 84, Lincoln 7647, New Zealand. E-mail: dgramaje@ias.csic.es

En este trabajo se estudió una colección de 58 aislados españoles de *Togninia minima* (anamorfo *Phaeoacremonium aleophilum*) obtenidos de plantas de vid con síntomas de Yesca y de la enfermedad de Petri. En ellos se estudiaron la distribución de grupos de apareamiento, la diversidad genética mediante análisis UP-PCR y la diversidad de virulencia mediante estudios de patogenicidad. Los aislados se aparearon en todas las combinaciones posibles, incluyendo auto-apareamientos, mediante suspensiones de conidios en medio de cultivo agar-agua con fragmentos de madera de vid estéril y fueron incubados a 22 °C con fotoperíodo. Al cabo de 28 días se observaron peritecios en la superficie de la madera de vid y en el agar. Los resultados mostraron un equilibrio en la frecuencia de los dos grupos de apareamiento (MAT-1 y MAT-2) en la población española de aislados de *T. minima*, mientras que se observaron diferencias entre provincias. Mediante el análisis con 7 cebadores UP-PCR se obtuvieron un total de 49 marcadores polimórficos. Los aislados se agruparon en cuatro grupos diferentes con porcentajes de similitud mayores del 82%. Los valores de diversidad génica y genotípica fueron similares entre subpoblaciones y variaron desde 0,24 a 0,27 y desde 27 a 33%, respectivamente. Los análisis de contrastes entre los grupos definidos por el estudio de UP-PCR mostraron diferencias significativas en la virulencia de aislados de *T. minima*. Los aislados pertenecientes al grupo 3 causaron mayor longitud de lesión que el resto de aislados. Los resultados de este estudio indican que la población de aislados de *T. minima* en España no presenta una elevada diversidad genética y hay pocas evidencias de división poblacional. Sin embargo, el elevado número de genotipos obtenido, junto con el equilibrio en la frecuencia de grupos de apareamiento sugiere que probablemente ocurra reproducción sexual entre los aislados. La detección de aislados genéticamente idénticos dentro y entre subpoblaciones sugiere que el fenómeno de reproducción asexual entre aislados no debería de ser excluido; por tanto, es más razonable concluir que la población española de *T. minima* está compuesta por una mezcla de individuos derivados de reproducción asexual y sexual. Financiado por el proyecto RTA2010-00009-C03-03 (INIA), cofinanciado con fondos FEDER.

**DIVERSIDAD GENÉTICO/PATOGÉNICA DE LAS POBLACIONES DE
Fusarium oxysporum f. sp. *dianthi* EN EL SUR DE ESPAÑA**

Gómez-Lama, C.¹, Valverde-Corredor, A.¹, Melero-Vara, J.M.¹, Pérez-Artés, E.¹

¹IAS-CSIC, Alameda del Obispo s/n Apartado 4084-14080 Córdoba, eperezartes@ias.csic.es.

Fusarium oxysporum f. sp. *dianthi* (Fod) es el agente causante de la fusariosis vascular del clavel, la enfermedad más importante de las que afectan a este cultivo en todo el mundo. Investigaciones anteriores con una colección de aislados de Fod, obtenida entre los años 1998 y 2003 de las principales zonas productoras de clavel en Andalucía, demostraron que existía diversidad genética dentro de las razas 1 y 2, y que dicha diversidad iba asociada a diferencias en virulencia. Con el objetivo de hacer un seguimiento de la diversidad presente en la población del patógeno, se han realizado nuevas prospecciones entre los años 2008 y 2012 en las principales áreas productoras de clavel de Andalucía (provincias de Cádiz y Sevilla). Cada año se tomaron muestras de suelos y plantas en invernaderos afectados, de las que se obtuvieron un total de 129 aislados monoconídicos de Fod. La raza y el Grupo molecular de cada aislado se determinó a partir de su ADN mediante reacciones multiplex-PCR con los iniciadores Ft3/R2.1/R8.1. Además, algunos de los aislados fueron utilizados en pruebas de patogenicidad con cultivares de clavel diferenciadores, para confirmar la identificación racial obtenida por métodos moleculares. Los resultados obtenidos demuestran la presencia de las razas 1 y 2 en todas las zonas prospectadas, y ponen de manifiesto que han ocurrido cambios en la diversidad de las poblaciones de Fod a lo largo del tiempo. En las zonas prospectadas de Cádiz y Sevilla se obtuvieron porcentajes similares de aislados de raza 1 tipo y raza 2 Grupo molecular I, tanto de plantas como de suelos. El porcentaje de aislados de raza 2 Grupo molecular II fue significativamente inferior, y además se reaislaban casi exclusivamente de suelos, y muy raramente de plantas. Estos datos demuestran un incremento de los aislados de raza 1 tipo en la zona, y una disminución de los aislados de raza 2 Grupo molecular II.

Este trabajo ha sido financiado por los Proyectos AGL2006-03252 y AGL2010-18279, y por incentivos al grupo PAIDI AGR-217 de la Junta de Andalucía.

PAN-91

ESTUDIO DE LA DIVERSIDAD GENÉTICA DEL BEGOMOVIRUS DE LA DEFORMACIÓN DE LA HOJA DEL TOMATE EN PERÚ

Martínez-Ayala, A.¹, Sánchez-Campos, S.¹, Márquez-Martín, B.¹, Aragón-Caballero, L.², Navas-Castillo, J.¹, Moriones, E.¹

¹Instituto de Hortofruticultura Subtropical y Mediterránea "La Mayora" (IHSM-UMA-CSIC), Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Estación Experimental "La Mayora". 29750 Algarrobo-Costa, Málaga. E-mail: moriones@eelm.csic.es.

²Facultad de Agronomía, Universidad Nacional Agraria La Molina, La Molina, Lima, Perú.

El virus de la deformación de la hoja del tomate (*Tomato leaf deformation virus*, ToLDeV), descrito recientemente por nuestro grupo, es el único begomovirus (género *Begomovirus*, familia *Geminiviridae*) descrito hasta el momento en Perú infectando cultivos de tomate. Los begomovirus son virus de DNA transmitidos por la mosca blanca *Bemisia tabaci* y que poseen genomas circulares de cadena sencilla (ssDNA) compuesto por una (monopartitos) o dos moléculas (bipartitos) denominadas DNA-A y DNA-B. Hasta el momento, para ToLDeV, a diferencia de la mayoría de los begomovirus presentes en América Latina, solamente se ha detectado la presencia de una única molécula de estructura similar al DNA-A en las infecciones. Dada la importancia de conocer la diversidad natural de un virus para el establecimiento de estrategias de control estables y duraderas, en este trabajo se ha estudiado la diversidad genética de ToLDeV en Perú. Se ha analizado la diversidad presente en muestras recogidas en Perú durante los años 2003 a 2010 en las principales regiones productoras de tomate (Lambayeque, La Libertad, Lima, Ica y Arequipa), tanto de tomate como de especies silvestres. Se ha estudiado un fragmento de unos 1.000 nt que contiene tanto zonas codificantes como no codificantes. Las secuencias obtenidas se han comparado con la secuencia del aislado de ToLDeV previamente descrita. Los resultados obtenidos muestran una amplia distribución de ToLDeV en todas las regiones productoras de tomate visitadas, estando presente tanto en tomate como en especies silvestres. Se detecta una diversidad genética que deberá ser tomada en cuenta de cara a su control.

PATOGENICIDAD Y ANÁLISIS RAPD DE AISLADOS DE *Fusarium oxysporum* DE SUELOS Y PLANTAS DE TABACO DE CÁCERES

Rodríguez-Molina, M.C.¹, Morales-Rodríguez, M.C.¹, Picón-Toro, J.¹, Palo, C., Osuna, M.D.¹, García-Gallego, A.¹, Iglesias, M.J.², García J. A.³

¹Centro de Investigación Agraria "Finca La Orden-Valdesequera", Gobierno de Extremadura. Finca La Orden. 06187 Guadajira (Badajoz). E-mail: carmen.rodriguez@juntaextremadura.net.

²Centro Universitario de Plasencia. Universidad de Extremadura. Avda. del Puerto 2, 10600 Plasencia (Badajoz).

³Centro Tecnológico Agroalimentario de Extremadura (CTAEX). 06195 Villafranco del Gadiana (Badajoz).

Desde su detección en 2001, la Fusariosis Vascular del tabaco se ha convertido en una enfermedad grave de este cultivo en Cáceres. *Fusarium oxysporum* f. sp. *batatas* se ha identificado como agente causal de la enfermedad, asociado a nematodos del complejo *Globodera tabacum*. Con el objeto de caracterizar las poblaciones de *F. oxysporum* de tabaco de esta zona se ha determinado la patogenicidad de una colección de 40 aislados procedentes de plantas de tabaco enfermas y de suelos de cultivo, y se ha realizado un análisis de la amplificación al azar del ADN polimórfico (RAPD) de los mismos.

Los aislados se inocularon en plantas de tabaco tipo Burley (cv. Tennessee-86) y tipo Virginia (cv. Ct-681) para la determinación de la raza de la forma especializada. Para el análisis RAPD se emplearon 20 primers de 10 pares de bases (Kit A. Operon Technology Inc.) y la agrupación de genotipos se realizó por el método de las medias aritméticas no ponderadas (UPGMA) mediante el programa NTSYS pc versión 2.2.

Todos los aislados procedentes de tabaco Virginia, excepto 2 no patógenos, pertenecían a la raza 2 de *F. oxysporum* f. sp. *batatas*. Todos los aislados de tabaco Burley, excepto 1 no patógeno, pertenecían a la raza 1. La mayoría de los aislados de suelo no fueron patógenos, pero 4 de ellos se asignaron a la raza 2. El análisis RAPD permitió separar los aislados en 2 clusters. El primero de ellos (C-I) incluía todos los aislados de tabaco Burley y la mayoría de los aislados no patógenos de suelo. El segundo (C-II) incluía los aislados patógenos de suelo y la mayoría de los de tabaco Virginia.

Los marcadores RAPD permitieron diferenciar los aislados de la raza 2 de los de la raza 1 y de los no patógenos aislados del suelo, y los resultados sugieren una importación reciente de la raza 2 en la zona de cultivo de tabaco en Cáceres.

Financiación: proyecto 2PR03B032, Grupo de Investigación GR10130 del Gobierno de Extremadura, fondos FEDER y Fondo Social Europeo.

**ESPECIFICIDAD PARASITARIA Y DIFERENCIACIÓN GENOTÍPICA
ENTRE AISLADOS DE *Phytophthora nicotianae***

Morales-Rodríguez, M.C., Picón-Toro, J., Palo, C., Palo, E.J., García-Gallego, A., Rodríguez-Molina, M.C.

Centro de Investigación Agraria "Finca La Orden-Valdesequera", Gobierno de Extremadura, Finca La Orden, 06187 Guadajira (Badajoz). Email: carmen.mrodriguez@juntaextremadura.net

P. nicotianae presenta 264 especies distintas de hospedadores naturales, número que se amplía hasta 301 si se consideran los hospedadores inoculados artificialmente; pero no implica que un aislado concreto sea patógeno de todas las especies de plantas que son hospedadores potenciales. Este trabajo tiene como objetivo la caracterización patogénica y molecular de aislados de *P. nicotianae* procedentes de plantas de pimiento y de tomate de dos zonas de cultivo de Extremadura: los valles del Tiétar y el Alagón en el caso del pimiento, y las vegas del Guadiana en el caso del tomate.

La caracterización patogénica se realizó mediante la inoculación de los aislados de *P. nicotianae* en plantas de pimiento y de tomate en tres estados de desarrollo: planta pequeña (2-4 hojas verdaderas), mediana (6-8 h.v.) y grande (10-12 h.v.). En ambos hospedadores se observó una resistencia relacionada con la edad de la planta, siendo el estado de planta pequeña el más susceptible a la enfermedad. Esta resistencia es aún más evidente cuando las plantas de tomate se inocularon con aislados procedentes de plantas de pimiento, que causaron enfermedad en plantas pequeñas de tomate, pero no en las plantas en estados de desarrollo más avanzados (planta mediana y grande). Los resultados obtenidos indicaron además, que los aislados de plantas de tomate se muestran más específicos en su patogenicidad que los de pimiento, ya que únicamente causaron enfermedad en plantas de tomate, especie de la que provienen. Se ponen así de manifiesto claras diferencias de patogenicidad, existiendo una tendencia a la especificidad parasitaria entre los aislados y su hospedador de procedencia.

El análisis de los marcadores RAPDs mostró una variabilidad genética entre los aislados estudiados, separando los aislados en dos grupos claramente diferenciados, los cuales se corresponden con el hospedador de procedencia.

De esta forma se diferencian patogénica y genotípicamente dos poblaciones en los aislados de *P. nicotianae* según el hospedador de origen.

Financiación: proyecto RTA 2008-00058-C03-02, Grupo GR10130 del Gobierno de Extremadura, fondos FEDER y Fondo Social Europeo.

PAN-94

DISTRIBUCIÓN EN LAS AGROZONAS ANDALUZAS DE LOS VIRUS QUE AFECTAN A PIMIENTO

Simón Martínez, A., García García, M. C., Pascual Aso, F., Ruiz García, M. L., Janssen, D., Cuadrado Gómez, I. M.

IFAPA Centro La Mojonera, Consejería de Agricultura y Pesca de la Junta de Andalucía, Camino de San Nicolás, 1, 04745 La Mojonera, Almería. Email: dirk.janssen@juntadeandalucia.es

En la Comunidad de Andalucía destaca el cultivo de pimiento con una superficie de 10.496 ha. La zona más importante de producción se sitúa en la franja costera de la provincia de Almería donde la mayoría de los cultivos se realiza en invernadero. El resto de provincias computan una superficie de pimiento que asciende a 3.441 ha, en su mayoría de cultivo al aire libre. En Andalucía hay distintas agrozonas de cultivo de pimiento (*Capsicum annuum* L.), correspondientes a distintas zonas geográficas que emplean diferentes sistemas de cultivo (invernadero y aire libre) y cultivares. El objetivo fundamental es conocer la distribución de enfermedades ocasionadas por los principales virus en los cultivos de pimiento en Andalucía. Para evaluar la distribución de estas enfermedades, se ha procedido al desarrollo de prospección de campo dirigida a la toma de muestras en las provincias de Andalucía. Se han prospectado 71 municipios andaluces, comprendiendo las 18 agrozonas más relevantes en la producción de pimiento. Se han recopilado 297 muestras de material vegetal, representativas de un 2,71% de la superficie total de cultivo de pimiento andaluza. Todas las muestras han sido analizadas en el laboratorio mediante E.L.I.S.A. para la detección de TSWV, CMV, ToMV, PMMoV, TMGMV y PVY, y RT-PCR para PMoV. El virus prevalente en Almería, Granada y Cádiz es TSWV, mientras que en Sevilla, Córdoba y Jaén es CMV. En Málaga tienen similar incidencia TSWV y CMV. En Huelva no se ha detectado ninguno de los virus estudiados. ToMV solo se ha detectado en Málaga, y PVY y PMMoV en Sevilla. Por último, destaca PMoV en Almería y Granada. En el sureste andaluz las técnicas de producción que emplean la protección bajo plástico favorecen el potencial biótico para el desarrollo de plagas transmisoras de virosis, especialmente en el patosistema TSWV-*F. occidentalis*-pimiento, resultando a nivel global TSWV el virus con mayor relevancia.

Este estudio ha sido financiado por el proyecto INIA-FEDER: RTA09-00016-00-00.

PAN-95

ANÁLISIS DE LA TRANSMISIBILIDAD POR MOSCA BLANCA DE DOS IPOMOVIRUS, *Cucumber vein yellowing virus* Y *Sweet potato mild mottle virus*

Vilaplana, Ll. ¹, Tovar, R. ², Navas-Castillo, J. ², López-Moya, J.J. ¹

¹ Centre de Recerca en Agrigénomica, CRAG, CSIC-IRTA-UAB-UB, edifici CRAG Campus UAB Bellaterra, Cerdanyola del Vallès, 08193 Barcelona.

Email: juanjose.lopez@cragenomica.es

² Instituto de Hortofruticultura Subtropical y Mediterránea "La Mayora" (IHSM-UMA-CSIC), 29750 Algarrobo-Costa, Málaga.

Dentro de la familia *Potyviridae*, el género *Ipomovirus* incluye por el momento cuatro especies de virus. El virus tipo del género es el virus del moteado suave de la batata, *Sweet potato mild mottle virus* (SPMMV), descrito inicialmente como transmisible por *Bemisia tabaci*. La organización genómica de SPMMV es similar a la de otros miembros de la familia, incluyendo la presencia de una proteína HCPro, aunque se desconoce exactamente qué funciones desempeña este producto durante el ciclo del virus. De hecho, la función de supresión de silenciamiento génico de SPMMV se localiza en la proteína P1 y tiene un modo de acción que difiere del descrito para otros supresores virales. Dentro del género *Ipomovirus* se incluyen virus con distinta estructura genómica, en concreto el virus del amarilleamiento de las venas del pepino, *Cucumber vein yellowing virus* (CVYV), que carece de región HCPro y cuyo supresor es la proteína P1b.

Con objeto de comparar la transmisibilidad por *B. tabaci* de SPMMV y CVYV, se han realizado experimentos de transmisión en paralelo con sendos aislados de cada virus. Mientras que el aislado de CVYV se transmitía de forma eficiente, no fue posible transmitir el aislado africano 130 de SPMMV, a pesar de emplear diferentes condiciones experimentales, combinaciones de plantas huéspedes de ensayo y biotipos de mosca blanca. La secuenciación completa del genoma de SPMMV-130 puso de manifiesto una estructura genómica similar a la del genoma de referencia previamente descrito. El seguimiento mediante RT-PCR de secuencias virales dentro de la mosca blanca tampoco sirvió para identificar diferencias después de distintos períodos de adquisición entre insectos alimentados sobre plantas infectadas con CVYV o con SPMMV. En el caso de CVYV, la duración de las etapas del proceso sugiere una relación de tipo semipersistente y se observó que la tasa de transmisión se correlacionaba de forma positiva con el número de vectores y con el tiempo de adquisición. Las diferencias biológicas en transmisión entre SPMMV y CVYV podrían tener implicaciones en la taxonomía del género *Ipomovirus* y también deberían ser tenidas en cuenta en los programas de control de estas virosis. Financiación a cargo de AGL2010-14949 (PN de I+D+i) y 2009SGR-09626 (Generalitat de Catalunya).

***Biscogniauxia nummularia*: PATÓGENO EN HAYEDOS Y ENDÓFITO EN PASTOS DE LA SIERRA DE URBASA**

Canals, R. M.¹, Pedro, J.¹, Gómez, J.², Zabalgogeoazcoa, I.¹

¹*Departamento de Producción Agraria. Universidad Pública de Navarra. Campus Arrosadía s/n. 31006 Pamplona*

²*Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología, IRNASA-CSIC. Apartado 257, 37071 Salamanca.*

Carex brevicollis (Cyperaceae) es una planta herbácea común en las praderas y el sotobosque de hayedos de la sierra de Urbasa (Navarra). Esta planta es tóxica debido a su contenido del alcaloide brevicolina y causa trastornos en ganado. En un censo de hongos endófitos de *C. brevicollis* en esta zona se identificó a *Biscogniauxia nummularia* como la especie dominante de la micobiota endofítica, siendo aislado este hongo del 80% de las plantas analizadas.

El ascomiceto *B. nummularia* (Xylariaceae) es un hongo saprófito y patógeno del haya (*Fagus sylvatica*). Sus infecciones están asociadas a la formación de chancros en ramas, en las que fructifica formando estromas. Los daños más importantes causados por este hongo se correlacionan con episodios de estrés abiótico como sequía y altas temperaturas.

Tras la identificación de *B. nummularia* en plantas de *C. brevicollis* simpátricas con hayas, se ha comprobado que este hongo está presente y fructifica en hayas de la sierra de Urbasa. Un análisis morfológico y molecular de cultivos no ha detectado diferencias entre los aislados de haya y los de *C. brevicollis*.

Estos resultados indican que las ascoesporas de *B. nummularia* producidas y dispersadas por estromas en ramas y troncos de haya podrían infectar eficientemente y de manera asintomática las plantas de *Carex*, en las que se convierte en un endófito dominante. Se desconoce si *B. nummularia* puede esporular en plantas de *Carex*, de ser así los hayedos estarían rodeados de un importante reservorio de inóculo de un patógeno potencialmente dañino en situaciones de estrés abiótico.

PAN-97
PATOGENICIDAD DE *Neofusicoccum parvum* EN ESPECIES
FORESTALES NATIVAS Y EXÓTICAS DEL PAÍS VASCO

Quaglia, F.¹, Mesanza, N.², Berta, G.¹, Iturrutxa, E.²

Universita Degli Studi Del Piemonte Orientale Amedeo Avogadro. Italy.
Neiker tecnalia. Granja Modelo de Arkaute. Apartado 46. CP 01080 Vitoria
Álava.

Uno de los grupos más comunes de hongos causantes de chancros en *Eucalyptus* es el de las Botryosphaeriaceae.

Neofusicoccum parvum/ *Neofusicoccum ribis* es un complejo de especies que engloba los miembros más agresivos de las Botryosphaeriaceae.

Neofusicoccum parvum ha sido identificado como agente causal de chancro en *Eucalyptus globulus* in el País Vasco.

En este estudio se estima los niveles de susceptibilidad de las especies arbóreas más frecuentes, nativas y exóticas, colindantes a plantaciones de eucaliptos afectados por esta enfermedad.

Quercus robur, *Castanea sativa*, *Eucalyptus globulus* y *E. nitens* resultaron ser especies altamente sensibles a esta enfermedad con lesiones medias de 9,30±1,88 cm de longitud en *Castanea sativa*, 7,64±2,21 cm de longitud en *Eucalyptus* y 6,42±2,67 en *Quercus robur*.

Su distribución resulta ser bastante amplia y el impacto en plantaciones de *Eucalyptus* está incrementando en los últimos años. La determinación del potencial riesgo de infección de las especies forestales exóticas y nativas es un paso previo al planteamiento de estrategias de prevención y control de la dispersión de la enfermedad.

Palabras Clave: Chancro, *Eucalyptus*, *Neofusicoccum*

PAN-98
DISTRIBUCIÓN DE *Cryphonectria Parasitica* Y PRESENCIA DE
HIPOVIRULENCIA EN CASTILLA Y LEÓN

Zamora, P., Martín, A. B., Rigling, D., Diez, J. J.

¹*Centro de Sanidad Forestal de Calabazanos, Consejería de Medio Ambiente, JCyL, Polígono de Villamuriel, 34190, Villamuriel de Cerrato, Palencia Spain*

²*Departamento de Producción Vegetal y Recursos Forestales, ETSIAA Palencia, University of Valladolid, Madrid, Palencia. Spain*

³*WSL Swiss Federal Research Institute, Birmensdorf, Switzerland*

En Castilla y León se analizaron aislados de *Cryphonectria parasitica* de 44 localidades dentro de las provincias de León, Zamora, Salamanca y Ávila, obteniendo su grupo de compatibilidad vegetativa, mating type y presencia de hipovirus 1 (CHV1). Los 1232 aislados analizados se clasificaron dentro de 11 grupos vegetativos diferentes, cinco de ellos coincidentes con los grupos establecidos dentro de la colección europea (EU1, EU11, EU12, EU28 y EU66) y seis grupos nuevos (CL4, CL5, CL6, CL8, CL9 y CL10). El número de grupos compatibles diferentes dentro de cada provincia varió entre dos y siete. El tipo compatible EU11 se encontró en todas las provincias y supuso el 48,9% de los aislados totales mientras que EU1 se detectó en tres de las provincias muestreadas (39,1% de los aislados). Los grupos EU12, EU66, CL5 y CL6 aparecieron en una o dos provincias con un porcentaje de aislados entorno al 3%. El resto de los grupos vegetativos aparecieron de forma puntual. El mating type más abundante fue Mat-1 en las provincias de León y Ávila mientras que en Salamanca y Zamora se encontraron los dos, Mat-1 y Mat-2. Entre los aislados analizados solo se encontraron catorce aislados hipovirulentos, nueve del grupo compatible EU1 y cinco del EU11. Todos los aislados hipovirulentos se encontraron en la provincia de León y presentan el hipovirus francés CHV-F1.

EFFECTO DE LA FRECUENCIA DE RIEGO EN LA VERTICILOSIS DEL OLIVO

Pérez-Rodríguez, M.¹, Serrano, N.², Arquero, O.², Lorite, I.², Orgaz, F.³, López-Escudero, F. J.¹.

¹Departamento de Agronomía, Universidad de Córdoba, Campus Universitario Rabanales, 14071, Córdoba; ²IFAPA, e ³Instituto de Agricultura Sostenible, CSIC, Alameda del Obispo, 14080 Córdoba.

El incremento de las infecciones de la Verticilosis del olivo (VO), causada por *Verticillium dahliae*, parece estar relacionado con el incremento del riego en las plantaciones de olivar. El objetivo de este trabajo es determinar la influencia de la frecuencia del riego en el desarrollo de VO en condiciones semicontroladas. En Octubre (2011) se estableció un recinto de microparcelas (MP) resguardadas de la exposición solar y de la lluvia. Éstas se rellenaron con suelo infestado naturalmente con *V. dahliae* (10 propágulos por gramo de suelo) de las marismas del Guadalquivir (Utrera, Sevilla). Se plantaron 9 plantas por MP y cultivar, de 9 meses de edad de 'Picual' (susceptible), 'Frantoio' (moderadamente resistente) y 'Arbequina' (moderadamente susceptible), con 3 MP por cultivar y tratamiento. Cada MP se riega mediante una tubería principal con 6 ramales portagoteros, separados 16,5 cm, y 36 goteros autocompensantes de 2 l/h, distribuidos homogéneamente por todos los ramales. Se han incluido 4 tratamientos de frecuencia de riego: 1) diario (T1), quincenal (T2), mensual (T3) y deficitario (T4). La cantidad de agua a aplicar en cada tratamiento se determina según un plan de riego en función de los valores de contenido de humedad del suelo y de sus características hidráulicas, Capacidad de Campo (CC) y Punto de Marchitez Permanente (PMP) en función de sensores de contenido de humedad, empleando el parámetro "Relative soil water deficit" (RSWD). En T1 (RSWD = 0) y T2 (RSWD = 0.4), el valor de este parámetro no implica que la fisiología de la planta pueda verse afectada durante el experimento. Sin embargo, en T3 (RSWD = 0.6), y T4 (RSWD= 0.9) sí se prevén trastornos fisiológicos. Durante el periodo de estudio se están realizando observaciones: 1) fitopatológicas (severidad de síntomas, incidencia, mortalidad, infecciones, evolución de la densidad de inóculo del patógeno en el suelo) y 2) fitotécnicas (índices de detección precoz de la enfermedad, evolución del estado vegetativo y productivo de las plantas enfermas en relación al contenido de humedad del suelo). Los primeros síntomas de la enfermedad ya han aparecido durante el mes de Mayo en plantas de 'Picual'.

Trabajo financiado por el acuerdo entre la Universidad de Córdoba, CITOLIVA y la Interprofesional del Aceite de Oliva Español (UG 400544).

COMPARACIÓN DE LA POBLACIÓN DE *Verticillium dahliae* EN SUELO Y EN ÁRBOLES INFECTADOS EN PLANTACIONES DE OLIVO

Trapero C.¹, Raya-Ortega, C.¹, Valverde-Corredor, A.², Mercado-Blanco, J.²
López-Escudero F.J.¹

¹Departamento de Agronomía, Universidad de Córdoba, Campus Universitario de Rabanales, Edificio Celestino Mutis (C4), 14071 Córdoba,

²Departamento de Protección de Cultivos, Instituto de Agricultura Sostenible, Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), Alameda del Obispo s/n, 14080 Córdoba.

La Verticilosis de olivo (VO), causada por *Verticillium dahliae*, causa severas pérdidas económicas en este cultivo. Una de las causas es el incremento de las infecciones por aislados virulentos del patógeno (D) (patotipo defoliante), frente a los cuales no hay cultivares resistentes hasta el momento. En los 80, los aislados D estaban localizados en las marismas del valle del Guadalquivir. En las décadas siguientes, probablemente debido al cultivo del algodón y a la dispersión por material vegetal de olivo infectado, los aislados D se han dispersado a lo largo de todo el valle. El objetivo del trabajo fue comparar la virulencia de las poblaciones de *V. dahliae* residentes en suelos de plantaciones experimentales de olivo afectadas por VO en las que se está evaluando resistencia de cultivares, con aquéllas obtenidas de árboles infectados en dichas plantaciones. Evaluamos la hipótesis de si tiene lugar una selección de aislados de acuerdo a su virulencia. Objetivos adicionales de este estudio fueron determinar la influencia de la resistencia del cultivar en esa selección y examinar la posible existencia de aislados no virulentos de *V. dahliae* en suelo. La primera plantación se estableció en Utrera (Sevilla), en 2009, con 500 árboles distribuidos en 6 bloques en una parcela donde se determinó una densidad de inóculo (DI) de 21 propágulos por gramo de suelo. Se tomaron muestras de suelo aleatoriamente, obteniendo colonias microesclerociales en placas de APSM (método del tamizado húmedo) y se obtuvieron aislados transfiriendo microesclerocios individuales a PDA. Los aislados procedentes de la parte aérea de las plantas se obtuvieron mediante aislamientos microbiológicos en PDA a partir de tejidos de árboles infectados. Se obtuvieron sendas colecciones de 120 aislados procedentes de suelo y de parte aérea. El 96% de los aislados de suelo se caracterizaron como patotipo D mediante análisis PCR. Por su parte, el 100% de los aislados de parte aérea eran del patotipo D. Estos resultados sugieren una posible selección a favor de aislados D existentes en suelo. En la actualidad se está efectuando un estudio similar en una plantación experimental de las mismas características en Andujar (Jaén), aunque con menor DI.

Trabajo financiado por AGL 2011-30137 del Ministerio de Ciencia e Innovación, cofinanciado por fondos FEDER de la UE.

PAN-101

RELACIÓN ENTRE LAS DENSIDADES INICIALES DE POBLACIÓN Y LA TASA DE MULTIPLICACIÓN DE *Meloidogyne javanica* EN SANDÍA

Blanco, M., López-Gómez, M.F., Verdejo-Lucas, S.

IRTA. Protección Vegetal Sostenible. Ctra. de Cabriels Km 2. 08348, Cabriels (Barcelona). E-mail: soledad.verdejo@irta.cat

El daño producido por *Meloidogyne* en las raíces hace que se reduzca la absorción de nutrientes y agua produciéndose una pérdida de producción. La sandía, perteneciente a la familia de las Cucurbitáceas, es susceptible al ataque de *Meloidogyne*. El objetivo de este estudio fue determinar la relación entre la población inicial de nematodo (P_i) y i) la tasa de multiplicación del nematodo (Población final / Población inicial; P_f/P_i), ii) la biomasa aérea y radical. Se infectaron plantas de sandía con 14 niveles crecientes de P_i : 0, 0.062, 0.125, 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128 y 256 huevos + juveniles (J2) por cm^3 de suelo de *M. javanica*. Se prepararon 7 repeticiones por tratamiento en 1 litro de arena esterilizada y las plantas se mantuvieron en invernadero. Se realizaron dos experimentos: el primero (Exp. 1) se cosechó a los 84 días post inoculación (dpi), y el segundo (Exp. 2) a los 64 dpi. Los resultados indicaron que la tasa de multiplicación máxima del nematodo se obtuvo para valores de P_i de 2 (Exp. 1) y 0.062 (Exp. 2) huevos + J2/ cm^3 de suelo. Esta tasa disminuyó conforme aumentaba la P_i , llegando a mínimos de P_f/P_i para los valores máximos de P_i . Respecto a la relación entre la P_i y la biomasa se utilizó la ecuación de Seinhorst: $Y = m + (1 - m)^{Z(P - T)}$ siendo m la producción mínima del cultivo, Z la tasa de saturación, P la P_i y T el límite de tolerancia del cultivo. En este estudio, los valores del límite de tolerancia de la sandía al ataque de *M. javanica* fueron 49 (Exp. 1) y 54 (Exp. 2) huevos + J2/ cm^3 de suelo aunque apenas se encontró diferencias entre la P_i y la biomasa aérea.

Financiado por INIA RTA2010-00017-C02-01. López-Gómez recibe financiación de INIA para la realización de su tesis doctoral.

**ANÁLISIS DE EXPRESIÓN DE GENES RELACIONADOS CON LA
RESPUESTA AL ESTRÉS POR OLIGOTROFIA A TEMPERATURAS
AMBIENTALES EN *E. amylovora***

Santander, R. D.^{1,2}, Oliver, J. D.², Biosca, E. G.¹

¹Universidad de Valencia, Departamento de Microbiología y Ecología, Avenida Dr. Moliner 50, 46100, Burjassot, Valencia. E-mail: elena.biosca@uv.es.

²Universidad de Carolina del Norte en Charlotte, Departamento de Biología, 9201 University City Blvd., Charlotte, NC, 28223, USA.

Erwinia amylovora es el agente etiológico del fuego bacteriano de las rosáceas. Al igual que ocurre en otros patógenos, su persistencia en la naturaleza depende de su habilidad para adaptarse a variaciones en distintos factores ambientales. *E. amylovora* responde a la escasez de nutrientes, característica de la mayoría de ambientes naturales, adoptando el estado fisiológico de supervivencia en inanición y/o el estado viable no cultivable (VNC). La inducción de una u otra estrategia se ve influenciada por la temperatura. Estas respuestas de supervivencia constituyen estados fisiológicos diferentes, lo que podría reflejar distintas respuestas moleculares a la oligotrofia, aún poco caracterizadas en este patógeno. El objetivo de este trabajo ha sido investigar la expresión de genes relacionados con la respuesta de supervivencia en inanición (*rpoS*, *cstA*, *dps*) y el estado VNC (*oxyR*, *katA*, *katG*), así como genes de virulencia/patogenicidad (*hrpL*, *rcsB*, *rlsA* y *dfoA*) en células de *E. amylovora* expuestas a condiciones de oligotrofia a temperaturas ambientales. Para ello, se inocularon por separado microcosmos de agua natural con dos cepas de *E. amylovora* y se incubaron a 22°C y 37°C, para inducir su entrada en los estados de supervivencia en inanición y VNC, respectivamente. La expresión de los genes de interés se analizó periódicamente mediante RT-PCR, usando como control interno el gen *rrs*. En paralelo, se realizó un seguimiento de la cultivabilidad y la viabilidad de las poblaciones inoculadas, así como de su patogenicidad en frutos inmaduros. Los resultados iniciales mostraron una disminución generalizada de la expresión durante las primeras 24 h en células en estado de inanición a 22°C, estabilizándose después en niveles basales y coincidiendo con el mantenimiento de la cultivabilidad y la patogenicidad. La incubación a 37°C indujo un descenso pronunciado de la expresión de todos los genes (excepto del control interno), que fue paralelo a la entrada en el estado VNC y a la pérdida de patogenicidad, y que cayó por debajo de los niveles de detección cuando todas las células adoptaron el estado VNC. En conjunto, los resultados de este trabajo han permitido iniciar la caracterización de las respuestas de *E. amylovora* a condiciones naturales de oligotrofia, aportando nuevos datos sobre la biología de este patógeno en el medio natural.

Este trabajo ha sido financiado por los proyectos AGL2008-05723, UV-INV-AE 112-66196 y NCW-2011-02772 (USA).

PAN-103

ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS DE LA MANCHA MARRÓN DE LAS MANDARINAS CAUSADA POR *Alternaria alternata* EN CONDICIONES DE CLIMA MEDITERRÁNEO

Bassimba, D.D. M., Mira, J.L., Vicent, A.

Centro de Protección Vegetal y Biotecnología. Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA). Apdo. Oficial, Moncada 46113, Valencia.
Email: avicent@ivia.es

La mancha marrón de las mandarinas causada por un patotipo de *Alternaria alternata* (Fr.) Keissl. es un factor limitante para el cultivo de variedades comerciales como Fortune, Nova, y algunos híbridos de nueva implantación. La enfermedad está ampliamente distribuida en las zonas citrícolas de la cuenca Mediterránea, pero apenas existen estudios sobre su epidemiología en condiciones de clima semiárido. En 2011 se inició un estudio para caracterizar la epidemiología de la mancha marrón en las parcelas experimentales del IVIA. Se siguió la dinámica semanal de los conidios de *Alternaria* en aire con un captador de esporas y se realizaron exposiciones de placas con medio selectivo ARSA. Se determinó la presencia de inóculo en las hojas y brotes de los árboles afectados, en las malas hierbas y la hojarasca del suelo. Para el seguimiento de las infecciones se utilizaron plantas trampa de Fortune y Nova, con diferente grado de sensibilidad a la enfermedad. Las variables meteorológicas se registraron con una estación automática. Se detectó la presencia de conidios de *Alternaria* de forma continua durante todo el período de estudio. No obstante, sólo un 5% de los aislados de *Alternaria* obtenidos en la exposición de placas se identificaron como pertenecientes al patotipo causante de la enfermedad. Las hojas y brotes afectados constituyeron la principal fuente de inóculo, detectándose entre un 15-76% de aislados patógenos. En nuestras condiciones, la supervivencia del hongo en la hojarasca de suelo fue mucho mayor que la descrita en Florida, probablemente debido a las diferencias pluviométricas entre ambas zonas. La presencia de inóculo en las malas hierbas fue testimonial. Las infecciones en las plantas trampa se produjeron principalmente en los meses de Mayo-Junio y Septiembre-Octubre, con una incidencia variable entre 26-63% en Fortune y el 13-15% en Nova. Se detectó una correlación significativa entre la incidencia de la enfermedad en las plantas trampa y la lluvia, pero no así con la duración de los períodos de humectación. Los resultados obtenidos permiten concluir que las lluvias primaverales y otoñales determinan en gran medida el desarrollo epidémico de la enfermedad en nuestras condiciones de clima Mediterráneo.

Trabajo financiado por el Proyecto INIA RTA2010-00105-00-00.

**EPIDEMIOLOGÍA Y CONTROL DE LA MANCHA GRASIENTA DE LOS
CÍTRICOS CAUSADA POR *Mycosphaerella citri* EN PANAMÁ**

Aguilera-Cogley, V.¹, Vicent, A.²

¹Laboratorio de Protección Vegetal. Instituto de Investigaciones Agropecuarias de Panamá (IDIAP). Los Canelos – Santa María, Panamá.

²Centro de Protección Vegetal y Biotecnología. Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA). Apdo. Oficial, Moncada 46113, Valencia.
Email: avicent@ivia.es

La mancha grasienta o "greasy spot" causada por *Mycosphaerella citri* Whiteside es la principal enfermedad fúngica de los cítricos en Panamá. En condiciones climáticas favorables, causa la defoliación anticipada de los árboles, acompañada de una reducción del vigor y disminución de la producción y el tamaño de los frutos. La eficacia de las estrategias de control es muy errática, debido principalmente a la falta de información epidemiológica de la enfermedad en las condiciones particulares de Panamá. En marzo de 2011 se inició un estudio en una parcela de naranja cv. Valencia en la región central de Coclé, fuertemente afectada por la enfermedad. Se delimitó un área experimental donde se instaló un capturador de esporas para seguir la evolución semanal de las ascosporas de *M. citri* en el aire. La dinámica del inóculo en la hojarasca del suelo se cuantificó mediante muestreos semanales y posterior extracción de las ascosporas en un túnel de viento. La evolución de las infecciones se determinó mediante la exposición semanal de plantas trampa, y posterior evaluación de la severidad de los síntomas en invernadero. Las variables meteorológicas se registraron con una estación automática situada en el margen de la parcela. Paralelamente al estudio epidemiológico, se realizaron dos ensayos de control donde se evaluó la eficacia de una estrategia de tratamientos de fenbuconazol aplicados en función de los datos epidemiológicos. La mayor cantidad de ascosporas de *M. citri* en el aire se detectó durante los meses de marzo, abril y mayo, disminuyendo notablemente a partir de junio hasta mediados de noviembre. Respecto al inóculo potencial, la mayor cantidad de ascosporas en la hojarasca se detectó durante los meses de marzo y abril. La intensidad síntomas en las plantas trampa fue variable, observándose una mayor severidad de daños durante los primeros meses de evaluación. La pluviometría durante el período de estudio fue muy elevada, observándose una correlación negativa con la producción de inóculo debida a la descomposición de la hojarasca. Las aplicaciones de fenbuconazol redujeron significativamente en el porcentaje de hojas afectadas respecto al testigo sin tratar.

Trabajos financiados parcialmente por el Programa de Formación del Sistema de los INIA de Iberoamérica.

PAN-105

EFFECTO ANTAGONICO DEL VIRUS DEL BRONCEADO DEL TOMATE (TSWV) EN LA INFECTIVIDAD EN HABA POR EL VIRUS DEL MARCHITAMIENTO DEL HABA (BBWV-1)

Ferriol, I.¹, Debreczeni, D.E.¹, Puchades, A.V.¹, Luis Rubio, L.¹

¹Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA), 46113 Moncada, Valencia. E-mail: elvirafw2002@yahoo.com.

