



LLEIDA2014

XVII Congreso de la Sociedad Española de Fitopatología
Palau de Congressos de Lleida. La Llotja
7-10 de octubre de 2014

Libro de Resúmenes



Índice

PRÓLOGO	4
Patrocinadores	6
RESÚMENES DE PONENCIAS INVITADAS	7
RESÚMENES DE COMUNICACIONES ORALES	
Sesiones plenarias (PL-I a PL-IV)	17
Sesión simultánea 1: Etiología y Diagnóstico I (SIM1-1 a SIM1-6)	35
Sesión simultánea 2: Interacción Planta-Microorganismo I (SIM2-1 a SIM2-6)	43
Sesión simultánea 3: Interacción Planta-Microorganismo II (SIM3-1 a SIM3-6)	51
Sesión simultánea 4: Interacción Planta-Microorganismo III (SIM4-1 a SIM4-8)	59
Sesión simultánea 5: Control de Enfermedades I (SIM5-1 a SIM5-8)	69
Sesión simultánea 6: Epidemiología I (SIM6-1 a SIM6-8)	79
Sesión simultánea 7: Interacción Planta-Microorganismo IV (SIM7-1 a SIM7-8)	89
Sesión simultánea 8: Control de Enfermedades II (SIM8-1 a SIM8-8)	99
Sesión simultánea 9: Epidemiología II (SIM9-1 a SIM9-8)	109
RESÚMENES DE PANELES	
Etiología y diagnóstico (PAN-1 a PAN-53)	119
Interacción planta-microorganismo (PAN-54 a PAN-100)	173
Epidemiología (PAN-101 a PAN-131)	221
Control (PAN-132 a PAN-230)	253
ÍNDICE ALFABÉTICO DE AUTORES	353



LLEIDA2014

XVII Congreso de la Sociedad
Española de Fitopatología

Queridos amigos,

El comité organizador del XVII Congreso de la Sociedad Española de Fitopatología (SEF) os da la bienvenida a Lleida, ciudad acogedora y capital de la llamada "Terra Ferma", zona interior de Cataluña.

Si hacemos historia, parece que el congreso de la SEF viene a Cataluña cada diez años, pues hace veinte (1994) se celebró en Sitges (Barcelona) y hace diez (2004) en Lloret de Mar (Girona), por lo que si la coincidencia se hace norma, habrá que pensar en Tarragona como sede para el congreso en el 2024. Y como las dos anteriores sedes catalanas fueron zonas turísticas con playa, se podría casi sugerir Salou. Es obvio que Lleida no tiene playa, pero si un río caudaloso, el río Segre, afluente del Ebro, que la hace la zona agraria por excelencia y la más fértil de toda la comunidad. Así, pues, era casi obligado, que tarde o temprano el congreso de la SEF tuviera lugar por esta tierra.

Lleida, y sobre todo su gente, os reciben con los brazos abiertos, como han hecho tantas ciudades en anteriores congresos de la SEF, pero en este caso se puede decir que la ciudad entera se ha volcado en la organización del XVII Congreso de la SEF, pues todas sus instituciones están implicadas, como se puede comprobar en la relación de patrocinadores. Una ciudad con el potencial agroalimentario de Lleida enseguida reconoció la importancia del evento y ha ofrecido su máximo apoyo para que el congreso sea un éxito. Entidades locales como el Ayuntamiento (Paeria) y la Diputación de Lleida, o de la comunidad catalana, como la Subdirección General de Agricultura de la Generalitat de Cataluña, o el IRTA, y también estatales como el INIA, han sabido reconocer la relevancia que un congreso de la SEF se merece. La Universidad de Lleida, su Consejo Social y, en particular, la Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agraria se han unido también en la organización y aporte económico, y muchos de sus estudiantes harán de voluntarios, a los que de antemano ya agradecemos su trabajo. Tampoco podemos olvidar el apoyo de los Colegios Profesionales de Ingenieros Agrónomos y Agrícolas, Institutos de investigación como el Centro Tecnológico

Forestal de Cataluña (CTFC) y AGROTECNIO, y el del mismo Parque Científico y Tecnológico Agroalimentario de Lleida PCiITAL). A todo ello hay que sumar la sede del congreso, el Palacio de Congresos de Lleida "La Llotja", que por sus instalaciones, belleza y simplicidad arquitectónica ofrece un marco incomparable para su realización.

Se ha hablado y habla mucho de crisis. Se hizo en el congreso de Vitoria, en el de Málaga, y hace dos años, al proponer la candidatura de Lleida, pesaba más que flotaba en el aire un cierto pesimismo. Pues, bien, en plena crisis (aún estamos en ella), se demuestra que al menos la carencia de recursos no lo es de ideas pues, en lo que respecta a la SEF, y a juzgar por los datos, ésta goza de muy buena salud, permitiéndonos mantener el optimismo. En este congreso, se ha superado de nuevo el número de 300 congresistas, con alrededor de 950 autores, y, pese a presentar novedades, derivadas de la encuesta que se hizo a los socios de la SEF el año pasado, como ha sido la reducción a prácticamente dos días los dedicados a sesiones plenarias y simultáneas, el número de comunicaciones orales no se aleja mucho de las 97 del congreso anterior, pues se ha organizado para un total de 82. De la misma forma que en congresos anteriores se mantiene una Mesa Redonda centrada esta vez en la problemática fitopatológica en frutales, de gran importancia y actualidad en Lleida. Se ha aumentado el número de ponencias invitadas a 8 y concentrado el de las 16 comunicaciones orales a 4 en cada una de las 4 sesiones plenarias y 6-8 en cada una de las 9 simultáneas. Pese a la reducción en tiempo, aconsejada por la encuesta mencionada, al presentarse, además, 230 pósteres, el número total trabajos de investigación es de 336, con lo que se supera en más de un 10% el número de comunicaciones del congreso anterior. Y se mantienen los premios a comunicación oral y pósteres de otros congresos.