En los ecosistemas naturales y en los cultivos agrícolas se encuentran con frecuencia plantas con infecciones mixtas de dos o varios virus. En algunos casos, dependiendo del tipo de huésped y los virus puede ocurrir un efecto sinérgico o antagónico que produce un aumento o disminución de la intensidad de los síntomas y/o de la acumulación de alguno o varios virus coinfectantes.

La inoculación del virus del bronceado del tomate (*Tomato spotted wilt virus*, TSWV) en haba (*Vicia faba*) induce lesiones locales en la zona inoculada. Se trata de un mecanismo de defensa de la planta en el que tras el reconocimiento del patógeno se produce la necrosis o muerte programada de las células inicialmente infectadas y de aquellas que las rodean con el fin de confinar el virus y evitar su dispersión a través de la planta. Por otra parte, la inoculación del virus 1 del marchitamiento del haba (*Broad bean wilt virus 1*, BBWV-1) produce una infección sistémica apareciendo una clorosis en las hojas al cabo de 10 a 12 días.

En este trabajo se realizó un ensayo en el que se inocularon grupos de 20 plantas de haba a los 10 y/o 14 días después de sembrar: (I) TSWV a los 10 días, (II) BBWV-1 a los 10 días, (III) coinoculación de BBWV-1 y TSWV a los 10 días, (IV) BBWV-1 a los 10 días y TSWV a los 14 días, (V) TSWV a los 10 días y BBWV-1 a los 14 días, (VI) BBWV-1 a los 14 días, (VII) TSWV a los 14 días, y (VIII) coinoculación de BBWV-1 y TSWV a los 14 días. Para detectar y cuantificar ambos virus tanto en el inóculo como en las plantas inoculadas se utilizó DAS-ELISA y RT-PCR en tiempo real. TSWV no se detectó en las hojas apicales de ninguna planta, lo que indica que la infección de BBWV-1 no produce ningún efecto en la infección de TSWV en haba. La tasa de infección de BBWV-1 fue elevada ($\geq 80\%$) en plantas inoculadas solamente con este virus o cuando TSWV fue inoculado 4 días más tarde. Sin embargo ésta disminuyó cuando BBWV-1 se inoculó 4 días después que TSWV y decreció drásticamente en las plantas coinoculadas simultáneamente con ambos virus ($\leq 15\%$). Todas las plantas infectadas manifestaron síntomas similares mientras que las plantas no infectadas permanecieron asintomáticas. Finalmente se encontró que TSWV no tuvo ningún efecto apreciable en la acumulación de BBWV-1 en las hojas apicales de las pocas plantas preinoculadas o coinoculadas con TSWV que resultaron infectadas por BBWV-1.

PRODUCCIÓN DE MICROESCLEROCIOS DE *Verticillium dahliae* PARA LA INFESTACIÓN ARTIFICIAL DEL SUELO

Varo, A., Raya, M.C., Roca, L. F., Lozano, M.D., Traperó, A

Dpto. Agronomía (Patología Agroforestal), Universidad de Córdoba. Campus de Rabanales, Edificio C-4, 14071, Córdoba. E-mail: g22vasua@uco.es

La Verticilosis causada por el hongo *Verticillium dahliae* Kleb. se ha convertido en una grave amenaza para el olivar en los últimos años. Los microesclerocios (*me*) formados por *V. dahliae* constituyen las estructuras infectivas y de resistencia del patógeno, permaneciendo viables en el suelo durante años. En la actualidad, la principal limitación para el estudio de aspectos epidemiológicos y de control de la verticilosis radica en la falta de un método eficaz de inoculación de plantas, que reproduzca las condiciones naturales de infección, para lo cual, la producción masiva de *me* para la infestación artificial del suelo es de crucial importancia.

El objetivo del presente trabajo fue evaluar la capacidad formadora de *me* de 4 aislados de *V. dahliae* (V-004, V-024, V-025, V-117) representativos de la micoteca del grupo de Patología Agroforestal de la Universidad de Córdoba. Para ello, se caracterizó el crecimiento de estos aislados a distintas temperaturas (5, 10, 15, 20, 25, 30 y 35°C) y paralelamente se contabilizó el número y tamaño de los microesclerocios producidos en 4 medios de cultivo sólidos (PDA, PDA diluido al 10%, PDA-celofán y Medio Mínimo) y 2 medios líquidos en agitación continua (SSN y Czapek-Dox), una vez transcurrido 30 días de incubación.

El crecimiento de los aislados entre 0 y 30°C se ajustó perfectamente al modelo Beta de Analytis, existiendo interacción significativa entre aislado y temperatura que se reflejó en diferentes curvas de crecimiento para los aislados. La temperatura óptima osciló entre 20 y 23°C y la tasa máxima de crecimiento entre 1.19 y 1.76 mm/día, siendo la temperatura de 25°C la que determinó mayores diferencias entre aislados. A 25°C, la ordenación de los aislados por su crecimiento fue: V117 > V004 = V025 > V024. La producción de *me* dependió de la interacción entre aislado y medio de cultivo. El aislado V117 sólo produjo *me* en Czapek-Dox (2.2×10^3 *me*/ml), mientras que los tres aislados restantes los produjeron en todos los medios ensayados. Para estos tres aislados, el medio PDA diluido fue el más homogéneo (tamaño de *me* 27-150 μ m) y el más productivo para el aislado V024 (2.3×10^3 *me*/ml); sin embargo, para los aislados V025 y V004, el Medio Mínimo resultó en la mayor producción de *me*/ml, con 91.2×10^3 y 17.4×10^3 , respectivamente.

Los medios Czapek-Dox Agar y PDA diluido están siendo utilizados para la producción masiva de microesclerocios destinados a la infestación artificial del suelo con diferentes aislados de *V. dahliae*.

PAN-107

GERMINACIÓN DE BELLOTAS DE *Quercus ilex* EN SUELOS INFESTADOS POR *Phytophthora quercina*, *P. gonapodyides* Y *P. cinnamomi*

Solla, A.¹, Miranda, J.¹, Corcobado, T.¹, Martín-García, J.¹, Cubera, E.¹, Pérez, A.¹, Pérez-Sierra, A.², Jung, T.^{1,3}

¹Ingeniería Forestal y del Medio Natural, Universidad de Extremadura, Avenida Virgen del Puerto 2, 10600 Plasencia. E-mail: asolla@unex.es

²Phytophthora Research and Consultancy, Thomastrasse 75, 83098 Brannenburg, Germany.

³Instituto Agroforestal Mediterráneo, Universitat Politècnica de València, Camino de Vera s/n, 46022 Valencia.

Son varias las especies de *Phytophthora* que originan decaimiento de la encina (*Quercus ilex*) en España, entre ellas *P. cinnamomi*, *P. quercina* y *P. gonapodyides*. La falta de regeneración natural de la encina es motivo actual de gran preocupación en el entorno forestal, y apenas existe información sobre los efectos de estos tres patógenos en la viabilidad o germinación de las bellotas y el posterior establecimiento de las plántulas en suelo infestado. Se pretende (i) cuantificar la germinación y supervivencia de *Q. ilex* en suelos infestados por tres especies diferentes de *Phytophthora*, y (ii) detectar posibles diferencias de germinación y supervivencia entre distintas procedencias. En diciembre de 2011 se recolectaron y almacenaron bellotas de 16 procedencias distintas, incluyéndose frutos de España, Portugal, Italia y Marruecos. En febrero de 2012 se sembraron las bellotas a 1 cm de profundidad en bandejas conteniendo una mezcla de arena y turba (1:1), y un 5% (vol) de inóculo con los tres patógenos por separado. El tratamiento control no contuvo inóculo. La presencia de *P. cinnamomi* redujo significativamente la germinación de *Q. ilex* y causando alrededor de un 50% de mortalidad (60 dpi). La presencia de *P. quercina* y *P. gonapodyides* no redujo significativamente el éxito de germinación pero sí el número y longitud de las raíces finas absorbentes y la longitud de la raíz principal, en comparación con las bellotas/plántulas control sobre suelo no infestado. Se encontraron interacciones interesantes entre las diferentes especies de *Phytophthora* y las diferentes procedencias de *Q. ilex* utilizadas. Se concluye que la presencia de *Phytophthora* spp. en suelo es un claro factor limitante en el proceso de regeneración natural de la encina.

SUSCEPTIBILIDAD DE *Quercus ilex* A INOCULACIONES COMBINADAS DE DISTINTAS ESPECIES DEL GÉNERO *Phytophthora*

Miranda, J.¹, Corcobado, T.¹, Jung, T.^{1,2}, Martín-García, J.¹, Pérez-Sierra, A.³, Abad-Campos, P.³, Solla, A.¹

¹*Ingeniería Forestal y del Medio Natural. Universidad de Extremadura. Avenida Virgen del Puerto 2, 10600 Plasencia. E-mail: asolla@unex.es*

²*Phytophthora Research and Consultancy, Thomastrasse 75, 83098 Brannenburg, Germany*

³*Instituto Agroforestal Mediterráneo, Universidad Politécnica de Valencia, Camino de la Vera s/n, 46022 Valencia.*

El decaimiento de distintas especies del género *Quercus* en la península ibérica se ha asociado a un fenómeno complejo, denominado “Seca”, que requiere de una combinación de varios factores. Aunque los árboles dañados se encuentran frecuentemente infectados por varios oomicetos, la interacción entre dichos organismos no ha sido todavía estudiada. El presente trabajo tiene por objetivo determinar si un efecto sinérgico o antagónico podría tener lugar en posibles interacciones entre las distintas especies del género *Phytophthora* sobre *Quercus ilex*. Para ello, se trabajó en condiciones de invernadero con plántulas de un año de edad procedentes de semilla recogida de un único árbol (Malpartida de Plasencia, Cáceres) y aislamientos de *P. cinnamomi* (C), *P. gonapodyides* (G) y *P. quercina* (Q) obtenidos de la rizosfera de suelo en encinares decaídos. El inóculo utilizado fue micelio de las distintas especies de *Phytophthora* previamente cultivado a 20 °C durante 6 semanas en una mezcla de vermiculita, avena y zumo V8. Las inoculaciones fueron llevadas a cabo en diciembre y enero de 2011 y 2012, respectivamente. Un total de 10 tratamientos fueron aplicados, nueve de ellos combinaciones de inóculo de las distintas especies de *Phytophthora* (CC, GG, QQ, CG, CQ, GC, GQ, QC y QG), más un tratamiento control en el que las plantas no fueron inoculadas (n = 23 plántulas/tratamiento). Todas las plántulas fueron inundadas durante dos días por semana. Los ratios de mortalidad en abril del 2012 fueron 100, 36, 9, 95, 95, 64, 50, 86, 9, y 0% para CC, GG, QQ, CG, CQ, GC, GQ, QC, QG y el tratamiento control, respectivamente. Las inoculaciones con C, G o Q no incrementaron la resistencia de las plántulas a una segunda inoculación, y ningún efecto sinérgico o antagónico fue observado. Como conclusión preliminar cabe destacar que *P. cinnamomi* fue la especie más agresiva causando la mayor mortalidad, independientemente del momento de su inoculación.

EVALUACIÓN DEL BARRENILLO DEL OLIVO (*Phloeotribus scarabaeoides*) COMO VECTOR DE *Verticillium dahliae* AGENTE DE LA VERTICILOSIS DEL OLIVO

Eldesouki-Arafat, I.¹, Aldebis, H.K.¹, Vargas Osuna, E.¹, Trapero, A.², López-Escudero, F.J.²

¹Departamento de Ciencias y Recursos Agrícolas y Forestales y

²Departamento de Agronomía, Universidad de Córdoba, Campus Universitario. de Rabanales, Edificio Celestino Mutis (C4), 14071 Córdoba

Se ha estudiado la posible dispersión de *Verticillium dahliae* mediante *Phloeotribus scarabaeoides*, un escolítido que por las actividades inherentes a su ciclo biológico podría transportar conidios infectivos del patógeno al trasladarse de un árbol enfermo de verticilosis (VO) a otro sano. A finales de primavera, el insecto abandona las galerías de puesta y produce en otros árboles galerías de alimentación hasta Noviembre, momento en el que permanecen invernantes hasta la siguiente primavera. Hay antecedentes similares en otros patosistemas como *Ophiostoma ulmi*/olmo. Los experimentos se han desarrollado desde Marzo de 2009 a Junio de 2012 en umbráculo, abordando todas las posibilidades de inoculación por el insecto. Así, desde Mayo de 2009 a Marzo de 2010, se evaluó la posible transmisión primaveral u otoñal, empleando tiendas mosquiteras que albergaban plantones sanos de 'Picual' (susceptible a la VO), usando dos métodos de inoculación: 1) natural, introduciendo ramas afectadas por barrenillo e infectadas con *V. dahliae*; 2) artificial, liberando adultos del insecto inoculados superficialmente con conidios de *V. dahliae*. Los experimentos se repitieron entre Abril de 2010 y Marzo 2012, liberando igualmente adultos inoculados o procedentes de ramas afectadas por VO, en tiendas mosquiteras similares. En este caso, los árboles de las tiendas se inocularon dos veces (Abril y Octubre de 2010) mediante inyección al tronco, para aumentar la colonización de los tejidos por el patógeno. En los momentos del ciclo del insecto correspondientes a salidas o entradas, se introdujeron en las tiendas plantas sanas de 'Picual' para estudiar la transmisión. Durante los experimentos se evaluaron los síntomas de VO y la presencia del patógeno mediante métodos microbiológicos y moleculares (PCR) en los árboles visitados por el escolítido. Por último, en Mayo de 2012 se prospectaron ramas de árboles afectados por VO y con daños de barrenillo en parcelas de campo. En ninguno de los casos estudiados se aisló al patógeno de adultos de barrenillo, ni se demostró la infección o la producción de síntomas de VO en las plantas de olivo expuestas al insecto. Por tanto, en las condiciones experimentales descritas no se han encontrado evidencias del papel del barrenillo del olivo como vector de *V. dahliae* en olivo.

Trabajo financiado por Proyecto de Excelencia P08-AGR-03635 de la Junta de Andalucía, cofinanciado por fondos FEDER de la UE.

PAN-110

CARACTERIZACIÓN DE AISLAMIENTOS LOCALES DE *Fusarium* PRESENTES EN VARIEDADES DE SEMILLA DE ALUBIA DE LEÓN

Campelo, M.P.¹, Reinoso, B.¹, Lorenzana, A.¹, González, A.J.²

¹*Departamento de Ingeniería y Ciencias Agrarias, E.S.T.I.Agraria, Universidad de León, Avda. de Portugal, 41, 24071 León, Correo-e: mpcamr@unileon.es*

²*Servicio Regional de Investigación y Desarrollo Agroalimentario (SERIDA), Ctra. de Oviedo, s/n, 33300 Villaviciosa, Asturias.*

El cultivo de alubia (*Phaseolus vulgaris* L.) en León se ve afectado por numerosas micosis transmitidas por semilla, siendo de las más frecuentes las denominadas fusariosis radicular y vascular, producidas por *Fusarium solani* (Mart.) Sacc. (Fs) y *F. oxysporum* Schlecht. (Fo), respectivamente. En estudios previos, realizados para conocer la micoflora presente en semillas de variedades locales de judía, se obtuvieron aislamientos de estas especies y se estudió su virulencia respecto a dichas variedades. En este trabajo se presentan los resultados de los experimentos realizados para caracterizar fenotípicamente 94 aislamientos de Fs y 47 de Fo, obtenidos en 77 lotes de semilla de 12 variedades. Se estudiaron características culturales macroscópicas (color del micelio aéreo, del reverso de la colonia, del pigmento difusible en agar y de los esporodoquios) y microscópicas (presencia y abundancia de macroconidios, microconidios, clamidosporas, y forma de los conidióforos) sobre cultivos en medio APD incubados en bancada a 18-25° C durante 15 días. Además, se evaluó en el medio AA la velocidad de crecimiento radial durante 16 días en condiciones de oscuridad a 25° C y a 30° C. De los resultados cabe destacar que se identificaron 15 morfotipos de Fs y 14 morfotipos de Fo, observándose de forma predominante para ambas especies las características más habitualmente descritas en la bibliografía: (i) en Fs: color blanco del micelio aéreo (71%), color crema del reverso de la colonia (65%), monofiálidas largas (100%) y presencia de clamidosporas (51%), y (ii) en Fo: color malva del micelio aéreo (70%) y del reverso de la colonia (81%), gran abundancia de microconidios (72%) y de clamidosporas (70%), y presencia de monofiálidas cortas (57%). Los colores del pigmento difusible en agar y de los esporodoquios fueron violeta y crema, respectivamente, en el 23% y el 31% de las colonias de Fs, y rojo y azul en el 38% y el 28% de las de Fo. Los 141 aislamientos ensayados mostraron crecimiento activo con tendencia logarítmica para las dos temperaturas ensayadas; el desarrollo inicial fue más rápido a 30° C, sin embargo, al final de ensayo se cuantificó una merma en el diámetro medio a dicha temperatura respecto al registrado a 25° C que alcanzó el 9% en Fs y el 11% en Fo. Los datos obtenidos permiten profundizar en el conocimiento de la flora fusárica asociada a semilla de variedades de alubia de León en aspectos relacionados con sus capacidades colonizadora y de supervivencia.

LA MULTIPLICACIÓN DIFERENCIAL DE AMPELOVIRUS EN PLANTAS DE VID PODRÍA EXPLICAR LAS DIFERENCIAS DE INCIDENCIA EN LOS VIÑEDOS

Velasco, L.¹, Padilla, C.V.², Padilla, V.², García, B.², Hita, I.², Bota, J.M.³, Montero, R.³

¹IFAPA, Centro de Churriana, Cortijo de la Cruz s/n, 29140 Málaga. E-mail: leonardo.velasco@juntadeandalucia.es.

²IMIDA, C/ Mayor s/n, 30150 La Alberca, Murcia.

³IRFAP, C/ d'Eusebi Estada, 145, 07009 Palma de Mallorca.

El complejo del enrollado de la vid está compuesto por al menos nueve especies del género *Ampelovirus* y una del género *Closterovirus* (GLRaV-2). Dentro de los *Ampelovirus*, dos de ellos, GLRaV-1 y GLRaV-3 son aparentemente los más frecuentes en los viñedos y además están incluidos en la legislación vigente como no autorizados en material de vivero. Los demás *Ampelovirus* (GLRaV-4, -5, -6, -9, -Pr, -CV) parecen formar un grupo separado, el llamado grupo GLRaV-4LV, que aunque están muy relacionados serológica y filogenéticamente se consideran especies diferentes. Algunos de ellos han sido identificados recientemente en España y su incidencia es, aparentemente, menor que la de GLRaV-1 y -3. La disponibilidad de técnicas de análisis de RT-qPCR de estos virus nos ha permitido iniciar estudios de cuantificación de las copias del genoma en plantas de vid para tratar de relacionar la concentración diferencial de los virus como posible explicación de las diferencias en la incidencia relativa en el campo. En particular, hemos empleado como modelo los *Ampelovirus* GLRaV-3, -4 y -5 presentes en distintos materiales de vid. Tras obtener curvas estándar a partir de RNA sintetizado *in vitro* de los genes *RdRp* clonados de GLRaV-3, -4 y -5 hemos calculado la concentración de virus en pecíolos de hoja. De esta manera, hemos podido determinar el número de copias de GLRaV-3 y -5 en cinco plantas de la variedad Tintilla de Rota y otras cinco de la variedad Rome que estaban infectadas por ambos virus, resultando que el número medio de copias por mg de tejido de GLRaV-3 era de $5,7 \times 10^6$ mientras que las copias de genoma de GLRaV-5 fue inferior, $1,60 \times 10^5$. Por otra parte, hemos analizado plantas de la variedad Gorgollasa que estaban infectadas por GLRaV-4 o bien por GLRaV-3 y GLRaV-4, simultáneamente. En dos plantas con infección simple de GLRaV-4 el número de copias por mg de tejido era de $2,70 \times 10^5$. En otras cuatro plantas que tenían infección doble el número de copias de GLRaV-4 fue similar a las de infección simple, $2,57 \times 10^5$, mientras que el número de copias de GLRaV-3 era mayor y del mismo rango que en las variedades Tintilla y Rome: $3,22 \times 10^6$ copias.mg⁻¹. Estos resultados preliminares no pueden descartar interacciones entre *Ampelovirus*, aunque parecen indicar que dos miembros del grupo GLRaV-4LV se multiplican menos en la planta que GLRaV-3, el más frecuente en España, ofreciendo una posible explicación de las diferencias en incidencia de los distintos *Ampelovirus*.

PAN-112

EFFECTO DE LA PRESENCIA DE *Fusarium circinatum* EN SEMILLA DE PINO EN LA GERMINACIÓN Y DESARROLLO DE PLÁNTULAS

Elvira-Recuenco, M., Raposo, R.

INIA. Centro de Investigación Forestal. Dpto de Selvicultura y Gestión Forestal. Avda A Coruña km 7,5. 28040.Madrid. E-mail: elvira@inia.es

La enfermedad del chancro resinoso del pino está actualmente localizada en el norte de España y su presencia supone una seria amenaza para las masas forestales de *Pinus pinaster* y *Pinus radiata*. En viveros también produce serios daños, causando damping-off de pre y postemergencia así como mortalidad de plántulas ya establecidas. La ocurrencia de la enfermedad en vivero está relacionada con la transmisión de *F. circinatum* en semilla, en la que el hongo puede estar presente superficial o internamente. Bajo determinadas condiciones, la semilla infectada puede dar lugar a plántulas asintomáticas pero en las que el patógeno está presente, lo que supone una vía potencial para la dispersión del patógeno. Los objetivos de este estudio son analizar el efecto de la presencia de *F. circinatum* en la germinación y posterior desarrollo de las plántulas, así como hacer un seguimiento de la colonización e invasión de la plántula en plantas asintomáticas. Concretamente, el estudio incluye el efecto de la cantidad de hongo presente en la semilla y su localización, interna o externa. Se realizaron ensayos de inoculación de semillas de *Pinus radiata* y *P. pinaster* mediante inmersión en suspensiones de esporas de *F. circinatum* (aislado CECT20759) a concentraciones de 10^4 , 10^6 esporas/ml y agua como control y su posterior siembra en bandejas forestales con turba. Se realizaron muestreos periódicos anotando la fecha de emergencia y de aparición de primeros síntomas y plaqueando las plantas muertas en medio selectivo para *Fusarium* (SFA). Además se inocularon semillas de *P. radiata* interna y externamente a concentraciones de 10^4 , 10^2 esporas/ml y agua y su posterior siembra en bandejas con papel filtro. Se anotaron la fecha de aparición de radícula, hipocotilo y de los primeros síntomas de invasión de *F. circinatum* así como la secuencia en la colonización. Los resultados preliminares indicaron que la presencia interna o externa del patógeno no influye en el número de semillas que desarrollaron la radícula, pero la inoculación interna tuvo un efecto mayor en el retraso de la emergencia. El efecto en el retraso del desarrollo del hipocotilo fue también mayor cuando el patógeno estaba presente internamente. *F. circinatum* tuvo un efecto significativo en el número de plántulas muertas en pre y postemergencia. Se ha determinado el índice de transmisión del patógeno a plántula.

**ESTUDIO EPIDEMIOLOGICO DE LA PROLIFERACIÓN DEL MANZANO
CAUSADA POR *Candidatus Phytoplasma mali*, EN ESPAÑA**

Laviña, A.¹, Sabaté, J.¹, Berra, D.², Batlle, A.¹

¹*Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentàries (IRTA). Ctra Cabrils Km 2. 08348 CABRILS (Barcelona) amparo.laviña@irta.es*

²*Lab.Agroambiental de Frisoro. Dip.Foral de Gipuzkoa.20159 ZIZURKIL*

La enfermedad de la proliferación del manzano (AP) causada por el fitoplasma "*Candidatus Phytoplasma mali*" fue descrita por primera vez en Italia en 1950 y desde entonces ha causado importantes epidemias y considerables pérdidas económicas en cultivos de manzano de toda Europa. En España ha sido identificada principalmente en País Vasco y Asturias en manzanos de sidra, aunque algunas variedades de mesa también se encuentran afectadas. En una prospección realizada para determinar la presencia de vectores de este fitoplasma en cultivos de manzano en España, las dos especies citadas como transmisoras del mismo, *Cacopsylla picta* y *C.melanoneura* fueron identificadas en País vasco y Asturias pero no en muestreos realizados en parcelas de manzano de otras zonas del país como Cataluña y Aragón. Así mismo, el fitoplasma fue identificado en material vegetal de manzano de mesa en proceso de selección sanitaria, lo que alerta de la posible diseminación de la enfermedad si no se realizan controles adecuados y si la presencia de los vectores se extendiera a otras zonas o aparecieran otras especies con capacidad de transmitir el fitoplasma.

El objetivo de este trabajo ha sido determinar la incidencia de Ca.P.mali en parcelas de distintas variedades y determinar la presencia de plantas huéspedes del fitoplasma y de los vectores. Por otro lado se ha determinado la evolución de la población de *C.picta* y *C.melanoneura* en País vasco y Asturias durante dos años, 2010 y 2011, y se ha determinado el porcentaje de individuos portadores del fitoplasma. También se ha estudiado la presencia de otros vectores potenciales en Cataluña y Aragón.

La incidencia de la enfermedad en las parcelas afectadas del País Vasco osciló entre el 20 y el 80%. Las parcelas más afectadas correspondían a variedades de sidra. El fitoplasma fue también identificado en Reineta Gris.

Las poblaciones de *C.picta* fueron muy superiores a las de *C.melanoneura* y también fueron superiores en el País Vasco que en Asturias. La evolución de ambas especies mostró dos picos de población, uno para los adultos re-inmigrantes, el cual los dos años tuvo lugar a principios de abril y otro para las nuevas generaciones entre Junio y Julio. La población más alta de estos vectores fue determinada en una de las parcelas más afectadas en Orbelaún (País vasco). El porcentaje de individuos de *C.picta* portadores del fitoplasma osciló alrededor del 15 % en los individuos re-inmigrantes y entre el 6 y el 33% en las nuevas generaciones, determinándose un incremento progresivo del porcentaje de portadores de mayo a julio. Para *C.melanoneura* no se han determinado hasta el momento individuos re-inmigrantes portadores, mientras que en las nuevas generaciones el 33% fueron positivos.

Trabajo financiado por el proyecto INIA RTA 2009-070-00

**PANELES DE ETIOLOGÍA Y DIAGNÓSTICO
(PAN-114-PAN-160)**

PAN-114

MICOFLORA ENCONTRADA EN SEMILLAS CERTIFICADAS DE *Pinus pinaster* DE DIFERENTES ORÍGENES GEOGRÁFICOS EN ESPAÑA

Beltrán, R.¹, Naya, M.², Aguado, A.².

¹INIA-Centro de Ensayos de Valencia, C/Joaquín Ballester, nº39, 46009 Valencia. E-mail: oevvval@hotmail.es

²Dirección General de Desarrollo Rural y Política Forestal, Centro Nacional de Recursos Genéticos Forestales "Alaquàs", Camí Mas del Moret, nº2, 46970 Alaquàs (Valencia).

Desde 2008 hasta 2011 se analizaron un total de 44 lotes de semilla certificada de *Pinus pinaster* Aiton procedentes de siete comunidades autónomas. Para cada uno de los lotes, se tomó una muestra significativa de 500 semillas, las cuales se sembraron en medios de cultivo PDAS y Komada. Las placas se incubaron durante 30 días a 25°C; las colonias observadas se repicaron a los medios de cultivo PDA y/o SNA, incubándose posteriormente en las mismas condiciones. Quince días después, se observaron las características macroscópicas y microscópicas de cada una de dichas colonias, con el objetivo de identificarlas a nivel de género.

De las 22.000 semillas analizadas, no creció ninguna colonia en el 21% de ellas. Respecto a las colonias obtenidas, y tras su identificación, los principales géneros aislados fueron *Penicillium* (26,3%), *Aspergillus* (8,04%), *Fusarium* (6,95%) y *Alternaria* (6,91%). Se obtuvieron porcentajes de aislamiento entre el 1 y el 5% en los géneros siguientes: *Acremonium*, *Cladosporium*, *Cylindrocarpon*, *Gliocladium*, *Paecilomyces*, *Rhizopus* y *Ulocladium*. Con valores inferiores al 1% de aislamiento cada uno, se encontraron los géneros *Diplodia*, *Epicoccum*, *Geotrichum*, *Mucor*, *Nigrospora*, *Trichoderma*, *Trichothecium* y *Stemphyllium*. En menor medida se detectaron los géneros *Botryosphaeria*, *Chaetomium*, *Cylindrocladium*, *Curvularia*, *Pestalotiopsis*, *Rhizomucor* y otros. No se aisló *Fusarium circinatum* en ninguna de las muestras consideradas. Al analizar los resultados según su procedencia por comunidad autónoma, no se encontraron diferencias significativas entre ellas para los principales géneros observados. Se pretende profundizar en el estudio de las colonias observadas, para lograr su identificación a nivel de especie.

Este trabajo se realizó en base al convenio firmado entre la DGDRPF y el INIA en diciembre de 2006.

PAN-115

PRIMER REGISTRO DE *Monilinia fructicola* EN CIRUELO EN EL SUROESTE DE ESPAÑA

Arroyo, F.T., Camacho, M., Daza, A.

IFAPA Centro "Las Torres-Tomejil", Apdo Oficial, 41200, Alcalá del Río, Sevilla. E-mail: franciscot.arroyo@juntadeandalucia.es.

La podredumbre marrón o momificado de frutos, causada por *Monilinia* spp., es una de las enfermedades más destructivas que afectan a los frutales de hueso y de pepita en regiones templadas del mundo, ocasionando importantes pérdidas económicas. Se han descrito tres especies de *Monilinia* relacionadas con esta enfermedad, *M. laxa* y *M. fructigena*, ambas de origen europeo, y *M. fructicola*, de origen americano. Recientemente se ha identificado también *M. polystroma*, de procedencia asiática, que afecta igualmente a frutales de hueso y pepita. En verano de 2011 se detectaron frutas de ciruelo japonés *Prunus salicina* Lindl, cultivar 'Larry Ann', con síntomas de momificado en dos campos experimentales de frutales de hueso ubicados en Alcalá del Río (Sevilla). Ambas plantaciones, establecidas en 2005, fueron diseñadas para realizar un estudio comparado del cultivo del ciruelo bajo los sistemas convencional y ecológico. Todos los árboles de este cultivar estaban afectados, tanto en la parcela convencional como en la ecológica. Los frutos presentaban lesiones de color marrón, algo hundidas, y cubiertas con pústulas de color marrón grisáceo. Los síntomas eran similares a los causados por las especies *M. laxa*, *M. fructigena*, y *M. fructicola*. El patógeno se aisló de los frutos afectados, se creció en medio de cultivo PDA, y se utilizó para las pruebas de patogenicidad en frutos sanos recolectados de los cultivares 'Larry Ann' y 'Songold'. El aislado reprodujo los síntomas iniciales y fue reaislado desde las lesiones en los frutos inoculados, confirmando los postulados de Köch. Finalmente, el aislado fue caracterizado morfológica, cultural y molecularmente mediante la técnica PCR, siendo identificado como *Monilinia fructicola* (G. Winter) Honey.

De acuerdo con nuestra información, este trabajo describe por primera vez la ocurrencia de este patógeno en ciruelo en España, aunque había sido comunicado previamente en melocotonero en el Valle del Ebro.

PAN-116

PREVALENCIA DE VIRUS DE VID EN LA DENOMINACIÓN DE ORIGEN ALICANTE ESTIMADA POR ELISA, SINGLEPLEX Y MULTIPLEX RT-PCR A TIEMPO REAL

Olmos, A.¹, Yuste, A.², Bertolini, E.¹, Martínez, C.¹, García, J.¹, Cambra, M.¹

¹*Centro de Protección Vegetal y Biotecnología, Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA), Carretera Moncada a Náquera km 5, 46113 Moncada, Valencia. E-mail: aolmos@ivia.es*

²*Universidad Politécnica de Valencia, Camino de Vera s/n, 46022 Valencia.*

La dispersión a larga distancia de los virus de vid se debe principalmente a la propagación o multiplicación vegetativa de material infectado. En la actualidad hay descritos más de 60 virus que infectan vid (Martelli, 2009), causando muchos de ellos desórdenes en la planta que se traducen en pérdidas de vigor, longevidad y calidad de la cosecha. En la legislación española según se establece en el Real Decreto 208/2003; Orden APA/2474/2006; Directiva UE 2002/11/CE, el material vegetal de vivero objeto de comercialización debe estar libre de los nepovirus entrenudo corto infeccioso (GFLV) y mosaico del Arabis (ArMV), además de los virus del enrollado 1 y 3 (GLRaV-1 y 3) y del virus del jaspeado (GFkV). Por tanto, los programas de certificación sanitaria, dependerán de la sensibilidad y especificidad de las técnicas de diagnóstico empleadas. En este estudio se han comparado ELISA, singleplex y multiplex RT-PCR a tiempo real para la detección de estos cinco virus, aplicándose a material vegetal procedente de la D.O. Alicante. El muestreo se realizó en base al área de cultivo y la toma de 158 muestras se realizó de forma aleatoria según Lohr (2000), recolectando muestras de diferentes localidades alicantinas: Benissa, Xaló, Teulada, Pinosos, La Algueña, Biar, Castalla, Sax, Salinas, La Romana, Hondón de las Nieves, Petrer, Villena y Monforte del Cid. La coincidencia entre los métodos basados en la química TaqMan fue casi perfecta según la interpretación de Landis y Koch (1977), para el índice kappa de Cohen (1960), que varió entre 0.97 y 1.00. Los métodos moleculares fueron mucho más sensibles que ELISA, detectando un nivel de infección del 90%. La variante multiplex identificó infecciones mixtas en un solo ensayo y reveló que el 84% de las muestras estaban infectadas por GFkV, el 60% por GLRaV-3, el 40% por GFLV y el 1% por GLRaV-1. ArMV no se detectó en ninguna muestra analizada. Las infecciones mixtas fueron mayoritarias destacando la coinfección de GFkV y GLRaV-3 (31% de las muestras) y la coinfección por GFkV, GLRaV-3 y GFLV (22% de las muestras). El método multiplex RT-PCR a tiempo real demostró su aplicabilidad a muestras de campo y abre nuevas perspectivas en la detección fiable de virus de vid.

Este trabajo ha sido financiado por el proyecto RTA2011-00067.

PAN-117
HONGOS DE LA FAMILIA *Diatrypaceae* ASOCIADOS A
ENFERMEDADES DE LA MADERA DE LA VID

Luque, J.¹, Elena, G.¹, Garcia-Figueres, F.², Legorburu, J.³,
Muruaamendaraz, A.³, Armengol, J.⁴, Trouillas, F.⁵

¹Patología Vegetal, IRTA. Ctra. de Cabrils km 2, 08348 Cabrils. E-mail: jordi.luque@irta.cat, georgina.elena@irta.cat; ²Laboratori de Sanitat Vegetal, DAAM Generalitat de Catalunya. Ctra. de Cabrils km 2, 08348 Cabrils. E-mail: fgarciafigueres@gencat.net; ³Producción y Protección Vegetal, NEIKER-Tecnalia, Granja Modelo de Arkaute. Apartado 46, 01080 Vitoria/Gasteiz. E-mail: amuruamendaraz@neiker.net; jlegorburu@neiker.net; ⁴Instituto Agroforestal Mediterráneo, Universidad Politécnica de Valencia, Camino de Vera s/n, 46022-Valencia. E-mail: jarmengo@eaf.upv.es; ⁵flotrouillas@gmail.com

En la última década, el número de especies de hongos diatrypáceos asociados a enfermedades de la madera de la vid se ha visto incrementado, hasta los 14 taxones reconocidos actualmente, como consecuencia de múltiples estudios realizados en diversas zonas vitivinícolas del mundo. Hasta la fecha en España, tan sólo se habían citado dos de ellos; *Eutypa lata*, agente causal de la eutipiosis, una de las enfermedades de la madera más destructivas, y *Cryptovalsa ampelina*. Por ello, se estimó conveniente actualizar el conocimiento sobre la incidencia de especies de la familia Diatrypaceae en la vid y en nuestro país. Sobre la base de distintos caracteres morfológicos y el análisis filogenético de la secuencia completa de los espaciadores internos transcritos (ITS) del ADN ribosómico y parte del gen de la β -tubulina, se identificaron hasta cinco especies: además de las dos anteriores, *Anthostoma decipiens*, *Eutypella citricola* y *Eutypella microtheca*. Cuatro taxones adicionales no pudieron ser identificados a nivel de especie, aunque se encontraban estrechamente relacionados con *Eutypa tetragona*. *Eutypa lata* fue la especie aislada con mayor frecuencia (60 % de los aislados obtenidos) y mostró asimismo la mayor diversidad genética. *Cryptovalsa ampelina* y *E. microtheca* ocuparon el segundo lugar en cuanto a la frecuencia de aislamientos (10 %), mientras que todas las demás especies fueron poco abundantes. *Eutypella citricola* y *E. microtheca* se citan por primera vez sobre vid en España. Además, *A. decipiens* constituye una primera cita mundial sobre vid. La mayoría de los 38 aislados estudiados se obtuvieron de madera infectada (esto es, de necrosis de tejidos vasculares) y de chancros de vides enfermas, lo que sugiere un posible papel patogénico de estas especies respecto la vid.

Financiado por el proyecto INIA RTA2010-00009-C03 y FEDER. Georgina Elena recibe financiación de INIA para la realización de su tesis doctoral.

PAN-118

ENFERMEDADES EMERGENTES EN LOS VIVEROS DE ALTURA DE FRESA TRAS LA RETIRADA TOTAL DEL BROMURO DE METILO EN 2009

Redondo, C., Villarino, M., Larenas, J., Melgarejo, P., De Cal, A.

Departamento de Protección Vegetal. INIA. Madrid. E-mail: cal@inia.es

Los principales hongos patógenos de suelo presentes en los viveros de fresa durante los últimos diez años son: *Phytophthora cactorum* y *Verticillium* spp. Los tratamientos con cloropicrina (PIC), dicloropropeno:cloropicrina (DD:Pic), metamsodio aplicado con Rotary Spader y dazomet reducen los porcentajes de plantas infectadas con *P. cactorum* y *Verticillium* spp. en la misma medida que el bromuro de metilo (BM) cuya aplicación fue totalmente prohibida en viveros en 2009. Sin embargo, no se descarta la posible aparición y desarrollo de patógenos secundarios y/o oportunistas que favorecidos por la desaparición del BM, den lugar a enfermedades emergentes o potencien el desarrollo de enfermedades ya conocidas pero de escasa importancia hasta la desaparición del uso de BM.

Se ha estudiado la evolución de posibles hongos patógenos en la población fúngica del suelo y sobre las plantas de fresa, en parcelas diferentes no bromuradas con anterioridad, de dos viveros comerciales situados en las provincias de Segovia y Avila, durante los últimos cinco años (2007-2011). La parcela elemental tenía una anchura de 2,75 m (con doble fila de planta madre) y una longitud de 30 m (82,5 m²). Se estimó la población de *Fusarium* en la población fúngica total del suelo (unidades formadoras de colonias (ufc)/g suelo seco) antes y después del tratamiento con BM, PIC, DD:PIC, Metamsodio y Dazomet por dilución de la solución del suelo en placas con agar patata dextrosa y en medio específico de *Fusarium*. . Así como el efecto de dichos tratamientos sobre la incidencia de los hongos patógenos sobre las plantas de fresa a lo largo del cultivo.

La frecuencia de especies patógenas de *Fusarium* ha aumentado significativamente en el suelo y las plantas de fresa de vivero tras la desaparición del bromuro de metilo. Por otra parte se ha comprobado la patogenicidad de 5 aislados de *F. oxysporum* y 6 aislados *F. solani* desde tejido enfermo de planta de fresa. Se han cumplido los postulados de Koch's con estos aislados, re-infectando plantas sanas de fresa y re-aislándolos sobre el tejido nuevamente enfermo.

**FILOGENIA Y DIVERSIDAD MOLECULAR DE NEMATODOS DEL
GRUPO *Xiphinema americanum* MEDIANTE DIAGNÓSTICO
POLIFÁSICO**

Gutiérrez-Gutiérrez, C., Cantalapiedra-Navarrete, C., Palomares-Rius, J.E.,
Castillo, P.

*Instituto de Agricultura Sostenible, IAS-CSIC, Alameda del Obispo s/n,
14005-Córdoba; e-mail: p.castillo@csic.es*

El complejo del grupo *Xiphinema americanum* comprende alrededor de 50 especies de distribución cosmopolita y difícil diagnóstico debido a su escasa variabilidad fenotípica. El diagnóstico preciso en este grupo de nematodos es particularmente importante por incluir especies de cuarentena (grupos EPPO A1 y A2) y vectores de virus vegetales como *Tobacco ringspot virus* (TRSV), *Tomato ringspot virus* (TomRSV), *Cherry rasp leaf virus* (CRLV), y *Peach rosette mosaic virus* (PRMV). En este trabajo se analiza la diversidad y filogenia molecular de este grupo de nematodos usando ADN ribosómico (ADNr) (fragmento D2-D3 del gen 28S y región ITS1) y mitocondrial (ADNmt) (citocromo c oxidasa 1 o CO1) de 15 poblaciones procedentes de varios cultivos y ambientes naturales de Andalucía.

La integración de estudios morfológicos y el análisis de marcadores ADNr y ADNmt, demostró la existencia de especies crípticas, *i. e.* morfológicamente indistinguibles pero filogenéticamente distantes y características fitopatológicas importantes (transmisión de virus) dentro del grupo *X. americanum*. Se diagnosticaron nueve especies, incluyendo *Xiphinema duriense*, *Xiphinema incertum*, *Xiphinema opisthohysterum*, *Xiphinema pachtaicum*, *Xiphinema rivesi*, *Xiphinema santos*, *Xiphinema* sp1, *Xiphinema* sp2, y *Xiphinema* sp3. El análisis filogenético basado en el fragmento D2-D3, ITS1 y CO1 fue generalmente congruente con estudios fenéticos anteriores, pero no sugiere la diferenciación en subgrupos propuesta por otros autores. Asimismo, se demuestra que algunas especies de este grupo constituyen en realidad un complejo de especies (*i. e.* *X. brevicolle*) que requiere un análisis específico adicional.

En conclusión, este estudio proporciona marcadores moleculares para un diagnóstico rápido y preciso de especies del grupo *X. americanum*, que permitirá diferenciar inequívocamente vectores de virus y especies de cuarentena de las que no lo son, ya que es muy frecuente detectar varias especies coinfectando el mismo suelo.

Investigación financiada por AGL2009-06955 y fondos FEDER.

PAN-120

FALTA DE RELACIÓN ENTRE SÍNTOMAS FOLIARES Y ESPECIES DE HONGOS AISLADAS DE MADERA EN LA EUTIPIOSIS DE LA VID

Muruamendiaraz, A., Legorburu, F.J.

NEIKER-Tecnalia, Instituto Vasco de Investigación y Desarrollo Agrario, Apartado 46, 01080 VITORIA/GASTEIZ. E-mail: jlegorburu@neiker.net

Los hongos de la madera de la vid provocan síntomas foliares característicos, a pesar de no colonizar las hojas. Existe una relación a tres bandas entre los síntomas foliares, los síntomas en la madera y los patógenos asociados que es preciso esclarecer para delimitar las diferentes enfermedades. En trabajos previos, encontramos una asociación muy débil entre la intensidad de los síntomas foliares de eutipiosis y la frecuencia de aislamiento de *Eutypa lata* mediante muestreo a ciegas, no destructivo. Con el fin de profundizar en el estudio de esta relación, se muestrearon destructivamente 18 cepas de Tempranillo, de unos 30 años de edad, en una viña de Laguardia, Rioja Alavesa. Se escogieron de manera que representaban todo el rango de intensidad de síntomas foliares expresados los años anteriores. Se arrancaron y cortaron en secciones transversales cada 10 cm. Las superficies expuestas se fotografiaron y estudiaron mediante programas de análisis de imagen. Se cultivaron en agar de patata-dextrosa con estreptomicina astillas representativas de los diferentes síntomas en madera. Mientras la relación entre estos últimos y las especies fúngicas aisladas resultó según lo esperado - *Fomitiporia mediterranea* (*Hymenochaetaceae*), podredumbre blanda clara; *Eutypa lata* (*Diatrypaceae*), necrosis dura oscura; *Phaeomoniella chlamydospora*, puntos necróticos), no se asoció una mayor intensidad de síntomas foliares a ningún hongo en particular, sino a una mayor proporción de superficie de madera afectada, independientemente del síntoma en ésta. Si bien el papel de *E. lata* como agente etiológico de la eutipiosis (en su expresión foliar) está demostrado mediante inoculaciones artificiales en invernadero y reaislamiento (tercer y cuarto postulados de Koch), la prospección de plantas afectadas no parece la mejor estrategia de estudio (no se cumpliría el primer postulado de Koch). Este trabajo fue parcialmente financiado por el proyecto INIA RTA2010-00009-C03 y fondos FEDER.

VIRUS DEL ENROLLADO DE LA VID EN LA VITICULTURA ESPAÑOLA

Padilla, V.¹, Hita, I.¹, García de Rosa, B.¹, Salmerón, E.¹, Velasco, L.², Padilla, C.V.¹

¹ *Instituto Murciano de Investigación y Desarrollo Agrario y Alimentario (IMIDA) La Alberca, 30150 Murcia e-mail:ventura.padilla@carm.es*

² *Instituto de Investigación y Formación Agraria y Pesquera (IFAPA) Centro de Churriana, Cortijo de la Cruz, 29140 Churriana*

Mediante éste trabajo tratamos de relacionar zonas vitícolas españolas, con la presencia de variantes moleculares (1,2,3,4,6,9) de éste complejo virótico, considerándolas de forma independiente o en combinación con otros virus.

Las muestras utilizadas proceden de los candidatos a cabeza de clon (c.c.c.) de diferentes cultivares, que las CCAA envían al IMIDA para su diagnóstico sanitario vs. Virosis.

No pretendemos extrapolar los resultados a la viticultura en general, ya que llevar a cabo un trabajo de ésta índole a nivel de plantaciones comerciales conllevaría una necesidad de medios y mano de obra prácticamente inabordable; a pesar de todo, consideramos que al tratarse de los citados c.c.c. provenientes de procesos de preselección clonal, y si después de los análisis realizados durante dichas preselecciones continúan apareciendo diferentes virus, hemos de pensar que dichos patógenos aparecen con cierta frecuencia en la variedad en cuestión así como en la zona de origen de la planta.

El serotipo 2 de enrollado es el aparece con mayor frecuencia, a continuación el 1 y el 3 y el resto se encuentran junto con otras virosis, como jaspeado fundamentalmente. Así mismo y de forma genérica indicamos la manifestación de síntomas referidos a la presencia de enrollado (LR), que sin embargo ni ELISA ni PCR son capaces de diagnosticar, bien porque se trate de serotipos desconocidos, o por alguna de las causas que también exponemos referidas a resultados contrarios, dudosos, etc., entre laboratorios al hacer el diagnóstico mediante dichas técnicas. Motivo por el cual, en nuestra opinión y en concordancia con todos los foros internacionales, cuando se trata de diagnósticos dirigidos a certificación es necesario llevar a cabo los indexages biológicos pertinentes.

PAN-122

***Heterobasidion annosum*: HONGO ASOCIADO AL DECAIMIENTO DEL PINO NEGRAL EN CASTILLA Y LEÓN**

Prieto-Recio, C., Díez, J.J.

Instituto Universitario de Gestión Forestal Sostenible, Universidad de Valladolid-INIA, Avda. Madrid 44, Edificio E, 34004 Palencia.

Pinus pinaster Ait., es una de las especies forestales españolas mas relevantes tanto por su valor protector como por su producción maderera. En los últimos años, se ha venido observando un decaimiento generalizado de algunas masas de pino negral en el centro de la Península Ibérica. Los síntomas más característicos de este decaimiento son: la inusual transparencia de copa, el enanismo en las acículas, la decoloración del follaje y la muerte prematura del árbol. Un muestreo realizado en varias zonas de Castilla y León que presentaban este tipo de síntomas y cuya especie principal es el pino negral, ha revelado mediante detección tanto morfológica como por técnicas moleculares, que uno de los agentes implicados en el decaimiento de estas masas es el basidiomycete *Heterobasidion annosum* (Fr.) Bref. Este hongo que causa pudrición en las raíces; es un agente patógeno de importancia, ya que afecta a un gran número de coníferas en Europa, Asia y Norte America provocando importantes pérdidas económicas.

HONGOS E INSECTOS ASOCIADOS AL CHANCRO RESINOSO DEL
PINO EN PLANTACIONES DE *Pinus radiata* EN CANTABRIA

Bezós, D., Fernández, M., Martínez-Álvarez, P., Lomba, J.M., Díez, J.J.

*Instituto Universitario de Investigación y Gestión Forestal Sostenible.
Universidad de Valladolid – INIA. Avda. Madrid 44, 34004 Palencia
dbezosg@pvs.uva.es*

La enfermedad del chancro resinoso de los pinos (Pitch Canker Disease, PCD) está causada por el hongo ascomicete *Fusarium circinatum*. Algunos insectos de la subfamilia *Scolitinae* son capaces de transportar las esporas de este hongo transmitiendo así la enfermedad de unos árboles a otros. El objetivo de este estudio fue conocer los hongos y los insectos asociados a esta enfermedad. Para ello, se establecieron tres tipos de trampas en una parcela de *Pinus radiata* con alto nivel de afección en Cantabria: cuatro trampas multiembudo cebadas con pityol, seis trampas multiembudo cebadas con alfa-pineno y etanol y doce trampas cebo, con 5 a 7 trozas de *P. radiata*. Se recogieron semanalmente los insectos de trozas y embudos, además de muestras vegetales de xilema y floema de las trozas. Para detectar la posible implicación de *Tomicus piniperda* como especie vector de la enfermedad se recogieron 287 ramillos caídos al suelo desde julio hasta octubre de 2010. *Hylastes attenuatus*, *Hylastes ater*, *Hylastes angustatus* e *Ips sexdentatus* fueron las especies más abundantes en las trozas cebo. *H. ater* y *Xyleborinus saxeseni* fueron los más abundantes en las trampas con etanol y alfa pineno. Los insectos y el tejido vegetal fueron cultivados en medio selectivo para *Fusarium* (FSM) y en Patata Dextrosa Agar con estreptomycin (PDAS) respectivamente. Posteriormente, se llevó a cabo la identificación molecular de los hongos aislados. *Fusarium circinatum* fue aislado del 0.6% de los insectos de embudos y trozas. Respecto a las muestras de tejido vegetal, *F. circinatum* fue aislado del 0.42% de las trozas y del 3.13% de los ramillos de *T. piniperda*. Además, tanto del tejido como de los insectos, fueron aisladas otras especies de hongos, entre ellas especies del género *Fusarium* así como otros endófitos que aparecen comúnmente en pinos.

PRESENCIA DE PLÁSMIDOS pEA29 y pEI70 EN NUEVOS FOCOS DE *Erwinia amylovora* EN LA COMUNIDAD VALENCIANA Y ARAGÓN

Palacio-Bielsa, A.¹, Roselló, M.², Cambra, M.A.³, Berruete, I.M.¹, Collados, R.³, Palazón, M.L.³, Peñalver, J.⁴, Navarro, I.⁴, López, M.M.⁴

¹*Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria de Aragón. Av. Montañana 930, 50059 Zaragoza. E-mail: apalaciob@aragon.es.*

²*Laboratorio del Servicio de Análisis Agroalimentario. Generalitat Valenciana. Ctra. de Alicante a Valencia km 276,5, 46460 Silla, Valencia.*

³*Centro de Sanidad y Certificación de Vegetales. Av. Montañana 930, 50059 Zaragoza.*

⁴*Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias. Ctra. de Moncada a Náquera km 4,5, 46113 Moncada, Valencia.*

Las cepas de la bacteria *Erwinia amylovora*, agente causal del fuego bacteriano de las rosáceas, puede albergar varios plásmidos. Entre ellos, se consideraba que el plásmido pEA29 era universal en todas las cepas patógenas, pero recientemente se han identificado cepas de *E. amylovora* que no poseen pEA29. Además, se ha identificado y secuenciado un nuevo plásmido, pEI70, que se ha encontrado en 11 países europeos con una prevalencia variable, por lo que su presencia puede proporcionar información acerca de la biogeografía de *E. amylovora*.

En 2011, se detectó por primera vez *E. amylovora* en la Comunidad Valenciana, en Villena (Alicante). Mediante dúplex PCR, se analizó la presencia de pEA29 y pEI70 en 80 cepas de peral, manzano, membrillero y níspero, procedentes de 9 parcelas distribuidas en una superficie aproximada de 50 km². Todas las cepas estudiadas contenían pEA29 pero en ninguna de ellas se identificó pEI70. Los análisis RAPD y AFLP sugieren que todas las cepas eran muy similares y podría tratarse de una única introducción en la zona.

También en 2011, ocho años después de la última detección de *E. amylovora* en Aragón, se identificó un nuevo foco en la Comarca de Calatayud (Zaragoza), a más de 50 km del foco anterior erradicado en 2003. Se estudió la presencia de pEA29 y pEI70 en 47 cepas de peral, membrillero y *Crataegus* sp. procedentes de 35 parcelas que se encuentran dispersas en una superficie aproximada de 700 km². pEA29 estaba presente en todas las cepas, y 27 de ellas contenían también pEI70. Dado que pEI70 es altamente estable, estos resultados sugieren que se habría producido más de una introducción de *E. amylovora* en el foco estudiado. Las cepas aisladas en el foco anterior de Aragón contenían únicamente pEA29.

Este trabajo supone el primer estudio de la distribución de pEI70 en poblaciones naturales de *E. amylovora*.

**DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN DE *Erwinia piriflorinigra*s MEDIANTE
PCR CONVENCIONAL Y A TIEMPO REAL**

Barbé, S. Llop, P., Bertolini, E., López, M.M.

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

*Erwinia piriflorinigra*s, nueva especie de bacteria fitopatógena descrita recientemente, causa necrosis en flores de peral (López et al. 2011), con síntomas similares a las provocadas por *E. amylovora*, reduciendo el número de frutos. La identificación de *E. piriflorinigra*s puede ser complicada dada su morfología colonial similar a la de otras especies de *Erwinia*, así como algunos resultados de test miniaturizados y el perfil de ácidos grasos. Con respecto a *E. amylovora*, *E. piriflorinigra*s reacciona frente a los anticuerpos policlonales de *E. amylovora* estudiados, pero no frente a los monoclonales y ambas comparten secuencias del gen 23S rRNA, utilizadas para la detección de *E. amylovora* mediante PCR. Todo ello podría dar lugar a una incorrecta identificación de los aislados de la nueva especie.

Se ha demostrado que las cepas de *E. piriflorinigra*s estudiadas poseen un plásmido de 37 kb estable y no conjugativo, denominado pEPIR37 y los análisis de restricción de dicho plásmido, han mostrado el mismo patrón en todas ellas. El plásmido se secuenció, se realizó su anotación y se comparó su secuencia con la de otros plásmidos de similar tamaño presentes en especies de *Erwinia* patógenas y saprófitas de frutales de pepita. Para realizar una rápida y precisa detección e identificación de *E. piriflorinigra*s, se han desarrollado dos protocolos de PCR, uno convencional y otro a tiempo real basados en secuencias del mismo. El protocolo de PCR convencional amplifica un fragmento de ADN plasmídico de 255 pb y el de PCR a tiempo real uno de 74 pb, que no tienen similitud con secuencias registradas en el GenBank. Los ensayos de especificidad se realizaron utilizando 32 cepas de *E. piriflorinigra*s, 137 cepas de flora saprofita de peral de origen francés y español, y con 62 cepas de otras especies de bacterias fitopatógenas. Únicamente se obtuvo amplificación tanto por PCR convencional como a tiempo real con las 32 cepas caracterizadas como *E. piriflorinigra*s. Se han realizado ensayos de sensibilidad detectándose 10^2 - 10^3 células/ml mediante PCR convencional y 10^1 - 10^2 células/ml mediante PCR a tiempo real. Ambas técnicas se ensayaron también con muestras de material vegetal sintomático y asintomático obteniéndose resultados similares a los de los aislamientos. Los protocolos desarrollados para el diagnóstico de *E. piriflorinigra*s en material vegetal, también podrían ser utilizados en estudios epidemiológico y en programas de control de la enfermedad.

PAN-126

HONGOS DE LA FAMILIA *Botryosphaeriaceae* ASOCIADOS A CHANCROS Y MUERTE DE RAMAS EN NÍSPERO

González-Domínguez, E., León M., Armengol, J.

Instituto Agroforestal Mediterráneo, Universidad Politécnica de Valencia, Camino de Vera s/n, 46022 Valencia, España. E-mail: elgondo1@upvnet.upv.es

Durante los años 2010 y 2011 se llevaron a cabo prospecciones en 30 parcelas de níspero en las principales zonas de producción de este cultivo en España (Comunidad Valenciana y este de Andalucía), con el objetivo de conocer su estado fitosanitario. En ellas se observaron frecuentemente chancros y muerte de ramas de níspero. Para determinar los agentes asociados a esta sintomatología, se tomaron muestras de tres árboles de cada una de las parcelas estudiadas y se realizaron aislamientos de fragmentos de madera con necrosis en medio PDAS, obteniéndose consistentemente hongos pertenecientes a la familia *Botryosphaeriaceae*. Para la identificación de las especies se estudió una colección de 81 aislados representativos. En primer lugar, se realizó un estudio de caracterización fenotípica. Para ello se indujo la producción de picnidios mediante la siembra de los aislados en medio de cultivo agar-agua con acículas de pino e incubación durante 30-45 días a 25°C con fotoperíodo. Además, para conocer la temperatura óptima de crecimiento de cada una de las especies se realizó un estudio de crecimiento de los aislados a 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35 y 40 °C. Posteriormente, se extrajo el ADN de todos los aislados secuenciándose las regiones ITS del ADNr y un fragmento del factor de elongación 1- α . Las secuencias fueron comparadas con las depositadas en el GenBank. Para confirmar su identificación molecular, se realizó un estudio filogenético utilizando secuencias de referencia de la familia *Botryosphaeriaceae*. Entre los 81 aislados se identificaron 8 especies: *Diplodia seriata* (n=55), *Spencermartinsia viticola* (n=11), *Dotiorella sarmentorum* (n=7), *Neofusicoccum parvum* (n=3), *D. olivarum* (n=2), *N. mediterraneum* (n=1), *D. alatafructa* (n=1) y *D. pinea* (n=1).

PAN-127

ESTADO SANITARIO RESPECTO A VIRUS Y FITOPLASMAS DEL CEREZO DULCE (*Prunus avium*, L.) EN ESPAÑA

Martínez, M.C.¹, Bertolini, E.¹, Capote, N.², Santiago, R.³, García, M.T.⁴,
Cambra, M.A.⁵, Cambra, M.¹

¹*Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA), Ctra. Moncada a Náquera km 5, 46113 Moncada, Valencia. E-mail: cmartine@ivia.es*

²*IFAPA, Centro Las Torres-Tomejil. Alcalá del Río, Sevilla.*

³*Servicio Sanidad Vegetal de Badajoz, Ctra. San Vicente 3, Badajoz.*

⁴*Servicio Sanidad Vegetal de Plasencia, C/Dolores Ibárruri s/n, Plasencia*

⁵*Centro de Protección Vegetal, Avda. de Montañana, 930. Zaragoza.*

La superficie del cultivo de cerezo dulce y guindo en España ocupan el cuarto lugar dentro de los frutales no cítricos, con un total de 33.442 ha. y con una producción de más de 91.000 t, siendo las comunidades de Extremadura (37.126 t) y Aragón (20.844 t) las de mayor producción. Existen dos zonas de cultivo con Denominación Origen: “Cereza del Jerte” en Cáceres y “Montaña de Alicante” en Alicante. Hace años, se viene observando una problemática en el cultivo de cerezo asociada a la presencia de distintos síntomas tanto en hojas como en frutos, que hacían sospechar de la posible presencia de virus. Por ello, se realizaron prospecciones en el Valle del Jerte y también se analizaron muestras sintomáticas procedentes de Aragón y Alicante (total 75 muestras). Las variedades analizadas fueron Ambrunés, Burlat, Lapins, Pico Negro, Prime Giant, Starking, Sunburst, Sweetheart, Van, 4/70 y 7-91 y los virus analizados mediante ELISA, RT-PCR (a tiempo real o convencional): *Prunus necrotic ringspot virus* (PNRSV), *Prune dwarf virus* (PDV), *Apple mosaic virus* (ApMV), *Apple chlorotic leaf spot virus* (ACLSV), *Plum pox virus* (PPV), *Little cherry virus 1 y 2* (LChV 1-2), *Cherry mottle leaf virus* (CMLV), *Cherry necrotic rusty mottle virus* (CNRMV), *Cherry twisted leaf virus* (CTLV), *Cherry leaf roll virus* (CLRV), *Cherry rasp leaf virus* (CRLV), *Cherry green ring mottle virus* (CGRMV), *Cherry virus A* (CVA), *Arabis mosaic virus* (ArMV), *Strawberry latent ring spot virus* (SLRSV), *Tomato black ring virus* (TBRV), *American plum line pattern* (APLPV), *Tobacco ring spot virus* (TRSV) y *Raspberry ringspot virus* (RpRSV). También se analizaron a fitoplasmas mediante PCR a tiempo real. Cabe resaltar el gran número de infecciones mixtas (86%) y la alta prevalencia de virus ILAR (PNRSV, PDV y ApMV), especialmente de ApMV y de ACLSV, así como la detección de otros virus típicos de cerezo, no estudiados previamente (CTLV, CGRMV, CVA, LChV-2, CLRV y RpRSV). Todo ello podría justificar la sintomatología observada. En un 10% de árboles prospectados no se detectó ninguno de los virus analizados. Los análisis a fitoplasmas resultaron negativos. Se ha realizado secuenciación masiva de algunas muestras.

PREVALENCIA DE *Potato spindle tuber viroid* y *Peach latente mosaic viroid* DETERMINADA POR RT-PCR A TIEMPO REAL

Bertolini, E.¹, Martínez, M.C.¹, Serra, P.², Durán-Vila, N.¹, Cambra, M.¹

¹*Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA), Ctra. Moncada a Náquera km 5, 46113 Moncada, Valencia. E-mail: ebertoli@ivia.es*

²*Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas (IBMCP), Universidad Politécnica de Valencia-Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Avenida de los Naranjos s/n, 46022 Valencia.*

Potato spindle tuber viroid (PSTVd) pertenece al género *Pospiviroid*, causa la enfermedad del ahusado o tubérculos fusiformes de la patata (*Solanum tuberosum*), es considerado de cuarentena en la legislación europea, es muy polífago pudiendo parasitar a 94 especies de 31 familias, pero su principal hospedador son especies de solanáceas de diversos géneros. *Peach latent mosaic viroid* (PLMVd) pertenece al género *Pelamoviroid*, causa decoloraciones y malformaciones en frutos de melocotonero (*Prunus persicae*). Ambas enfermedades causan pérdidas económicas importantes en distintos cultivos.

Los métodos de detección de viroides se basan principalmente en técnicas biológicas, bioquímicas y moleculares o en combinación de las mismas. RT-PCR convencional, no se ha popularizado en la detección de viroides por problemas de reproducibilidad, de inhibiciones y amplificaciones inespecíficas. La aplicación de RT-PCR a tiempo real a la detección de viroides que causan enfermedades de plantas, está en su etapa inicial y son prometedores los resultados obtenidos. Se han diseñado iniciadores y sondas TaqMan específicos para detección de PSTVd y PLMVd, se han comparado con las metodologías tradicionales de detección de viroides (hibridación, RT-PCR convencional y secuenciación) y se han aplicado a la detección de estos viroides en distintos huéspedes para determinar su prevalencia. Además, se han puesto a punto métodos directos de preparación de muestras (impresión y “spot”) que evitan la purificación de ARN mediante kits y/o protocolos convencionales. Se detectó una alta prevalencia (22.5 %) de PSTVd en *S. jasminoides*, *Brugmansia*, sp., *Datura* sp., *Petunia*, sp. y *Dendrathera* sp., pero no se ha detectado en patata ni tomate. PLMVd fue detectado en melocotoneros con síntomas sospechosos, con una prevalencia del 73.5 %. Todos los resultados positivos por RT-PCR a tiempo real frente a PSTVd y/o PLMVd fueron confirmados por hibridación molecular y/o RT-PCR convencional con sondas e iniciadores de los respectivos géneros. Muestras con resultados discordantes entre los métodos convencionales y RT-PCR a tiempo real, se han secuenciado y en todos los casos se han confirmado los resultados de RT-PCR a tiempo real.

**IDENTIFICACIÓN DE *Cylindrocladiella parva* Y *C. peruviana*
ASOCIADAS A EL PIE NEGRO DE LA VID EN ESPAÑA**

Agustí-Brisach, C.¹, Alaniz, S.², Gramaje, D.³, Pérez-Sierra, A.¹, Armengol, J.¹, Landeras, E.⁴, Izquierdo, P.M.⁵

¹Instituto Agroforestal Mediterráneo, UPV, Camino de Vera s/n, 46022-Valencia; ²Dpto. de Protección Vegetal, Facultad de Agronomía, Universidad de la República, Garzón 780 CO 12900, Montevideo, Uruguay; ³Dpto. de Protección de Cultivos, Instituto de Agricultura Sostenible (IAS), Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), Alameda del Obispo s/n, 14080 Córdoba; ⁴Laboratorio de Sanidad Vegetal, Consejería de Agroganadería y Recursos Autóctonos del Principado de Asturias. C/ Lucas Rodríguez, 4-bajo, 33011 Oviedo; ⁵Instituto de la Vid y el Vino de Castilla-La Mancha (IVICAM), Ctra. Toledo-Albacete s/n, 13700 Tomelloso, Ciudad Real. E-mail: caragbri@upvnet.upv.es

En los años 2007 a 2009, se obtuvieron cultivos fúngicos con morfología similar a *Cylindrocladiella* a partir de raíces de plantas de vid que mostraban síntomas característicos de pie negro (desarrollo escaso y necrosis de raíces), procedentes de diferentes zonas geográficas. Para su identificación, se seleccionaron tres aislados representativos: CPa1 obtenido de plantas del cv. Albarín Tinto y CPa2 obtenido de plantas del cv. Carrasquín, en ambos casos injertadas sobre el patrón 110-R, procedentes de Asturias, y CPe523 obtenido de plantas del cv. Syrah injertado sobre el patrón 161 49 C, procedentes de Cuenca. Para su identificación morfológica, estos aislados se sembraron en agar extracto de malta (MEA) y Spezieller Nährstoffarmer Agar (SNA) con hojas de clavel estériles. Las colonias crecidas en MEA mostraron un micelio algodonoso de color blanco a marrón claro. En SNA, los aislados CPa1 y CPa2 produjeron conidios de 0 a 1 septo, siendo sus medidas: (10.4-) 15.3 (-18.9) × (1.7-) 2.4 (-3.1) µm; el aislado CPe523 también produjo conidios de 0 a 1 septo siendo sus medidas (6.4-) 9.7 (-12.3) × (1.6-) 2.4 (-3.3) µm. La identificación molecular se llevó a cabo secuenciando el gen de la beta-tubulina con los cebadores T1 y Bt2b. Los aislados CPa1 y CPa2 fueron identificados como *C. parva*, y el aislado CPe523 como *C. peruviana*. Posteriormente, se confirmó su patogenicidad a vid inoculando plántulas de un mes de edad, observándose un menor desarrollo tanto de la parte aérea como del sistema radicular y en ocasiones la muerte de la planta. Esta es la primera cita de *C. parva* y *C. peruviana* asociadas al pie negro de la vid en España así como en Europa. Financiado por el proyecto RTA2010-00009-C03-03 (INIA), cofinanciado con fondos FEDER (EU).

PAN-130

PRESENCIA DE *Cladobotryum mycophilum* EN CULTIVOS DE SETA DE CARDO (*Pleurotus eryngii*)

Gea, F.J., Carrasco, J., Navarro, M.J.

Centro de Investigación, Experimentación y Servicios del Champiñón (CIES), 16220 Quintanar del Rey, Cuenca. E-mail: fjgea.cies@dipucuenca.es

El cultivo de *Pleurotus eryngii* en España se realiza sobre bolsas de sustrato esterilizado, elaborado a base de pajas de cereales y aditivos, sobre el que se aplica una capa de cobertura (suelo mineral y turba) tras la incubación. En 2010, se observaron síntomas de la enfermedad de la telaraña en cultivos de seta de cardo de Castilla-La Mancha, caracterizados principalmente por la aparición de masas de micelio de color blanco y aspecto pulverulento sobre la mezcla de cobertura, y por la pérdida de calidad comercial y posterior pudrición de los cuerpos fructíferos afectados. El hongo patógeno aislado se caracteriza por crecer rápidamente sobre medio de cultivo, formando abundante micelio aéreo, y difundir un pigmento de color rojo en el medio. Presenta conidios cilíndricos, ligeramente elipsoidales, de 17-25 x 8-10 µm, con 0-3 septos. La identificación molecular se realizó mediante la amplificación de la región ITS del ADN ribosómico con los iniciadores ITS1F/ITS4 y posterior secuenciación del amplímero de un aislado (GenBank Accession No. JF505112), que mostró una similaridad del 100% con dos secuencias de *Cladobotryum mycophilum* (teleomorfo *Hypomyces odoratus*). Se realizó un test de patogenicidad inoculando 20 cuerpos fructíferos de seta de cardo (10 en la superficie exterior y 10 en el tejido interno) con 50 µl de suspensión conidial de un aislado de *C. mycophilum* ($3,4 \times 10^5$ ml⁻¹). Como control se utilizaron 20 carpóforos inoculados con agua destilada. Tras la incubación en cámara húmeda a 22°C durante 7 días, *C. mycophilum* se reaisló del 85% de los cuerpos fructíferos inoculados internamente y del 40% de los inoculados en la superficie exterior, mientras que el control no mostró síntomas de la enfermedad. El ensayo se realizó por duplicado. Un segundo ensayo de patogenicidad se llevó a cabo en una cámara de cultivo, utilizando 24 paquetes de sustrato esterilizado, sembrado e incubado con *P. eryngii*. Cinco días después de añadir la mezcla de cobertura, se aplicaron 5 ml de una suspensión conidial (7×10^3 conidios ml⁻¹) de *C. mycophilum* a cada paquete. Otros 22 paquetes utilizados como control se inocularon con agua destilada estéril. Los primeros síntomas de telaraña se observaron 23 días después de la inoculación, y el patógeno se reaisló en el 37,5% de los paquetes infectados, mientras que los paquetes del control permanecieron sanos. Ésta es la primera cita de *Cladobotryum mycophilum* como agente causal de la telaraña en cultivos de seta de cardo en España.

Este trabajo ha sido financiado por el INIA y con fondos FEDER (Proyecto RTA2010-00011-C02-01).

PAN-131

DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE *Ilyonectria* spp. CAUSANTES DEL PIE NEGRO DE LA VID EN SUELOS DE VIVEROS MEDIANTE NESTED-MULTIPLEX PCR y PCR A TIEMPO REAL

Agustí-Brisach, C.¹, Armengol, J.¹, Mostert, L.²

¹Instituto Agroforestal Mediterráneo, Universidad Politécnica de Valencia, Camino de Vera s/n, 46022-Valencia, España, ²Department of Plant Pathology, University of Stellenbosch, Private Bag X1, Stellenbosch 7602, South Africa. E-mail: caragbri@upvnet.upv.es

En Julio de 2012 se muestrearon suelos de tres campos de enraizamiento y tres campos de plantas madre en dos viveros comerciales de plantas de vid. En cada campo se recogieron 10 muestras de suelo, tomando 3 submuestras de 10 gr cada una por muestra. Todas las submuestras se liofilizaron y, posteriormente, se molieron mecánicamente hasta obtener un polvo fino, a partir del cual se realizó la extracción de ADN mediante el kit de extracción ZR Soil Microbe DNA MiniPrep™. El ADN se analizó mediante “nested-multiplex PCR” usando tres pares de cebadores específicos (Mac1/MaPa2, Lir1/Lir2 y Pau1/MaPa2) para *Ilyonectria* spp. Se detectó la presencia de *Ilyonectria* spp. en 172 submuestras de suelo, de las 180 analizadas. *Ilyonectria macrodidyma*-complex se encontró en 141 submuestras y en todos los campos estudiados. Sin embargo, *I. liriodendri* sólo se encontró en 16 submuestras en todos los campos estudiados, exceptuando un campo de plantas madre. Paralelamente, se cuantificaron los niveles de ADN de *Ilyonectria* spp. en todas las submuestras de suelo mediante PCR a tiempo real utilizando los cebadores YT2F/Cyl-R. Con esta técnica se detectó ADN de *Ilyonectria* spp. en la mayoría de las submuestras analizadas, coincidiendo en general con los resultados obtenidos mediante “nested-multiplex PCR”. Las concentraciones de ADN de *Ilyonectria* spp. obtenidas estuvieron comprendidas entre 0.001 y 190.5 pg μL^{-1} , detectándose normalmente mayores concentraciones en las submuestras de suelo procedentes de campos de plantas madre. Estas técnicas moleculares se han mostrado como muy útiles para la detección y cuantificación de *Ilyonectria* spp. asociadas al pie negro de la vid.

Financiado por el proyecto RTA2010-00009-C03-03 (INIA), cofinanciado con fondos FEDER (EU). Agradecemos a la UPV la ayuda para la estancia de C. Agustí-Brisach en la University of Stellenbosch (PAID-00-11)

**DESCRIPCIÓN DE UN NUEVO BEGOMOVIRUS QUE INFECTA
CULTIVOS DE TOMATE, PIMIENTO Y JUDÍA EN PERÚ**

Martínez-Ayala, A.¹, Sánchez-Campos, S.¹, Aragón-Caballero, L.², Navas-Castillo, J.¹, Moriones, E.¹

¹ *Instituto de Hortofruticultura Subtropical y Mediterránea "La Mayora" (IHSM-UMA-CSIC), Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Estación Experimental "La Mayora". 29750 Algarrobo-Costa, Málaga. E-mail: moriones@eelm.csic.es.*

² *Facultad de Agronomía, Universidad Nacional Agraria La Molina, La Molina, Lima, Perú.*

El género *Begomovirus*, incluido en la familia *Geminiviridae* de virus de plantas, es considerado como uno de los principales grupos virales emergentes. Estos virus causan importantes pérdidas económicas afectando a la producción de numerosos cultivos en todo el mundo. A raíz de la detección por primera vez de un begomovirus en Perú, realizada por nuestro grupo, se ha llevado a cabo un análisis exhaustivo de la posible presencia de otros begomovirus. Para ello, se han analizado muestras recogidas en las principales regiones hortícolas de Perú durante los años 2009 y 2010, tanto de especies cultivadas como silvestres. El genoma de los begomovirus está formado por una o dos moléculas de DNA de cadena sencilla y circular (ssDNA), siendo la mayoría de los begomovirus presentes en Latinoamérica bipartitos, es decir, presentan dos moléculas de DNA (DNA-A y DNA-B). Basándonos en esta propiedad, a partir de extractos de ácidos nucleicos de las muestras, se realizaron ampliificaciones mediante RCA (Rolling circle amplification) con la polimerasa Phi 29 que amplifica moléculas circulares de DNA. Sobre los productos de la amplificación por RCA se realizaron análisis del polimorfismo de los fragmentos de restricción (RFLP) que apoyaron la presencia de begomovirus en las muestras. En este trabajo se muestra el clonaje y caracterización del genoma de uno de estos begomovirus. El análisis de la secuencia del DNA-A y DNA-B amplificados demuestra que se trata de una nueva especie de begomovirus. Hemos encontrado este nuevo begomovirus ampliamente distribuido en las regiones muestreadas, detectándose en muestras tanto de judía, tomate y pimiento como en algunas especies de malas hierbas. A partir de estas muestras hemos realizado el estudio de variabilidad genética donde se observa que existe una alta homología de secuencia en la población. La información obtenida en este estudio nos servirá de base para el planteamiento de estrategias de control de este nuevo virus.

***Hemicycliophora* spp. ¿UN NUEVO PROBLEMA EN EL CULTIVO DE LA FRESA EN HUELVA?**

Bascón, J.¹, C. Arcos, S.², Páez, J.I.³, Avilés, M.⁴, Robertson, L.², Vega, J.M.³, Navas, A.²

¹Laboratorio de Producción y Sanidad Vegetal, Ctra. Punta Umbría-Cartaya km. 12, 21459 Cartaya (Huelva).

²Dpto. Biodiversidad y Biología Evolutiva, Museo Nacional de Ciencias Naturales, José Gutiérrez Abascal 2, 28006 Madrid.

³Laboratorio de Producción y Sanidad Vegetal, Apdo 121, 41089 Montequinto (Sevilla).

⁴Dpto. Ciencias Agroforestales, Universidad de Sevilla, E.T.S.I.A., Ctra. de Utrera km. 1, 41013 Sevilla. E-mail: aviles@us.es

Durante las dos últimas campañas se ha observado en túneles distintos de tres plantaciones de fresa de Huelva (dos de Palos de la Frontera y una de Isla Cristina) rodales con síntomas muy patentes en los primeros meses de desarrollo de las plantas: éstas presentaban crecimiento menor, pequeños engrosamientos y necrosis radicular; por último producían pocos frutos de pequeño tamaño.

La etiología de los síntomas no está asociada a hongos, virus o bacterias por lo que se llevó a cabo un análisis nematológico de la fracción periradicular del suelo de las plantas afectadas. Los nematodos se extrajeron mediante centrifugación en azúcar, detectándose elevadas poblaciones de individuos pertenecientes al género *Hemicycliophora* de Man, 1921 (syn. *Procriconema* Micoletzky, 1925).

Hemicycliophora es un nematodo ectoparásito perteneciente a la familia Hemicycliophoridae, superfamilia Criconematoidea (infraorden Tylenchomorpha). Numerosas especies de este género se reconocen en la bibliografía como fitopatógenas, asociadas fundamentalmente a cultivos hortícolas y plantas herbáceas. La alta densidad y diversidad de poblaciones que hemos encontrado, sugiere que en fresa existe un daño asociado a la presencia de al menos tres especies de *Hemicycliophora* cuyo origen geográfico es distinto. Hasta la fecha, y considerando lo complejo de la taxonomía del género, hemos identificado: *H. ritteri* y *H. typica* en Palos de la Frontera y *Hemicycliophora* sp. en Isla Cristina.

**DISEÑO DE UN PROTOCOLO DE DETECCIÓN DE
Mycosphaerella nawae EN MUESTRAS VEGETALES DE CAQUI**

Berbegal, M.¹, Mora, B.^{2,1}, García-Jiménez, J.¹

¹Instituto Agroforestal Mediterráneo, Universidad Politécnica de Valencia, Camino de Vera s/n, 46022-Valencia, España, ²Fundación Agroalimed, c/ Tramuntana, 16. Polígono Industrial Ciudad de Carlet, 46240-Carlet, Valencia. E-mail: mobermar@etsia.upv.es

La producción de caqui (*Diospyros kaki*) en España ha aumentado de forma significativa en la última década, debido, entre otros factores, al interés despertado por el cv. "Rojo Brillante" que resulta rentable y de gran calidad. En 2008, se identificó en la Comunidad Valenciana y por primera vez en Europa la enfermedad de la necrosis foliar del caqui causada por el hongo *Mycosphaerella nawae*. Este patógeno infecta los árboles en primavera aunque los síntomas no se observan hasta final de verano incluyendo lesiones foliares y defoliación masiva, adelanto en la maduración y abscisión de los frutos. El objetivo de este trabajo fue diseñar un protocolo de detección del patógeno mediante PCR a partir de muestras vegetales de caqui. Para ello, se analizaron las secuencias de ITS de una amplia colección de aislados de *M. nawae* procedentes de diferentes zonas afectadas en la Comunidad Valenciana. Las secuencias se compararon entre sí y con las de otras especies de *Mycosphaerella*, diseñando los primers en las zonas variables específicas de *M. nawae*. Se comprobó la especificidad y sensibilidad de la amplificación mediante PCR convencional y nested-PCR.

El protocolo desarrollado resultó ser específico y muy sensible, pudiéndose detectar hasta 5×10^{-6} ng/μl de DNA del hongo mediante nested-PCR. La técnica puesta a punto se evaluó con muestras procedentes de parcelas afectadas con y sin síntomas. El protocolo resulta fiable para el análisis de muestras vegetales con síntomas o asintomáticas y se propone como método para la detección temprana de la enfermedad en hojas de caqui.

PAN-135

CARACTERIZACIÓN DE AISLADOS DE LA PHYTOPHTHORA DEL ALISO PROCEDENTES DE MASAS CON DECAIMIENTO DE CASTILLA Y LEÓN

Haque, M.M., Hidalgo, E., de Lucas, A.I., Díez, J.J.

Instituto Universitario de Investigación en Gestión Forestal Sostenible, Universidad de Valladolid - INIA. Avenida de Madrid 57, 34004 Palencia.