El XVII Congreso de la SEF en Lleida presenta otras novedades de gran interés para los socios y en las que pueden participar en el momento que se inscriben al congreso. En la mañana previa al mismo se celebran tres importantes simposios satélites, el de la Sociedad Español de Sanidad Vegetal (AESAVE) (que integra a

la SEF, la Sociedad Española de Entomología Aplicada y la Sociedad Española de Malerbología), el de la Red Española de Virólogos de Plantas (REVIPLANT) y el organizado por el Grupo de Diagnóstico de la SEF. En cada uno de ellos hay ponentes invitados para tratar temas de máxima actualidad en el campo de la Fitopatología, elevando a 22 el número de conferenciantes invitados en el total del congreso. También, y por primera vez, la Sociedad Americana de Fitopatología estará presente en un congreso de la SEF, pues envía a uno de sus miembros en representación, ocupando un espacio en la zona de exhibición donde se podrán adquirir libros o revistas de la misma. Y se ha conseguido que al menos 9 doctorandos puedan disfrutar de estancia gratuita durante el congreso.

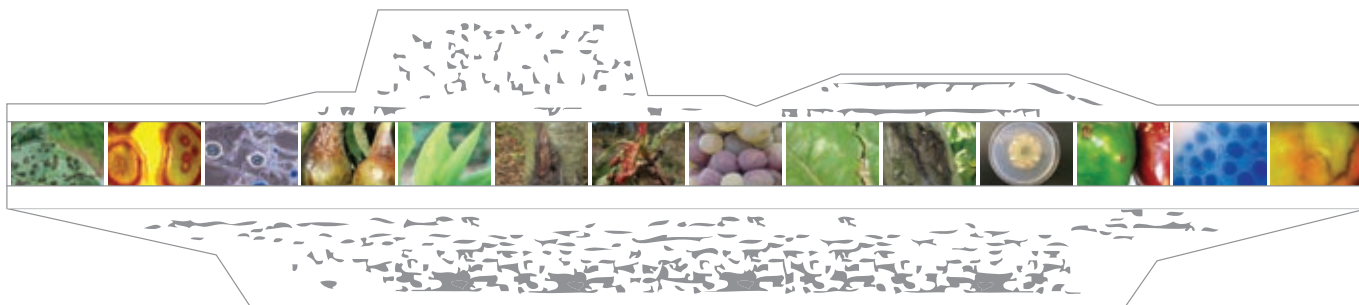
En estos días podréis conocer los últimos avances de la ciencia fitopatológica española y una mínima parte de la extranjera, pues acuden grupos de otros países (USA, Colombia, México, Ecuador, Italia, Francia, etc.) pero, también, los atractivos de esta agradable y tranquila ciudad, su centro histórico, con el antiguo hospital de Santa María, sede actual del Instituto de Estudios Ilerdenses, la plaza de San Juan, la Calle Mayor, vía comercial que lo cruza, la Catedral Nueva y la iglesia románica de San Lorenzo, o el nuevo Museo de Arte Sacro, etc. y, sobre todo, dominando la ciudad, la catedral vieja o Seu Vella, en lo alto de un cerro en el mismísimo centro de la ciudad, visible desde lejos, y todos los puntos cardinales, al aproximarse a Lleida. Por otra parte, la gastronomía leridana es famosa y aunque no son fechas para degustar uno de sus platos más reconocidos, los caracoles en sus variadas

presentaciones culinarias, siempre están presentes en sus restaurantes, y aun se está a tiempo de saborear la fruta, principalmente, pera, manzana, melocotón, uva e higos, productos de la zona hortofrutícola leridana, durante las semanas de la gastronomía de la fruta. Y si se quiere uno quedar en Lleida, después del congreso, del 10 al 12 se celebra la Fiesta del Vino en Lleida. Ni que decir tiene que el vino y cava de Lleida son también muy reconocidos, como podremos comprobar en la Cena de Gala del Congreso.

En la visita técnica se contemplarán los avances en la industria agroalimentaria, especialmente dedicada a la fruta, en el PCITAL y concretamente en el FRUITCENTRE. Pero, os animamos a que también aprovechéis vuestra visita a Lleida para conocer mejor la provincia. Lleida tiene unos paisajes naturales impresionantes sobre todo en los Pirineos, como pueden ser los del Parque Nacional de Aigüestortes o del conjunto de iglesias románicas, Patrimonio de la Humanidad, del Valle de Boi, a los que se puede ir en la excursiones facultativas.

Deseamos que os encontréis lo más a gusto posible estos días en Lleida, 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 disculpas, aunque siempre actuamos con la mejor de nuestras intenciones, tanto con el comité organizador como el comité científico. Nuestro deseo es que disfrutéis del XVII Congreso de la SEF y de Lleida.

EL COMITÉ ORGANIZADOR





Organismos Oficiales



Entidades Colaboradoras y/o Patrocinadoras



Resúmenes de ponencias invitadas





PONENCIA 1 (C-1)

UBIQUITOUS *Phytophthora* INFESTATIONS OF NURSERIES AND PLANTINGS IN EUROPE: THE IMPORTANCE OF THE NURSERY PATHWAY

Thomas Jung

Center for Mediterranean Bioresources and Food (MeditBio), Laboratory of Molecular Biotechnology and Phytopathology, University of Algarve, Campus de Gambelas, 8005-139 Faro, Portugal *Phytophthora* Research and Consultancy, Thomastrasse 75, D-83098 Brannenburg, Germany E-mail: trjung@ualg.pt

Phytophthora surveys were conducted by 36 research groups in 23 European countries in 732 forest, advanced tree, horticultural and ornamental nurseries and 2525 forest, riparian, amenity, landscape and ornamental plantings and horticultural plantations. Over all countries and nursery types, 1614 out of 1993 nursery fields and container stands (81.0%) in 670 nurseries (91.5%) were found infested by a total of 49 different species and designated or previously unknown taxa of *Phytophthora*. In contrast to many southern European nurseries where mortality, wilting and dieback symptoms were often common, most plants in infested stands of intensely managed nurseries in Central and Western Europe with regular applications of fungicides and fungistatic chemicals appeared visually healthy underpinning that international plant health protocols that are based on visual inspections are outdated.