E-mail: mhaque@pvs.uva.es

En el año 2009 se observó en la provincia de Lugo un severo decaimiento de las masas de alisos (*Alnus glutinosa*). Para determinar las causas de los daños y la muerte de los alisos, se realizaron durante los años 2010 y 2011 muestreos en las zonas de ribera de la Comunidad Autónoma de Castilla y León. Así, se aisló al patógeno de las áreas necrosadas en la corteza del cuello de la raíz y zona baja del tronco. A los aislados obtenidos se les realizó estudios morfológicos, moleculares así como fisiológicos. Los aislados resultaron ser homotáticos y producían oogonios sobre medio de cultivo de zumo V8 con agar (V8A), con anteridios de una o dos células, paredes de lisas a ornamentadas con protuberancias globosas y gran cantidad de oosporas abortadas. Se encontraron esporangióforos largos, con esporangios terminales no papilados, de forma elipsoide u ovoide. El crecimiento de la colonia sobre medio de cultivo de zanahoria con agar (CA) y V8A fue de uniforme a irregular, con micelio de aplanado a ligeramente algodonoso. Las tasas de crecimiento de la colonia a diferentes temperaturas, pH y potencial osmóticos fueron diferentes según el medio de cultivo utilizado. La región ITS del ADN fue secuenciada y comparada con las existentes en el GenBank. De esta manera el análisis molecular confirmó que los aislados pertenecían a la especie *Phytophthora alni*, como apuntó la identificación morfológica y fisiológica previa. En la actualidad se están llevando a cabo estudios moleculares complementarios con el objetivo de identificar al patógeno hasta el nivel de subespecie.

AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE ESPECIES DE *Phytophthora* Y *Phytophythium* EN CULTIVOS DE AGUACATE DE LAS ISLAS CANARIAS

Rodríguez Padrón, C.¹, Domínguez Correa, P.¹, Siverio de la Rosa, F.², Pérez Sierra, A.³, Gallo Llobet, L.¹, Rodríguez Pérez, A.⁴

¹Dpto. Protección Vegetal. Instituto Canario de Investigaciones Agrarias (ICIA). Apdo. 60, 38200 La Laguna, Tenerife. e-mail: crodpad@icia.es

²Sección de Laboratorio de Sanidad Vegetal. Carretera del Boquerón s/n. Valle de Guerra. Apdo. 20, 38270 La Laguna, Tenerife.

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

⁴Dpto. Microbiología y Biología Celular. Facultad de Farmacia. Universidad de La Laguna. 38207 La Laguna, Tenerife.

Una de las principales limitaciones del cultivo del aguacate es la incidencia de la podredumbre de raíz cuyo agente causal es *Phytophthora cinnamomi* Rands. En un estudio destinado a inventariar cultivos de aguacate afectados por esta enfermedad se procesaron un total de 51 muestras procedentes de 35 plantaciones distintas, localizadas en diferentes zonas productoras de aguacate de las islas de Tenerife y La Palma. A partir de estas muestras, compuestas en su mayoría por tierra acompañada de material vegetal, se realizaron aislamientos de raíces, mediante siembra en medios de cultivo generales y selectivos para el género *Phytophthora*, y de suelo, utilizando la técnica de trampeo con frutos y hojas de aguacate. Los aislados obtenidos fueron identificados a nivel morfológico atendiendo a las características de su micelio, temperatura de crecimiento, inducción de estructuras reproductoras y morfología de esporangios, oogonios, anteridios y oosporas. Además, se analizaron mediante PCR con la pareja de iniciadores específicos para *P. cinnamomi* LPV2-LPV3, lo que permitió confirmar la identidad de nueve aislados de *P. cinnamomi*. La identificación del resto de aislados se completó con la amplificación de la región ITS del ADNr con los iniciadores ITS4-ITS6. Los amplificados se secuenciaron y se compararon con secuencias depositadas en el GenBank mediante la aplicación BLAST (Basic Local Alignment Search Tool). Los resultados obtenidos permitieron identificar siete aislados de *Phytophthora multivora*, un aislado de *Phytophthora palmivora* y un aislado de *Phytophthora nicotianae*, así como diez aislados del complejo *Pythium vexans*, incluido en el grupo K del género *Pythium*. Los estudios morfológicos y filogenéticos sitúan a las especies de este grupo entre *Phytophthora* y *Pythium*, y recientemente se ha propuesto su clasificación en el género *Phytophythium* gen. nov.

INCIDENCIA Y CARACTERIZACIÓN DE HONGOS PATÓGENOS DE FRESA EN PLANTAS Y SUELOS DE VIVEROS DE ALTURA Y FINCAS DE PRODUCCIÓN DE FRUTO

Pastrana, A.M., Aguado, A., De los Santos, B., Sánchez, M.C., Chamorro, M., Romero, F., Capote, N.

IFAPA Las Torres-Tomejil. Carretera Sevilla-Cazalla Km 12,2. 41200 Alcalá del Río, Sevilla E-mail: marian.capote@juntadeandalucia.es

El cultivo de la fresa (*Fragaria x ananassa* Duch.) en España se realiza en dos etapas y en dos regiones geográficas diferentes. La producción de plantas de fresa se lleva a cabo entre los meses de Febrero y Septiembre en suelos de viveros de altura concentrados en las provincias de Ávila, Segovia y Valladolid. En esta zona, las condiciones climáticas son las apropiadas para la multiplicación vegetativa de las plantas y la acumulación de las horas-frío necesarias para una buena fructificación. Posteriormente, las plantas son enviadas a las fincas de producción de fruto de la provincia de Huelva donde tiene lugar su desarrollo vegetativo, floración y fructificación (Octubre-Mayo). La prohibición de la fabricación y aplicación de BrMe como desinfectante de suelo en todo el territorio comunitario y su retirada definitiva en 2007 en campos de producción y en 2009 en viveros de altura, ha provocado importantes pérdidas en la producción debido, entre otros factores, a la emergencia de enfermedades fúngicas con alta virulencia. En particular, se ha observado recientemente la aparición de dos nuevos patógenos que podrían causar severas pérdidas en el cultivo de la fresa, *Fusarium oxysporum* (Schlechtend emend. Snyder & Hansen) y *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid, además de un aumento de la incidencia de los patógenos habituales de este cultivo. Para llevar a cabo estrategias de control es imprescindible en primer lugar, conocer las posibles fuentes de inóculo y la incidencia real de estos hongos en el suelo y en la planta, tanto en viveros como en los campos de producción. Por ello, se han llevado a cabo prospecciones en suelos de viveros de tres localidades de las provincias de Ávila, Segovia y Valladolid, antes y después de los tratamientos de desinfección de suelo, y se han analizado plantas madre prebase y plantas hija de distintas variedades de fresa entre las que se incluyen 'Amiga', 'Antilla', 'Benicia', 'Camarosa', 'Candongra', 'Fabette', 'Festival', 'Fortuna', 'Primoris', 'Sabrina', 'San Andrea', 'Splendor', y 'Viva'. Asimismo, se han analizado muestras de suelos pre- y post-plantación en dos fincas de producción de fruto de fresa de la provincia de Huelva (Palos de la Frontera y Cartaya) y de plantas enfermas de esas mismas fincas recogidas a lo largo del periodo de producción. La detección, caracterización e incidencia de los hongos fitopatógenos *F. oxysporum*, *M. phaseolina* y *Phytophthora* spp. tanto de muestras de suelo como de planta se ha llevado a cabo mediante cultivo en placa en medio semiselectivo y PCR en tiempo real. Los resultados serán presentados y discutidos en este congreso.

Este trabajo ha sido financiado por el proyecto INIA:RTA2011-00011-00-00, con un 70% de financiación FEDER "Programa operativo de economía basada en el conocimiento"

**IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DEL HONGO DE PUDRICIÓN DE
RAÍZ *Heterobasidion annosum* (FR.) BREF. sensu lato EN EL PAÍS
VASCO**

Mesanza, N., Iturrutxa, E.

*Neiker Tecnalia Producción y Protección Vegetal. Granja Modelo de Arkaute.
46 Post. Vitoria- Gasteiz, 01080 España. E-mail: eiturrutxa@neiker.net*

En la segunda mitad del siglo XX la superficie forestal en el norte de España empezó a aumentar debido al incremento de la reforestación, principalmente, introduciendo monocultivos de especies exóticas de coníferas.

Una de las implicaciones que conllevan la explotación forestal intensa y la introducción de nuevas especies forestales es el aumento en la aparición de enfermedades. Puesto que el género *Heterobasidion* incluye algunos de los patógenos de coníferas más significativos del mundo, el estudio se realizó con el objetivo de recoger e identificar cepas de *Heterobasidion* asociadas a diferentes hospedadores en bosque y plantaciones de coníferas del País Vasco. Se estudiaron un total de 159 parcelas de las que se obtuvieron 46 aislados de diferentes árboles. La identificación de especies se basó en la secuenciación de la región ITS del ADN ribosómico. Todos los aislados fueron identificados como *Heterobasidion annosum* s.s. (Tipo-P Europeo).

Así, *Heterobasidion annosum* s.s fue detectado en el 28,9 % de las parcelas muestreadas siendo su distribución por hospedador la siguiente: *Chamaecyparis lawsoniana* (10.9 %), *Pinus pinaster* (2.2%), *P. radiata* (43.4%), *P. nigra* (2.2%), *P. sylvestris* (17.4%), *Pseudotsuga menziesii* (17.4%) y *Picea abies* (6.5%). La distribución espacial de la población mostró un alto grado de agrupación.

Éste es el primer informe en España de daños causados por *H. annosum* s.s. a plantaciones forestales de *Chamaecyparis lawsoniana*, *Pinus pinaster*, *P. radiata*, *Pseudotsuga menziesii* y *Picea abies*.

En el actual contexto de patosistemas forestales en el norte de España se recomienda, como práctica de silvicultura, la sustitución de las especies forestales susceptibles por especies resistentes.

PRIMERA CITA DE PUNTISECADO CAUSADO POR *Neofusicoccum parvum* Y *N. australe* EN ARÁNDANO EN ESPAÑA

Borrero, C.¹, Castaño R.¹, Castillo, S.¹, Rodríguez, A.², Avilés, M.¹

¹*Departamento de Ciencias Agroforestales, E.T.S.I.A, Universidad de Sevilla, Ctra. Utrera km 1, 41013, Sevilla. aviles@us.es*

²*BASF Española S.L. Estación Experimental Agrícola, Ctra. A-376, km 22.6, 41710, Utrera, Sevilla.*

En otoño del 2009 en una prospección en explotaciones de arándano de la provincia de Huelva se recogieron plantas enfermas. Las plantas presentaban chancros marrón rojizo en tallos y puntisechado o muerte regresiva con distinto grado de afectación. La incidencia en las parcelas visitadas se estimó entre el 1 y el 2%.

A partir de trozos de tallos afectados de las 35 plantas de la muestra, desinfectados superficialmente e incubados en placas con medios PDA y agar-agua, se aislaron colonias fúngicas de aspecto y morfología coincidente con *Botryosphaeria* spp. en 18 de ellas. La identidad de estos aislados se confirmó analizando la zona ITS y el gen *Transcription elongation factor 1- α* (TEF1- α), usando los primers ITS1-ITS4 y EF728f-EF986r, respectivamente. Búsquedas en el GenBank a través de BLAST confirmaron que 12 de los aislados presentaban una alta identidad con *Neofusicoccum parvum*, 3 con *Neofusicoccum australe* y 3 con *Botryosphaeria dothidea*.

Tras un agrupamiento filogenético se realizó un test de patogenicidad en cámara de cultivo con un aislado representativo de cada especie, usando los cultivares 'Mystic' y 'Star'. Los aislados crecieron en PDA acidificado y la inoculación consistió en la aplicación de discos de agar (4-5 mm de diámetro) sobre heridas en el tallo, causadas con un taladro, de 5 mm de profundidad y realizados a 10 cm de altura de la planta. Estos discos se sellaron con parafilm y posteriormente las plantas se mantuvieron al 100 % de humedad durante 2 h. A continuación las plantas permanecieron con un fotoperiodo de 14 h día (30 °C) y 8 h noche (28 °C). Se inocularon seis plantas (repeticiones) por cultivar y aislado. A los testigos se les aplicó discos de agar sin hongo en las heridas. El ensayo duró tres meses. La severidad se evaluó semanalmente y estas medidas fueron integradas como área bajo la curva de progreso de la enfermedad. En ambos cultivares el aislado de *N. parvum* fue el más virulento seguido del de *N. australe*. El aislado de *B. dothidea* no presentó virulencia. Cada patógeno fue reaislado de las plantas inoculadas, cumpliéndose los postulados de Koch.

Según la información de la que disponemos, esta es la primera cita de *N. parvum* y *N. australe* como agentes causales de chancros y puntisechado en arándano en España.

PAN-140

CARACTERIZACIÓN BIOLÓGICA Y MOLECULAR DE *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* EN EL SUR DE ESPAÑA

Castaño, R., Avilés, M.

Dpto. Ciencias Agroforestales, E.T.S.I.A., Universidad de Sevilla. Ctra. Utrera km 1, 41013, Sevilla. mail:aviles@us.es

Fusarium oxysporum f. sp. *dianthi* (Fod) es un fitopatógeno causante de la Fusariosis vascular en el clavel cuya presencia, concretamente en el suroeste de España, condiciona la productividad del cultivo. Un estudio de la diversidad y distribución racial de Fod es determinante para su control y para el desarrollo de programas de mejora vegetal. El objetivo de este trabajo fue estudiar la diversidad racial y la prevalencia de las poblaciones patógenas de Fod en localidades de Cádiz con una alta tradición en el cultivo del clavel. Durante los años 2004 al 2006 se prospectaron 54 invernaderos de 25 pagos en las localidades de Chipiona, Sánlúcar de Barrameda y Rota, obteniéndose 132 aislados a partir de plantas con síntomas de Fusariosis vascular. Estos aislados se caracterizaron molecularmente, usando primers específicos de raza para Fod. Paralelamente, se realizó un estudio molecular mediante técnicas filogenéticas usando la técnica de huella génica RAPD-PCR y la secuenciación del gen Transcription Elongation Factor 1- α (*TEF1- α*). Posteriormente, se realizó un test de patogenicidad para evaluar fenotípicamente aislados seleccionados de cada agrupamiento filogenético.

Los datos filogenéticos mostraron una alta homogenidad genética intra razas, diferenciando la raza 2 de la raza 1-8 con un alto índice de similaridad. Usando los datos obtenidos con los estudios filogenéticos (usando *TEF1- α* , más fiable que RAPD-PCR), Fod raza 2 fue la más prevalente en la zona (59.3%), seguida de Fod raza 1-8 (37.0%). Por otro lado, usando los primers específicos de raza, las prevalencias fueron de 57.4 y 38.9% respectivamente. Esta diferencia se debió a tres razones principales: i) los primers específicos mostraron 10 aislados con una amplificación específica de Fod raza 1-8 retardada, los cuales fueron filogenéticamente agrupados como *outgroup* y clasificados según secuencia como *F. proliferatum*; ii) los estudios filogenéticos agruparon a 7 aislados no patogénicos en 3 clusters, los tres con amplificaciones diferentes usando primers específicos de raza; iii) tres aislados fueron agrupados como Fod raza 2 según filogenia, presentando la misma virulencia diferencial para esta raza. En cambio, no presentaron amplificación específica de raza. Este último punto podría indicar la presencia de un subgrupo de Fod raza 2 en esta región.

Este trabajo ha sido financiado por el proyecto AGL2008-05414-C03-01/AGR del Ministerio de Ciencia e Innovación y P06-AGR-02313 de la Consejería de Innovación, Ciencia y Empresa, Junta de Andalucía.

DETECCIÓN DE *Pseudomonas syringae* pv. pisi y *P. syringae* pv. *syringae* EN LOTES DE SEMILLA DE GUISANTE. EFECTIVIDAD DE LA DESINFECCIÓN CON HIPOCLORITO SÓDICO

Martín-Sanz, A.¹, Palomo, J.L.², Pozo, B.¹, García-Vaquero, C.A.¹, Aguado, E.¹, Rodríguez-Cachón, M.J., Caminero, C.¹.

¹Instituto Tecnológico Agrario, Junta de Castilla y León, Ctra. Burgos, km 119, 47071, Valladolid. E-mail: camsalco@itacyl.es. ²Centro Regional de Diagnóstico, Junta de Castilla y León, Apdo. 61, 37080, Salamanca.

El cultivo del guisante ha cobrado en los últimos años un gran interés en España, con una superficie de 234 mil ha en 2011. En el centro-norte de la Península Ibérica los ataques de bacteriosis originados por *Pseudomonas syringae* pv. pisi (*Ppi*) y *P. syringae* pv. *syringae* (*Psy*) están ocasionando importantes pérdidas económicas. Estos patógenos se transmiten fundamentalmente por semilla, por lo que el empleo de semilla libre de *Ppi* y *Psy* es la principal medida de control de la enfermedad. El objetivo de este trabajo es poner a punto un método de diagnóstico en semilla efectivo tanto para *Ppi* como para *Psy* que pueda ser realizado rutinariamente en cualquier laboratorio, así como un método simple de desinfección basado en hipoclorito sódico que pueda ser utilizado por el propio agricultor o por multiplicadores de semilla para reducir la incidencia de esta enfermedad.

El protocolo de diagnóstico se basó en la siembra del líquido de maceración de las semillas en medios semiselectivos sólidos (KBC y S4), y en medio KBC líquido, implementado con diagnóstico molecular (marcadores PCR *syxB* y AN3/AN7 para *Psy* y *Ppi*, respectivamente). El método fue efectivo para *Ppi* y *Psy*. Con esta metodología se analizaron 60 lotes de diferentes variedades de guisante que habían presentado diferentes grados de infección por bacteriosis en campo. Los resultados mostraron que prácticamente todos ellos estaban contaminados, aunque en grados muy diversos según los conteos de colonias efectuados. Esta información fue acorde con las valoraciones de incidencia y severidad de las parcelas de origen. La consistencia de los diagnósticos en diferentes repeticiones fue alta pero no siempre corroborada.

Para la desinfección se evaluaron diferentes concentraciones y tiempos de aplicación de hipoclorito sódico en semilla contaminada. La medida más efectiva y sin perjuicio en la germinación fue al 1% de lejía comercial (40g/l de cloro activo) durante 10 minutos. Posteriormente 25 lotes de semilla fueron desinfectados y nuevamente evaluados, mostrándose en todos los casos reducciones en el número de colonias de entre el 30 y el 100%. Por último se realizó un ensayo en el campo durante la campaña 2009/2010 y 2010/2011 con lotes de semilla tratados con lejía y controles sin tratar mostrándose la efectividad del tratamiento en las muestras altamente contaminadas.

Esta investigación ha sido financiada por el proyecto UE/FEDER/POCTEP 0186_AGROCELE_3_E

ESTADO ACTUAL DE LA INFECCIÓN NATURAL POR EL VIRUS DEL ENANISMO MOTEADO DE LA BERENJENA (EMDV) EN ESPAÑA

Monge, P.¹, Luis Arteaga, M.¹, Tornos, T.², Escriu, F.¹

¹ Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria. Avda Montañana 930, 50059 Zaragoza, España.

² Laboratori de Sanitat Vegetal, Generalitat de Catalunya, Ctra de Cabrils Km2 Edificio IRTA, 08348 Cabrils, Barcelona, España.

El virus del enanismo moteado de la berenjena (*Eggplant mottled dwarf virus*, EMDV, *Nucleorhabdovirus*, *Rhabdoviridae*) fue descrito por primera vez en berenjena en Italia, por Martelli y Cirulli en 1969. Desde entonces se ha encontrado en varios países del norte de África, Europa Central y Meridional y Oriente Medio sobre diferentes especies (tomate, tabaco, pimiento, patata, pepino, melón, *Pittosporum tobira*, *Hibiscus rosa-sinensis*, pelargonium, madreselva, alcaparra, *Solanum nigrum* y *S. sodomaeum*). En España el virus se encontró por primera vez en Tenerife sobre *H. rosa-sinensis* en 1981 y más tarde en pepino y berenjena en Barcelona (2005), en *P. tobira* en Valencia y Tarragona (2009) y en berenjena y pimiento en Almería (2011). En 1995 y 1997, en prospecciones realizadas por nuestro grupo en cultivos de pimiento en la provincia de León, se observaron frutos con síntomas virales, áreas decoloradas y deprimidas. La reacción de una gama de huéspedes inoculados con extractos de planta infectada y el análisis por microscopía electrónica indicaron que el agente causal era probablemente EMDV. En 2001 se volvieron a observar síntomas similares en pimiento en Navarra y en la misma localidad de León en el periodo 2002-2005. En 2010 se observaron síntomas de mosaico y deformación intensos en frutos de pepino y tomate en Zaragoza y en 2011 en pimiento, tomate, *Luffa cylindrica* y *Physalis alkekengi* en la provincia de Barcelona. De nuevo, la reacción de huéspedes indicadores inoculados con extractos de planta infectada fue similar a la descrita para EMDV. Las muestras de campo y/o los huéspedes indicadores infectados se analizaron por ELISA-DAS. A partir de extractos de RNA total se obtuvieron fragmentos amplificados por RT-PCR con cebadores específicos de rhabdovirus, que se clonaron y secuenciaron. Tanto el análisis serológico como el molecular confirmaron la infección por EMDV. El análisis BLAST de las secuencias obtenidas mostró un 96 y 98% de identidad con las secuencias de los aislados de EMDV procedentes de *P. tobira* (números de acceso: HM636919 y HM636918) y un 90% con la de un aislado de Grecia (AM922322). El análisis filogenético agrupó todos los aislados españoles, junto con el aislado de Grecia, dentro del grupo de los nucleorhabdovirus de plantas. Los resultados de este trabajo y los datos encontrados en la bibliografía indican un aumento de la frecuencia de infección natural por EMDV en España en un número creciente de huéspedes. Este trabajo es, que sepamos, la primera detección de EMDV en *P. alkekengi* y *L. cylindrica*.

DEFORMACIONES EN LOS PINOS RELACIONADAS CON “*Candidatus Phytoplasma pini*”

Alfaro-Fernández, A.¹, Mas, H.², Pérez-Laorga E.³, Hernández-Llopis, A.¹, Fernández-Serrano, A.¹, Pastor, C.¹, Pali, J.¹, Dolz L.¹, Font, M.I.¹

¹*Grupo de Virología. Instituto Agroforestal Mediterráneo. Universidad Politécnica de Valencia. Cno. Vera, s/n. 46022 Valencia. E-mail: analfer1@doctor.upv.es.*

²*Laboratori de Sanitat Forestal. Centre per a la Investigació i Experimentació Forestal (CIEF). Conselleria d'Infraestructures, Territori i Medi Ambient. Generalitat Valenciana. Avda. Comarques del País Valencia, 114, 46930, Quart de Poblet, València. lab_plagas.ctv@gva.es*

³*Servici d'Ordenació i Gestió Forestal. Conselleria d'Infraestructures, Territori i Medi Ambient. Generalitat Valenciana. C. Francisco Cubells, 7, planta 3, 46011 València. perezlaorga_edu@gva.es*

En los últimos años se vienen observando en los pinares españoles un mayor número de *Pinus halepensis* y *Pinus sylvestris* con desarreglos en su desarrollo. El propósito de este trabajo fue determinar durante los años 2010 y 2011 la presencia de fitoplasmas en pinos de distintas zonas de la Comunidad Valenciana con cinco tipos de desarreglos: pinos que presentaban un desarrollo en bola de una de sus ramas (rama bola), pinos en los que toda la copa se había desarrollado en bola (árbol bola), pinos que presentaban acículas deformadas, brotación de las ramas en escoba de bruja y el engrosado de las mismas (deformación), seca de la puntas de las acículas de ramas sin deformación aparente (puntisecado), y seca importante de acículas en sectores definidos de la copa a modo de manchas o fogonazos (fogonazo).

La detección e identificación de *Ca. Phytoplasma pini* se realizó empleando la técnica molecular “nested-PCR”, cebadores universales del ADN ribosómico 16S (P1/P7 y R16F2n/R2), y la posterior secuenciación de los fragmentos amplificados.

Los resultados obtenidos hasta la fecha muestran que el fitoplasma *Candidatus Phytoplasma pini* ha sido diagnosticado en la mayoría de pinos que presentaban la “brotación en bola” (una rama o todo el árbol), “deformación” y el “fogonazo”. No se ha podido determinar la presencia de fitoplasmas en pinos con “puntisecado”.

**ESTUDIOS PRELIMINARES SOBRE LA PRESENCIA DE OOMICETOS
EN LA LAURISILVA EN TENERIFE**

Beltrán, A.¹, León, M.¹, Abad-Campos, P.¹, Siverio, F.², Gallo, L.³, Pérez-Sierra, A.¹

¹*Instituto Agroforestal Mediterráneo, Universitat Politècnica de València, Camino de Vera s/n, 46022 Valencia. E-mail: aperesi@eaf.upv.es*

²*Laboratorio de Sanidad Vegetal de la Consejería de Agricultura, Ganadería, Pesca y Aguas del Gobierno de Canarias. Ctra. de El Boquerón s/n, Valle Guerra, La Laguna, 38270 Tenerife.*

³*Instituto Canario de Investigaciones Agrarias, Ctra. de El Boquerón s/n, Valle Guerra, La Laguna, 38270 Tenerife.*

La laurisilva es un ecosistema único, de amplia diversidad vegetal, y de gran importancia para la conservación en las Islas Canarias, Madeira y Azores. La laurisilva se da en regiones de clima húmedo y templado; estas condiciones la hacen un lugar favorable para el desarrollo de oomicetos que podrían amenazar a la vegetación existente. El objetivo de este estudio fue investigar la presencia de dichos oomicetos en la vegetación de laurisilva en el Parque Rural de Anaga (14.419 ha), situado en el extremo nordeste de la isla de Tenerife. Se realizó una prospección en 22 puntos distintos del parque durante el otoño de 2011, tomándose muestras de suelo y de raíces de diferentes árboles y arbustos (*Ocotea foetens*, *Arbutus canariensis*, *Viburnum rigidum* y *Persea indica*). Se realizaron aislamientos de raíces en medio de cultivo PARPH y se utilizaron hojas de aguacate como trampa vegetal para los aislamientos de suelo. Se obtuvieron sesenta y ocho aislados de oomicetos que se identificaron a nivel morfológico en función de sus estructuras vegetativas y reproductivas, y a nivel molecular mediante la amplificación y secuenciación de la región ITS del ADNr con los cebadores ITS4 e ITS6. Las secuencias obtenidas se compararon con secuencias depositadas en GenBank. En este muestreo preliminar se detectó *Phytophthora multivora* y cinco especies de *Pythium*: *P. diclinum*, *P. heterotallicum*, *P. litorale*, *P. mamillatum*, *P. mercuriale* y *P. vexans*. Tres especies de *Pythium* no pudieron ser identificadas en base a su morfología y secuencias. Se trata de la primera detección de estos oomicetos en el bosque de laurisilva en las Islas Canarias. En un futuro se prevé la realización de nuevos muestreos y un estudio de la patogenicidad de estos oomicetos con el fin de evaluar el riesgo que puedan representar para el bosque de laurisilva.

Este estudio ha sido financiado por INIA/Euphresco-CEP.

DIVERSIDAD DE OOMICETOS Y PATÓGENOS FÚNGICOS EN VIVEROS FORESTALES

Abad-Campos, P.¹, Puértolas, A.¹, Ortega, A.², Guirao, P.², León, M.¹, García-Jiménez, J.¹, Pérez-Sierra, A.¹

¹*Grupo de Investigación en Hongos Fitopatógenos, Instituto Agroforestal Mediterráneo, Universitat Politècnica de València. Camino de Vera s/n. 46022-Valencia. Email: pabadcam@eaf.upv.es*

²*Dpto. Producción Vegetal, Escuela Politécnica Superior de Orihuela. Carretera de Beniel km 3,2. 03312- Orihuela.*

La calidad fitosanitaria es uno de los múltiples factores implicados en el éxito de un programa de reforestación o del establecimiento de una plantación forestal. Se ha realizado una prospección en viveros forestales de la Comunidad Valenciana. En todos ellos, las plantas se cultivaban en contenedores de alveolos, incluyéndose en el muestreo planta completa y su sustrato. Se realizaron dos tipos de muestreo, uno dirigido seleccionando plantas sintomáticas (manchas foliares, coloración anormal de acículas, clorosis, malformación de brotes, defoliación, enanismo y/o marchitez) y otro aleatorio de plantas asintomáticas. Los aislamientos de material vegetal se realizaron en los medios de cultivo CMA-PARPBH y PDAS. El uso de manzanas como cebo vegetal se utilizó para aislar oomicetos a partir de las muestras de sustrato. Los aislados de hongos y oomicetos obtenidos se sembraron en medio PDA para una primera identificación morfológica. Los oomicetos se sembraron en medio jugo V8-agar para inducir la formación de estructuras reproductivas. El crecimiento en medio SNA facilitó el reconocimiento de las especies de *Fusarium*. La identificación molecular se basó en la amplificación y secuenciación de la región ITS del ADNr usando cebadores universales. Los resultados indican una incidencia baja de infecciones en la parte aérea, en comparación con las asociadas a la raíz, destacando la presencia de *Fusarium oxysporum*, *F. proliferatum*, *F. solani*, *F. verticillioides*, *Fusarium* sp., *Cylindrocarpon macrodidymum*, *C. liriodendri*, *Cylindrocarpon* sp., *Rhizoctonia* sp., *Phytophthora cactorum*, *P. citrophthora*, *P. cryptogea*, *P. nicotianae*, *P. plurivora* y *Pythium* spp.

Este trabajo ha sido financiado por el Proyecto AGL2011-30438-C02-01 del Ministerio de Ciencia e Innovación y cofinanciado con fondos FEDER (EU).

ENFERMEDADES FÚNGICAS DE LOS CÍTRICOS EN PANAMÁ

Aguilera-Cogley, V.¹, Vicent, A.²

¹Laboratorio de Protección Vegetal. Instituto de Investigaciones Agropecuarias de Panamá (IDIAP). Los Canelos – Santa María, Panamá.

²Centro de Protección Vegetal y Biotecnología. Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA). Apdo. Oficial, Moncada 46113, Valencia. Email: avicent@ivia.es

La superficie cítricola en Panamá ha aumentado considerablemente durante los últimos años, destinándose la producción tanto al consumo en fresco como para la industria de zumo. En las parcelas es frecuente observar la presencia de diferentes enfermedades, pero en la mayoría de los casos se desconoce su etiología. Esta situación dificulta enormemente el diseño de estrategias de control efectivas que permitan mejorar los rendimientos. En 2010 se inició una prospección a nivel nacional en la que se visitaron un total de 50 parcelas en las diferentes áreas geográficas del país. En cada una de ellas, se caracterizaron los síntomas observados y se tomaron muestras de los órganos afectados: hojas, flores, frutos, tronco y raíces. Dependiendo del tipo de muestra, se realizaron aislamientos en medio de cultivo generales y/o selectivos. Los aislados fúngicos obtenidos se repicaron a PDA y V8 para su identificación morfológica. Adicionalmente, se realizó una identificación molecular de algunos aislados representativos mediante la amplificación y secuenciación la región ITS. En 75% de las parcelas prospectadas se detectó la presencia de pústulas necróticas en las hojas, de las que se aisló consistentemente *Mycosphaerella citri* Whiteside, agente causal de la mancha grasienta o "greasy spot" de los cítricos. Las parcelas afectadas presentaban defoliaciones intensas, asociadas a pérdidas de rendimiento significativas, especialmente acusadas en las parcelas de pomelo. En algunos huertos de naranja y lima se observaron lesiones de color anaranjado en los pétalos florales, que provocaban la caída de los frutos recién cuajados. De estas lesiones se aisló consistentemente *Colletotrichum acutatum* J.H. Simmonds. Las pruebas de patogenicidad confirmaron que se trataba del agente causal de la antracnosis o "postbloom fruit drop" de los cítricos. Por último, se detectó también la presencia de síntomas de melanosis en hojas y frutos de naranja, de los que se aisló *Phomopsis* sp. En conclusión, los resultados de la prospección indican que la mancha grasienta es la principal enfermedad fúngica de los cítricos en Panamá, sobre la que es necesario realizar estudios específicos de epidemiología y control.

Trabajos financiados parcialmente por el Programa de Formación del Sistema de los INIA de Iberoamérica.

VIRUS DETECTADOS EN HIGUERAS DE LA PENÍNSULA IBÉRICA

Alfaro-Fernández, A., Hernández Llopis, A., Font, M.I.

Grupo de Virología. Instituto Agroforestal Mediterráneo. Universidad Politécnica de Valencia. Cno. Vera, s/n. 46022 Valencia. E-mail: analfar1@doctor.upv.es.

La higuera (*Ficus carica* L.) es una especie típica de la cuenca mediterránea que se ve afectada por la enfermedad del mosaico de la higuera, de etiología viral y transmitida por el eriófido *Aceria ficus* Cotte. En la actualidad, se han identificado varios virus afectando a esta especie que pertenecen a distintas familias, aunque mayoritariamente se detecta el virus del mosaico de la higuera, *Fig mosaic virus*, (FMV, género *Emaravirus*). Por el momento se considera que FMV es el agente causal de la enfermedad.

Durante 2010 y 2011, se tomaron muestras de higueras que presentaban mosaicos en hojas y que se encontraban aisladas en campos particulares o jardines de diferentes zonas de la Península Ibérica. Hasta la fecha, las muestras de hojas han sido analizadas mediante RT-PCR con cebadores específicos de FMV, y de dos virus pertenecientes al género *Closterovirus* que afectan a esta especie: *Fig leaf mottle-associated virus 1* (FLMaV-1) y *Fig leaf mottle-associated virus 2* (FLMaV-2). En el 84,6% de las muestras analizadas se ha detectado FMV y en el 19,2% FLMaV-1, encontrándose siempre este último en infección mixta con FMV.

Otros estudios recientes, han identificado estos dos virus en higueras afectadas de las Islas Canarias. A pesar de existir trabajos previos sobre la incidencia de la enfermedad en zonas del este de España, este trabajo constituye la primera detección de estos dos agentes en higueras de la Península Ibérica.

**PATÓGENOS DETECTADOS EN CULTIVOS DE ZANAHORIA
ESPAÑOLES CON AMARILLOS, ENROJECIMIENTOS Y
DEFORMACIONES**

Alfaro-Fernández, A.¹, Hernández Llopis, A.¹, Serrano Fernández, A.¹, Villaescusa, F.J.¹, Teresani, G.R.², Bertolini, E.², Martínez, M.C.², Ferrandiz, J.A.³, Bartolomé, P.³, Sanjuán, S.³, Hermoso, A.², López, M.M.², Cambra, M.², Font, M.I.¹

¹Grupo de Virología. Instituto Agroforestal Mediterráneo. Universidad Politécnica de Valencia. Cno. Vera s/n. 46022 Valencia.

E-mail: analfer1@doctor.upv.es.

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

³Agrícola Villena Coop. V. Ctra. Del Puerto s/n 03400 Villena, Alicante

Desde la década de los 80 se viene observando en diferentes zonas productoras de zanahoria de la Península e Islas Canarias amarillos, enrojecimientos, proliferación de hojas, deformación y reducción del tamaño de las raíces, y en ocasiones proliferación de raicillas secundarias. En 1997-1998, se identificaron fitoplasmas de los grupos Stolbur y Aster Yellows como agentes implicados en su desarrollo. En verano de 2008, cultivos de zanahoria de Villena (Alicante) mostraron síntomas de esta enfermedad. Desde ese momento, se ha llevado a cabo un seguimiento de dichos cultivos, realizando tomas de muestras periódicas (2008-2012) y analizándolas frente a distintos agentes fitopatógenos (virus, mollicutes y bacterias). Todas las muestras fueron analizadas mediante PCR con cebadores específicos de fitoplasmas, *Spiroplasma citri* y *Candidatus Liberibacter solanacearum* (CaLsol); mediante DAS-ELISA con antiseros comerciales frente a *Cucumber mosaic virus* (CMV) y *Potyvirus*; y mediante RT-PCR con cebadores específicos de *Carrot red leaf virus* (CtRLV) y degenerados del género *Umbravirus*. En muestras sintomáticas se detecta mayoritariamente CaLsol, encontrándose puntualmente y siempre en infección mixta con esta bacteria: *S. citri*, fitoplasmas (de la especie *Candidatus Phytoplasma asteris* o del grupo Stolbur) y CtRLV asociado a virus del género *Umbravirus*. Cabe destacar que tanto *S.citri* como CaLso son patógenos recientemente detectados en nuestro país afectando a este hospedante, sin embargo CtRLV no había sido identificado en España hasta el presente estudio. Actualmente se están realizando ensayos de transmisión para comprobar si "*Ca. Liberibacter solanacearum*" es el agente causal de los amarillos enrojecimientos y deformaciones de la zanahoria, así como el efecto que provoca en este hospedante la coinfección de esta bacteria con el resto de agentes encontrados.

El presente trabajo ha sido financiado por Agrícola Villena Coop. V., la Consellería de Agricultura-GVA y proyectos IVIA (5301) e INIA (RTA2011000142-C03-00).

**DETECCIÓN DE LOS VIRUS DEL GÉNERO *Fabavirus* MEDIANTE
HIBRIDACIÓN CON UNA ÚNICA SONDA**

Rangel, E.A.^{1,2}, Ferriol, I.¹, Rubio, L.¹

¹Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA), 46113 Moncada, Valencia, España. E-mail: ezequiel_r@yahoo.com

²Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas, CENIAP, Unidad de Protección Vegetal, Maracay 2101, Aragua, Venezuela.

El género *Fabavirus*, subfamilia *Comovirinae*, familia *Secoviridae*, está compuesto de cinco especies virales: el virus 1 del marchitamiento del haba (*Broad bean wilt virus 1*, BBWV-1), el virus 2 del marchitamiento del haba (BBWV-2), el virus del mosaico suave de la ortiga blanca (*Lamium mild mosaic virus*, LMMV), el virus del mosaico de la genciana (*Gentian mosaic virus*, GeMV) y el recientemente descubierto, virus del mosaico suave de las cucurbitáceas (*Cucurbit mild mosaic virus*, CuMMV). El análisis de la secuencia nucleotídica de los dos RNAs genómicos (RNA 1 y RNA 2) de estos virus mostró una identidad nucleotídica de alrededor del 40% entre distintos virus y mayor del 75% entre aislados del mismo virus. Una característica interesante del genoma de los cinco virus es que contiene una secuencia específica de 10 nucleótidos que se repite entre tres y cinco veces en la zona no codificante del extremo 5' de cada RNA genómico. Este segmento de 10 nucleótidos repetido parece ser específico del género *Fabavirus* ya que no se ha encontrado en ningún otro virus.

Basado en esto, se sintetizó una sonda de RNA marcada con digoxigenina correspondiente al extremo 5' del RNA 1 de un aislado de BBWV-1 mediante transcripción *in vitro*. Esta sonda hibridó a 68 °C con extractos de RNA de aislados del género *Fabavirus* mientras que no se produjo hibridación con extractos de RNA de plantas sanas o del virus del mosaico del *Arabis* (*Arabis mosaic virus*, ArMV), que pertenece a otro género (*Nepovirus*) de la misma subfamilia (*Comovirinae*). Este método de hibridación molecular permite detectar estos virus y posiblemente descubrir nuevas especies del género *Fabavirus*.

PAN-150

EXPRESIÓN DE LOS GENES DE LA PROTEÍNA DE LA CÁPSIDA DE LOS POTYVIRUS MOSAICO COMÚN Y MOSAICO COMÚN NECRÓTICO DE LA JUDÍA MEDIANTE UN RNA DEFECTIVO DEL VIRUS MOTEADO DEL HABA

Torres, R., Carazo, G., Romero, J.

Departamento de Protección Vegetal, INIA, Carretera de La Coruña Km. 7,0 28040-Madrid. E-mail: romero@inia.es

En trabajos anteriores hemos demostrado el uso de los RNAs defectivos interferentes (D-RNAs) del virus del moteado del haba (*Broad bean mottle virus*, BBMV) como vector viral para la expresión de proteínas exógenas, principalmente por presentar los D-RNAs menos restricciones para ser modificados, al no ser estrictamente necesarios para la infección. Con la finalidad de obtener la proteína de la cápsida (CP) de los potyvirus mosaico común y mosaico común necrótico de la judía (*Bean common mosaic virus*, BCMV y *Bean common mosaic necrotic virus*, BCMNV), para ser utilizados como antígenos en la producción de anticuerpos específicos para la detección de estos virus, hemos usado nuestro vector viral basado en los D-RNAs del BBMV. Para ayudar a la purificación de las CPs hemos agregado a nuestro vector secuencias de la proteasa Nia de los potyvirus que se auto-procesa para liberar las diversas proteínas de la poliproteína en los *Potyvirus*, con la finalidad de liberar las CPs antes de su purificación. El vector viral fue construido para expresar una proteína que contenía secuencias del RNA2 del BBMV, de la Nia, de la CP del BCMV o BCMNV y de la región no codificante del RNA2 del BBMV. Las plantas de haba inoculadas con los transcritos RNA de este vector y los RNAs genómicos del BBMV desarrollaron síntomas de la infección viral 10 días después de la inoculación. La presencia de los D-RNAs fue analizada mediante la purificación del virus y sus RNAs, demostrando que los D-RNAs eran encapsidados y se multiplicaban en las plantas inoculadas. La expresión de la proteína fue analizada en experimentos de Western blots usando un anticuerpo monoclonal comercial anti-potyvirus (ADGIA). Los D-RNAs se mantuvieron después de diferentes pases a plantas nuevas y se discutirá la acción de la proteasa en la purificación de las CPs expresadas.

**CARACTERIZACIÓN DE AISLADOS DE *Colletotrichum* spp.
CAUSANTES DE LA ANTRACNOSIS DEL OLIVO EN AUSTRALIA**

Jurado, J¹., Moral, J²., Pérez, M³., Xavier, C³., Sergeeva, V⁴., Trapero, A³.

¹IFAPA Centro "Alameda del Obispo". Apartado 3092. 14080 Córdoba.

²Dpto. Mejora Vegetal, Instituto de Agricultura Sostenible (IAS)-CSIC, 14080 Córdoba.

³Dpto. Agronomía, ETSIAM, Universidad de Córdoba. Campus de Rabanales, Edif. Celestino Mutis, 14071 Córdoba.

⁴Centre for Plant and Food Science, University of Western Sydney, Locked Bag 1797, South Penrith, DC, NSW 1797, Australia.

E-mail: trapero@uco.es.

La Antracnosis, es la enfermedad más grave del olivo en Australia, pero las investigaciones sobre ella son escasas. En este trabajo, un total de 20 aislados de *Colletotrichum* spp. obtenidos de olivos afectados de Antracnosis en Australia y Andalucía fueron caracterizados morfológica, patogénica y molecularmente.

Para la caracterización de las colonias, los aislados se cultivaron en placas con agar-patata-dextrosa (PDA) determinándose el tipo de micelio. Los conidios se clasificaron según su morfología (oblongo, fusiforme o claviforme) y tamaño (longitud, anchura y esbeltez). Además, se estudió la sensibilidad al fungicida Benomilo (5 ppm) en PDA y su capacidad de hidrolizar caseína que fue determinada en medio PDA enriquecido con leche. La identificación molecular de los aislados se realizó mediante la secuenciación de la regiones ITS1-5.8S-ITS2 y β -tubulina. Finalmente, aceituna sanas del cv. Hojiblanca fueron inoculadas con cada uno de los aislados estudiados.

Las colonias del patógeno mostraron una coloración variada no pudiéndose establecer relación entre especies y tipo de colonia. Los aislados de *C. gloeosporioides* mostraron conidios preferentemente oblongos, sensibilidad al Benomilo, incapacidad de hidrolizar la caseína y menor virulencia. En cambio, los aislados de *C. acutatum sensu lato* mostraron conidios de varios tipos, mayor tolerancia al Benomilo, capacidad de hidrolizar la caseína y mayor virulencia que los aislados de *C. gloeosporioides*.

La caracterización molecular nos ha permitido demostrar que la mayoría (67%) de aislados de *Colletotrichum* de Australia pertenecen a la especie *C. gloeosporioides*. El 26% a *C. acutatum*-grupo A5 (*C. acutatum sensu stricto*) y uno (7%) pertenece a *C. acutatum* grupo-A3, que recientemente ha sido reclasificado como *C. fioriniae*. En cambio, todos los aislados de Andalucía pertenecen a *C. acutatum* grupo A4 que actualmente se ha identificado como *C. clavatum*.

**COMPARACIÓN DE MÉTODOS SEROLÓGICOS Y MOLECULARES
PARA LA IDENTIFICACIÓN DE AISLADOS DE *Cucumber mosaic virus***

Alfaro-Fernández, A.¹, Beltrán, R.², Fernández-Serrano, A.¹, Font, M.I.¹

¹*Grupo de Virología. Instituto Agroforestal Mediterráneo. Universidad Politécnica de Valencia. Cno. Vera, s/n. 46022 Valencia. E-mail: analfer1@doctor.upv.es.*

²*INIA-Centro de Ensayos de Valencia, C/Joaquín Ballester, nº39, 46009 Valencia.*

El virus del mosaico del pepino (*Cucumber mosaic virus*, CMV) tiene un amplio rango de hospedantes y provoca importantes pérdidas económicas tanto en especies cultivadas como ornamentales. Actualmente, los aislados de CMV se clasifican en los subgrupos I y II según sus características serológicas y la identidad de sus secuencias.

El objetivo de este trabajo ha sido determinar la técnica de diagnóstico adecuada para diagnosticar CMV, y también poder identificar el subgrupo de este virus presente en las muestras. Para ello se compararon distintos antisueros comerciales, que según especificaciones del fabricante, pueden diferenciar los dos subgrupos, y también técnicas moleculares: RT-PCR con cebadores degenerados de CMV de dos zonas diferentes del genoma, y análisis RFLP para conseguir discriminar el subgrupo presente. En este estudio se emplearon aislados de la colección del Grupo de Virología (IAM-UPV) procedentes de distintas zonas geográficas de España y de distintos hospedantes, así como una serie de controles positivos comerciales.

Los resultados para el diagnóstico de CMV con antisueros que detectan todos los subgrupos fueron similares para todas las casas comerciales ensayadas, detectándose el mismo número de positivos. Sin embargo, al comparar las distintas técnicas serológicas y moleculares empleadas, para discriminar entre ambos subgrupos, se encontraron resultados divergentes y en algunos casos no concluyentes. En principio, los aislados españoles elegidos pertenecientes a la colección del Grupo presentan diferencias moleculares, aunque aparentemente se englobarían todos en el subgrupo I.

Actualmente, se están realizando bioensayos con los aislados elegidos, así como la secuenciación de los productos de PCR para verificar los resultados obtenidos tras el análisis mediante RFLPs.

PAN-153

DETECCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE AISLADOS DEL VIRUS DEL AMARILLAMIENTO NECRÓTICO DEL HABA (FBNYV) INFECTANDO LEGUMINOSAS DE GRANO EN CASTILLA-LEÓN

Larenas, J., Carazo, G., Romero, J.

Departamento de Protección Vegetal, INIA. Carretera de La Coruña km. 7,0, 28040 – Madrid. E- mail: larenas.javiera@inia.es

El virus del amarillamiento necrótico del haba (*Faba bean necrotic yellows virus*, FBNYV) fue descrito infectando cultivos de habas en el campo de Cartagena (Murcia) en el 2000. Desde entonces el virus ha sido detectado todos los años en el campo de Cartagena, pero no en los cultivos de leguminosas de otras provincias españolas. En una prospección en cultivos de leguminosas de grano en las provincias de Salamanca y Zamora, durante la campaña de 2011, observamos plantas con amarillamiento y deformación de hojas en guisantes (*Pisum sativum* L.), lentejas (*Lens culinaris* Medx.), garbanzos (*Cicer arietinum* L.) y alfalfa silvestre (*Medicago* sp.), las cuales fueron recolectadas y llevadas al laboratorio para su análisis mediante ELISA-indirecto utilizando un anticuerpo monoclonal comercial anti-potyvirus (ADGIA, USA). Todas las muestras analizadas fueron negativas, por lo que descartamos la presencia de Potyvirus. Un segundo análisis serológico mediante inmunopresión, utilizando un anticuerpo policlonal anti-FBNYV y un anticuerpo monoclonal de amplio espectro sirvió para identificar la presencia de FBNYV en las muestras analizadas. Una posterior caracterización molecular, amplificando algunas partes del genoma del virus por PCR y su posterior secuenciación nos permitió concluir que las muestras obtenidas en Castilla - León, estaban infectadas por el FBNYV. Análisis filogenéticos de las secuencias obtenidas han demostrado que el virus encontrado en Castilla - León es similar a los aislados descritos en Murcia. Por los daños que ocasiona este virus en los cultivos de leguminosas y por su fácil dispersión por pulgones el FBNYV constituye una nueva amenaza para las legumbres cultivadas en Castilla-León.

Este trabajo ha sido financiado por el proyecto RTA2009-00081.

**ETIOLOGÍA DE LA MANCHA FOLIAR DEL OLIVO CAUSADA POR
Phoma sp.**

Romero, J.¹, Moral, J.², Trapero, A.¹

¹Dpto. de Agronomía (Patología Agroforestal), Universidad de Córdoba,
Campus de Rabanales, Edif. C4, 14071 Córdoba. E-mail: trapero@uco.es

²Dpto. Mejora Vegetal, Instituto de Agricultura Sostenible (IAS)-CSIC, 14080
Córdoba. E-mail: trapero@uco.es

En prospecciones realizadas durante 2009-2012 en olivares del cv. Arbequina en las provincias de Jaén y Málaga se han detectado manchas foliares no atribuibles a ninguna enfermedad actualmente descrita. Estas consisten en pequeñas punteaduras (≤ 3 mm de diámetro) que pueden aparecer rodeadas de un halo clorótico. En ocasiones, el tejido central de la mancha se necrosa y agrieta y sobre él aparecen cuerpos oscuros del patógeno. El tejido necrótico puede caerse produciendo un cribado. El patógeno muestra una distribución vertical en la copa del árbol observándose una defoliación más intensa en la zona inferior. En condiciones de infección natural se observa un acusado efecto varietal siendo mucho más susceptible el cv. Arbequina que el cv. Picual. A pesar de ello, no se ha descrito aún el agente causal de esta nueva enfermedad.

Hojas con síntomas de la enfermedad fueron desinfestadas con lejía comercial (1%) durante un minuto y se dejaron secar a temperatura ambiente. Posteriormente, se realizaron aislamientos de la zona marginal de las lesiones en agar patata dextrosa (PDA) acidificado. Paralelamente, hojas con síntomas de Mancha foliar se incubaron a $22 \pm 2^\circ\text{C}$ y humedad de saturación para inducir el desarrollo de picnidios y conidios del patógeno.

En las muestras recogidas durante Junio de 2009 y 2010 de la provincia de Jaén, se aisló de forma consistente un hongo identificado como *Phoma* sp. En las muestras recogidas durante Abril de 2012 de la provincia de Málaga nuevamente se aisló *Phoma* sp. aunque de forma menos consistente. En todas las muestras, el hongo formó picnidios en las hojas incubadas en cámara húmedas y desarrolló conidios típicos del género *Phoma* de $3.00 \pm 0.35 \times 1.17 \pm 0.25 \mu\text{m}$.

Para terminar de elucidar la etiología de ésta y otras enfermedades del olivo causadas por especies del género *Phoma*, se han realizado inoculaciones de hojas separadas y plantones del cv. Arbequina con aislados procedente de hojas asintomáticas o con Mancha foliar y olivos que mostraban desecación de ramas y chancros. El conjunto de los aislados de *Phoma* está siendo caracterizado morfológicamente, fisiológicamente y molecularmente. Para ello, se ha evaluado el su crecimiento micelial (mm/día) en agar-patata-dextrosa (PDA) de 5 a 35°C . La identificación definitiva se está realizando atendiendo a las características morfológicas de los aislados (tamaño de los conidios y picnidios, tipo de micelio, célula conidiógena, etc.) y la secuenciación de las regiones ITS1-5.8S-ITS2 y β -tubulina de todos los aislados.

**DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DEL VIRUS DEL TORRADO DEL
TOMATE MEDIANTE RT-PCR EN TIEMPO REAL**

Herrera-Vásquez, J.A.^{1,2}, Ferriol, I.², Alfaro-Fernández, A.³, Font, M.I.³, Rubio, L.²

¹*Centro de Investigación Agropecuaria Central (CIAC), Instituto de Investigación Agropecuaria de Panamá (IDIAP), Ctra. Panamericana, Los Canelos-Santa María, Herrera, Panamá, 0601 Chitré, Herrera, Panamá.*

²*Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA), 46113 Moncada, Valencia, España.*

³*Grupo de Virología. Instituto Agroforestal Mediterráneo. Universidad Politécnica de Valencia Cno. Vera s/n. 46022, Valencia, España. E-mail: analfar1@etsia.upv.es*

El virus del torrado del tomate (*Tomato torrado virus*, ToTV) fue identificado y caracterizado por primera vez en 2007 en muestras de tomate procedentes de Murcia y propuesto como el miembro tipo de un nuevo género denominado *Torradovirus* dentro de la familia *Secoviridae*. Posteriormente este virus se detectó en Polonia, Australia, Hungría, Francia, Italia, Colombia y Panamá. ToTV se transmite por las moscas blancas *Bemisia tabaci* y *Trialeurodes vaporariorum*. Actualmente es considerado uno de los virus más importantes que afectan tomate y está incluido en la lista de alerta de la Organización Europea y Mediterránea de Protección de las plantas (EPPO) y del Sistema de Alerta Fitosanitaria de la Organización Norteamericana de Protección de las plantas (NAPPO).

En este trabajo se desarrolló un método de RT-PCR en tiempo real usando iniciadores y una sonda TaqMan diseñados a partir de zonas genómicas conservadas para una detección sensible y una cuantificación de aislados de ToTV en extractos de RNA de planta. Este método podría ser una herramienta valiosa para los programas de saneamiento, cuarentena y certificación, dada su gran sensibilidad y su amplio espectro de detección. Asimismo, se pudo cuantificar el RNA viral utilizando una curva patrón con diluciones seriadas de transcritos de RNA de la zona genómica seleccionada. La estimación de la acumulación viral se puede aplicar para evaluar la efectividad de resistencias genéticas implementadas en programas de mejora genética.

**DETECCIÓN Y DIAGNÓSTICO DEL VIRUS DEL AMARILLEO DEL
TOMATE (*TOMATO CHLOROSIS VIRUS*, TOCV) EN PIMIENTO EN LA
ISLA DE TENERIFE**

Espino de Paz, A.I.¹, Botella Guillén, M.¹, Reyes Carlos, J.A.¹, González García, A.C.², Gómez González, E.¹

¹*Laboratorio de Sanidad Vegetal, Dirección General de Agricultura y Desarrollo Rural, Consejería de Agricultura Ganadería Pesca y Aguas, 38270 La Laguna Tenerife. e-mail: aesppaz@gobiernodecanarias.org*

²*Servicio de Genómica de la Universidad de La Laguna*

Desde el año 1997 comenzó a detectarse en tomates de exportación, bajo invernadero de malla, tanto en Tenerife como en Gran Canaria (variedad tolerante al virus de “la cuchara” TYLCV), síntomas de amarilleo, pero no fue hasta 1999 cuando se confirmó mediante análisis moleculares que los síntomas manifestados de amarilleo desde la parte basal de la planta hasta su parte apical se debían al virus del Amarilleo del tomate *Tomato chlorosis virus* (ToCV), perteneciente al género *Crinivirus* de la familia *Closteroviridae*. En años sucesivos la incidencia de ToCV fue aumentando.

En la Campaña 2005- 2006, se realizó una prospección exhaustiva en todas las zonas productoras de tomate de exportación en Tenerife y en Gran Canaria alcanzando una incidencia del 100% en la mayoría de las explotaciones. Esta incidencia coincidía con una elevada población de la mosca blanca de las especies (*Bemisia tabaci* y *Trialeurodes vaporariorum*, siendo *Bemisia tabaci* la que presentaba una mayor incidencia), que suelen convivir juntas en las islas.

En el año 2012 se realiza una prospección para *Eggplant mottle dwarf virus* (EMDV) en diferentes cultivos hortícolas (tomate, pimiento, berenjena, calabacín, calabaza, pepino y sandía) a consecuencia de la reciente aparición de EMDV (2011) en diferentes especies de Solanáceas y una especie de Cucurbitáceas en Cataluña, así como en tomate y pepino en Almería. Se aprovechó esta prospección para detectar diferentes virus. En tres invernaderos de pimiento se detectaron síntomas de amarilleo típicos de ToCV. Se analizaron mediante hibridación molecular y RT- PCR con primers específicos de ToCV, obteniendo resultados positivos. Estos resultados se confirmaron por secuenciación de varios amplicones en el Servicio de Genómica de la Universidad de La Laguna. La secuencia de nucleótidos obtenida se comparó con las presentes en la base de datos del GenBank observando una homología del 99% con el ToCV (Accesion number: JN867337). Los resultados obtenidos confirman la primera detección de ToCV en cultivos de pimiento en la isla de Tenerife.

PAN-157

DETECCIÓN DE LOS PRINCIPALES VIRUS Y VIROIDES QUE AFECTAN AL CULTIVO DE VID EN LA REGION DE REQUENA

Zamorano, A.¹, Fiore, N.¹, Sánchez-Diana, N.², Pallás, V.³, Sánchez-Navarro, J.A.³

¹*Departamento de Sanidad Vegetal, Universidad de Chile. 11315 Santiago de Chile, Chile.*

²*Escuela de Viticultura y Enología. 46340 Requena, Valencia.*

³*Instituto de Biología Molecular y Celular de plantas (CSIC-UPV). 46022 Valencia. E-mail: jesanche@ibmcp.upv.es.*

El cultivo de la vid se ve afectado por diversas enfermedades de etiología viral y/o viroidal cuya sintomatología puede ser leve (prácticamente asintomática) o bien ocasionar clorosis, enrojecimiento o amarilleamiento intervenal, retraso en la maduración de la uva, etc, pudiendo afectar también a la producción de uva con pérdidas de hasta el 15% (Martelli, 1993). Entre los principales virus y viroides que afectan al cultivo de vid cabe destacar: Grapevine fanleaf virus (GFLV), Grapevine leafroll associated virus 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 y 9 (GLRaV-1, -2, -3, -4, -5, -6, -7 y -9), Grapevine virus A (GVA), Grapevine virus B (GVB), Grapevine virus D (GVD), Grapevine fanleaf virus (GFLV), Grapevine fleck virus (GFKV), Grapevine rupestris stem pitting-associated virus (GRSPaV), Grapevine rupestris vein feathering virus (GRVfV), Arabis mosaic virus (ArMV), Grapevine vein-clearing virus (GVCV), Hop stunt viroid (HSVd-g), Citrus exocortis viroid (CEVd-g), Australian grapevine viroid (AGVd), Grapevine yellow speckle viroid 1 (GYSVd-1) y Grapevine yellow speckle viroid 2 (GYSVd-2). En el presente estudio hemos analizado la presencia de los 17 virus y 5 viroides en 127 muestras de vid (84 variedades) procedentes de la colección de la 'Escuela de Viticultura y Enología' de Requena (Valencia). El análisis se realizó mediante RT-PCR utilizando RNA total extraído a partir de sarmientos lignificados recolectados en noviembre de 2011 y cebadores específicos para cada patógeno. Los resultados obtenidos, en base a la presencia de amplicones, pusieron de manifiesto la detección de HSVd (97,6%), GRSPaV (48,8%), GLRaV-2 (14,9%), GFKV (10,2%), GLRaV-3 (8,6%), GFLV (7,8%), GRVfV (7%), GYSVd-1 (6,3%), GLRaV-9 (4,7%), GLRaV-5 (3,1%), GVA (3,1%), AGVd (2,3%), GLRaV-4 (0,7%) y GYSVd-2 (0,7%), no observándose ningún positivo para el resto de patógenos. La mayoría de las infecciones fueron dobles (41,1%) seguidas de las infectadas con uno (29%), tres (20,9%), cuatro (8,8%), cinco (1,6%) y hasta seis patógenos (0,8%). En la actualidad, se está evaluando la variabilidad genética de los diferentes patógenos detectados mediante la determinación de secuencia de residuos de nucleótidos de los diferentes amplicones.

***Plantago coronopus* L. UN NUEVO HOSPEDANTE NATURAL DE
IMPATIENS NECROTIC SPOT VIRUS**

Tornos, T.¹, Córdoba-Sellés, M.C.², Alfaro-Fernández, A.², Martí, M.³,
García-Murillo, J.L.¹, Monton, C.¹, Font, M.I.²

¹Laboratori de Sanitat Vegetal. Departament d'Agricultura, Ramaderia, Pesca, Alimentació i Medi Natural. Generalitat de Catalunya. Ctra. Cabrils, Km2, 08348 Cabrils (Barcelona). E-mail: ttornos@gencat.cat

² Grupo de Virología Vegetal. Instituto Agroforestal Mediterráneo. Universidad Politécnica de Valencia. Cno. Vera s/n, 46022 Valencia

³ Federació d'Associacions de Defensa Vegetal Selmar. C/ Masia de Can Ratés s/n, 08398 Sta. Susanna. Barcelona.

El virus de las manchas necróticas del impatiens (*Impatiens necrotic spot virus*, INSV, familia *Bunyaviridae*, género *Tospovirus*) es uno de los patógenos más importante que afecta a cultivos de planta ornamental pero también se ha detectado en especies hortícolas como lechuga, tomate, pimiento, patata o tabaco. En mayo del 2010 se observaron en un invernadero de Balaguer, Catalunya, síntomas anómalos en plantas de *Plantago coronopus* L., 'cuerno de ciervo' o 'estrella de mar', éstas mostraban falta de desarrollo y manchas cloróticas en las hojas que evolucionaban a necrosis, seca y finalmente morían. Diversas plantas sintomáticas fueron analizadas con anticuerpos comerciales para el diagnóstico de INSV, *Tomato spotted wilt virus* (TSWV), *Alfalfa mosaic virus* (AMV), *Cucumber mosaic virus* (CMV) y *Tomato mosaic virus* (ToMV) mediante DAS-ELISA (Loewe Biochemica GmbH), y para *Potyvirus* con un test de ELISA indirecto (Agdia Inc., Elkhart, IN). En todas las muestras afectadas se detectó INSV. Para confirmar la identidad del virus se enviaron tres muestras al Laboratorio de Virología del Instituto Agroforestal Mediterráneo de la UPV donde se llevó a cabo el análisis mediante RT-PCR con cebadores específicos de INSV (Mumford et al., 1996). Los productos de PCR amplificados, correspondientes a un fragmento de 602 pb del gen de la nucleocápside en el segmento S del genoma del virus, fueron secuenciados. Las secuencias obtenidas fueron comparadas mediante un análisis BLAST con las depositadas en la base de datos del GenBank, observándose un 99% de identidad nucleotídica con secuencias de INSV procedentes de especies ornamentales como verbena de Japón o hibisco de Nueva Zelanda (Nº Accesoión AB109100 y FJ495173, respectivamente), y también con INSV procedente de tomate infectado en Italia (Nº Accesoión DQ425096). INSV se ha descrito esporádicamente en España sobre todo en cultivos de planta ornamental. Ésta es la primera vez que se detecta el virus infectando de forma natural cultivos de *P. coronopus* L. Todas las plantas del invernadero se eliminaron y el virus fue erradicado de la zona.

**CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE AISLADOS DE LOS
FITOPLASMAS *Ca. P. prunorum* y *Ca. P. pyri* EN ESPAÑA**

Bech, J.², Laviña, A.¹, Torres, E.², Sabaté, J.¹, Batlle, A.¹

¹*Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentàries (IRTA). Ctra Cabrils Km 2. 08348 CABRILS (Barcelona) assumpcio.batlle@irta.es*

²*Laboratori de Sanitat Vegetal. DAR. Generalitat de Catalunya. Ctra Cabrils Km 2. 08348 CABRILS (Barcelona)*

Los fitoplasmas más importantes que afectan a frutales en Europa son '*Candidatus Phytoplasma prunorum*' (European stone fruit yellows), '*Ca. P. mali*' (Apple proliferation) y '*Ca. P. pyri*' responsable del pear decline o decaimiento del peral. Estos tres fitoplasmas pertenecen al grupo ribosómico 16SrX, caracterizado por una alta homología en este gen (>98 %). Se han descrito importantes diferencias de virulencia tanto entre aislados de '*Ca. P. prunorum*' como entre aislados de '*Ca. P. pyri*', pero hasta hace poco, estos aislados no podían distinguirse mediante estudios moleculares. El desarrollo de marcadores para amplificar secuencias de los genes *imp* y *secY* que codifican para una proteína de superficie de membrana y para un componente del mecanismo de secreción de proteínas, han permitido distinguir nueve aislados distintos de *Ca. P. prunorum* en Europa, entre ellos un aislado hipovirulento de Azerbaiyán. Así mismo la caracterización molecular de *Ca. P. pyri* también ha permitido distinguir entre varios aislados. En este trabajo se estudia la variabilidad genética de *Ca. P. prunorum* y *Ca. P. pyri* presente en frutales de hueso procedentes de distintas áreas geográficas del país.

Para ello se han recogido muestras infectadas por *Ca. P. prunorum*, de ciruelo, melocotonero, albaricoquero y nectarina en Extremadura, Cataluña, Aragón y Valencia. Así mismo, se han recogido muestras de perales con *Ca. P. pyri* de las mismas zonas de cultivo.

Los extractos de ADN de estas muestras se han amplificado con iniciadores *Imp*, los cuales amplifican un fragmento de este gen de 673 pb y a continuación se han secuenciado. Mediante Blast se ha determinado si las secuencias identificadas se correspondían con las ya descritas o si se identificaba alguna nueva secuencia. Los estudios previos han permitido determinar 3 aislados de *Ca. P. prunorum* y dos de *Ca. P. pyri* en España. Actualmente se está procesando un mayor número de muestras, con el objetivo de determinar la proporción de cada uno de los aislados y las posibles implicaciones epidemiológicas de cada uno de ellos.

Trabajo financiado por el proyecto INIA RTA 2009-070-00.

PAN-160

EVALUACIÓN DE LA EFICIENCIA DE LAS TÉCNICAS PCR A TIEMPO REAL Y LAMP PARA LA DETECCIÓN DE *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni* EN MUESTRAS SINTOMÁTICAS DE ALMENDRO

Palacio-Bielsa, A.¹, López-Soriano, P.², Bühlmann, A.³, van Doorn, J.⁴, Pham, K.⁴, Cambra, M.A.⁵, Berruete, I.M.¹, Collados, R.⁵, Palazón, M.L.⁵, Olmos, A.², López, M.M.²

¹Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria de Aragón. Av. Montañana 930, 50059 Zaragoza. E-mail: apalaciob@aragon.es.

²Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias. Ctra. de Moncada a Náquera km 4,5, 46113 Moncada, Valencia.

³Agroscope Changins-Wädenswil ACW. Schloss 1, CH-8820 Wädenswil, Suiza.

⁴Wageningen University, Applied Plant Research, Prof. van Slogterenweg 2, 2161 DW, Holanda

⁵Centro de Sanidad y Certificación de Vegetales. Av. Montañana 930, 50059 Zaragoza.

Xanthomonas arboricola pv. *pruni* (Xap) es una bacteria de cuarentena en la Unión Europea causante de la mancha bacteriana de los frutales de hueso y almendro. Recientemente se han desarrollado dos protocolos para la detección de este patógeno, uno de ellos basado en PCR a tiempo real (PCR-tr) (Palacio-Bielsa et al., 2011) y otro en amplificación isoterma *Loop-mediated isothermal amplification* (LAMP) (Bühlmann, com. personal). En este estudio se realizó un ring-test, en el que participaron cuatro laboratorios europeos, para la evaluación de los parámetros diagnósticos asociados a estas dos técnicas en muestras de almendro. Además, se analizaron dos modalidades de preparación del material vegetal empleando muestras directas de lavado de hojas y ADN purificado de los tejidos.

La concordancia interlaboratorios para estas técnicas según el coeficiente kappa (Cohen, 1960) demostró que las muestras procedentes de lavados directos y sus diluciones 1:10 fueron las más reproducibles y coincidentes con valores kappa que variaron de 0,87 a 1,00. Sin embargo las muestras procedentes de los purificados de ADN revelaron una problemática asociada a este procedimiento en un laboratorio, con un rango de kappa que varió desde 0 hasta 1,00. Ésta se solventó para sus diluciones 1:10 y 1:100, con un rango de kappa que varió desde 0,87 a 1,00. Los resultados de las diluciones 1:100 procedentes de lavado de hojas pusieron en evidencia problemas en LAMP, con una concordancia que varió desde 0,47 hasta 0,84.

La sensibilidad estimada en este ring-test para la PCR-tr fue de 98,3% y 89,3%, para lavados y extractos de ADN, respectivamente, y superior a la de LAMP, con valores de 85,9% y 58,0%, respectivamente. La especificidad de PCR-tr fue del 99,4% independientemente del tratamiento de las muestras, y la de LAMP fue del 100% para los lavados y del 99,2% para los extractos de ADN. En base a estos resultados, el protocolo de PCR-tr empleando los lavados de hojas de almendro resultó el más adecuado para la detección precisa y fiable de Xap en este ring-test.

**PANELES DE INTERACCIONES PLANTA-PATÓGENO
(PAN-161-PAN-201)**

GRADO DE RESISTENCIA DE ESPECIES HUÉSPED Y NO-HUÉSPED AL MILDIU DE LA VID (*Plasmopara viticola*) MEDIANTE MICROSCOPIA DE EPIFLUORESCENCIA

Huerga, V.¹, Kassemeyer, H.H.², Díez-Navajas, A.M.¹

¹Neiker-Tecnalia. Departamento de Producción y Protección Vegetal. Apdo. 46, 01080 Vitoria-Gasteiz. E-mail: vhuerga@neiker.net, adiez@neiker.net

²Staatliches Weinbauinstitut Freiburg (WBI). Merzhauser Str. 119 79100 Freiburg (Alemania)

El mildiu de la vid, causado por el oomiceto *Plasmopara viticola*, es una de las enfermedades que mayores pérdidas ocasiona en este cultivo. Las especies vitáceas procedentes de América (*Vitis rupestris*, *V. riparia* o *Muscadinia rotundifolia*) se caracterizan por presentar diferentes niveles de resistencia a este patógeno. Sin embargo, las variedades de *Vitis vinifera*, cultivadas para la obtención de uva de mesa o uva para vinificación, son susceptibles al ataque del patógeno, presentando diferentes grados de susceptibilidad al mismo.

El estudio micrososcópico de la evolución de *P. viticola* sobre diferentes variedades de *V. Vinifera*: Solaris, Cabernet sauvignon, Tempranillo y Petit courbu, así como sobre la especie no hospedadora *Arabidopsis thaliana*, permitió determinar y comparar su nivel de resistencia al mildiu de la vid.

Tras la inoculación artificial en hoja, se observó el enquistamiento de zoosporas en los estomas vegetales, siendo estos la vía de entrada del patógeno. Las variedades Tempranillo y P. courbu presentaron mayor porcentaje de estomas infectados respecto a Solaris y C. sauvignon. La especie no-huésped *A. thaliana* presentó el mayor porcentaje de estomas infectados.

Por otro lado, se analizó la evolución del micelio intratisular a lo largo del tiempo de infección. Éste avanzó más rápidamente en las variedades Tempranillo y P. courbu, ya que se observó un mayor número de estructuras infectivas a lo largo de todo el proceso de infección. Así mismo, tras 3 días post- inoculación (dpi) pudo observarse la formación de abundantes esporangióforos en estas variedades. C. sauvignon y Solaris mostraron una evolución más lenta en la formación de estructuras infectivas, observándose las mayores diferencias entre éstas a los 3 dpi, cuando C. sauvignon desarrolló cierto número de esporangióforos, mientras que sobre Solaris no se registró esporulación. En *A. thaliana*, a diferencia del resto, el micelio sólo se desarrolló hasta una hifa primaria.

El análisis estadístico de estos resultados permitió determinar el grado de resistencia de las variedades de *V. Vinifera* estudiadas frente a *P. viticola*. Así, se clasificaron de menor a mayor resistencia: Tempranillo, P. courbu, C. saugvinon y Solaris. Ésta última, junto con la especie no huésped *A. Thaliana*, mostraron resistencia total al patógeno en cuanto a la imposibilidad de éste para completar su ciclo de vida.

PAN-162

DISEÑO DE UN CULTIVO AUTOTRÓFICO “IN VITRO” DE HIGUERA PARA EVALUAR INTERACCIONES ENTRE *ARMILLARIA MELLEA* Y EL HONGO ARBUSCULAR *GLOMUS INTRARADICES*

Camprubí, A.¹, García-Figueres, F.², Bordas, M.³, Barnés, V.¹, Calvet, C.¹

¹IRTA, Departament de Protecció Vegetal Sostenible, Centre de Cabrils, Ctra. de Cabrils Km 2, 08348 Cabrils, Barcelona.

²Laboratori de Sanitat Vegetal, Centre de Cabrils, Ctra. de Cabrils Km 2, 08348 Cabrils, Barcelona.

³Agromillora, El Rebato s/n, Subirats, 08739 Barcelona.

Un dispositivo experimental ha sido diseñado para sostener el crecimiento de plántulas de *Ficus carica* L. var. “Brown Turkey” micropropagadas en medio MMS. Las plántulas se transfirieron a medio MSR sin azúcar ni vitaminas en frascos estériles de 600 ml de capacidad, manteniendo la parte aérea fuera del recipiente para conseguir un cultivo autotrófico, mientras que el sistema radical crecía en condiciones axénicas dentro del recipiente.

Simultáneamente se inocularon los frascos con un cultivo axénico de *Glomus intraradices* Schenck & Smith (BEG 72) en raíces transformadas de zanahoria (*Daucus carota* L.) y con micelio de un aislado de *Armillaria mellea* (Vahl:Fr.) P. Kumm de raíz infectada de *Prunus* y subcultivada en agar malta.

El objetivo del diseño experimental es que el dispositivo planta-patógeno-micorriza permita evaluar los patrones de colonización de ambos hongos por técnicas moleculares y observaciones morfológicas.

EL VIRUS DEL MANCHADO FOLIAR DE LOS CÍTRICOS (CLBV) INVADE TEJIDOS MERISTEMÁTICOS DE *Nicotiana benthamiana* Y CITRICOS

Agüero, J., Vives, M.C., Velázquez, K., Ruiz-Ruiz, S., Juarez, J., Navarro, L., Moreno, P., Guerri, J.

Centro de Protección Vegetal y Biotecnología. IVIA. Apartado oficial 46113, Moncada, Valencia. jguerri@ivia.es

Para que un virus infecte sistémicamente una planta necesita multiplicarse en la célula infectada, invadir las células vecinas mediante el movimiento célula a célula a través de los plasmodesmos, y una vez alcanzado el sistema vascular, moverse a larga distancia para iniciar nuevos focos de infección en puntos distantes. La mayoría de virus y viroides son incapaces de invadir las regiones meristemáticas, ya que el sistema vascular de las plantas no está diferenciado en dichas regiones. Este fenómeno se ha aprovechado comercialmente para obtener plantas de cítricos libres de virus mediante microinjerto de ápices caulinares *in vitro*. Sin embargo, el virus del manchado foliar de los cítricos (CLBV) no se puede eliminar empleando esta técnica y además se transmite por semilla, lo que sugería que este virus podría invadir los meristemas. Para demostrar esta hipótesis, se analizó el movimiento y acumulación de CLBV durante la infección sistémica de plantas de *N. benthamiana* utilizando un clon infeccioso de cDNA del genoma de CLBV en el que se incluyó el gen que codifica la proteína verde fluorescente (GFP) bajo el control del promotor que induce la transcripción del ARN subgenómico de la proteína de la cápsida duplicado en la región 3' no codificante del virus (clon *clbv3'pr*-GFP). La presencia de este gen añadido no altera la funcionalidad del virus y da lugar a la expresión de GFP en las células infectadas. En las plantas de *N. benthamiana* inoculadas con *clbv3'pr*-GFP el virus se acumuló en todos los tejidos incluyendo órganos florales y regiones meristemáticas. Sin embargo, la fluorescencia verde emitida por GFP no se observó claramente en plantas de cítricos inoculadas con dicho clon, aunque si se detectó GFP mediante western blot utilizando anticuerpos específicos de esta proteína. Para determinar si el virus también invadía las regiones meristemáticas de los cítricos se inocularon por injerto plantas de lima Mexicana con CLBV, con el virus de la tristeza de los cítricos (CTV), que se puede eliminar mediante microinjerto, o con ambos virus simultáneamente. CLBV se detectó mediante hibridación y RT-PCR a tiempo real en ápices de menos de 0.2 mm de las plantas inoculadas con CLBV o con CLBV+CTV, mientras que CTV no se detectó en ningún caso.

EVALUACIÓN DE LA RESISTENCIA DE TOMATE A *Meloidogyne incognita* MEDIANTE ENSAYOS BIOLÓGICOS Y MOLECULARES

Touriño, A.², Portillo, I.¹, Herradón, E.², Moyano, C.¹

¹Laboratorio de Sanidad y ²Laboratorio de Técnicas Biomoleculares. Estación de Ensayos de Semillas y Plantas de Vivero, Dirección Técnica de Evaluación de Variedades y Productos Fitosanitarios (DTEVPF), INIA, Ctra. La Coruña Km. 7.5, 28040 Madrid. E-mail: cardaba@inia.es

La resistencia de tomate a *Meloidogyne incognita* es un carácter obligatorio y de agrupamiento en el protocolo de tomate de la Oficina Comunitaria de Variedades Vegetales (CPVO), utilizado para describir variedades de cara a su inclusión en el registro de variedades comerciales o para la protección de las obtenciones vegetales en la Unión Europea. La resistencia a enfermedades se evalúa mediante ensayos biológicos aunque recientemente se está estudiando la posibilidad de incluir marcadores moleculares para el estudio de algunos de estos caracteres. En la DTEVPV hemos evaluado la resistencia de 240 variedades de tomate a *Meloidogyne incognita* mediante ensayos biológicos y moleculares.

Para la realización del ensayo biológico que es una modificación del protocolo CPVO- TP/044-4, se inoculó tomate en estado de 4 hojas con nódulos procedentes de variedades susceptibles. La evaluación se hizo a los 40 días determinando el porcentaje de nódulos radiculares de acuerdo a una escala de 0 a 4. Las variedades se clasificaron como resistente (R), susceptible (S) o resistencia intermedia (RI).

El ensayo molecular se basa en la detección del gen *Mi-1.2* que confiere resistencia a diferentes especies de nematodo, entre ellas *M. incognita*. Para la detección del gen *Mi-1.2* en tomate se han desarrollado varios marcadores moleculares: Rex1, Mi23, PM3, etc. En este trabajo, la presencia de este gen se determinó utilizando el marcador co-dominante PMiF3/R3 (El Mehrach et al., 2005) que permite identificar variedades resistentes, susceptibles y de resistencia intermedia al igual que en el test biológico.

Los resultados con ambas técnicas son coincidentes en un 97% (240 variedades evaluadas). Aquellas variedades cuyo resultado es S o R en el ensayo molecular dan el mismo resultado en el ensayo biológico, en cambio, de las 44 variedades con RI en el ensayo molecular, 6 presentaron un fenotipo discordante en el ensayo biológico. La RI es a menudo difícil de evaluar en el ensayo biológico, pudiendo confundirse en ocasiones con variedades heterogéneas. La resistencia intermedia está asociada al gen *Mi-J* procedente de *S. chilense* y está ligado al gen *Ty-1* que confiere tolerancia a Begomovirus. Se estudiará la presencia del gen *Mi-J* en estas variedades y se discutirán los resultados.

El marcador PMiF3/R3 es una buena herramienta de apoyo al ensayo biológico para evaluar la resistencia a *M. incognita* y es de gran ayuda para la evaluación de fenotipos que presentan resistencia intermedia.

PAN-165

CONTRIBUCIÓN A LA VIRULENCIA DE *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* DE UNA REGIÓN GENÓMICA ESPECÍFICA DE *Pseudomonas* PATÓGENAS DE HUÉSPEDES LEÑOSOS

Caballo, E., Matas, I.M., Ramos, C.

Instituto de Hortofruticultura Subtropical y Mediterránea 'La Mayora', Universidad de Málaga-Consejo Superior de Investigaciones Científicas. Área de Genética, Universidad de Málaga. E-mail: crr@uma.es

El complejo *Pseudomonas syringae* agrupa un conjunto de bacterias fitopatógenas entre las que se encuentra *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* (Psv), agente causal de la tuberculosis del olivo y patógeno modelo en el estudio de interacciones con plantas leñosas. El análisis comparativo del borrador del genoma de Psv NCPPB3335 con los genomas completos de 3 patovares (pvs.) de *P. syringae* patógenos de plantas herbáceas (pv. *tomato* DC3000, pv. *syringae* B728a y pv. *phaseolicola* 1448A) reveló la existencia de 12 regiones variables (VR) presentes exclusivamente en el genoma de Psv. Una de estas regiones, VR8 de 14,7 kb, contiene 15 ORFs probablemente implicados en la degradación de compuestos aromáticos y agrupados en al menos dos operones. Uno de estos operones, es homólogo al operón *antABC* del plásmido pCAR1 de *Pseudomonas resinovorans*, responsable en esta bacteria de la transformación de antranilato en catecol. El segundo, homólogo al operón *catBCA* presente en algunas cepas de *P. fluorescens* y *P. putida*, está implicado en la degradación de catecol a intermediarios del ciclo de Krebs. Hibridaciones Southern con sondas específicas para VR8 mostraron que esta región se localiza en 29 aislados de Psv de distinta procedencia geográfica. Adicionalmente, el análisis detallado de esta región en los genomas del complejo *P. syringae* recientemente secuenciados, ha revelando que VR8 es específica de patógenos de plantas leñosas, e.g. *P. syringae* pv. *aesculi*, pv. *morsprunorum* y pv. *actinidiae*. Para analizar la contribución de VR8 a la virulencia de Psv NCPPB 3335, se construyó un mutante $\Delta antA$ mediante intercambio alélico. La sintomatología generada por el mutante en plantas de olivo adultas se encuentra reducida significativamente con respecto a la cepa silvestre, sin embargo, estas diferencias no se observaron en plantas de olivo micropropagadas *in vitro*. Estos resultados, apoyan el papel que VR8 podría tener en la virulencia de *Pseudomonas* patógenas de plantas leñosas, así como su posible implicación en el catabolismo de compuestos derivados de la lignina. En la actualidad, se está llevando a cabo la construcción de un mutante de Psv en el operón *catBCA*, así como se está analizando la expresión de los genes *ant* y *cat* en este patógeno.