In the planting surveys, a total of 56 *Phytophthora* taxa were recovered from 1667 of the 2525 tested plantings (66.0%). Affected plants frequently showed symptoms such as thinning, chlorosis and dieback of the crown caused by extensive fine root losses and/or collar rot. Besides 297 and 407 new *Phytophthora* – host associations in nurseries and plantings, respectively, known highly deleterious host-*Phytophthora* combinations were frequently found, eg. *Alnus* spp. and *P. alni*; *Castanea sativa* and *P. cambivora* and/or *P. cinnamomi*; *Fagus sylvatica* and *P. cactorum*, *P. cambivora* and/or *P. plurivora*; *Quercus* spp. and *P. cambivora*, *P. cinnamomi*, *P. quercina* and/or *P. plurivora*. At least 47 of the 68 *Phytophthora* species/taxa detected in nurseries and plantings are exotic. Eight *Phytophthora* taxa were previously unknown to science. These recent introductions demonstrate that with the exponentially increasing volume of imports of living plants from overseas to Europe unintended introductions of *Phytophthora* species are also increasing dramatically. The reasons for this major failure of plant biosecurity in Europe and the implications for forest and semi-natural ecosystems will be discussed.



PONENCIA 2 (C-2)

SEPTIN-MEDIATED PLANT TISSUE INVASION BY THE RICE BLAST FUNGUS *Magnaporthe oryzae*

Yogesh K. Gupta, Lauren S. Ryder, Wasin Sakulkoo, Michael J. Kershaw, Yasin F. Dagdas, George Littlejohn, Xia Yan, Nicholas J. Talbot

School of Biosciences, University of Exeter, Geoffrey Pope Building, Exeter EX4 4QD, United Kingdom.
E-mail: N.J.Talbot@exeter.ac.uk

Magnaporthe oryzae is the causal agent of rice blast, one of the most serious diseases of cultivated rice. During plant infection, *M. oryzae* forms a special infection structure called an appressorium. The appressorium generates enormous turgor, which is focused as mechanical force to breach the rice cuticle and facilitate entry of the fungus into plant tissue. A hetero-oligomeric septin GTPase complex re-organises a toroidal F-actin network at the base of the appressorium to allow establishment of polarised fungal growth and cuticle rupture. Re-modelling of F-actin at the appressorium pore is necessary for cortical rigidification and localisation of proteins associated with membrane curvature to the point of plant infection. Septin-mediated cytoskeletal re-modelling is necessary for development of a penetration peg that breaks the host cuticle and leads to invasion of epidermal cells by biotrophic invasive hyphae of *M. oryzae*. Septin-mediated plant infection is controlled by NADPH oxidase activity and a regulated burst of reactive oxygen species occurs within the appressorium. A specialised Nox2 NADPH oxidase-tetraspanin complex is necessary for septin-mediated control of actin dynamics. The appressorium pore is the site of polarised exocytosis during plant infection and the octameric exocyst complex localises to the pore in a septin-dependent manner and is essential for cytoskeletal regulation. We will also describe the potential operation of both cell cycle and pressure-mediated checkpoints, that are necessary for initiation of septin activation and the re-orientation of the cortical F-actin cytoskeleton to facilitate plant tissue invasion.



PONENCIA 3 (C-3)

INNATE IMMUNITY IN TOMATO: *Mi-1*-MEDIATED RESISTANCE AND MOREIsgouhi Kaloshian

Department of Nematology, Institute for Integrative Genome Biology, University of California, Riverside, CA 92521. USA.
E-mail: isgouhi.kaloshian@ucr.edu

Root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.; RKN) are the most devastating nematode pests worldwide. In tomato (*Solanum lycopersicum*; *Sl*) resistance to three species of RKN is conferred by *Mi-1*. In addition to RKN resistance, *Mi-1* confers resistance to three phloem feeding insects including potato aphid (*Macrosiphum euphorbiae*). It is not clear how *Mi-1* is able to recognize effectors from these diverse groups of pests and whether the detection of nematode and insect pests involve similar recognition complexes. *Mi-1* encodes a nucleotide-binding leucine-rich repeat immune receptor with no subcellular localization signal. Surprisingly, using confocal microscopy and biochemical fractionation, we found that *Mi-1* is localized to three subcellular pools including the plasma membrane, cytoplasm and the nucleus. Using forward genetics, we identified *Somatic Embryogenesis Receptor Kinase 1* (*SERK1*) to be required for *Mi-1*-mediated aphid resistance but not for RKN resistance. SERKs are plasma membrane localized transmembrane proteins. Tomato has three SERK family members (*Sl-SERK1*, *Sl-SERK3A* and *Sl-SERK3B*). The *Arabidopsis thaliana* *SERK3/BAK1* is required for pattern-triggered immunity (PTI). Interestingly, silencing *Sl-SERK3A* or *Sl-SERK3B* and not *Sl-SERK1* in susceptible tomato cv. MoneyMaker, resulted in enhanced susceptibility to RKN suggesting the existence of PTI against nematodes.