Financiación: AGL2011-30343-C02-01 (MINECO), cofinanciado por FEDER.

**IMPORTANCIA DE LA PRODUCCION DE ACIDO GLUCONICO EN LA
EXPRESION DE ENDOPOLIGALACTOURONASAS DE *Monilinia*
fruticola EN MEDIO DE CULTIVO**

Martinez, F.¹, Morales-Clemente, M.T.¹, Prusky, D.², Melgarejo, P.¹, De Cal,

¹Departamento de Protección Vegetal, INIA, Carretera de La Coruña km 7, 28040 Madrid. ²Department of Postharvest Science of Fresh Fruit, the Volcani Center, Agricultural Research Organization, Bet Dagan, 50250, Israel. Email: cal@inia.es

Monilinia fruticola es un hongo patógeno necrotrófo de los frutales de hueso, que después de su penetración coloniza el tejido del fruto a partir del crecimiento de las hifas a través de los espacios intercelulares e intracelularmente provocando el colapso del protoplasma. El crecimiento intracelular supone la ruptura previa de la pared celular del huésped y la penetración principalmente a través de la laminilla media. La infección inicial de *M. fruticola* va acompañada de la secreción de endopoligalactouronasas y pectinesterasas.

Por ello se plantea el estudio de las condiciones idóneas para la producción de endopoligalactouronasas por parte del patógeno en medio de cultivo. Se utilizaron dos aislados de *M. fruticola*, los cuales después de crecer durante 7 días en caldo de patata a pH 5.3 (PDB) fueron traspasados a medio mínimo pH (7, 6, 5) durante 8, 16, 24, 36 y 48 horas de incubación a 150 rpm. Posteriormente se filtraron a vacío, midiendo el pH del sobrenadante y determinando la concentración de ácidos orgánicos (ácido málico, cítrico, glucónico, fumárico y oxálico) a los diferentes tiempos de incubación mediante HPLC. El micelio obtenido se congelaba para estudiar la expresión de genes relacionados con las endopoligalactouronasas a distintos pH mediante PCR en tiempo real. DNA se obtenía desde el micelio de *M. fruticola* con el kit DNeasy kit, la transcripción reversa con Verso cDNA Synthesis kit, el cDNA se recogía por filtración a vacío y se diluía 1:10. El nivel de expression de PG1, PG2, PG3, y PG5 era obtenido mediante PCR cuantitativa.

El crecimiento de *M. fruticola* en medio mínimo reduce el pH inicial entre 0,5 y 1,5 unidades de pH a las 48 h, siendo el ácido glucónico el responsable de la acidificación del medio. La concentración de ácido málico o cítrico no varía en el tiempo de incubación, y la de fumárico u oxálico era prácticamente inexistente. Existe una correlación negativa entre la concentración de ácido glucónico y el pH ($r = -0.75$, $P = 0.0006$). La mayor concentración de ácido glucónico (40.39 mg/g peso seco de micelio) se detecta a partir de las 48 horas. La acidificación del medio supone una expresión 10 superior de PG5.

PAN-167

ANÁLISIS POR MICROARRAYS DE LA RESISTENCIA MEDIADA POR EL GEN *Mi-1* DEL TOMATE A NEMATODOS FORMADORES DE NÓDULOS (*Meloidogyne javanica*)

Emiliozzi, M., Nombela, G.

Departamento de Protección Vegetal, Instituto de Ciencias Agrarias (ICA), Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), c/ Serrano 115 Dpdo., Madrid-28006. gnombela@ica.csic.es

Los nematodos formadores de nódulos (*Meloidogyne* spp.) causan importantes daños en los cultivos hortícolas al alimentarse del floema de las plantas. El empleo de variedades resistentes a estos nematodos es una de las estrategias habitualmente utilizadas en los programas del Manejo Integrado de Plagas y Enfermedades. El gen *Mi-1*, presente en algunas variedades de tomate, es el responsable de su resistencia frente a 3 especies de nematodos formadores de nódulos (*M. incognita*, *M. javanica* y *M. arenaria*), además de ciertos insectos transmisores de virus (áfidos y moscas blancas). Como se ha demostrado en otras interacciones planta-patógeno, en la respuesta resistente del tomate probablemente se necesitan, además de *Mi-1*, otros genes que funcionen coordinadamente. Aunque se han identificado algunos de estos genes (*Rme-1*, *Hsp90*, etc.), aún se desconoce a la mayoría de ellos y su papel en la resistencia mediada por *Mi-1*.

En el presente estudio se ha utilizado la técnica de microarrays de oligonucleótidos para analizar el transcriptoma de plantas adultas de tomate portadoras y carentes del gen *Mi-1*, infestadas y no infestadas con juveniles infectivos (J2) de *M. javanica*. En concreto, se utilizó el GeneChip[®] Tomato Genome Array de Affymetrix[®] para comparar plantas de tomate de 8 semanas de edad de los cultivares Motelle (*Mi-1/Mi-1*) y Moneymaker (*mi-1/mi-1*). Así fue posible, en primer lugar, identificar genes del tomate con expresión diferencial asociada a la presencia/ausencia del gen *Mi-1*. De igual modo, se identificaron genes sobreexpresados o reprimidos tras la infección por *M. javanica* en las interacciones tomate-nematodo incompatible (resistencia regulada por *Mi-1*) y compatible (susceptibilidad en ausencia del gen).

Este trabajo se llevó a cabo en el marco del Proyecto AGL2007-65854/AGR del Plan Nacional de I+D+I del Ministerio de Educación y Ciencia, financiado con fondos de los Presupuestos Generales del Estado (PGE) y Fondos Europeos de Desarrollo Regional (FEDER). La participación de M. Emiliozzi fue financiada mediante una beca/contrato predoctoral del Programa Junta de Ampliación de Estudios (JAE-Predoc) del CSIC.

REEVALUACIÓN DEL EFECTO DE LA INFECCIÓN VIRAL DE YEMAS
DE VID EN LA PROPAGACIÓN E IMPLANTACIÓN DEL CULTIVO

Muruamendiaraz, A¹., Cibriain, J.F.², Aguirrezábal, F²., Legorburu, F.J.¹

¹NEIKER-Tecnalia, Instituto Vasco de Investigación y Desarrollo Agrario,
Apartado 46, 01080 VITORIA/GASTEIZ. E-mail: jlegorburu@neiker.net

²INTIA, Valle de Orba 34, 31390 OLITE (Navarra).

Se conoce desde antaño el efecto perjudicial del virus del entrenudo corto infeccioso (*Grapevine fanleaf virus*, GFLV, género *Nepovirus*) en el agarre de los injertos de vid. Existen también trabajos que apuntan al virus del enrollado nº 2 (*Grapevine leafroll-associated virus 2*, GLRaV-2, género *Closterovirus*) como una de las causas de incompatibilidad de injerto. Por otro lado, en un contexto de vitivinicultura de calidad, que propugna rendimientos contenidos de uva, se levantan voces favorables a la utilización de material de propagación infectado, como método de control del vigor vegetativo de la vid. Efectivamente, la planta adulta puede coexistir con algunos virus, incluso graves como el enrollado nº 3 (*Grapevine leafroll-associated virus 3*, GLRaV-3, género *Ampelovirus*). La comercialización de material de viníferas infectado por virus graves (GFLV, GLRaV-1 y 3 y mosaico del arabis, *Arabis mosaic virus*, ArMV, género *Nepovirus*) está reglamentariamente prohibida, si bien algún viticultor/bodega se podría plantear la posibilidad de encargar la multiplicación de material propio infectado. Por ello nos propusimos evaluar el riesgo para el proceso de propagación e implantación de la viña joven. Se diseñó un experimento de virus graves, tomando yemas de Tempranillo con GFLV, GLRaV-3 y libres de estos virus en varias viñas de Rioja Alavesa y Navarra. Se dieron a un vivero profesional para su injertación y aviveramiento sobre tres patrones comerciales: Richter 110, SO4 y 41B. El efecto de los virus sobre el rendimiento de planta-injerto no llegó a ser significativo, mientras que SO4 presentaba menor tasa de agarre que los otros dos patrones. Sin embargo, el segundo año de aviveramiento, que simulaba la plantación de una viña comercial reveló una mortalidad significativa asociada a GFLV. Un experimento similar con los virus leves GLRaV-2 y jaspeado (*Grapevine fleck virus*, GFkV, género *Maculavirus*) tampoco detectó diferencias significativas en rendimiento de planta injerto, poniendo en duda que todos los aislados de GLRaV-2 puedan inducir incompatibilidad. Este trabajo fue parcialmente financiado por el proyecto INIA RTA2008-00078-C03 y fondos FEDER.

**EVOLUCIÓN DE LA VIRULENCIA DE UN VIRUS DE PLANTAS EN DOS
HUÉSPEDES DISTINTOS**

Moreno, M.G., García-Arenal, F., Fraile, A.

Centro de Biotecnología y Genómica de Plantas (UPM-INIA), and E.T.S.I. Agrónomos, Campus de Montegancedo, Universidad Politécnica de Madrid, Pozuelo de Alarcón (Madrid). Email: aurora.fraile@upm.es

La superación de la resistencia genética por los patógenos es un problema central de la Patología Vegetal. El éxito del control basado en el uso de resistencia depende de la durabilidad de la misma que, en el caso de los virus, se ha demostrado que está determinada por el coste biológico de la virulencia. Hemos analizado la evolución de la virulencia sobre el gen de resistencia *Tsw* del pimiento en el virus del bronceado del tomate (TSWV, *Tomato spotted wilt virus*). Para ello se ha obtenido una colección de aislados que representan la población de TSWV que infecta a pimiento en el SE de España. Los aislados se han caracterizado por su capacidad de superar *Tsw*, y molecularmente determinando la secuencia del gen *Nss*. Los datos muestran que la virulencia sobre *Tsw* ha aparecido en distintos linajes incluso en esta área geográfica limitada. Estos mismos aislados se han caracterizado por su capacidad de superar el gen de resistencia *Sw5* en tomate, y molecularmente por la secuencia del gen *Nsm*. La capacidad de superar la resistencia en tomate no está genéticamente ligada a la capacidad de superar la resistencia en pimiento. La existencia de aislados procedentes de pimiento que superan una resistencia de tomate demuestra flujo genético entre las poblaciones de ambos cultivos. La falta de ligamiento ente ambas virulencias sugiere un coste biológico y un posible compromiso ente ambos fenotipos.

PAN-170

SUSCEPTIBILIDAD VARIETAL AL CHANCRO DEL ALMENDRO (*Phomopsis amygdali* (Delacr.) J.J. Tuset & M.T. Portilla)

Miarnau, X.¹, Luque, J.², Marimon, N.³, Alegre, S.¹, Vargas, J.F.³

¹ *Olivicultura, Elaiotècnia i Fruita Seca, IRTA-Estació Experimental de Lleida. Av. Alcalde Rovira Roure, 191. 25198 Lleida. E-mail: xavier.miarnau@irta.cat*

² *Patologia Vegetal, IRTA-Cabrils. Ctra. de Cabrils, km 2. 08348 Cabrils.*

³ *Olivicultura, Elaiotècnia i Fruita Seca, IRTA-Mas de Bover. Ctra. Reus-El Morell, km 3,8. 43120 Constantí.*

El chancro del almendro, conocido comúnmente por “fusisocum”, es una enfermedad causada por el hongo *Phomopsis amygdali* (Delacr.) J.J. Tuset & M.T. Portilla que afecta muchas plantaciones de almendro españolas situadas en zonas con humedad ambiental elevada.

Los estudios de susceptibilidad varietal a este patógeno han sido escasos y, en la mayoría de los casos, mediante observaciones en colecciones de variedades en campo sometidas a una contaminación natural espontánea e incontrolada.

En 2009 se inició un ensayo en una parcela experimental situada en Les Borges Blanques (Lleida) para evaluar las diferencias de susceptibilidad a la enfermedad en un total de 20 variedades de almendro, mediante inoculación artificial del patógeno. En la parcela experimental no se aplicaron tratamientos fungicidas para evitar interferencias en el desarrollo de *P. amygdali*. El diseño estadístico del ensayo fue de bloques al azar con 4 repeticiones de 4 árboles por parcela elemental. La inoculación artificial se realizó en el mes de junio, y consistió en colocar un fragmento de micelio del hongo en una incisión, realizada con un bisturí estéril, en la corteza de cada brote. Dos meses después de la inoculación, a mediados de agosto, se midió la longitud de la parte necrosada del brote, que se utilizó como variable indicadora de la susceptibilidad de las variedades.

Durante dos años se ha evaluado la incidencia de la enfermedad en las diferentes variedades del ensayo. Los resultados obtenidos permitieron valorar el diferente grado de respuesta a la enfermedad de las variedades, pudiendo clasificarlas en diferentes grupos de susceptibilidad al chancro. Las variedades más susceptibles a la enfermedad fueron ‘Lauranne’ y ‘Marcona’, entre otras, mientras que ‘Marinada’, ‘Masbovera’ y ‘Tarraco’ se encontraron entre las más tolerantes.

PAN-171

SUSCEPTIBILIDAD VARIETAL A LA 'MANCHA OCRE' (*Polystigma ochraceum* (Whalenb.) Sacc.) EN EL CULTIVO DEL ALMENDRO

Marimon, N.¹, Luque, J.², Vargas, F.J.¹, Alegre, S.³, Miarnau, X.³

¹ *Olivicultura, Elaiotècnia i Fruita Seca, IRTA-Mas de Bover. Ctra. Reus-El Morell, km 3,8. 43120 Constantí.*

² *Patologia Vegetal, IRTA-Cabrils. Ctra. de Cabrils, km 2. 08348 Cabrils.*

³ *Olivicultura, Elaiotècnia i Fruita Seca, IRTA-Estació Experimental de Lleida. Av. Alcalde Rovira Roure, 191. 25198 Lleida. E-mail: xavier.miarnau@irta.cat*

Una de las principales enfermedades en el cultivo del almendro en los países del área mediterránea es la 'mancha ocre', causada por el hongo *Polystigma ochraceum* (Whalenb.) Sacc. En los últimos años, la importancia de esta enfermedad en España se ha incrementado debido al aumento de plantaciones en zonas de interior y a la utilización de nuevas variedades más susceptibles. Sin dejar de lado otras medidas de control, la resistencia varietal podría ser una buena estrategia para el control de la mancha ocre a largo plazo. Para ello, se ha creído necesario caracterizar la susceptibilidad de distintas variedades.

En una parcela experimental situada en Les Borges Blanques (Lleida) se han evaluado las diferencias de susceptibilidad al patógeno en un total de 20 variedades de almendro, mediante el análisis visual de los síntomas en árboles infectados de forma natural. El diseño estadístico del ensayo fue de bloques al azar con 4 repeticiones de 4 árboles por parcela elemental. En esta parcela no se aplicaron tratamientos fungicidas para evitar interferencias en el desarrollo de la enfermedad.

En 2011 se realizaron dos tipos de valoración de la incidencia y severidad de la enfermedad. En primer lugar, una apreciación visual del nivel de afectación de la enfermedad en el árbol y, en segundo lugar, una medición del porcentaje de la superficie de hoja afectada. Los resultados de la aplicación de ambas metodologías resultaron similares. La valoración visual del nivel de afectación de la enfermedad en el árbol fue un método mucho más rápido, comparativamente, mientras que la evaluación de la severidad foliar fue más costoso en tiempo pero resultó más preciso, lo que permitió discriminar más grupos de susceptibilidad entre las variedades.

Los resultados obtenidos permitieron valorar el diferente grado de respuesta a la enfermedad de las variedades, pudiendo clasificarlas en diferentes grupos de susceptibilidad al patógeno. Las variedades más susceptibles a la mancha ocre fueron 'Guara', 'Tuono' y 'Tarraco', mientras que 'Mardía' y 'Vairo' resultaron las más tolerantes.

IMPLICACIÓN DE LAS ENZIMAS β -1,3-GLUCANASA Y QUITINASA EN LA RESPUESTA DE DEFENSA DE LA CAÑA DE AZÚCAR FRENTE A *S. scitamineum*

Vicente, C.¹, Santiago, R.¹, Alarcón, B.¹, Blanch, M.², Legaz, M. E.¹

¹*Departamento de Biología Vegetal I (Fisiología Vegetal), Te Lichen-Cane Team, Facultad de Biología, Universidad Complutense, 28040 Madrid, España. E-mail: cvicente@bio.ucm.es*

²*Departamento de Caracterización, Calidad y Seguridad. Instituto de Ciencia y Tecnología de los alimentos y Nutrición (ICTAN-CSIC). Jose Antonio Novais 10, MADRID 28040, España. E-mail: mblanchr@hotmail.com*

La respuesta defensiva de las plantas se caracteriza por ser de naturaleza multicomponente, incluyendo la acumulación de un conjunto de proteínas que puedan frenar la expansión de un patógeno. La expresión de algunas familias génicas que codifican proteínas relacionadas con la patogénesis (PRs), que son armas de ataque frente al patógeno y, por lo tanto, componentes de la propia respuesta. En este trabajo se ha comprobado si el efecto de un proceso de infección simulado con factores de virulencia, aislados de *Sporisorium scitamineum*, afecta a la actividad β -1,3-glucanasa y quitinasa de *Saccharum officinarum*. El análisis de ambas actividades se llevó a cabo en discos de hoja de caña de los cultivares B 42231 (susceptible) y My 55-14 (resistente) incubados con una disolución de factores de virulencia fúngicos. Estas dos PRs se valoraron después de incubar discos foliares con dos tipos de posibles inductores de la respuesta defensiva SA y JA. En B 42231, ninguna de las dos PRs valoradas mostró una activación significativa con ninguno de los tres tratamientos. Sin embargo, en el cultivar My 55-14, la actividad β -1,3-glucanasa incrementó de manera significativa tras el tratamiento con SA y factores fúngicos, y la enzima quitinasa se vió activada únicamente cuando los discos de hoja se incubaron en presencia de factores de *S. scitamineum*. Es posible que la presencia en el medio de incubación de SA exógeno, hubiera provocado la activación, únicamente del gen que codifica para β -1,3-glucanasa en el cv. My 55-14. Ninguna de las dos PRs estudiadas en este trabajo respondieron al tratamiento con JA exógeno. Parece que la activación de estas dos PRs está restringida al cultivar resistente tras la interacción con factores fúngicos. Son enzimas con capacidad hidrolítica que pueden desempeñar funciones protectoras directas o indirectas al liberar *elicitores*. En el caso particular de *S. scitamineum*, por la constitución química de su pared celular, las glucanasas y quitinasas pueden degradar directamente dicha estructura limitando así su crecimiento. De acuerdo con los resultados, se propone la utilización de la enzima β -1,3-glucanasa como marcador de resistencia sistémica adquirida (SAR).

¿ESTÁN IMPLICADAS LAS PROTEÍNAS DIRIGENTES DE CAÑA DE AZÚCAR EN LA RESISTENCIA A LA ENFERMEDAD DEL CARBÓN CAUSADA POR *Sporisorium scitamineum*?

Díaz, E.M., de Armas, R., Sacristán, M., Vicente, C., Legaz, M.E.

Departamento de Biología Vegetal I (Fisiología Vegetal), The Lichen-Cane Team, Facultad de Biología, Universidad Complutense, 28040 Madrid, España. E-mail: evasilvestre7@hotmail.com

En la caña de azúcar se han descrito dos grupos de glicoproteínas de carácter heterogéneo, denominadas HMMG (de alto) y MMMG (de mediano) peso molecular. Las características de estas moléculas, así como las evidencias de su implicación en el mecanismo de reconocimiento y defensa frente a patógenos es un hecho, como lo demuestran diferentes trabajos del grupo de investigación. Estas glicoproteínas incrementan en respuesta a daños mecánicos, a la inducción con agentes patógenos y a tratamientos con SA. Teliosporas de *S. scitamineum*, causante de la enfermedad del carbón en caña de azúcar, sufren agregación en presencia de HMMG y MMMG correlacionándose este reclutamiento con la adhesión de las glicoproteínas a las paredes celulares de las teliosporas. Este ligamiento disminuye la germinación de las teliosporas al impedir la polarización del citoesqueleto de éstas. En el presente trabajo, las glicoproteínas de caña que son activamente sintetizadas como respuesta al carbón han sido analizadas por métodos de proteómica. Se seleccionaron dos cultivares de caña de azúcar, uno sensible (B 42231) a la enfermedad del carbón y otro resistente (My 55-14) de los cuales se aislaron los dos tipos de glicoproteínas antes mencionadas. Tras un análisis convencional mediante SDS-PAGE, las bandas de proteínas fueron secuencialmente lavadas, reducidas y alquiladas para digerirse finalmente con tripsina. Los péptidos tripticos fueron extraídos de la matriz y analizados mediante HPLC/MS/MS. Los datos generados en el PKL fueron analizados en el servidor MASCOT. Los resultados indican que existen secuencias peptídicas procedentes de HMMG y MMMG semejantes en ambos cultivares. Sin embargo, se ha detectado la presencia de un péptido con una cobertura de secuencia del 8% de una carboxipeptidasa de *Zea mays* y dos péptidos procedentes de MMMG con porcentajes de cobertura del 11%, correspondientes a proteínas dirigentes, que únicamente aparecen en el cultivar resistente. El análisis proteómico proporciona una base indiscutible que involucra algunas de las enzimas de biosíntesis de lignina en los mecanismos de defensa de la planta frente al carbón. Aunque los resultados que se presentan son preliminares, se podría hipotetizar sobre esta base, suponiendo que las proteínas dirigentes estarían implicadas en fenómenos de resistencia, modulando la síntesis de lignina en aquellos cultivares de caña de azúcar resistentes a la enfermedad del carbón.

**CARACTERIZACIÓN PARCIAL DE CINAMIL ALCOHOL
DESHIDROGENASAS EN TALLOS DE CAÑA DE AZÚCAR ELICITADOS
CON FACTORES DE VIRULENCIA DE *Sporisorium scitamineum***

Sacristán, M., Alarcón, B., Vicente, C., Legaz, M.E.

Departamento de Biología Vegetal I (Fisiología Vegetal), The Lichen-Cane Team, Facultad de Biología, Universidad Complutense, 28040 Madrid, España. E-mail: marasac@hotmail.com

El hongo *Sporisorium scitamineum* produce la enfermedad del carbón en la caña de azúcar. Se ha comprobado que la esterificación diferencial de fenoles en la pared celular y su posterior deposición en forma de lignina influye en la susceptibilidad o resistencia de plantas de distintos cultivares de caña. En angiospermas, la lignina es un heteropolímero resultante del acoplamiento oxidativo de tres monolignoles: *p*-cumaril, coniferil y sinapil alcohol. Las cinamil alcohol deshidrogenasas (CAD) son las enzimas involucradas en la reducción de los distintos cinamaldehídos a los distintos cinamil alcoholes, el último paso en la biosíntesis de monolignoles. Se han descrito múltiples isoformas de CAD en varias angiospermas, proponiendo que el último paso en la biosíntesis de guayacil o siringil monolignoles está catalizado por CAD, capaz de reducir tanto coniferaldehído como sinapaldehído.

El objetivo del presente trabajo ha sido caracterizar parcialmente la enzima CAD, aislada y purificada a partir de tallos de caña de azúcar de un cultivar, My 55-14 resistente al carbón. Para ello, a partir de un extracto libre de células, la enzima se sometió a diferentes pasos de purificación. Las actividades enzimáticas fueron ensayadas mediante la reacción reversa, que consiste en la oxidación de los correspondientes cinamil alcoholes a los cinamaldehídos, y analizada por HPLC mediante la detección del incremento en la cantidad de los productos y la bajada en la cantidad de los sustratos. Se ha estimado una $v_{\max}$ de 0.013 nmol de coniferaldehído formado·min⁻¹ y un valor de K_m de 8.8 μ M. La $v_{\max}$ para sinapaldehído fue de 0.015 nmol de sinapaldehído formado·min⁻¹ y el valor de K_m de 6.7 μ M, valores similares a los encontrados para otras cinamil alcohol deshidrogenasas de diferentes especies vegetales. También se ha estimado una temperatura óptima de 20 °C y un pH óptimo cercano a la neutralidad.

ACCIÓN DE LAS PROTEÍNAS R DE CAÑA DE AZÚCAR SOBRE LA QUIMIOTAXIS DE TELIOSPORAS DE *Sporisorium scitamineum*

Sánchez-Elordi, E., Díaz, E.M., de Armas, R., Vicente, C., Legaz, M.E.

Departamento de Biología Vegetal I (Fisiología Vegetal), Te Lichen-Cane Team, Facultad de Biología, Universidad Complutense, 28040 Madrid, España. E-mail: elena_ese@hotmail.com

La caña de azúcar produce diferentes glicoproteínas segregables como respuesta a la invasión por fitopatógenos o a heridas mecánicamente infligidas. En el caso del carbón (*Sporisorium scitamineum*), la planta produce glicoproteínas de defensa, que han sido identificadas por su actividad enzimática (arginasa, β -1,3-glucanasa o quitinasa, serie I) o mediante análisis proteómico (proteínas dirigentes, cinamoil alcohol deshidrogenasa, serie II). La caña emplea pues al menos dos mecanismos de defensa distintos basados en las glicoproteínas producidas tras la infección: las de la serie I están dirigidas a la maceración enzimática de las paredes celulares del patógeno, mientras que las de la serie II incrementarían la resistencia mecánica de la planta por sobre-síntesis de ligninas frente a la penetración del micelio. Ambas clases de proteínas incrementan su síntesis tras la infección de variedades resistentes. Un tercer mecanismo ha sido estudiado muy recientemente en nuestro laboratorio. Las teliosporas que los látigos distribuyen pueden desarrollar directamente un micelio infectivo sobre la epidermis, que rompen para penetrar en el mesófilo. Pero también pueden desplazarse sobre la superficie húmeda de las hojas hasta encontrar una vía de entrada, como estomas o alguna herida superficial de los tallos. Las teliosporas no tienen órganos periféricos de motilidad, por lo que basan su capacidad de desplazamiento en contracciones de una proteína semejante a la miosina II adherida a las fibras de F.actina que componen el citoesqueleto, provocando así una invaginación de la célula. Una vez conseguido esto, la F-actina despolimeriza a G-actina en el polo de avance, con lo que la célula recupera su esfericidad, desplazándose simultáneamente hasta que se reconstituye la fibra de F- actina. Esta secuencia ha sido desvelada mediante el uso de inhibidores de la despolimerización de la F-actina, agentes despolimerizantes de la misma o inhibidores de la contracción de la miosina. Los cambios de forma de las teliosporas se han estudiado en microscopía de fluorescencia y confocal y por microscopía electrónica de transmisión y de barrido. La identificación de la actina fúngica como β -actina se ha llevado a cabo mediante el uso de anticuerpos anti- β -actina y Western blot. Las glicoproteínas producidas por variedades resistentes al carbón actúan como quimioatrayentes de las esporas, induciendo el mecanismo de contracción-relajación del citoesqueleto tras su unión a receptores específicos de la pared celular de la teliospora. La migración se traduce en agregación celular (falso *quenching*) y la germinación de las esporas es completamente inhibida.

COMPORTAMIENTO DE AISLADOS DE *Phytophthora* spp. Y LA RESISTENCIA GENÉTICA EN PIMIENTO

Hernández-Piñera, A.¹, Sánchez, F.¹, Lacasa, C.M.¹, Sánchez, E.², Lacasa, A.¹

¹Equipo de Biotecnología y Protección de Cultivos. ²Equipo de Horticultura. IMIDA. C/ Mayor s/n, 30.150 La Alberca. Murcia. ana.hernandez6@carm.es

Phytophthora es el principal patógeno fúngico de suelo en los cultivos de pimiento del Campo de Cartagena (Murcia). El injerto en patrones portadores de resistencia a *Phytophthora* se ha contemplado como una alternativa a la desinfección del suelo para el control de la “tristeza” o “seca”. En los ensayos de evaluación fitosanitaria y agronómica de porta-injertos se han infectado y muerto plantas injertadas sobre patrones portadores de resistencia a *Phytophthora* en invernaderos con *P. capsici* o *P. parasitica*, ambas infectando el suelo. Dado que la eficacia de la resistencia y la estabilidad de sus efectos, parece fundamental para considerarla como una solución al problema, se planteó un ensayo en condiciones controladas, de inoculación de híbridos F1 comerciales portadores de resistencia a *Phytophthora*, híbridos F1 de obtención propia y líneas parentales, tomando como referencia variedades comerciales (híbridos F1) sin resistencias, con 3 aislados de *P. capsici* y 4 de *P. parasitica*. El ensayo serviría también para la caracterización patogénica de los aislados.

Se han encontrado diferencias en el comportamiento de los aislados para una misma especie y material vegetal. Frente a las variedades sin resistencia un aislado de *P. capsici* y otro de *P. parasitica* no se mostraron patógenos. Frente al material portador de resistencia los resultados fueron variables. Respecto al comportamiento del material vegetal, se han observado diferencias entre líneas, variedades e híbridos frente a los aislados patógenos. Las especies de *Phytophthora* han resultado discriminantes en algunas líneas por su resistencia. Algunos materiales se muestran resistentes a los aislados de *P. capsici*, mientras otros lo son a *P. parásitica*, y otros se han comportado como sensibles o resistentes a todos los aislados de ambas especies. Estos resultados preliminares plantean cuestiones relativas a la posible especialización parasitaria de las *Phytophthora* en pimiento, a la agresividad y los factores que la determinan, a las características del material vegetal, a la expresión de los genes de resistencia, y sobre la influencia que la base genética en la que se introduce la resistencia pueda ejercer sobre la expresión de la misma. Estudios más detallados sobre las interacciones hospedante-patógeno serán necesarios para responder a las cuestiones planteadas.

Este trabajo ha sido realizado en el marco de los proyectos INIA-RTA2009-0058 y RTA2011-005-C03 Ana Hernández Piñera disfruta de una beca de formación concedida por el IMIDA y Fulgencio Sánchez Solana es beneficiario de una beca prodoctoral FPI-INIA.

PAN-177

EFFECTOS DE INFECCIONES VIRALES SOBRE EL DESARROLLO Y LA PRODUCTIVIDAD DE PLANTAS DE INTERÉS EN BIORREFINERÍAS

Zurita, L., Mansilla, C., Sánchez, F., Ponz, F.

Centro de Biotecnología y Genómica de Plantas (UPM-INIA). Campus de Montegancedo, autopista M-40 km. 38. 28223 Pozuelo de Alarcón, Madrid.

La capacidad de las plantas para sintetizar compuestos de gran pureza química, difícilmente obtenible por procedimientos químicos, y para la generación de energía ha hecho que en los últimos años se extienda la producción de cultivos para su uso como biorrefinerías.

La extensión de estos cultivos los expone a agentes patógenos, cuyos efectos mayoritariamente aun no han sido estudiados.

Hemos llevado a cabo un estudio sobre cómo afecta la infección de virus pertenecientes a los géneros *Potyvirus* y *Tobamovirus* a la productividad en algunas de las especies de plantas con alto potencial de utilización en biofactorías y agroenergía. Concretamente, se ha estudiado el efecto de la infección por dos cepas del *Virus del mosaico del nabo* (*Turnip mosaic virus*, *TuMV*, género *Potyvirus*) y *Virus del mosaico de la colza* (*Oilseed rape mosaic virus*, *ORMV*, género *Tobamovirus*) en diversas plantas. Dentro de las plantas analizadas hay especies de la familia Brassicaceae, como *Brassica juncea* (mostaza india), *B. carinata* (mostaza de Abisinia o col etiope), *Camelina sativa* (camelina), *Sinapis alba* (mostaza blanca) y *Crambe abyssinica* (mostaza etíope), y de la familia Asteraceae, como *Carthamus* sp. (cártamo centennial y cártamo raucho).

Se presentarán resultados referentes a la infectividad de los virus utilizados en estas especies y a los efectos de los patógenos sobre el desarrollo de la planta y la producción de semillas, medidos mediante diversos parámetros.

PAN-178

ANÁLISIS GENÉTICO DE LA CONTRIBUCIÓN INDIVIDUAL A LA VIRULENCIA DE LOS EFECTORES DEL SISTEMA DE SECRECIÓN TIPO III DE *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*

Macho, A.P., Zumaquero, A., Gonzalez-Plaza, J.J., Ortiz-Martín, I., Rufián, J.S., Beuzón, C.R.

Departamento de Biología Celular, Genética y Fisiología, Área de Genética, Universidad de Málaga, Instituto de Hortofruticultura Subtropical y Mediterránea (IHSM-UMA-CSIC), Campus de Teatinos, 29010 Málaga. E-mail: cbl@uma.es

Los efectores de tipo III de un patógeno determinan su rango de hospedador y su capacidad de virulencia. No obstante, el análisis del fenotipo de virulencia de mutantes sencillos en efectores de *Pseudomonas syringae* se ha caracterizado tradicionalmente por la falta de fenotipo, lo cual ha sido atribuido a un elevado grado de redundancia funcional entre los efectores de un mismo patógeno. De este modo, los efectores de *P. syringae* pv. *tomato* (Pto) DC3000 han sido clasificados en grupos de efectores redundantes (GERs), y su implicación en virulencia demostrada mediante el uso de mutantes múltiples.

No obstante, nuestro equipo ha demostrado que el uso de los índices de competitividad (competitive index o CI) como ensayos de virulencia permite establecer la contribución individual de AvrPto1_{PtoDC3000} a la virulencia de Pto DC3000 en tomate, su hospedador natural, a pesar de que la virulencia de AvrPto1 solo se había podido demostrar en mutantes dobles *avrPto1 avrPtoB*, ambas miembros de un mismo GER. Este trabajo demostró que incluso efectores que actúan sobre las mismas rutas de defensa pueden tener un papel individual durante el desarrollo de la enfermedad, y señala a los CI como el ensayo idóneo para establecer su contribución.

En este trabajo, hemos analizado la contribución individual a la virulencia de la mayoría de los efectores de *P. syringae* pv. *phaseolicola* (Pph) 1448a, siguiendo el desarrollo de los síntomas y determinando el CI de los mutantes sencillos en diferentes etapas de crecimiento durante la infección en judía, su hospedador natural. A pesar de la potencial redundancia funcional, hemos establecido una contribución individual a la virulencia para seis de los 15 efectores analizados. Además, hemos analizado la relación funcional entre aquellos efectores que mostraron contribución individual a la virulencia, para establecer redundancia, independencia, u otras relaciones funcionales.

**ANÁLISIS DE EXPRESIÓN MEDIANTE MICROARRAYS DEL
SOLAPAMIENTO ENTRE LA RESPUESTA DE LA PLANTA A LA
INFECCIÓN BACTERIANA Y AL SILENCIAMIENTO GÉNICO**

Zumaquero, A., Bejarano, E., Beuzón, C.R.

Departamento de Biología Celular, Genética y Fisiología, Área de Genética, Universidad de Málaga, Instituto de Hortofruticultura Subtropical y Mediterránea (IHSM-UMA-CSIC), Campus de Teatinos, 29010 Málaga. E-mail: cbl@uma.es

Los RNAs de 20-30 nucleótidos (nt) no codificantes, han surgido como la clave en la regulación de varios procesos biológicos, incluyendo desarrollo, respuesta al medio ambiente, mantenimiento de la estabilidad genómica, y defensa ante virus y bacterias en organismos eucariotas. Las dos clases más importantes de riboreguladores de 20-24 nt. son los microRNAs y los pequeños RNA interferentes (siRNA), ambos tipos codificados por el genoma de *Arabidopsis*. Estos pequeños RNAs actúan como represores de la expresión génica, específicos de secuencia, y pueden llevar a cabo dicha regulación bien a nivel transcripcional o a nivel post-transcripcional. Los pequeños RNAs son procesados a partir de precursores específicos por una o varias de las cuatro enzimas Dicer-Like RNase III, según del tipo.

Para determinar el papel de la regulación por pequeños RNAs en la defensa frente a bacterias, nos planteamos la identificación de genes que estuvieran diferencialmente expresados en plantas mutantes para el proceso de silenciamiento génico y/o en plantas sobreexpresando supresores víricos de silenciamiento, y cuya expresión varíe durante la infección con *P. syringae*, en respuesta a la secreción de efectores tipo III. Los genes cuya expresión se veía modificada de forma significativa durante las infecciones, mostrando un patrón de expresión diferencial en las infectadas con *P. syringae* pv. *tomato* DC3000 y aquellas infectadas con un derivado con un sistema de secreción tipo III no funcional, así como en alguna de las líneas afectadas en silenciamiento, se han seleccionado como posibles genes diana de ambos procesos. Los genes seleccionados han sido procesados en distintas bases de datos con objeto de extraer anotaciones funcionales y de procesos biológicos (GO, TAIR). Se han llevado a cabo análisis de agrupación jerárquica usando la herramienta multi-experiment viewer (disponible en la página web del "The Institute for Genomic Research" (TIGR)) de los distintos tratamientos. Y la expresión diferencial de aquellos con un mayor interés potencial con respecto a su relevancia biológica han sido analizados mediante RT-qPCR. Este proceso nos ha permitido identificar procesos biológicos solapantes y novedosos.

**EFFECTO DEL ENCHARCAMIENTO SOBRE LA INFECCIÓN POR
Phytophthora cinnamomi Rands EN PATRONES DE AGUACATE**

Álvarez Acosta, C.¹, Domínguez Correa, P.², Gallo Llobet, L.², Rodríguez Padrón, C.², Marrero Domínguez, A.¹

¹Dpto. Ingeniería, Producción y Economía Agrarias. Universidad de La Laguna. 38071 La Laguna, Tenerife. España

²Dpto. Protección Vegetal. Instituto Canario de Investigaciones Agrarias (ICIA). Apdo. 60, 38200 La Laguna, Tenerife. España. lgallo@icia.es

El estudio de la tolerancia-resistencia a *Phytophthora cinnamomi* de patrones seleccionados de aguacate requiere de ensayos con plántulas jóvenes (seedlings) en las que el sustrato se infesta artificialmente con inóculo preparado en laboratorio. La aparición de síntomas en las plantas sensibles puede demorarse varios meses lo que hace necesario la búsqueda de metodologías que aceleren el proceso.

En este trabajo se estudia el efecto del encharcamiento del sustrato en el cultivo del aguacate, sobre la velocidad de aparición de síntomas debidos al patógeno.

Se desarrollan asimismo dos índices cuantitativos de la infección: Índice de Decaimiento (ID), e Índice de Podredumbre de raíz (IP), así como varios parámetros asociados al crecimiento. Analizando las similitudes y diferencias de los síntomas ocasionados por el estrés biótico del patógeno, frente a los producidos por el estrés abiótico del encharcamiento, así como su interacción.

**CARACTERIZACIÓN DE MUTANTES EN BOMBAS DE EXTRUSIÓN EN
Pseudomonas syringae pv. tomato DC3000 Y *Dickeya dadantii* 3937**

Senovilla, M., González-Mula, A., Río-Álvarez, I., Rodríguez-Herva, J. J., Rodríguez-Palenzuela, P., López-Solanilla, E.

Centro de Biotecnología y Genómica de Plantas. Departamento de Biotecnología. ETSI Agrónomos. Universidad Politécnica de Madrid – I.N.I.A. Parque Científico y Tecnológico de la U.P.M. Campus de Montegancedo 28223 Pozuelo de Alarcón. Madrid. E-mail: isabel.rio@upm.es

Dickeya dadantii 3937 (Dd 3937), uno de los principales agentes causales de la podredumbre blanda de los vegetales, y *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000 (PsPto), responsable de la mancha bacteriana del tomate y otras plantas hospedadoras, son dos bacterias fitopatógenas con “estilos de patogenicidad” bastante diferentes, si bien comparten ciertos determinantes de virulencia. Entre los principales factores responsables de la virulencia de dichas bacterias cabe destacar la producción de enzimas hidrolíticas de la pared celular o el sistema Sap de resistencia a péptidos antimicrobianos, en Dd 3937, y el sistema de secreción tipo III (especialmente importante en el caso de PsPto). Estos factores de virulencia se han estudiado extensamente en los últimos años.

Por otro lado, para colonizar el tejido vegetal con éxito, estas bacterias han de sobrevivir en el apoplasto vegetal, un nicho rico en sustancias antimicrobianas (flavonoides, isoprenoides, alcaloides, etc.). Para tal fin, los patógenos han desarrollado diferentes sistemas para contrarrestar el efecto tóxico de estas sustancias, entre los que destacan las bombas de extrusión o sistemas MDR (multidrug resistance) de resistencia a múltiples drogas. Dichos sistemas, bien conservados desde el punto de vista evolutivo, aún están muy poco estudiados en el ámbito de las fitopatógenesis bacteriana.

En el presente trabajo se ha realizado un análisis bioinformático comparativo para identificar los genes de sistemas MDR presentes en los genomas de ambas bacterias, con especial énfasis en cuatro de las cinco familias descritas: RND, SMR, MFS y MATE. Para analizar la posible función de algunos de estos genes en virulencia se han seleccionado aquellos que no presentaban genes filogenéticamente cercanos en bacterias no patógenas como *Escherichia coli* o *P. putida*, y se han aislado varios mutantes de Dd 3937 y de PsPto a partir de bancos de mutantes ya existentes o contruidos al efecto (mutantes por transposición al azar portadores de un gen indicador *gus* desprovisto de promotor). Actualmente se están caracterizando fenotípicamente dichos mutantes y se está analizando su comportamiento en el contexto de la patogénesis para determinar si ejercen un papel relevante en virulencia.

Este trabajo ha sido financiado por el proyecto AGL2009-12757 y por el programa ‘Ramón y Cajal’ (RYC-2007-01045) del Ministerio de Ciencia e Innovación

PAN-182

PMER, UN REGULADOR TRANSCRIPCIONAL QUE CONTROLA LA RESISTENCIA A FLAVONOIDES EN *P. syringae* pv. tomato DC3000

Vargas, P., Gallegos, M.T.

Departamento de Microbiología del Suelo y Sistemas Simbióticos, Estación Experimental del Zaidín (CSIC), c/ Profesor Albareda 1, 18008 Granada.

La resistencia múltiple a compuestos tóxicos es un fenómeno ampliamente extendido que afecta a la salud humana y al medio ambiente. Uno de los mecanismos más importantes de resistencia múltiple, tanto en procariotas como en eucariotas, es la eliminación activa de compuestos tóxicos con estructuras químicas diferentes mediante unas proteínas de membrana específicas denominadas transportadores de eflujo o bombas. En *Pseudomonas syringae* pv. tomato (Pto), una cepa fitopatógena para tomate y *Arabidopsis thaliana*, hemos analizado la expresión de la bomba de eflujo *mexAB-oprM* y el gen regulador, *pmeR* y hemos investigado el papel de la proteína PmeR en la transcripción de ambos operones.

Hemos observado que *mexAB-oprM* y *pmeR* se expresan *in vivo* a un nivel basal elevado y moderado, respectivamente, y que la presencia de diferentes flavonoides y otros compuestos antimicrobianos provoca un aumento de la expresión de ambos. Hemos demostrado que PmeR es el represor local del promotor de *mexAB-oprM* y que también regula su propia expresión uniéndose a un operador pseudopalindrómico que solapa con los promotores, tanto de *mexAB-oprM* como de *pmeR*. También hemos verificado que los flavonoides interaccionan con PmeR e inducen un cambio conformacional que interfiere con su unión al ADN, modulando así las expresiones del transportador y el regulador. Por último y mediante experimentos in planta, hemos demostrado que el sistema PmeR/MexAB-OprM contribuye a la supervivencia y a la colonización de las plantas de tomate.

Estos resultados proporcionan una nueva visión de un regulador transcripcional y de un sistema de transporte que desempeñan funciones esenciales en la capacidad de Pto DC3000 para resistir la acción de los flavonoides producidos por la planta hospedadora, ya que estos compuestos son los mejores sustratos de MexAB-OprM y los mejores inductores de su expresión a nivel transcripcional.

Financiación: BFU2008-0086 (MICINN) y P08-CVI-3745 (Junta de Andalucía), ambos cofinanciados por FEDER.

LA PROTEÍNA MENOR DE LA CÁPSIDA DEL CRINIVIRUS TOMATO CHLOROSIS VIRUS INTERACCIONA CON DOS PROTEÍNAS DE *B. tabaci*

Martín-Rodríguez, P.¹, Castillo, A.G.², Navas-Castillo, J.¹, Moriones, E.¹

¹*Instituto de Hortofruticultura Subtropical y Mediterránea "La Mayora", Universidad de Málaga-Consejo Superior de Investigaciones Científicas (IHSM-UMA-CSIC), Estación Experimental "La Mayora", 29750 Algarrobo-Costa, Málaga. E-mail: moriones@eelm.csic.es*

²*IHSM-UMA-CSIC, Departamento de Biología Celular, Genética y Fisiología, Universidad de Málaga, Campus Teatinos, 29071 Málaga.*

La enfermedad del amarilleo del tomate, presente en España al menos desde 1997, está causada por aislados de dos especies del género *Crinivirus* (familia *Closteroviridae*), el más extendido de los cuales es *Tomato chlorosis virus* (ToCV). ToCV está limitado al floema y se transmite de manera semipersistente por tres especies de mosca blanca: *Bemisia tabaci*, *Trialeurodes abutilonea* y *T. vaporariorum*. Su genoma está constituido por dos moléculas de RNA lineal de polaridad positiva. El RNA 1 codifica para proteínas implicadas en la replicación viral y el RNA 2 codifica para proteínas relacionadas con la protección del genoma, el movimiento viral y la interacción con el vector. La cápsida viral está constituida por dos proteínas, la proteína principal de la cápsida (CP) y la proteína menor de la cápsida (CPm). Ambas proteínas poseen actividad supresora del silenciamiento génico y la CPm se postula que está implicada en la transmisión por el vector. En este trabajo se ha llevado a cabo una búsqueda exhaustiva de proteínas de *B. tabaci* que puedan estar implicadas en el reconocimiento de ToCV. Para ello, se han buscado proteínas de *B. tabaci* que interaccionaran con la proteína CPm de ToCV mediante ensayos de doble híbrido en levadura. Tras la búsqueda se aislaron 10 clones de *B. tabaci* positivos en la interacción con CPm y su secuenciación mostró que se correspondían con 8 clones, ya que dos de ellos se aislaron por duplicado en interacciones independientes. Dichos clones positivos, codificaban dos proteínas de *B. tabaci* con alta identidad aminoacídica con una hexamerina de *Aedes aegypti* (BtHex) y con la proteína sec6 del complejo exocisto de *Acyrtosiphon pisum* (BtSec6). Además, hemos utilizado el sistema del doble híbrido para caracterizar la especificidad de interacción de estas dos proteínas con proteínas implicadas en la transmisión de otros virus transmitidos por mosca blanca. Nuestros resultados muestran una interacción positiva para BtHex y las CPms de ToCV, *Tomato infectious chlorosis virus* (TICV) y *Sweet potato chlorotic stunt virus* (SPCSV), todos ellos crinivirus transmitidos de manera semipersistente; mientras que BtSec6 exclusivamente interaccionó con la CPm de ToCV. La expresión *in vitro* de BtHex y BtSec6 y la obtención de anticuerpos contra estas proteínas permitirán entender mejor el significado biológico de estas interacciones.

PAN-184

GENERACIÓN DE CLONES AGROINFECTIVOS DEL CRINIVIRUS TOMATO CHLOROSIS VIRUS

Orlío, A.F., Fortes, I.M., Navas-Castillo, J.

Instituto de Hortofruticultura Subtropical y Mediterránea "La Mayora" (IHSM-UMA-CSIC), Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Estación Experimental "La Mayora", 29750 Algarrobo-Costa, Málaga. E-mail: jnavas@eelm.csic.es

Tomato chlorosis virus (ToCV) es un crinivirus (género *Crinivirus*, familia *Closteroviridae*) que causa una importante enfermedad emergente en tomate y otros cultivos. ToCV está limitado al floema, no se transmite mecánicamente y, de forma natural, sólo lo hace de manera semipersistente mediante las especies de mosca blanca *Bemisia tabaci*, *Trialeurodes vaporariorum* y *T. abutilonea*. Su genoma está constituido por dos moléculas de RNA lineales de sentido positivo y se encapsida en viriones flexuosos de estructura compleja.

En este trabajo presentamos la construcción de clones infectivos de los cDNAs correspondientes al genoma de ToCV (RNA1 y RNA2) bajo el control del promotor 35S de CaMV en un plásmido binario. La agroinfiltración de hojas de *N. benthamiana* con clones de ambos RNAs dio lugar a una infección sistémica. A partir de plantas de *N. benthamiana* agroinoculadas se logró asimismo la infección sistémica de plantas de tomate mediante injerto, observándose los síntomas típicos causados por este virus consistentes en manchas cloróticas iniciadas en las hojas inferiores que se extienden hacia la parte superior de la planta y evolucionan a amarilleo internervial. Además, la progenie viral generada en tomate fue transmisible a nuevas plantas de tomate mediante *B. tabaci*. Los clones infectivos generados constituyen un sistema genético fácilmente manipulable que permitirá llevar a cabo experimentos de genética inversa para la caracterización funcional de los genes de ToCV en relación a procesos como replicación, movimiento, transmisión y patología viral.

PAN-185

INTERACCIÓN ENTRE EL CRINIVIRUS SWEET POTATO CHLOROTIC STUNT VIRUS Y EL BEGOMOVIRUS SWEET POTATO LEAF CURL LANZAROTE VIRUS

Orlío, A.F., Navas-Castillo, J.

Instituto de Hortofruticultura Subtropical y Mediterránea "La Mayora" (IHSM-UMA-CSIC), Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Estación Experimental "La Mayora", 29750 Algarrobo-Costa, Málaga. E-mail: jnavas@eelm.csic.es

La batata (*Ipomoea batatas*) es un cultivo que se propaga vegetativamente, lo que favorece la existencia de infecciones virales mixtas que en algunos casos causan efectos patológicos sinérgicos. *Sweet potato chlorotic stunt virus* (SPCSV, género *Crinivirus*, familia *Closteroviridae*) y *Sweet potato leaf curl Lanzarote virus* (SPLCLaV, género *Begomovirus*, familia *Geminiviridae*), son dos virus transmitidos por la mosca blanca *Bemisia tabaci* que infectan a batata. Es bien conocida la interacción sinérgica establecida entre el crinivirus SPCSV y otros virus no relacionados, pero no existe ninguna información sobre la posible interacción entre SPCSV y ninguno de los numerosos begomovirus que infectan batata ("sweepovirus").

En este trabajo se ha estudiado la interacción entre SPCSV y SPLCLaV en infección mixta en *Ipomoea setosa*, huésped experimental de ambos virus. Para ello, se llevaron a cabo experimentos de co-inoculación con SPCSV (mediante *B. tabaci*) y SPLCLaV (mediante agroinoculación de un clon infectivo). La co-infección con ambos virus dio lugar a síntomas más graves que los causados por la infección por cada uno de ellos por separado y consistieron fundamentalmente en una reducción significativa de la altura y peso de las plantas doblemente infectadas. Sin embargo, no se observó un aumento en la acumulación viral de ninguno de los virus. Las diferencias de sintomatología observadas entre infecciones mixtas y simples parecen ser el resultado, más que de un fenómeno de sinergismo, del efecto aditivo de los síntomas causados por cada uno de los virus. Será interesante comprobar si el fenómeno observado en este trabajo en *I. setosa* se manifiesta de igual forma en batata, huésped natural de ambos virus, y si las infecciones mixtas pudieran tener un impacto significativo sobre la producción de este cultivo.

**LA MUTACIÓN GENÉTICA COMO FUENTE DE DIVERSIFICACIÓN Y
ADAPTACIÓN DE LOS BEGOMOVIRUS IMPLICADOS EN LA
ENFERMEDAD DEL RIZADO AMARILLO DEL TOMATE A SUS
HUÉSPEDES NATURALES**

Sánchez-Campos, S.^{1,2}, Domínguez-Huerta, G.^{1,2}, Tomás, D.M.¹, Navas-Castillo, J.¹, Grande-Pérez, A.², Moriones, E.¹

¹*Instituto de Hortofruticultura Subtropical y Mediterránea "La Mayora" (IHSM-UMA-CSIC), Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Estación Experimental "La Mayora". 29750 Algarrobo-Costa, Málaga. E-mail: moriones@eelm.csic.es.*

²*IHSM-UMA-CSIC, Área de Genética, Universidad de Málaga, Campus de Teatinos. 29071, Málaga.*

La enfermedad del rizado amarillo del tomate (TYLCD) es uno de los principales factores limitantes del cultivo del tomate en las regiones cálidas y templadas de todo el mundo. Está ocasionada por un complejo de especies virales del género *Begomovirus* (familia *Geminiviridae*), de las cuales hay descritas cuatro en España: tomato yellow leaf curl virus (TYLCV), tomato yellow leaf curl Sardinia virus (TYLCSV), tomato yellow leaf curl Málaga virus (TYLCMaV) y tomato yellow leaf curl Axarquía virus (TYLCAxV), estas dos últimas surgidas por recombinación de los anteriores. Son virus de DNA de cadena sencilla, con un genoma circular monopartito de ~2,7 kb que codifica para dos proteínas en sentido viral (proteínas CP y V2) y cuatro en sentido complementario (proteínas Rep, TrAP, REn y C4), y poseen una región intergénica (IR) no codificante. Estos virus presentan altas tasas de mutación y recombinación. La generación de poblaciones altamente variables permite a los virus evolucionar y adaptarse a condiciones ambientales cambiantes. Por ello, es fundamental conocer los factores que determinan su evolución para el diseño de estrategias de control más duraderas, basadas por ejemplo en el empleo de cultivares con resistencia genética. Dada la naturaleza dinámica de las poblaciones virales, debe estudiarse la posible aparición de mutantes que superen dichas resistencias. En este trabajo hemos estudiado la capacidad de evolución de los begomovirus TYLCV, TYLCSV y TYLCMaV en diversos huéspedes naturales en los que difieren en su aptitud para provocar una infección efectiva. Para ello, se han inoculado tomates susceptibles, tomates portadores de resistencia genética (*Ty1/ty1*), judía y *Solanum nigrum* con clones infectivos de estos virus y se han analizado los espectros de mutantes generados a los 15, 30 y 45 dpi. El análisis mediante secuenciación de las regiones genómicas que codifican las proteínas V2, CP, C4 y Rep así como de la IR (representativo del 50% de la secuencia viral) de los genomas virales presentes en la población progenie muestra para todas las combinaciones virus-planta espectros de mutantes con alta complejidad y diversidad genéticas, características de poblaciones virales con estructura en cuasiespecies. Se discutirán las diferencias observadas en las estructuras poblacionales obtenidas en los huéspedes analizados.

***Pseudomonas syringae* pv. *tomato* INDUCE CAMBIOS EPIGENÉTICOS
EN EL GENOMA DE ARABIDOPSIS**

Hulak, N., Lucía, A., Rodríguez-Negrete, E., Zumaquero, A., Beuzón, C.R.,
Castillo, A.G.

*Instituto de Hortofruticultura Subtropical y Mediterránea, Universidad de
Málaga, Consejo Superior de Investigaciones Científicas (IHSM-UMA-CSIC),
Departamento de Genética, Campus de Teatinos, Málaga E-29071.
ara@uma.es*

La respuesta inmune de la planta frente a la infección por patógenos está sujeta a estrictos mecanismos de regulación que aseguran la rápida activación de respuestas específicas, así como una respuesta basal robusta que conlleve el mínimo coste de mantenimiento. Recientemente se ha demostrado que en ambos procesos están sujetos a regulación epigenética. *Pseudomonas syringae* modifica el estado de metilación del DNA de *Arabidopsis* durante la infección (Pavet et al, 2006). La hipometilación producida se detectaba en loci heterocromáticos silenciados, como regiones repetidas pericentroméricas e inserciones del retrotransposon *Athila*. Los nucleos de tejido infectado mostraban alteraciones de la cromatina, incluyendo cromocentros difusos, y estos cambios se veían incrementados por infección con estirpes de *P. syringae* pv. *tomato* virulentas, pero no en su derivado mutante en el activador transcripcional del sistema de secreción tipo III, HrpL, sugiriendo la posible impliación de dicho sistema en el proceso de hipometilación.

En este trabajo hemos caracterizado la interacción entre *P. syringae* y el epigenoma de *Arabidopsis*, detectando *loci*, habitualmente silenciados a nivel transcripcional, cuya transcripción se ve activada tras la infección por *P. syringae*. La reactivación de la expresión de estos *loci* tras la infección con distintas estirpes de DC3000 (mutantes o que sobre-expresan efectores) en diversos mutantes de *Arabidopsis*, nos permitirá identificar los elementos implicados en la modificación del epigenoma de la planta tras la infección.

**LA PROTEÍNA REGULADORA Ust1 CONTROLA CAMBIOS
MORFOLÓGICOS ASOCIADOS AL DESARROLLO EN PLANTA EN
*Ustilago maydis***

Baeza-Montañez, L.¹, Gold, S.E.², García-Pedrajas, M.D.¹

¹*Instituto de Hortofruticultura Subtropical y Mediterránea "La Mayora" (IHSM-UMA-CSIC), Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Estación Experimental "La Mayora", 29750 Algarrobo-Costa, Málaga. E-mail: mariola@eelm.csic.es*

²*Department of Plant Pathology, University of Georgia, Athens 30602-7274, Georgia, EEUU.*

Ustilago maydis, agente causal del carbón del maíz, presenta formas haploides que crecen como levaduras y se prestan muy fácilmente al cultivo *in vitro* y la manipulación genética. Sin embargo, existen fases de su ciclo de vida que son totalmente dependientes de la planta. Esto hace que sea un modelo de especial interés para analizar patogénesis a nivel molecular en parásitos obligados de mayor interés agronómico, pero que carecen de un estadio de crecimiento manipulable genéticamente. Previamente hemos identificado un factor de transcripción en *U. maydis*, Ust1 de la familia APSES de reguladores de desarrollo en hongos, como un regulador crítico de morfogénesis y virulencia en esta especie. Un control preciso de los niveles de actividad de Ust1 parece ser crítico para generar cambios morfológicos que solo se producen en la planta, y que son necesarios para completar el ciclo de vida infeccioso. Por ello, actualmente estamos caracterizando qué mecanismos regulan la actividad de este factor de transcripción, y explotando su potencial para analizar fases del ciclo de vida de *U. maydis* que son de parasitismo obligado. En primer lugar hemos producido cepas del hongo que expresan *ust1* de forma condicional. Esto nos ha permitido realizar en cultivos *in vitro* un análisis temporal detallado de cambios morfológicos que en la naturaleza están asociados al proceso infeccioso. Por otra parte, estamos analizando como se regula la actividad de Ust1 a nivel transcripcional y post-transduccional. Para ello hemos construido cepas que expresan *ust1* de forma constitutiva y mostrado que la represión de la expresión de este gen no es necesaria para invadir la planta y completar el desarrollo parásito. Por otra parte, hemos generado cepas que expresan variantes de esta proteína modificadas en sitios potenciales de fosforilación. El análisis de estas cepas muestra que, a diferencia de lo que ocurre con otros factores de transcripción de tipo APSES, Ust1 no parece ser una diana de la ruta de señalización del AMPc que regula morfogénesis y virulencia en hongos. Además, se ha marcado la secuencia proteica de Ust1 con una proteína fluorescente, lo que permitirá visualizar en qué fases del ciclo de vida este factor de transcripción se acumula en el núcleo regulando la actividad de otros genes.

Este trabajo ha sido financiado con fondos del Proyecto: AGL2009-13445.

PAN-189

UN RECOMBINANTE ENTRE DOS VIRUS DE ESPECIES DISTINTAS SUPERA UNA RESISTENCIA MEDIADA POR EIF4E MEDIANTE LA GANANCIA DE UNA FUNCIÓN EN TRADUCCIÓN DEL RNA VIRAL

Miras, M., Aranda, M.A. Truniger, V.

CEBAS-CSIC, Apdo Correos 164; 30100 Murcia; mmiras@cebas.csic.es

El virus de las manchas necróticas del melón (*Melon necrotic spot virus*) (MNSV) es un virus de RNA de cadena sencilla de sentido positivo que infecta cucurbitáceas. La resistencia a MNSV en melón está mediada por el factor de iniciación a la traducción 4E (eIF4E) (Nieto et al., (2006) *The Plant Journal* 48:452-462). Recientemente, ha sido identificado un segundo aislado capaz de superar esta resistencia. El determinante de virulencia del primer aislado había sido localizado en una parte de su extremo 3' no traducido (3'-UTR), la cual le confería la capacidad de traducción independiente de cap no sólo en melón susceptible, sino también en resistente (Truniger et al., (2008) *The Plant Journal* 56:716-727). La secuencia nucleotídica del nuevo aislado, denominado MNSV-N, muestra una alta similitud con el resto de aislados de MNSV que no superan la resistencia, incluso en su 3'-UTR. Sin embargo, el inicio de su 3'-UTR contiene una inserción de 55 nucleótidos (nt) que es casi idéntica al comienzo del 3'-UTR del virus del amarilleo de las cucurbitáceas transmitido por pulgones (*Cucurbit aphid-borne yellows virus*) (CABYV), indicando que MNSV-N es un recombinante entre MNSV y CABYV. Mediante la construcción de virus quiméricos hemos localizado el determinante de virulencia de MNSV-N en su 3'-UTR. Estudios de traducción *in vivo* en protoplastos de melón han demostrado que el 3'-UTR de MNSV-N controla la traducción independiente de cap en melón susceptible y resistente del transcrito de un gen delator, siendo la inserción de 55 nt dentro del 3'-UTR esencial para la traducción en melón resistente, pero no en susceptible; estos resultados sugieren que esta capacidad sea responsable de la superación de la resistencia. La estructura secundaria del 3'-UTR de este aislado está siendo estudiada actualmente.

Así mismo, hemos comprobado que la traducción de MNSV-N probablemente sea independiente de eIF4E, al ser este aislado capaz de infectar plantas cuya expresión de eIF4E ha sido reducida a través de silenciamiento génico posttranscripcional.

SUPRESIÓN DE RESISTENCIA MEDIADA POR GENES R POR EL EFECTOR DE TIPO III HOPZ1A DE *Pseudomonas syringae*

Lucía, A., Rufián, J.S., Macho, A., Beuzón, C.R., Ruiz-Albert, J.

Instituto de Hortofruticultura Subtropical y Mediterránea, Universidad de Málaga, Consejo Superior de Investigaciones Científicas (IHSM-UMA-CSIC), Departamento Biología Celular, Genética y Fisiología, Campus de Teatinos, Málaga E-29071, Spain. ainhoalq@uma.es

HopZ1a es un efector de tipo III de la bacteria fitopatógena *Pseudomonas syringae*, que pertenece a la familia HopZ de cistein proteasas, y que dispara resistencia independiente de SA en *Arabidopsis thaliana*. En el laboratorio hemos demostrado que HopZ1a es capaz además de suprimir la resistencia disparada por los efectores AvrRpt2 (dependiente de *RPS2*), AvrRps4 (dependiente de *RPS4*), o AvrRpm1 (dependiente de *RPM1*), tanto local (ETI) como sistémica (SAR) (Macho et al., 2010). Las rutas de señalización implicadas en la resistencia frente a estos tres efectores son diferentes, por lo que la supresión de resistencia que la actividad de HopZ1a determina debe de llevarse a cabo a través de un mecanismo general y común a todas estas respuestas.

Recientemente, Lee y colaboradores han demostrado que HopZ1a presenta actividad acetiltransferasa *in vitro*, y que es capaz de autoacetilase en su residuo K289. En este trabajo queremos determinar el papel de esta actividad en la función de HopZ1a. Para ello, analizamos el efecto que una mutación en este residuo (K289R) tiene, tanto en su función de virulencia (supresión de ETI y SAR), como en el disparo de resistencia frente a este efector.

Hemos demostrado que el mutante HopZ1aK289R mantiene la capacidad de suprimir la acumulación local de PR1, y de potenciar el crecimiento bacteriano en tejido sistémico tras inoculación de *P. syringae* pv. *tomato* DC3000 al mismo nivel que lo hace el alelo silvestre del efector, lo cual indica que la autoacetilación de HopZ1a no es necesaria para la supresión de ETI o SAR. Sin embargo, dicha autoacetilación sí que está implicada en el disparo de resistencia por HopZ1a, ya que reduce la intensidad de la HR y la restricción del crecimiento asociados a dicha resistencia. No obstante, en el mutante dicha resistencia no es eliminada por completo ya que la expresión de HopZ1aK289R en DC3000 produce una ligera reducción del crecimiento bacteriano en tejido local, asociada a una débil HR, y lo más importante, todavía es capaz de proteger a *Arabidopsis* frente a la infección con Pto DC3000. Esta mutación es la primera descrita capaz de afectar de manera diferencial a la actividad de virulencia de HopZ1a de la de resistencia, y constituye por tanto un importante avance en su caracterización funcional.

PAN-191

INSIGHTS INTO TYPE III SECRETION SYSTEMS REGULATORY NETWORKS

Charova, S.^{1,2}, Gazi, A.³, Beuzón, C.R.², Panopoulos, N.¹, Kokkinidis, M.¹

¹*IMBB-FORTH, Crete, Greece*

²*Department of Cellular Biology, Genetics & Physiology, University of Malaga.*

Type III secretion systems (T3SS) are needle-like structures incorporated in the double bacterial membrane of many Gram-negative bacteria, with a protruding channel called 'the Hrp pilus' in phytopathogenic bacteria. Through this channel a number of substrates are transported to the extracellular milieu and/or the eukaryotic cytoplasm; the action of these substrates promotes disease in susceptible hosts or the hypersensitive response and resistance in non-host plants. The regulatory network that dictates the temporal hierarchy of export for the distinct substrates is vastly unknown even for the best studied T3SS families. In phytopathogenic bacterial T3SS, the protein regulatory interactions that lie upstream of T3SS transcriptional activation, the nature of the switch that switches T3SS from exporting early to middle and middle to late substrates as well as the existence of a cytoplasmic "plug" that inhibits the premature exit of substrates, remain elusive. Our group has identified a number of interactions for the regulatory protein HrpG with a range of soluble and membrane T3SS components, both in *Pseudomonas syringae* and *Erwinia amylovora*. These interactions in combination with the phenotypes exhibited by selected mutants provide for a solid indication that there may be a HrpG-centered protein network playing a critical role in the aforementioned regulatory processes.

MODIFICACIONES HISTOLÓGICAS PRODUCIDAS POR *Phytophthora cinnamomi* EN RAÍCES DE PLÁNTULAS DE *Quercus ilex*

Redondo, M.A.¹, Pérez-Sierra, A.¹, Abad-Campos, P.¹, García-Jiménez, J.¹, Solla, A.², Reig, J.³, García-Breijo, F.³

¹*Instituto Agroforestal Mediterráneo, Universitat Politècnica de València, Camino de Vera s/n, 46022 Valencia. E-mail: aperesi@eaf.upv.es*

²*Ingeniería Forestal y del Medio Natural. Universidad de Extremadura. Avenida Virgen del Puerto 2, 10600 Plasencia.*

³*Jardí Botànic de la Universitat de València, C/ Quart 80, 46008 Valencia.*

Desde la década de los 80, el decaimiento y la muerte de encinas (*Quercus ilex*) y alcornoques (*Q. suber*) en ecosistemas del suroeste de la Península ha sido atribuido al daño causado por *Phytophthora cinnamomi*. El objetivo de este estudio fue analizar las modificaciones histológicas producidas en raíces de plántulas de encina infectadas con *P. cinnamomi*, realizando un seguimiento del proceso de colonización, tratando de establecer el modo en que el patógeno se extiende en el interior del material vegetal, así como el tiempo que transcurre hasta que provoca daños severos en los tejidos. Para ello, se seleccionaron bellotas de *Q. ilex* subsp. *ballota* procedentes de Extremadura y posteriormente se germinaron en vermiculita estéril. Cinco semanas después de la germinación, las plántulas fueron inoculadas con *P. cinnamomi*. Se tomaron muestras de las raíces cada 12 horas durante un período de 7 días. Dichas muestras se fijaron sumergiéndolas en FAA y Karnovsky, para ser analizadas posteriormente con distintas técnicas de microscopía. Mediante el LTSEM ("Low temperature scanning electron microscopy"), se observaron zoosporas enquistadas 24 horas después de la inoculación. Secciones de raíces de 10-15 µm, teñidas con calcoflúor, se observaron en el microscopio de epifluorescencia, localizándose hifas de *P. cinnamomi* tanto en la superficie, como en el interior del tejido cortical. Cortes de menor grosor (8-10 µm) teñidos con safranina verde rápido, se observaron en microscopía de campo claro, donde las hifas de *P. cinnamomi* se observaron en la superficie del tejido cortical. La misma técnica de microscopía se utilizó con secciones de 2 µm teñidas con azul de toluidina, donde se observó la progresión de la colonización de *P. cinnamomi*, apareciendo alrededor de los haces vasculares a partir del cuarto día de inoculación, así como la descomposición de algunas estructuras radicales como la endodermis. Finalmente, se realizaron cortes de 80 nm para un estudio más exhaustivo de las muestras en el microscopio electrónico de transmisión, observándose tanto hifas en los espacios intercelulares, como intracelulares, con la consiguiente formación de los haustorios.

**CAPACIDAD DE INFECCIÓN EN LA RELACIÓN NARANJA-PATÓGENO.
INTERACCIÓN COMPATIBLE (*Penicillium digitatum*) Y NO-
COMPATIBLE (*P. expansum*)**

Vilanova, L.¹, Teixidó, N.¹, Viñas, I.², Usall, J.¹, Buron-Moles, G.², Solsona, C.¹, Torres, R.¹

¹IRTA, Postcollita- XaRTA, Rovira Roure, 191, 25198, Lleida.

²Universitat de Lleida, Postcollita-XaRTA, Rovira Roure, 191, 25198, Lleida.
rosario.torres@irta.cat

Penicillium digitatum y *Penicillium expansum* son los dos patógenos que más pérdidas ocasionan en la postcosecha de frutos cítricos y de pepita respectivamente. Mientras que *P. digitatum* es un patógeno específico de frutos cítricos (interacción compatible), *P. expansum* tiene un amplio rango de hospedadores, aunque no está descrito como patógeno de frutos cítricos (interacción no-compatible).

Este trabajo estudió la capacidad de infección de *P. digitatum* y *P. expansum* a diferentes concentraciones de inóculo en naranjas de las variedades 'Navelina' y 'Valencia' recolectadas a diferentes estados de madurez y posteriormente almacenadas en frío (4 °C) y a 20 °C.

En la interacción compatible se observaron diferencias significativas en la dinámica de podredumbre de las naranjas de la primera cosecha (inmadura) respecto a las demás, a ambas temperaturas de almacenaje (20 y 4 °C), exceptuando las inoculadas a la concentración de 10^7 conidias mL⁻¹ en la que no hubo diferencias entre cosechas. Por otro lado, la interacción no-compatible mostró que *P. expansum* era capaz de infectar ambas variedades de naranjas a partir del estado de madurez comercial a la concentración de 10^7 conidias mL⁻¹. En general, la incidencia y la severidad de las lesiones causadas por *P. expansum* fueron mayores a 4 que a 20 °C. También se realizaron estudios histoquímicos con el fin de detectar sustancias involucradas en la defensa de las naranjas frente a ambos patógenos. En naranjas inmaduras, a periodos de respuesta cortos (48 h) se observó una respuesta positiva para las tinciones de lignina ante ambos patógenos. La interacción incompatible mostró que la lignificación fue aparentemente más importante en frutos inmaduros y a periodos de respuesta largos (7 d). En todos los casos las muestras control dieron una respuesta negativa. Estos resultados demuestran que el estado de madurez de las naranjas puede afectar a la capacidad de infección tanto de *P. digitatum* como de *P. expansum* y que la formación de lignina es un proceso clave en los mecanismos de defensa. Además, este es el primer trabajo que demuestra que *P. expansum* es capaz de infectar naranjas bajo condiciones favorables.

Esto supone un nuevo paso en el conocimiento de los mecanismos de defensa del hospedador para poder desarrollar estrategias de control más racionales con el medio ambiente.

Este trabajo ha sido financiado por el proyecto AGL2008-04828-C03-01/AGR y por el INIA (Beca pre-doctoral L. Vilanova).

PAN-194

PRODUCCIÓN DE H₂O₂ COMO RESPUESTA A LA INFECCIÓN POR *Penicillium expansum* (COMPATIBLE) Y *P. digitatum* (NO-COMPATIBLE) EN MANZANAS A DIFERENTES ESTADOS DE MADUREZ

Buron-Moles, G.¹, Torres, R.², Teixidó, N.², Usall, J.², Vilanova, L.², Sánchez, C.², Viñas, I.¹

¹Universitat de Lleida. Postcollita-XaRTA, Av. Rovira Roure, 191, 25198 Lleida.

²IRTA, Postcollita-XaRTA, Av. Rovira Roure, 191, 25198 Lleida. E-mail: rosario.torres@irta.cat

Las células vegetales producen distintas especies reactivas de oxígeno (ERO o ROS reactive oxygen species). Estas ROS, como por ejemplo el H₂O₂, se generan de forma localizada como respuesta a la infección por patógenos, al daño mecánico o herida. Durante las interacciones planta-patógeno, las ROS desempeñan un papel crucial en la defensa del hospedador frente al ataque del patógeno. A pesar de la importancia del H₂O₂ en la defensa de las plantas, existen pocos estudios de su papel en las interacciones fruta-patógeno. Por otro lado, el estado de madurez del fruto está asociado con el aumento de la susceptibilidad por daños mecánicos, lo que favorece la infección por patógenos. El objetivo de este trabajo era determinar las diferencias que existen en la acumulación de H₂O₂ en manzanas cv. Golden a tres estados de madurez (inmadura, comercial y sobremadura) infectadas por el patógeno compatible *Penicillium expansum* y el no-compatible *P. digitatum*. El H₂O₂ se ha cuantificado en manzanas “*in vivo*” mediante el kit comercial Peroxidetect (Sigma) y se ha visualizado por la aparición de un precipitado marrón al reaccionar con el 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB). Además, se ha estudiado “*in vitro*” el efecto de diferentes concentraciones de H₂O₂ sobre la germinación de los patógenos. *In vivo*, la interacción no-compatible (*P. digitatum*-manzana) ha presentado una respuesta rápida al ataque del patógeno, similar a la de la herida. Por el contrario, la interacción compatible (*P. expansum*-manzana) ha presentado niveles de H₂O₂ inferiores a los encontrados en la interacción no-compatible y herida. *In vitro*, se determinó que concentraciones elevadas de H₂O₂ (200 mM) afectan drásticamente la germinación de *P. expansum*, pero no la de *P. digitatum*. Los resultados mostraron una disminución en la liberación de H₂O₂ como respuesta a herida conforme aumenta la madurez del fruto. Como consecuencia, se incrementó la susceptibilidad del fruto contra el patógeno compatible pero no contra el no-compatible. Por tanto, el H₂O₂ como respuesta a herida es necesario para inducir resistencia en manzana contra el patógeno no-compatible.

Este trabajo ha sido financiado por el proyecto AGL2008-04828-C03 y por la beca pre-doctoral BES-2009-027752 (Buron-Moles, G).

**IDENTIFICATION OF HOST GENES INVOLVED IN GEMINIVIRUS
INFECTION USING A REVERSE GENETICS APPROACH: NEW HINTS
ON THE IMPORTANCE OF HORMONAL CROSSTALK**

Rosas-Díaz, T., Lozano-Durán, R.¹., Luna, A.P., Bejarano, E.R.

*Instituto de Hortofruticultura Subtropical y Mediterránea "La Mayora.
Universidad de Málaga-Consejo Superior de Investigaciones Científicas
(IHSM-UMA-CSIC).*

¹*Present address: The Sainsbury Laboratory, Norwich Research Park,
Norwich NR4 7UH, United Kingdom*

Geminiviruses, like all viruses, rely on the host cell machinery to establish a successful infection, but the identity and function of these required host proteins remain largely unknown. *Tomato yellow leaf curl Sardinia virus* (TYLCSV), a monopartite geminivirus, is one of the causal agents of the devastating Tomato yellow leaf curl disease (TYLCD). The transgenic 2IRGFP *Nicotiana benthamiana* plants, which overexpress GFP in infected cells, used in combination with Virus Induced Gene Silencing (VIGS), entail an important potential as a tool in reverse genetics studies to identify host factors involved in TYLCSV infection. Using these transgenic plants, we have made an accurate description of the evolution of TYLCSV replication in the host in both space and time. Moreover, we have determined that TYLCSV and *Tobacco rattle virus* (TRV) do not dramatically influence each other when co-infected in *N. benthamiana*, what makes the use of TRV-induced gene silencing in combination with TYLCSV for reverse genetic studies feasible. Finally, we have tested the effect of silencing candidate host genes on TYLCSV infection, identifying eighteen genes potentially involved in this process, fifteen of which had never been implicated in geminiviral infections before. Seven of the analyzed genes have a potential anti-viral effect, whereas the expression of the other eleven is required for a full infection. Interestingly, almost half of the genes altering TYLCSV infection play a role in posttranslational modifications. Therefore, our results provide new insights into the molecular mechanisms underlying geminivirus infections, and at the same time reveal the 2IRGFP/VIGS system as a powerful tool for functional reverse genetics studies. Some of the results obtained in this study have led us to study in more depth the negative effect of jasmonates on the geminiviral infection, unveiling a crucial role of the jasmonate-salicylic acid crosstalk for the outcome of the geminivirus-plant interaction.

**ANÁLISIS DE LAS RUTAS DE SEÑALIZACIÓN MEDIADAS POR
FITOHORMONAS FRENTE AL VIRUS DEL RIZADO AMARILLO DEL
TOMATE Y A SU INSECTO VECTOR**

Sánchez-Guzmán, M.J.¹, Pozo, M.J.², Moriones, E.¹, Díaz-Pendón, J.A.¹

¹*Instituto de Hortofruticultura Subtropical y Mediterránea "La Mayora" (IHSM-UMA-CSIC), Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Estación Experimental "La Mayora". 29750 Algarrobo-Costa, Málaga. E-mail: diazpendon@eelm.csic.es*

²*Departamento de Microbiología de Suelos y Sistemas Simbióticos, Estación Experimental del Zaidín (CSIC), Granada.*

La enfermedad del rizado amarillo del tomate (TYLCD) ocasiona daños cuantiosos en los cultivos de tomate de la mayor parte de los países productores en todo el mundo. Esta enfermedad emergente está causada por un complejo de virus de DNA de cadena sencilla que incluye varias especies diferentes pertenecientes al género *Begomovirus* (familia *Geminiviridae*), que en condiciones naturales, son transmitidos por la mosca blanca *Bemisia tabaci* de manera persistente y circulativa. En este marco de interacciones multitróficas planta-virus-insecto vector, se conoce que las fitohormonas desempeñan un papel esencial en la regulación de las rutas de señalización implicadas en las respuestas de defensa de la planta, en particular, el ácido jasmónico, el ácido salicílico, el ácido abscísico y el etileno. Dado que un conocimiento profundo de las bases que regulan estas interacciones podría ayudar a potenciar el control de los virus y al diseño de nuevas estrategias de manejo más eficientes y duraderas, en este trabajo hemos estudiado la respuesta desencadenada en plantas de tomate por la interacción con el virus del rizado amarillo del tomate (TYLCV) y con su vector *B. tabaci*. Para ello se ha llevado a cabo un seguimiento, a lo largo del tiempo, de la regulación a nivel transcripcional de la biosíntesis de estas hormonas y de las respuestas de defensa que éstas regulan. Se discutirá la contribución de las distintas rutas hormonales a la resistencia basal frente a TYLCV como a *B. tabaci*, así como las posibles interacciones mutualistas entre el virus y el vector.

**RESISTENCIA DE ACEBUCHE A LA ANTRACNOSIS DEL OLIVO
CAUSADA POR *Colletotrichum* spp. Y SU POSIBLE ORIGEN**

Xaviér¹, C.J. Moral, J.², Cherífi, F¹., Díez, C.M¹, Trapero, A¹.

¹Dpto. Agronomía, ETSIAM, Universidad de Córdoba. Campus de Rabanales, Edif. Celestino Mutis, 14071 Córdoba.

²Dpto. Mejora Vegetal, Instituto de Agricultura Sostenible (IAS)-CSIC, 14080 Córdoba. E-mail: trapero@uco.es.

La Antracnosis del olivo, causada por *Colletotrichum* spp. es la enfermedad más importante de la aceituna. Durante prospecciones realizadas para evaluar el estado fitosanitario de las masas de acebuche (olivo silvestre) de Andalucía, se ha observado una escasa presencia de Antracnosis incluso en zonas húmedas propicias para la enfermedad. Los objetivos del presente trabajo son evaluar la resistencia del acebuche a *Colletotrichum* spp. y sus posibles origen.