To investigate *Sl-SERK1* association with *Mi-1*, we performed co-immunoprecipitation experiments. In both *Nicotiana benthamiana*, transiently expressing *Mi-1* and *Sl-SERK1*, and in transgenic 35S-*Sl-SERK1*-HA resistant tomato cv. Motelle, *Mi-1* and *Sl-SERK1* were detected in a complex in the microsomal fractions. Moreover, BiFC analysis indicated close association of *Sl-SERK1* and *Mi-1* only after aphid treatment.

Using reverse genetics, we have identified among others, members of WRKY transcription factors including WRKY72 to be required for *Mi-1*-mediated RKN and aphid resistance. Remarkably, *Arabidopsis* WRKY72 seem to regulate a network of genes independent of the defense hormone salicylic acid. Collectively, our work suggests similar *Mi-1*-mediated defense responses to RKN and aphids but distinct *Mi-1* recognition complexes to these pests.



PONENCIA 4 (C-4)

FIRE BLIGHT CONTROL STRATEGY IN BELGIUMTom Deckers

Pcfruit- Research Station, Fruittuinweg nr.1, 3800 Sint-Truiden, Belgium.

Fire blight, *Erwinia amylovora* (Burill, Winslow *et al.*), is present in the Belgian fruit growing region since 1981 and is still remaining an important risk, leading to economic losses in some years in apple and pear orchards as well as in fruit tree nurseries. The most important climatological infection risk occurs during primary bloom period but on pear this risk is rather limited. On apple the late blooming cultivars have an increased infection risk for primary blossom infection. Later in the season, secondary blossoms on apple and pear and primary blossoms on other host plants like *Cotoneaster* sp. and *Crataegus* sp. can become infected. In the summer period, the infection risk can increase extremely after thunderstorms with hail damage on immature fruitlets and young shoots. The typical ooze droplets on the infected tissues lead to a severe spread and outbreak of fire blight in the orchard (trauma blight).

Since the use of the antibiotic Streptomycin is forbidden in Belgium, new strategies to control fire blight have been developed. The early season copper applications remain important and help to reduce the inoculum in the orchards in the beginning of the season. During bloom it seems to be useful to apply a biological antagonist before the fire blight bacteria can infect the blossoms. In Belgium Blossom protect, a compound based on the antagonist *Aureobasidium pullulans* is the only compound registered for this purpose. In the post floral period a decrease in the host susceptibility using PDE molecules (Plant Defense Enhancing molecules) becomes important. Two PDE molecules Vacciplant (laminarin) and Aliette (fosetyl-Al) have been registered in Belgium. PDE molecules should be positioned preventively, prior to the infection, so that the defense mechanisms of the plants can be switched on in time. Vacciplant (laminarin) is more considered for the protection of secondary blossoms while fosetyl-Al shows an effect against different types of infections on blossoms, shoot and fruits. A reduction in the disease progression and a clear reduction in the ooze formation on the infected tissues were observed on plants treated 3 times with fosetyl-Al. This reduction in ooze production on fruits and shoots is considered to be a very interesting factor in the fire blight epidemiology. The PDE reaction with fosetyl-Al in the host plants is linked with the internal phosphonate content in the tree that increases for some weeks after repeated treatments.

The availability of young fruit trees coming from fire blight free nurseries is not only important for the export of the trees to fire blight free area in Europe, but is also an essential step in the start of a fire blight free situation in the newly planted orchards of apple and pear. Disinfection of the tools and the wounds on the trees during sanitation is an important step for the prevention of the dissemination of the fire blight bacteria through an infected orchard. Fruit growers that do not disinfect their material properly, can be an important vector of the disease.



PONENCIA 5 (C-5)

BROWN ROT IN STONE FRUITS, REDOX, AND RESISTANCE

Richard M. Bostock^{1*}, Ting-Hang Liu¹, Mohammad Yaghmour¹, Johan Leveau¹, Miin-Huey Lee², Pedro J. Martinez-Garcia³, Dan E. Parfitt³, Thomas M. Gradziel³, and Carlos H. Crisosto³

¹ Dept. of Plant Pathology, University of California, Davis, California USA

² Dept. of Plant Pathology, National Chung-Hsing University, Taichung, Taiwan

³ Dept. of Plant Sciences, University of California, Davis, California USA

Brown rot caused by the fungal pathogen *Monilinia fructicola* is one of the most important diseases of stone fruits worldwide. Various plant pathogenic *Monilinia* species can cause brown rot and some are quarantine pests because of the severe risk they pose to fruit production in regions where they do not occur. Although fungicides are the primary method to control brown rot in conventional production systems, there is strong desire to reduce their use as well as ongoing concerns about the development of fungicide resistance. Host-derived disease resistance presents a cost effective, sustainable strategy that is complementary to potential biological and existing cultural controls. Fruit susceptibility changes during the course of development. For example, mature peach and nectarine fruit are highly vulnerable to new infections and to quiescent infections that emerge just prior to and following harvest. Associated with this increased susceptibility are structural changes in the fruit surface, which includes thinning of the cuticle, and changes in fruit chemistry, such as production of sugars and a decline of antioxidant phenolic compounds. There are also significant differences among genotypes in their susceptibility to brown rot. This talk will review studies on the biology, biochemistry and molecular biology of *M. fructicola* infection and the screening and development of peach lines with fruit resistance to brown rot. More recent work on bioreporters to prospect fruit surface chemistry and the identification of genetic markers for brown rot resistance in peach also will be discussed.



PONENCIA 6 (C-6)

FUNGICIDE RESISTANCE MANAGEMENT.Frank van den Bosch

Rothamsted Research, Harpenden AL5 2JQ

The production of many crop species is dependent on fungicides to control diseases. Evolved resistance is a significant threat to the efficacy of current fungicides and the optimisation of tactics to extend their useful life is a priority. In discussions on resistance management it is often not explicit what the evidence is, what is opinion and what is speculation. Such resistance management strategies should however be based on evidence interpreted within a sound experimental and theoretical framework.