En un primer ensayo, y para confirmar la resistencia del acebuche a *C. acutatum* (especie del patógeno predominante en Andalucía), se realizaron inoculaciones de acebuchinas (frutos) de 45 genotipos distintos de acebuche junto con aceitunas de los cvs. Frantoio [altamente resistente (AR)], Picual [resistente (R)] y Hojiblanca [susceptible (S)]. Para estudiar los mecanismos de resistencia de la aceituna, se realizó el seguimiento de la infección mediante aislamiento secuencial de distintos tejidos (epidermis, mesocarpo, endocarpo y semilla) de aceitunas inoculadas de los cvs. Frantoio y Hojiblanca. Posteriormente, se estudió la capacidad de germinación y desarrollo de plántulas viables de olivo a partir de aceitunas infectadas natural y artificialmente. Por último, se realizaron inoculaciones de raíces de plántulas de olivo y acebuche para determinar el efecto del patógeno en su viabilidad.

Todos los genotipos de acebuche inoculados mostraron un nivel de resistencia a *C. acutatum* similar al cv. Frantoio (AR) y significativamente ($P < 0.05$) mayor al de los otros dos cultivares. En los estudios de seguimiento de la infección, el patógeno fue capaz de infectar todos los tejidos de las aceituna de ambos cultivares. En general, el patógeno colonizó más rápido los tejidos del cv. Hojiblanca (S) que los del cv. Frantoio (AR). En las aceitunas naturalmente afectadas, el patógeno llegó a infectar el endocarpo y la semilla detectándose un 10% de infecciones asintomáticas. El 11% de las semillas de las aceitunas afectadas mostraron acérvulos y masas de conidios y no germinaron y el 3,3% de las germinadas mostraron necrosis radicular que evolucionó a "Damping-off". Por último, el patógeno causó necrosis y disminución del peso del sistema radicular de plántulas de olivo y acebuche inoculadas, siendo significativamente ($P < 0.05$) más susceptibles las plántulas de olivo que las de acebuche.

En general, el efecto que tiene la infección de *Colletotrichum* spp. sobre la viabilidad de las semillas del acebuchina ha podido influir en una selección natural hacia resistencia de las masas de acebuche de Andalucía.

PAN-198

PROSPECCIÓN DE GENES IMPLICADOS EN LA PRODUCCIÓN DE FASEOLOTOXINA EN *Pseudomonas syringae* pv. phaseolicola

Bardaji, L., Martínez del Pino, L., Murillo, J.

Laboratorio de Patología Vegetal, ETS Ingenieros Agrónomos, Universidad Pública de Navarra, 31006 Pamplona

La bacteria *Pseudomonas syringae* pv. phaseolicola (Pph) produce la toxina antimetabolito faseolotoxina, inhibidora de la rutas metabólicas de arginina y poliaminas en un amplio espectro de organismos. La región de biosíntesis de faseolotoxina se compone de 22 genes agrupados en 23 kb (cluster Pht), incluidos en una putativa isla genómica (38 kb, Pht-PAI). En nuestro laboratorio estudiamos los mecanismos de evolución de genes de virulencia en Pph, y en particular del cluster Pht, así como la integración de estos determinantes en los circuitos biosintéticos y reguladores de la célula bacteriana. Con este fin, la cepa modelo Pph 1448A, productora de faseolotoxina, se sometió a mutagénesis al azar utilizando el transposón IS- Ω -Km/hah, que inactiva genes por inserción y puede producir la activación de genes aledaños a la inserción. En 120 mutagénesis independientes hemos generado 10.500 mutantes, a los que se les ha evaluado la producción de faseolotoxina en el medio mínimo PMS, a las 24 y 48 h de incubación a 18 °C. Se confirmó el fenotipo de los clones Tox-, o que mostraron una tasa reducida de producción, y se localizó punto de inserción del transposón. La mutagénesis dio lugar a un 0.8 % de mutantes auxótrofos, afectados en la biosíntesis de vitaminas, aminoácidos y nucleótidos. Igualmente, un 1.4 % de los clones analizados no produjo faseolotoxina en PMS. Estos mutantes se dividen entre aquellos que: 1) no producen faseolotoxina en ninguna de las condiciones ensayadas, y 2) no producen toxina en un medio mínimo con baja concentración de glucosa, pero sí con concentraciones altas. Dentro del grupo 1, hemos obtenido mutantes en 10 de los 22 genes del cluster Pht y en los reguladores globales *gacA* y *gacS*, previamente implicados en la biosíntesis de esta toxina. Además hemos obtenido, entre otros, mutantes en genes que codifican para un transportador de hierro, acetiltransferasas y una proteína hipotética (PSPPH_3885) cuya función es desconocida. Dentro del grupo 2 figuran mutantes defectivos en genes que codifican una putativa lipoproteína y una putativa gluconato permeasa, así como dos mutantes con una inserción en PSPPH_0857, que codifica para un regulador σ^{54} global, implicado en la regulación del balance carbono/nitrógeno. Estamos confirmando el fenotipo de estos mutantes mediante mutagénesis dirigida y ensayos de complementación.

**LA VIRULENCIA DE *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000 ES
DEPENDIENTE DE LA EXPRESIÓN DE LOS GENES *iaaL* y *matE***

Castillo Lizardo M.G.¹, Aragón I.M.¹, Carvajal V.², Matas I.M.¹, Gallegos M.T.², Barón M.², Ramos C.¹

¹Área de Genética, Universidad de Málaga, Instituto de Hortofruticultura Subtropical y Mediterránea "La Mayora", Universidad de Málaga-CSIC (IHSM-UMA-CSIC), Campus de Teatinos, 29071-Málaga. E-mail: crr@uma.es

²Estación Experimental del Zaidín, CSIC, Profesor Albareda 1, 18008-Granada.

La producción de ácido indol-3-acético (IAA) por bacterias fitopatógenas juega un papel importante en su patogenicidad y virulencia. El IAA puede ser conjugado con lisina, actividad dependiente del gen *iaaL* en aislados de adelfa de *Pseudomonas savastanoi*. En *P. syringae* pv. tomato (Pto) DC3000, el gen *iaaL* está precedido por un ORF, gen *matE*, que codifica un posible transportador de la familia MATE ("multidrug and toxic compound extrusion"). En el extremo 3' de *matE* se localiza una secuencia *Hrp-Box*, característica de promotores activables por el factor sigma HrpL, factor clave en la regulación de la expresión de factores de virulencia. La expresión del gen *iaaL* se analizó mediante hibridación *Northern*, detectándose la existencia de dos transcritos, uno generado a partir de la *Hrp-Box* de este gen y otro de mayor tamaño que corresponde al promotor del gen *matE*, resultados que se confirmaron mediante análisis de extensión de cebador y 5'-RACE. Además, análisis de la expresión de *iaaL* y *matE* mediante RT-PCR también mostraron la probable co-transcripción de ambos genes. La actividad de los promotores determinados y su dependencia del gen *hrpL* se demostró utilizando fusiones transcripcionales de los mismos a *lacZ*. Para obtener información sobre la contribución de estos genes a la virulencia de DC3000, se realizaron infecciones en plantas de tomate con la cepa silvestre y los mutantes *iaaL* y *matE*. La disminución de la virulencia de ambos mutantes en comparación a la cepa silvestre resultó evidente a 9 dpi (días post-inoculación), sin embargo, la utilización de técnicas de captura de imágenes foliares de la fluorescencia roja emitida por la clorofila y azul-verde procedente de metabolitos secundarios de interés en defensa frente a estrés vegetal, permitió detectar diferencias entre las distintas cepas antes de la aparición de síntomas visibles. Todas estas evidencias experimentales permiten vislumbrar un papel relevante de los genes *iaaL* y *matE* en la virulencia de Pto DC3000.

Financiación: AGL2011-30343-C02-01 y AGL2008-00214 (MINECO/MICINN), y P08-CVI-03475 (Junta de Andalucía), cofinanciados por FEDER.

FUNCIÓN DE PROTEÍNAS QUIMIORRECEPTORAS (MCP) EN DOS BACTERIAS FITOPATÓGENAS MODELO

Río-Álvarez, I., Navas, M., Rodríguez-Herva, J.J., Rodríguez-Palenzuela, P., López-Solanilla, E.

Centro de Biotecnología y Genómica de Plantas. Departamento de Biotecnología. ETSI Agrónomos. Universidad Politécnica de Madrid – I.N.I.A. Parque Científico y Tecnológico de la U.P.M. Campus de Montegancedo 28223 Pozuelo de Alarcón. Madrid. E-mail: isabel.rio@upm.es

La capacidad que tienen ciertas bacterias de moverse y orientarse hacia gradientes de concentración de sustancias químicas como azúcares o aminoácidos desencadenando distintos tipos de movimientos, se denomina quimiotaxis. *Dickeya dadantii* 3937 (Dd3937) y *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000 (PsPtoDC3000) son dos bacterias fitopatógenas causantes de enfermedades relevantes en cultivos de interés agronómico.

Los cambios en la dirección de rotación del flagelo están regulados por unos receptores de membrana o proteínas aceptoras de metilo (MCP) que perciben un estímulo extracelular. Las MCPs son proteínas transmembranales con varios dominios entre los cuales destaca un dominio MCP altamente conservado y un dominio de unión a ligando, generalmente extracelular, que estaría involucrado en la interacción con las sustancias químicas. Con el objetivo general de estudiar el conjunto de MCPs de Dd3937 y *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000 (PsPtoDC3000) y de forma particular, aquellas MCPs involucradas en la percepción de sustancias específicas de plantas, hemos llevado a cabo un análisis bioinformático mediante programas escritos en perl y basados en la herramienta HMMER. Este estudio ha permitido identificar las MCPs de Dd3937 y PsPtoDC3000 y conocer los distintos dominios que poseen.

Se han obtenido mutantes en ambas bacterias que están afectados en MCPs que representan distintos grupos funcionales según el análisis *in silico*. El estudio detallado de estos mutantes en relación a su quimiotaxis frente a distintos compuestos así como la expresión de las distintas MCPs seleccionadas en un sistema heterólogo nos está permitiendo identificar quimiorreceptores bacterianos que juegan un papel clave durante el proceso de virulencia.

Este trabajo ha sido financiado por el proyecto AGL2009-12757 del Ministerio de Ciencia e Innovación.

**D. *dadantii* 3937 REPROGRAMA SU VIRULENCIA EN RESPUESTA A
PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS DE PLANTAS**

Río-Álvarez, I., Rodríguez-Iglesias, A., Rodríguez-Herva, J.J., Rodríguez-Palenzuela, P. y López-Solanilla, E.

Centro de Biotecnología y Genómica de Plantas. Departamento de Biotecnología. ETSI Agrónomos. Universidad Politécnica de Madrid – I.N.I.A. Parque Científico y Tecnológico de la U.P.M. Campus de Montegancedo 28223 Pozuelo de Alarcón. Madrid. E-mail: isabel.rio@upm.es

Los péptidos antimicrobianos constituyen un factor esencial en la defensa de las plantas contra patógenos, y la resistencia bacteriana frente a estos péptidos es un factor de virulencia en *D. dadantii* 3937, el agente causal de la enfermedad de la pudrición blanda de los vegetales. Para comprender la respuesta bacteriana a los péptidos antimicrobianos, se realizó un análisis transcriptómico tras el tratamiento con concentraciones subletales de tioninas, un péptido de plantas. En total, 36 genes resultaron ser sobreexpresados, y se clasificaron de acuerdo a su función en i) reguladores transcripcionales, ii) transporte y iii) modificación de la membrana bacteriana. Un gen que codifica una uricasa fue el único gen reprimido por este tratamiento. La mayoría de estos genes están bajo el control del sistema de regulación de dos componentes, PhoP / PhoQ. Cinco genes que representan las diferentes funciones inducidas se seleccionaron para su posterior análisis. Estos resultados han permitido obtener una visión más global de los primeros estadios de la infección y se puede concluir que, cuando *D. dadantii* 3937 establece un contacto directo con su hospedador, desencadena una respuesta global que incluye la inducción de mecanismos de defensa frente a los péptidos antimicrobianos, y al mismo tiempo la regulación de otros sistemas que favorecen el establecimiento de la infección.

Actualmente estamos llevando a cabo el estudio del significado biológico de la represión del gen de la uricasa en el contexto de la función del urato vegetal durante los mecanismos de defensa.

Este trabajo ha sido financiado por el proyecto AGL2009-12757 del Ministerio de Ciencia e Innovación.

ÍNDICE ALFABÉTICO DE AUTORES

- Abad, R., 225
 Abad-Campos, P., 122, 170, 309, 347, 348, 398
 Abadías, M., 252
 Accotto, G.P. 87
 Achón, M.A., 147, 199
 Aldebis, H.K., 172, 310
 Alegre, S. 376, 377
 Aguado, A., 242, 317, 340
 Aguado, E. 344
 Agüero, J., 163, 369
 Águila-Clares, B., 127
 Aguilar, M.I., 277
 Aguilera-Cogley, V., 305, 349
 Aguirrezábal, F., 374
 Agustí, E., 248, 265
 Agustí-Brisach, C., 139, 289, 332, 334
 Alaniz, S., 332
 Alarcón, B., 378, 380
 Alba, J.M., 73
 Aldebis, H.K., 172, 310
 Alfaro-Fernández, A., 93, 346, 350, 351, 355, 358, 361
 Alabouvette, C., 148
 Alonso, A., 88
 Alonso-Blanco, C., 187
 Álvarez, B., 286
 Álvarez, J.M., 83
 Álvarez-Acosta, C., 386
 Ambrós, S., 192
 Antúñez-Lamas, M., 111
 Aparicio, F., 190
 Aragón, I.M., 109, 111, 405
 Aragón-Caballero, L., 292, 335
 Aramburu, J., 90, 162, 213, 221, 271
 Aranda, M.A., 79, 191, 395
 Arcos, S., 336
 Arias-Calderón, R., 209
 Arjona-Girona, I., 254
 Armengol, J., 77, 139, 140, 231, 232, 288, 289, 290, 320, 329, 332
 Arnold, D.L., 59, 128
 Arquero, O., 300
 Arrebola, E., 70, 107, 108, 168, 223
 Arroyo, F.T., 318
 Arroyo-Mateos, M., 78
 Avilés, M., 233, 244, 249, 250, 336, 342, 343
 Ayllón, M.A., 88
 Badosa, E., 100, 222, 238
 Baeza-Montañez, L., 119, 394
 Barbé, S., 328
 Barceló Muñoz, M., 253
 Bardají, E., 100, 222
 Bardají, L., 107
 Barón, M., 173, 405
 Barranco, D., 183, 262
 Barrau García, C., 245
 Barrios, G., 138
 Basallote-Ureba, M.J., 102, 245, 259, 260, 261, 263
 Bascón, J.C., 336
 Bassimba, D.D.M., 171, 304
 Barnés, V., 368
 Bartra, E., 101
 Batlle, A., 270, 314, 362
 Batllori, L., 248
 Bartolomé, P., 93, 351
 Bakker, P.A.H.M., 62, 203
 Bedoya, L., 132
 Bech, J., 362
 Bejarano Alcázar, J., 209
 Bejarano, E.R., 78, 164, 194, 385, 401
 Belaj, A., 209
 Belda, J.E., 218, 219
 Beltrán, A., 122, 347
 Beltrán, R., 317, 355
 Bellón-Gómez, D., 224, 225
 Belmonte, I., 221, 271
 Benito, E.P., 120
 Berbegal, M., 77, 122, 337
 Bernet, G., 251
 Berra, D., 314
 Berruete, I.M., 327, 363
 Bertolini, E., 93, 319, 327, 330, 331, 351
 Berta, G., 298
 Beuzón, C.R., 112, 128, 384, 385, 393, 396, 397
 Bindschedler, L.V., 123
 Biosca, E.G., 92, 286, 303
 Bisaro, D.M., 164
 Blanco, J., 228
 Blanco, M., 130, 302
 Blanco-Portales, R., 253
 Blanc, S., 60
 Blanch, M., 378
 Bonani, J.P., 73
 Bonaterra, A., 82
 Bonciani, G., 123
 Bonilla, N., 202, 269
 Bordas, M., 368
 Borrego-Benjumea, A., 261
 Borrero, C., 233, 244, 249, 342
 Bota, J.M., 312
 Botella, L., 75, 229
 Botella-Guillén, M., 359
 Botta, A., 272
 Bozhkova, V., 150
 Brun Esquiliche, P., 245
 Bühlmann, A., 363
 Bundó, M., 100
 Buron-Moles, G., 399, 400
 Cabaleiro, C., 236, 237
 Caballo, E., 371
 Cabrefiga, J., 181, 222, 243
 Calderón, C.E., 202, 215
 Calvet, C., 201, 270, 368
 Calvo, C., 101
 Camacho, M., 318
 Cambra, M., 93, 150, 179, 319, 330, 331, 351
 Cambra, M. A., 327, 330, 363
 Caminero, C., 344
 Campelo, M.P., 216, 227, 285, 311
 Campo, S., 100
 Campos, J.M., 267
 Camprubí, A., 201, 270, 368
 Canals, R.M., 297
 Cano, L., 222
 Cantalapiedra, C., 167
 Cantalapiedra-Navarrete, C., 322
 Canto, T., 159, 164, 188
 Cañizares, M.C., 134, 162, 164
 Cañizares, J., 79
 Capote, N., 242, 330, 340
 Caracuel, Z., 78
 Carazo, G., 353, 356
 Carr, J., 159
 Carrasco, J., 282, 287, 333
 Carrión, V., 70, 107, 108, 202
 Carvajal, V., 405
 Casado del Castillo, V., 121
 Casals, C., 141, 142, 143
 Casero, C., 80
 Casquero, P. A., 216
 Castañeda, P., 107
 Castañeda-Ojeda, M.P., 69, 111

- Castaño, R., 233, 244, 249, 342, 343
 Castillo, P., 322
 Castillo, R., 141, 211, 279
 Castillo, A.G., 194, 389, 393
 Castillo, S., 233, 244, 342
 Castillo-Lizardo, M.G., 405
 Catalá, S., 122
 Català-Senent, J., 92
 Cazorla, F.M., 70, 107, 108, 153, 168, 202, 215, 269
 Cerezo, V., 222
 Cibrián, J.F., 374
 Coca, M., 100
 Codes, M., 262
 Collados, R., 327, 363
 Cordier, C., 148
 Córdoba-Sellés, M.C., 361
 Corcobado, T., 308, 309
 Correa, R., 151
 Corry, D.S., 128
 Cramer, R., 123
 Crespo, J.I., 107, 215
 Crespo, M., 168
 Cruzado, L., 194
 Cuadrado-Gómez, I.M., 295
 Cubera, E., 308
 Cubero, J., 80, 91, 110, 264
 Cueto-Ginzo, A., 147, 199
 Chamorro, M., 98, 217, 340
 Cherifi, F., 403
 Chikh-Rouhou, H., 83
 Dáder, B., 281
 Dalmau, V., 93
 Damm, U., 289
 Darós, J.A., 132
 Davino, M., 87
 Davino, S., 87, 193
 Daza, A., 318
 de Armas, R., 379, 381
 de Cal, A., 97, 141, 142, 143, 149, 207, 210, 211, 212, 279, 321, 372
 de la Rosa, R., 209, 240, 339
 de los Santos, B., 98, 217, 242, 340
 de Lucas, A.I., 338
 de Paz, H.D., 266
 de Ramón-Carbonell, M., 71, 117
 de Vallejo, M., 229
 de Vega-Bartol, J.J., 121
 de Vicente, A., 70, 107, 108, 118, 153, 168, 182, 202, 215, 223, 226, 264, 269
 Debreczeni, D.E., 306
 Deising, H.B., 224
 del Río, C., 246
 del Toro, F.J., 158
 Diane, F., 282
 Díaz, E.M., 379, 381
 Díaz, J., 148, 214
 Díaz-Martínez, L., 131
 Díaz-Minguez, J.M., 121
 Díaz-Pendón, J.A., 189, 402
 Díez, C.M., 403
 Díez, M.J., 221, 271
 Díez, J.J., 325, 326, 338
 Díez-Navajas, A.M., 367
 Doblas, P., 188
 Dolz, L., 346
 Domínguez, P., 98
 Domínguez Correa, P., 240, 241, 339, 386
 Domínguez-Huerta, G., 392
 Donaire, L., 72, 158
 Durán-Vila, N., 331
 Egüen, B., 141, 149
 Eldesouki-Arafat, I., 172, 310
 Elena, G., 138, 169, 273, 320
 Elmer, P., 101
 Elvira-Recuenco, M., 267, 313
 Emiliozzi, M., 373
 Escobar-Bravo, R., 73
 Escriu, F., 345
 Espeso, E.A., 208
 Espino de Paz, A.I., 359
 Falcioni, T., 147, 199
 Fariás, G.A., 113
 Feliu, L., 100, 222
 Ferres, A., 73, 281
 Fernández, A.M., 283, 284
 Fernández, E., 250
 Fernández, L., 72
 Fernández, M., 326
 Fernández-Calvino, L., 158
 Fernández-Muñoz, R., 73
 Fernández-Ortuño, D., 177
 Fernández-Serrano, A., 346, 355
 Ferragud, E., 80, 91, 110
 Ferrándiz, J.A., 93, 351
 Ferré, R., 222
 Ferriol, J.P., 147
 Ferriol, I., 306, 352, 358
 Fiore, N., 360
 Flor-Peregrín, E., 137
 Flores, R., 161, 192, 193
 Flors, V., 148
 Font, M.I., 93, 346, 350, 351, 358, 361
 Fortes, I. M., 390
 Fraile, A., 74, 160, 187, 375
 Francés, J., 82, 238
 Freeman, S., 168
 Gaju, N., 206, 269
 Galeano, M., 218, 219
 Galipienso, L., 90, 213, 221, 271
 Gallegos, M.T., 109, 113, 388, 405
 Gallo Lobet, L., 240, 241, 339, 386
 Gallo, L., 347
 Garcés, A., 83
 García de Rosa, B., 324
 García B., 312
 García, J., 319
 García, J.A., 179, 293
 García, M.A., 267
 García, M.T., 330
 García, T., 214
 García-Arenal, F., 74, 160, 187, 375
 García-Breijo, F., 398
 García-Calvo, L., 236
 García-Carneros, A.B., 129, 200
 García-Figueres, F., 201, 368
 García-Gallego, A., 234, 235, 293, 294
 García-García, M.C., 295
 García-Gutiérrez, L., 107, 182, 223, 264, 272
 García-Jiménez, J., 77, 139, 140, 170, 231, 288, 337, 348, 398
 García-Luque, M., 241
 García-Marcos, A., 157
 García-Mariscal, K., 255
 García-Mas, J., 151
 García-Murillo, J.L., 361
 García-Pedrajas, M.D., 119, 394
 García-Ruiz, G.M., 246
 García-Vaquero, C.A., 344
 Garita-Cambronero, J., 80, 110
 Garzo, E., 73
 Gata, A., 233, 244
 Gea, F.J., 282, 287, 333
 Gell, I., 110
 Gheorghe, D., 123
 Gil, M., 179
 Girón, J., 110
 Gold, S.E., 394

- Gómez-Aix, C., 79, 191
 Gómez, J., 218, 219, 277, 297
 Gómez-González, E., 369
 Gómez-Lama, C., 291
 González-García, A.C., 359
 González, A.J., 227, 283, 284, 285, 311
 González, I., 159, 188
 González, O., 216
 González-Domínguez, E., 140, 231, 259, 288, 329
 González-Fernández, J., 269
 González-Jara, P., 74, 160
 González-Mula, A., 387
 González-Núñez, P., 236
 González-Plaza, J.J., 384
 González-Torres, R., 83
 González-Varela, G., 227
 Grabke, A., 177
 Gramaje, D., 84, 139, 232, 289, 290, 332
 Grande-Pérez, A., 392
 Granum, E., 173
 Güell, I., 222
 Guerrero, M.M., 178, 230
 Guerrí, J., 163, 369
 Guevara, C.M., 112
 Guillén-Bejarano, R., 259
 Guirao, P., 348
 Guiu, C., 151, 189
 Gutiérrez, S., 216
 Gutiérrez-Barranquero, J.A., 70, 107, 108, 153
 Gutiérrez-Gutiérrez, C., 322
 Gyetvai, G., 151
 Hamada, I.B., 72
 Hantula, J., 75
 Haque, M. M., 338
 Hermoso, A., 93, 351
 Hermoso, J.M., 269
 Hernández, A., 230
 Hernández-Llopis, A., 346, 350, 351
 Hernández-Piñera, A., 382
 Herradón, E., 370
 Herranz, Y., 97, 206, 207, 208, 211
 Herrera-Vásquez, J.A., 358
 Hidalgo, E., 338
 Hidalgo, J., 278
 Hidalgo, J.C., 278
 Hita, I., 312, 324
 Huerga, V., 367
 Huguet, S., 78
 Hulak, N., 393
 Iglesias, M.J., 293
 Izquierdo, E., 100
 Izquierdo, P.M., 332
 Iturrutxa, E., 298, 341
 Jung, T., 170, 308, 309
 Jurado, J., 354
 Kassemeyer, H.H., 367
 Kitajima, E.W., 93
 Lacasa, A., 178, 230, 382
 Lacasa, C.M., 178, 230, 382
 Lamarca, N., 141, 142, 143, 256
 Lamparter, T., 114
 Landa, B.B., 84, 167, 269
 Landeo-Ríos, Y., 134
 Landeras, E., 332
 Larena, I., 97, 206, 207, 208, 211, 279
 Larenas, J., 212, 321, 356
 Larregla, S., 178
 Laviña, A., 270, 314, 362
 Legaz, M.E., 378, 379, 380, 381
 Legorburu, F.J., 138, 280, 320, 323, 374
 León, L., 209
 León, M., 170, 329, 347, 348
 López-Aranda, J.M., 98, 212
 López, C., 90, 162, 213, 221, 271
 López, M.M., 80, 93, 127, 286, 327, 328, 351, 363
 López-Escudero, F.J., 172, 183, 244, 246, 300, 301, 310
 López-García, B., 220
 López-García, C., 170
 López-García, M.C., 122
 López-Gómez, M.F., 130, 302
 López-Herrera, C. J., 102, 253, 254, 260
 López-Moya, J.J., 180, 239, 296
 López-Solanilla, E., 69, 92, 107, 111, 114, 173, 387, 406, 407
 López-Soriano, P., 363
 Lorenzana, A., 216, 285, 311
 Lorite, I., 300
 Lozano, M.D., 307
 Lozano-Durán, R., 78, 164, 194, 401
 Lozano-Tovar, M.D., 268
 Lucena, C., 76
 Lucena-Lucena, N., 200
 Lucía, A., 112, 393, 396
 Luis-Arteaga, M., 345
 Luna, A.P., 401
 Luque, J., 138, 169, 273, 320, 376, 377
 Llave, C., 72, 158
 Llop, P., 328
 Llorente, I., 247, 248, 265
 Macho, A.P., 112, 384, 396
 McNally, R., 127
 Magan, N., 97
 Magno, C., 107, 223
 Maldonado-González, M.M., 99, 200, 203, 204
 Mallorquí, M., 206
 Mansfield, J.W., 59, 128
 Mansilla, C., 383
 Manzano, A., 157
 Manzo-Sánchez, G., 255
 Marimon, N., 376, 377
 Marco-Noales, E., 127
 Márquez-Martín, B., 292
 Marrero Domínguez, A., 241, 386
 Martínez-Treceño, A. 210, 212
 Martí, M., 331, 361
 Martín, A.B., 299
 Martínez, A., 267
 Martínez, C., 319
 Martínez, F., 208, 372
 Martínez, F., 132
 Martínez, M.A., 178
 Martínez, M.C., 93, 330, 331, 351
 Martínez, V., 178, 230
 Martínez del Pino, L., 404
 Martínez-Alonso, M., 206, 269
 Martínez-Álvarez, P., 228, 326
 Martínez-Ayala, A., 292, 335
 Martínez-Cruz, J., 118
 Martín-García, J., 308, 309
 Martín-Hernández, A. M., 151, 189
 Martín-Rodríguez, P., 390
 Martín-Sanz, A., 344
 Martorell-Reig, A., 288
 Mas, H., 346
 Matas, I.M., 107, 111, 371, 405
 Mayo, S., 216
 Medina, V., 147, 199
 Medina-Mínguez, J.J., 98
 Melero-Vara, J. M., 102, 129, 260, 261, 291
 Melgarejo, P., 97, 141, 149, 206, 207, 208,

- 210, 211, 212, 279,
321, 372
Mercado, J.A., 253
Mercado-Blanco, J., 81,
99, 200, 203, 204, 301
Mesanza, N., 298, 341
Metsis, M., 84
Miarnau, X., 376, 377
Micaló, L., 222
Michereff, S., 140
Mieg, I., 131
Milusheva, S., 150
Mingot, A., 180, 239
Miñana, A., 140
Mira, J.L., 171, 304
Miranda, L., 98
Miranda, J., 308, 309
Miras, M., 395
Molinero-Ruiz, L., 129,
200, 259
Monforte, A.J., 151
Monge, P., 345
Monte-serrano, M., 92
Montero, R., 312
Montes, N., 187
Montes-Borrego, M., 84,
167
Montesinos, E., 82, 100,
181, 222, 238, 243,
247, 265
Montesinos, L., 82, 100
Monton, C., 361
Mora, B., 337
Mora, I., 181, 243
Moragrega, C., 247, 265
Moral, J., 172, 262, 263,
354, 357, 403
Moralejo, E., 289
Morales, M.T., 141, 279
Morales-Clemente, M. T.,
210, 211, 372
Morales-Rodríguez, M.C.,
234, 235, 293, 294
Morello, P., 262
Moreno, A., 281
Moreno, J., 218
Moreno, M.G., 375
Moreno, P., 161, 163,
192, 369
Moreno-Letelier, A., 74
Moriones, E., 73, 134,
162, 164, 292, 335,
389, 392, 402
Mostert, L., 289, 334
Moyano, C., 370
Mulero, A., 233
Muñoz Blanco, J., 253
Muñoz-Díez, C., 183
Murillo, J., 70, 107, 404
Murruamendiaraz, A., 280,
320, 323, 374
Navarro, I., 327
Navarro, J. A., 133
Navarro, L., 161, 163,
369
Navarro, M.J., 282, 287,
333
Navarro-López, J., 192
Navas, A., 336
Navas, M., 114, 406
Navas-Castillo, J., 89,
134, 164, 292, 296,
335, 389, 390, 391, 392
Navas-Cortés, J.A., 76,
84
Naya, M., 317
Ng-Choi, I., 222
Nigro, F., 81
Nieto-Ángel, D., 255
Nombela, G., 373
Nowara, D., 123
Núñez-Zofío, M., 178
Núñez-Corcuera, B., 121
Nuss, D., 63
Olivain, C., 148
Oliver, J.D., 303
Olmedilla, A., 113
Olmo, D., 289
Olmos, A., 319, 363
Orgaz, F., 300
Orlío, A. F., 390, 391
Ornat, C., 103
Orozco-Santos, M., 255
Ortega, A., 348
Ortiz-Martin, I., 384
Orzáez, D., 132
Osorio, S., 158
Osuna, M.D., 293
Oumouloud, A., 83
Pacheco, R., 157
Padilla, C.V., 312, 324
Padilla, V., 312, 324
Páez, J.L., 336
Pagán, I., 74
Palacios, J., 107
Palacio-Bielsa, A., 80,
313, 327, 363
Palazón, M.L., 313, 327,
363
Pali, J., 346
Palma, M.J., 263
Palo, C., 234, 235, 293,
294
Palo, E., 234, 235, 294
Palomares-Rius, J.E.,
322
Palomo, J.L., 344
Palomo Ríos, E., 253
Palukaitis, P., 159
Pallás, V., 133, 190, 360
Panno, S., 87
Panopoulos, N., 397
Pascual, L., 79
Pascual Aso, F., 295
Pastor, C., 346
Pastor, V., 148
Pastrana, A.M., 242, 340
Pedro, J., 297
Peiró, A., 162
Pelegrián, F., 102
Peña, L., 161, 179
Peñalver, J., 327
Peñalver, R., 251, 266
Pérez, A., 277, 308
Pérez, E., 178
Pérez, M., 354
Pérez-Artés, E., 291
Pérez-Bueno, M.L., 173
Pérez-García, A., 107,
118, 182, 223, 224,
225, 226, 264, 272
Pérez-de-Castro, A., 271
Pérez-Laorga, E., 346
Pérez-Mendoza, D., 109
Pérez-Rodríguez, M.,
263, 300
Pérez-Sierra, A., 77, 122,
170, 289, 308, 309,
332, 339, 347, 348, 398
Pervaiz, Abbasi, 261
Pesqueira, A.M., 236, 237
Pham, K., 363
Picón-Toro, J., 234, 235,
293, 294
Piedra-Aguilera, A., 194
Pina, J.A., 163
Pineda, M., 173
Piñero, D., 74, 160
Planas, M., 100, 222
Pliego-Alfaro, F., 253
Pliego, C., 123, 215
Ponz, F., 383
Portillo, I., 370
Poulicard, N., 160
Pozo, B., 344
Pozo, M.J., 402
Prada, C., 190
Praveen, S., 159, 188
Puchades, A.V., 306
Puértolas, A., 170, 348
Prat, M., 201
Prieto, P., 200, 204
Prieto-Recio, C., 325
Prins, M., 162
Prusky, D., 121, 372
Puig, M., 247, 265
Quaglia, F., 300
Quesada-Moraga, E., 270
Quintanilla, P., 140
Raaijmakers, J.M., 70
Rakitina, D., 159
Rallo, L., 183
Ramos, B., 121
Ramos, C., 69, 107, 109,
111, 173, 204, 215,
223, 371, 405

- Rangel, E.A., 352
 Raposo, R., 267, 313
 Raya, M.C., 251, 307
 Raya-Ortega, C., 301
 Rayo, L., 262
 Rebollar, A., 220
 Redondo, C., 91, 110, 212, 321
 Redondo, M.A., 398
 Reig, J., 398
 Reigada, S., 169, 201
 Reinoso, B., 285, 311
 Resende, R.O., 162
 Reyes, J., 138
 Reyes Carlos, J.A., 359
 Ridgway, H. J., 290
 Rigling, D., 299
 Río-Alvarez, I., 107, 114, 406, 407
 Rivilla, R., 113
 Robertson, L., 336
 Robles-González, M.M., 255
 Roca, L.F., 152, 257, 258, 263, 307
 Rodelo-Urrego, M., 74
 Rodicio, M.R., 283, 284
 Rodríguez, A., 216, 342
 Rodríguez Jurado, D., 205, 209, 278
 Rodríguez Padrón, C., 240, 241, 339, 386
 Rodríguez Pérez, A., 240, 241, 339
 Rodríguez, M.V., 219
 Rodríguez, R., 199
 Rodríguez-Cachón, M.J., 344
 Rodríguez-Herva, J. J., 92, 107, 114, 387, 406, 407
 Rodríguez-García, C., 88
 Rodríguez-Iglesias, A., 407
 Rodríguez-López, M.J., 73
 Rodríguez-Molina, M.C., 234, 235, 293, 294
 Rodríguez-Negrete, E.A., 78, 194, 393
 Rodríguez-Palenzuela, P., 92, 107, 108, 111, 114, 173, 223, 387, 406, 407
 Rodríguez-Reina, J. M., 231
 Romeralo, C., 229
 Romero, D., 182, 223, 226, 264
 Romero, F., 98, 217, 242, 340
 Romero, J., 152, 357
 Romero, J., 353, 356
 Romero Muñoz, F., 245
 Ros, C., 178, 230
 Rosas-Díaz, T., 401
 Roselló, G., 82
 Roselló, M., 93, 327
 Rossignol, M., 100
 Rottwinkel, G., 114
 Ruano-Rosa, D., 253, 254
 Rubio, L., 87, 162, 306, 352, 358
 Rufián, J.S., 112, 128, 384, 396
 Ruiz García, M.L., 295
 Ruiz-Albert, J., 112, 396
 Ruiz-Ruiz, S., 161, 192, 193, 369
 Ruz, L., 247, 265
 Sabanadzovic, S., 89
 Sabaté, J., 270, 314, 362
 Sabuquillo, P., 80, 91
 Sacristán, M., 379, 380
 Sahana, N., 188
 Salmerón, E., 324
 San José, M., 284
 San Segundo, B., 100
 Sánchez, C., 400
 Sánchez, F., 382, 383
 Sánchez, E., 382
 Sánchez, M.C., 340
 Sánchez-Campos, S., 290, 335, 392
 Sánchez-Diana, H., 360
 Sánchez-Elordi, E., 381
 Sánchez-Guzmán, M.J., 402
 Sánchez-Navarro, J.A., 162, 360
 Sánchez-Pina, M.A., 79, 191
 Sánchez-Torres, P., 71, 117
 Sanjuan, S., 93, 351
 Santamaría, O., 229
 Santander, D., 120
 Santander, R.D., 92, 303
 Santiago, R., 330, 378
 Santos, M., 282, 287
 Santos Rufo, A., 205, 278
 Sarmiento-Villamil, J.L., 119
 Sayadi, S., 137
 Schiliro, E., 81, 99
 Schnabel, G., 177
 Schweizer, P., 123
 Segarra, G., 233, 244, 250
 Segarra, J., 141, 142, 143
 Semashko, M., 159
 Sena, M., 80, 110
 Senovilla, M., 387
 Sergeeva, V., 354
 Serra, P., 331
 Serra-Soriano, M., 133
 Serrano, L., 199
 Serrano, N., 300
 Serrano Fernández, A., 351
 Sifres, A., 271
 Simm, J., 84
 Simón Martínez, A., 295
 Sin, E., 199
 Siverio, F., 240, 339, 347
 Soler, M., 222
 Soler, S., 90, 213, 221, 271
 Solsona, C., 252, 399
 Solla, A., 308, 309, 398
 Sorribas, F. J., 103
 Soria, C., 98, 212
 Soto-Muñoz, L., 256
 Spanu, P.D., 61, 123
 Sundin, G. W., 127, 153
 Talavera, M., 102, 137, 260
 Talianky, M., 159
 Talleda, M., 222
 Tamames, J., 84
 Tanaka, F., 93
 Tasheva-Terzieva, E., 150
 Teixidó, N., 101, 252, 256, 273, 399, 400
 Tello, V., 121
 Tena, F., 188
 Tenllado, F., 157
 Teresani, G.R., 93, 351
 Thomma, B.P.H.J., 121
 Tomás, D.M., 392
 Torés, J.A., 168, 224, 225, 226
 Tornos, T., 345, 361
 Torres, E., 362
 Torres, R., 252, 256, 399, 400
 Torres, R., 353
 Touriño, A., 370
 Tovar, R., 296
 Trapero, A., 152, 172, 257, 258, 262, 263, 268, 307, 310, 354, 357, 403
 Trapero, C., 183, 246, 301
 Trapero-Casas, J.L., 76
 Trapiello, E., 227
 Trillas, M.I., 233, 244, 249, 250
 Trouillas, F., 320
 Troya, M.T., 267
 Truniger, V., 395
 Tuomivirta, T.T., 75
 Urizarna, M., 180, 239

Usall, J., 101, 141, 142, 143, 252, 273, 399, 400	Velázquez-Monreal, J.J., 255	Viñas, I., 101, 252, 256, 399, 400
Valverde, R.A., 89	Veloso, J., 148, 214	Vives, M.C., 163, 369
Valverde-Corredor, A., 291, 301	Verdejo-Lucas, S., 130, 137, 302	Voglmayr, H., 167
van der Voort, M., 70	Vicent, A., 171, 304, 305, 349	Xavier, C., 354
van Doorn, J., 363	Vicente, C., 378, 379, 380, 381	Xaviér, C.J., 403
Vargas, F.J., 377	Vidal, E., 150	Yáñez-Mendizábal, V., 252, 256
Vargas, J.F., 376	Vilà, S., 222	Yu, A., 158
Vargas, P., 113, 388	Vilajeliu, M., 248	Yuste, A., 319
Vargas-Osuna, E., 172, 310	Vilanova, L., 399, 400	Zabalgogezcoa, I., 297
Varo, A., 257, 268, 307	Vilaplana, Ll., 180, 239, 296	Zagrai, I., 150
Vázquez, G., 97, 206, 207, 210	Vilardell, P., 248	Zagrai, L., 150
Vega, J.M., 336	Villaescusa, F.J., 93, 351	Zamora, P., 299
Vega, V., 278	Villanueva, F. 89	Zamorano, A., 360
Vela, D., 118, 226	Villarino, M., 141, 208, 279, 321	Zerious, H., 107, 182, 223, 266
Vela, M.D., 102, 260,	Vinale, F., 254	Zubac, M., 98
Velasco, L., 312, 324		Zumaquero, A., 112, 384, 385, 393
Velázquez, K., 163, 369		Zurita, L., 383