In this presentation I review the existing experimental and modelling evidence on the (i) management of application dose, (ii) managing the number of applications, (iii) use of fungicide mixtures, (iv) use of fungicide alternation, and (v) provision of pathogen refugia, and combinations of these.

A governing principle emerges from the analysis that appears to have good predictive power. The principle states that reducing the product of the selection coefficient (defined as the difference between the per capita rate of increase of the sensitive and resistant strains) and the exposure time of the pathogen to the fungicide reduces the selection for resistance. We show that observations as well as modeling studies agree with the predicted effects.

The governing principle describes consistent qualitative trends but does not answer the question 'is the effect large enough to matter?' To be relevant, a resistance management tactic must increase effective disease control by at least 1 growing season. We therefore need to measure the success of a resistance management method in terms of years of effective disease control after the fungicide is introduced. I discuss models calculating fungicide effective life and discuss the use of mixtures in more detail.



PONENCIA 7 (C-7)

UNDERSTANDING PLANT-VIRUS CO-EVOLUTION TO ANTICIPATE VIRUS EMERGENCE.Fernando García-Arenal

Centro de Biotecnología y Genómica de Plantas UPM-INIA, Universidad Politécnica de Madrid, Spain

It is estimated that about one third of the losses due to pathogens in agricultural production are due to viruses. Viruses are the major group of emergent plant pathogens, accounting for about 47% of cases of emergence. It has been proposed that the high virulence of viruses in crops is the result of ecological changes associated to agriculture, however little is known about the virulence of viruses in wild plants and on how, or if, viruses impact wild plant populations: At odds with fungal pathogens, the evolutionary ecology of plant viruses in wild ecosystems has been underexplored. We are interested in two related aspects of plant-virus interactions that may contribute to understand virus emergence. The first is if virus infection acts as a selective pressure on wild plants leading to host-parasite co-evolution and equilibria. The second is to understand what factors ecological and evolutionary, may modify plant-virus interactions resulting in virus emergence.

If virus infection acts as a selective pressure on plants, plants would have evolved defences, either resistance and/or tolerance, against viruses. The analysis of the variation for resistance and tolerance within and among wild plant populations provides evidence that the outcome of the plant-virus interaction is determined by the genotypes of both the plant and the virus. Also, the spatial structure of defences suggests that they have not evolved randomly, both types of results indicating plant virus co-evolution. Last, the analysis of virus populations indicates adaptation of viruses to different hosts, again a result compatible with a hypothesis of plant virus co-evolution and, hence, of viruses being virulent parasites.

We have also analysed if human management of plant populations disrupts the co-evolutionary dynamics and results in virus emergence. We have found that human-driven decreases in biodiversity are associated to increased infection risk. We have also found evidence that anthropisation of the habitat results in the disruption of plant-virus co-evolution and on more virulent infections, expressed as more severe symptoms. Last, we have analysed if adaptation to new host populations as a consequence of these processes is hindered by fitness penalties in the original host. Our results show that this is indeed the case, and that penalties may affect fitness components related or unrelated to the plant-virus interactions itself, underlying the complexity of the evolution of plant-virus interactions.



PONENCIA 8 (C-8)

RNA INTERFERENCE (RNAi) STRATEGIES FOR TARGETING VASCULAR FEEDING HEMIPTERAN VECTORS OF PLANT PATHOGENS

Bryce W. Falk, W. Da Ha, Cristina Rosa, Raj Nandety, Tera Pitman, Shahideh Nouri, Yenwen Kuo, S. George Kamita, Almas Sharif, Arif Muhammad Khan

Department of Plant Pathology, University of California, Davis, CA 95616, USA

RNA interference (RNAi) is a natural gene regulation and anti-viral defense found in a majority of eukaryotes, and is the primary anti-viral defense in plants and possibly insects. We are evaluating RNAi strategies against specific vascular-feeding hemipteran vectors of plant pathogens. We induced RNAi effects in *Homalodisca vitripennis*, *Bactericera cockerelli* and *Planococcus citri* by injecting specific double-stranded RNAs into the hemocoel. RNAi effects were observable by increased mortality and by specific knockdown of target mRNAs as assessed by RT-qPCR. We were also able to induce RNAi effects in *B. cockerelli* by feeding RNAi inducers in an artificial diet, and for both *B. cockerelli* and *P. citri* we saw specific RNAi effects when the respective insects were fed on plants infected with recombinant *Tobacco mosaic virus* expressing specific interfering RNAs. We are now taking two new approaches to increase target insect specificity and reduce the potential for off-target effects. One is by producing specific artificial micro RNAs to target only the corresponding mRNA and the second is to identify new insect viruses by next generation sequencing and bioinformatics analyses and attempt to engineer these for insect specificity. The results from our overall efforts will be discussed.

Resúmenes de comunicaciones orales

*Sesiones plenarias
(PL-1 a PL-16)*





PL-1-01584

SECUENCIACIÓN MASIVA Y TRAMPAS DE ESPORAS PARA LA DETECCIÓN DE PATÓGENOS FORESTALES INVASORES

Castaño C.², Oliach D.², Oliva J.¹

1) Dept. Forest Mycology and Plant Pathology, Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala, Sweden

2) Area de Defensa del Bosc, Centre Tecnològic Forestal de Catalunya, Solsona.

La detección de patógenos forestales invasores es posible hoy en día combinando dos técnicas: la captura masiva de inóculo mediante trampas de esporas/inóculo y las técnicas de secuenciación masiva del ADN. El método de captura de esporas/inóculo debe adaptarse a los diferentes mecanismos de dispersión mediante los cuales un patógeno puede invadir una nueva área. Los patógenos forestales normalmente se dispersan por el aire, el agua, son transmitidos por insectos o mediante movimiento de material vegetal infectado. Actualmente en Suecia, estamos probando si diferentes tipos de sistemas de captura pueden utilizarse como sistema de seguimiento. Los patógenos que se dispersan por esporas se pueden capturar con trampas pasivas o activas. Los filtros de agua se pueden utilizar para concentrar los propágulos presentes en agua de río. La detección de los patógenos, cuyo vector es un insecto, requiere el establecimiento de trampas con feromonas y la posterior identificación de los patógenos dentro del vector. En todos los casos, amplificamos el ADN con cebadores universales, y luego usamos técnicas de secuenciación masiva para identificar las capturas a nivel de género/especie. A modo de validación interna, estamos evaluando la capacidad de estos métodos de captura para identificar patógenos invasores ya establecidos, como *Chalara fraxinea*, *Phytophthora alni*, *Ophiostoma novo-ulmi* y *Sphaeropsis sapinea*. Algunos de los patógenos invasores que pueden suponer una amenaza para Suecia, han sido detectados en el sur de Europa. Por eso, algunos de los esquemas de captura han sido replicados en España para así poder evaluar si este sistema de control puede ser utilizado como una herramienta de detección temprana para invasores conocidos. Se discuten las ventajas e inconvenientes del uso de estas técnicas a gran escala basándonos en los resultados preliminares obtenidos hasta la fecha.



PL-2-01519

RECOMBINATION BETWEEN CLONAL LINEAGES OF THE ASEXUAL FUNGUS *Verticillium dahliae* DETECTED BY GENOTYPING BY SEQUENCINGMilgroom M.G.¹, Jiménez M.M.², Olivares C.³, Drott M.T.¹, Jiménez-Díaz R.M.⁴

1) Cornell University

2) The Pennsylvania State University

3) University of Córdoba

4) Institute for Sustainable Agriculture

Recombination purges deleterious mutations and prevents the erosion of fitness caused by Muller's ratchet in asexual species. Therefore, asexual species are thought to be recent in origin, or they experience some sexual reproduction. *Verticillium dahliae* is a plant-pathogenic, ascomycete fungus with no known sexual stage and a population structure that is highly clonal. However, previously described discrepancies in phylogenetic relationships among clonal lineages may be simpler to explain by recombination than mutation. We addressed whether clonal lineages of *V. dahliae* arose by recombination. Genotyping by sequencing was performed on 141 *V. dahliae* isolates from diverse geographic and host origins, resulting in 26,748 single-nucleotide polymorphisms (SNPs). We found a strongly clonal population structure with the same lineages as described previously by vegetative compatibility groups (VCGs) and molecular markers. We detected 443 unique recombination events, evenly distributed throughout the genome. Recombination was widespread between clonal lineages, with relatively few recombinant haplotypes within clonal lineages. Two isolates representing lineage 6 (VCG6) and one isolate in lineage 2A (VCG2A) were recombinants; these isolates were in mating type MAT1-1, whereas all other isolates were in mating type MAT1-2. We found homologs of eight of 12 genes known to function in meiosis in other fungi in the *V. dahliae* genome, all with conserved or partially conserved protein domains. The extent of recombination suggests that clonal lineages arose by recombination, even though the current population structure is markedly clonal. Molecular signs of sex in *V. dahliae* (mating-type genes and meiosis-related genes) are consistent with the potential for sexual reproduction and for new clonal lineages to arise by recombination, thereby increasing genotypic diversity. We speculate that the current clonal population structure, despite the sexual origin of lineages, has arisen, in part, as a consequence of agriculture and selection for adaptation to agricultural cropping systems.

Research supported by grant AGL2011-24935 from Ministerio de Economía y Competitividad of Spain co-financed with FEDER funds from the European Union.



PL-3-01490

DESVELANDO LA NATURALEZA DE LA SUPRESIVIDAD DE SUELOS DE OLIVAR A LA VERTICILOSISMontes M.¹, Navas-Cortés J.A.¹, Landa B.B.¹

1) Instituto de Agricultura Sostenible

Las plantas han desarrollado estrategias de selección y sustento en su rizosfera de grupos específicos de microorganismos antagonistas como medida de defensa frente a patógenos de suelo, fenómeno que ocurre en suelos supresivos a enfermedades causadas por patógenos de suelo. Por ello, el conocer los microorganismos responsables de este fenómeno puede contribuir al control de estas enfermedades mediante dos vías: i) Favoreciendo el desarrollo de supresividad de forma artificial; ii) Identificando y aislando los microorganismos responsables para su posterior aplicación como agentes de biocontrol de dichos patógenos. En las dos últimas décadas el estatus fitosanitario de los olivares se ha visto amenazado por la Verticilosis; la enfermedad más limitante para este cultivo en la cuenca Mediterránea. Nuestros estudios indican que al menos el 25% de suelos representativos de olivar de Andalucía presentan un alto nivel de supresividad a la Verticilosis. Por ello, estamos determinado los factores asociados con este fenómeno utilizando tanto enfoques “Clásicos” como “Moleculares de Segunda Generación (NGS)”. Para identificar los microorganismos que pueden determinar la supresividad natural de los suelos se han utilizado técnicas clásicas que demuestran: i) la transferencia de la supresividad de suelos altamente supresivos a conducivos mediante mezclas de éstos; ii) la pérdida de parte de la supresividad de los suelos cuando éstos son tratados con calor; y iii) las bacterias aisladas de suelos supresivos poseen capacidad antagonista frente a *Verticillium dahliae* in vitro y suprimen el desarrollo de la Verticilosis in planta. En un segundo paso mediante NGS se han caracterizado las comunidades bacterianas asociadas a la rizosfera de plantas crecidas en suelos supresivos y conducivos en presencia o no de *V. dahliae* y en experimentos de transferencia de suelos. Para ello se han secuenciado más de 252 muestras rizosféricas independientes y se han obtenido más de 750.000 secuencias de calidad que se han podido agrupar en >15.000 OTUs. Posteriormente, a partir de las frecuencias de OTUs se han calculado diversos índices de diversidad α y β para determinar la estructura de las poblaciones bacterianas asociadas al fenómeno de supresividad, y mediante diversos análisis multivariantes (Canónico Discriminante, Árboles de Clasificación) se han determinado OTUs específicos presentes en mayor frecuencia en suelos supresivos, así como OTUs que se transfieren de suelos supresivos a conducivos, que podrían estar asociados con la transferencia de la supresividad entre suelos.

Financiado por fondos CICE-Junta de Andalucía (ayudas Grupo PAIDI AGR-136, P. Excelencia P10-AGR-5908). Interprofesional del Aceite de Oliva Español-Citoliva y cofinanciado por fondos FEDER (EU).



PL-4-01463

COMPARISON OF GENE EXPRESSION PROFILES OF PLANT HORMONE SIGNALLING PATHWAYS BETWEEN BLACK SIGATOKA SUSCEPTIBLE AND RESISTANT BANANA CULTIVARS INOCULATED WITH *Mycosphaerella fijiensis*

Rodríguez H.A.¹, Rodríguez E.¹, Sánchez D.², Arango R.E.^{1,3}, Morales J.G.⁴

- 1) Corporación para Investigaciones Biológicas CIB, Carrera 72A #78b-141. Medellín Colombia. hrodriguez@cib.org.co, erodriguez@cib.org.co
- 2) Centro de Investigaciones del Banano. Cenibanano-AUGURA. Conjunto Los almendros Km 4 vía Carepa - Apartadó. Carepa - Colombia. jsanchez@augura.com.co
- 3) Universidad Nacional de Colombia sede Medellín, Escuela de biociencias. Calle 59A No 63 - 20. Medellín-Colombia. rearango@unal.edu.co
- 4) Universidad Nacional de Colombia sede Medellín, Departamento de Ciencias Agronómicas. Calle 59A No 63 - 20. Medellín-Colombia. jgmoraleso@unal.edu.co

Black Leaf Streak disease (BLSD) is the most destructive phytopathological problem in banana and plantain crops around the world. This disease is caused by the fungus *Mycosphaerella fijiensis*, and requires many applications of chemical fungicides for its control. This situation has generated fungicide resistance making disease management a difficult and expensive agronomical problem. Black sigatoka resistant cultivars have been identified such as Calcutta 4 (AA), Yangambi Km5 (AAA), Pisang lili (AA) and others, which may be useful in the banana breeding programs worldwide. However resistant genotypes have undesirable characteristics that make them unsuitable for the markets. Moreover to transfer the resistant components by banana breeding to widely accepted commercial cultivars have proved to be very difficult. In this work we studied by high throughput analysis the expression profiles of genes related to plant hormones in *Musa acuminata* cv. Calcutta 4 (resistant cultivar) compared to *Musa acuminata* cv. Williams (susceptible cultivar) during the interaction with *Mycosphaerella fijiensis*. Samples from *M. fijiensis*-inoculated banana leaves from both cultivars were collected at 0, 24, 72 and 144 hours after inoculation (hai). Differentially expressed genes involved in some signal transduction pathways of plant hormone-related genes were identified and selected for further analyses. Key Jasmonate related genes such as coronatine insensitive and MYC2 transcription factors were observed to be up-regulated in cv. Calcutta 4 but not in cv. Williams suggesting a potential role for the jasmonate signaling pathway in the banana resistance against *M. fijiensis*. Ethylene signal transduction pathway seemed to be activated in cv. Calcutta 4 as shown by the over expression of the ethylene sensitive factor (ERF) gene, in contrast to cv. Williams which showed up regulation of the Ethylene Response (ETR) gene which has been shown to negatively regulate ethylene responses. In contrast, no genes were identified up-regulated for the salicylic acid pathway components in the resistant or sensitive cultivars.

Este trabajo fue financiado por Colciencias bajo el proyecto código 2213-452-21253, AUGURA, La CIB y La Universidad Nacional de Colombia sede Medellín.



PL-5-01529

A COMPARATIVE GENOMIC APPROACH TO IDENTIFY CANDIDATE EFFECTOR-ENCODING GENES IN THE MAIZE ANTHRACNOSE FUNGUS *Colletotrichum graminicola*Thon M.R.¹, Rech G.E.¹, Sanz J.M.¹, Sukno S.A.¹

1) Instituto Hispano-Luso de Investigaciones Agrarias, Universidad de Salamanca

To better understand patterns of genetic variation in the maize pathogen *Colletotrichum graminicola*, we sequenced the genomes of seven field isolates showing a variable range of virulence to maize and collected from different regions of the world. We analyzed genomic structural variations and patterns of gene gain and loss using genomic sequences obtained from various assembly and gene annotation strategies. We also performed a genome-wide analysis of selection acting on protein coding and non-coding DNA. We identified sets of unique genes in each isolate, and discovered that they are significantly enriched with genes coding for small secreted proteins (putative effectors), which could represent evolutionary innovations directly involved in host specificity or environment adaptation. We also show evidence of selective sweeps, balancing selection and positive selection affecting both protein coding and non-protein coding DNA of pathogenicity-related sequences. Genes coding for putative effector proteins and secondary metabolites (gene families with significant roles in plant-pathogen interactions) show evidence of positive selection acting on the coding sequence. We identified 22 genes encoding proteins of unknown function but with characteristics of effectors that also show evidence of positive selection in the coding sequence and represent candidates for functional validation. We performed gene deletion experiments of one candidate effector-encoding gene and show that the null mutant is non-pathogenic, demonstrating the important role of this gene in pathogenesis. Genomic variation, natural selection, and patterns of gene gain/loss provide valuable information for selecting targets for further functional and population genetic analyses aimed at identifying genes involved in the development of maize anthracnose.

This research was supported by funds from the Ministerio de Ciencia e Innovación (MICINN) of Spain (Grant: AGL2011-29446), the Ministerio de Economía y Competitividad (Grant: AGL2012-34139) and the Junta de Castilla y León (Grant: SA-165U13).



PL-6-01349

ANÁLISIS FUNCIONAL DE EFECTORES CANDIDATOS DE *Podosphaera xanthii***Martínez-Cruz J.¹, Romero D.F.¹, Prieto A.B.¹, De Vicente A.¹, Pérez-García A.¹**

1) Instituto de Hortofruticultura Subtropical y Mediterránea "La Mayora", Universidad de Málaga, Consejo Superior de Investigaciones Científicas. Departamento de Microbiología. Facultad de Ciencias. Campus de Teatinos s/n, 29071 Málaga, España. E-mail: jesusmcruz@uma.es

Los oídios son patógenos biotrofos obligados que requieren células vivas para completar su ciclo de vida, por lo que deben eludir o inhibir las respuestas de defensa de la planta mediante la secreción de efectores. El haustorio, estructura del hongo especializada en la toma de nutrientes, es también la vía de intercambio de factores con las células huésped. Hasta la fecha, son muy numerosos los efectores identificados en diversos hongos fitopatógenos, sin embargo, es poco lo conocido acerca de los efectores de oídios.

En este trabajo hemos desarrollado un método para la identificación y el análisis de efectores candidatos de *Podosphaera xanthii* (ECP), el principal agente causal del oídio de las cucurbitáceas, mediante el silenciamiento génico inducido por el hospedador (HIGS) y la sobreexpresión de estos efectores en cotiledones de melón, utilizando para ello *Agrobacterium tumefaciens*. El silenciamiento de algunos de los ECP analizados provocó la acumulación en las células de la planta de compuestos relacionados con la respuesta de defensa como peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y calosa, lo que sugiere un importante papel en el establecimiento de la infección. En concreto, ECPec2 parece interferir específicamente con la formación de la papila, primera barrera de defensa de la planta, impidiendo o ralentizando la penetración de la célula vegetal. En el caso de ECP5191, su silenciamiento se traduce en un aumento del número de células que acumulaban H_2O_2 y calosa, así como una disminución en el número de puntos de penetración del hongo, observándose todo lo contrario cuando se sobreexpresa dicho efector. Además, la fusión traduccional CSEP5191-GFP ha permitido localizar este efector de *P. xanthii* en los puntos de penetración y vesículas del haustorio del hongo.

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



PL-7-01566

A GEMINIVIRAL PATHOGENICITY FACTOR INTERFERES WITH JASMONATE SIGNALLING AND PLANT DEFENCE RESPONSES

Rosas-Díaz T.¹, Lozano R.², Macho A.P.², Fernández G.³, Solano R.³, Beuzón C.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)

2) The Sainsbury Laboratory, Norwich Research Park, Norwich NR4 7UH, United Kingdom

3) Departamento de Genética Molecular de Plantas/ Centro Nacional de Biotecnología, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Madrid, Spain

Viruses must create a suitable cell environment and elude defence mechanisms, which likely involves interactions with host proteins and subsequent interference with or usurpation of cellular processes. Geminiviruses are insect-transmitted small DNA viruses infecting a wide range of vegetable and field crops worldwide. Due to limited coding capacity, geminiviruses must rely on the plant machinery for the accomplishment of their infection. C2 is a multifunctional geminiviral protein important for pathogenicity, which has been shown to interfere with the function of the ubiquitin E3 ligase SCF complexes in the cell, affecting multiple plant responses (Lozano-Duran et al., 2011). Here, we describe that C2 from the begomovirus *Tomato yellow leaf curl Sardinia virus* (TYLCSV) interferes with jasmonate signalling when transgenically expressed in *Arabidopsis* or *Nicotiana benthamiana*. Given that the SCF^{COI1} complex is the jasmonate receptor, it would be feasible to speculate that the C2-mediated inhibition of jasmonate responses is likely due to the effect of C2 on this complex. However, transcriptomic analyses show that C2 is not generally affecting the transcriptional response to jasmonates, but specifically suppressing jasmonate-triggered defence responses and secondary metabolism. Consistently with the inhibition of jasmonate-mediated defences, transgenic plants expressing C2 are more susceptible to biotrophic pathogens. Interestingly, we found that C2 from TYLCSV, but not C2 from the curtovirus *Beet curly top virus* (BCTV), physically interacts with a member of the JAZ family of repressor proteins, and that this JAZ protein exerts a negative impact on the infection by begomoviruses. Based on our findings, we propose that C2 from begomoviruses may interfere with the jasmonate response at multiple levels.

References:

Lozano-Duran, R., Rosas-Díaz, T., Gusmaroli, G., Luna, A.P., Taconnat, L., Deng, X.W., and Bejarano, E.R. (2011). *Plant Cell* 23, 1014-1032.

This work was supported in part by grants AGL2010-22287-C02 from Ministerio de Ciencia, e Innovacion and from Campus de Excelencia Internacional Ayuda-Andalucía Tech.



PL-8-01625

LATERAL ORGAN BOUNDARIES *Domain 16*, *LBD16*, A SHARED MOLECULAR PLAYER IN PERICYCLE CELLS DURING GALL DEVELOPMENT AND IN LATERAL ROOT FORMATION.Cabrera J., Díaz F.E., Barcala M., Fenoll C., Escobar C.

Faculty of Environmental Science and Biochemistry, University of Castilla-La Mancha, Avenida de Carlos III s / n, 45071 Toledo, Spain.

Phyto-endoparasitic nematodes interact with their hosts in a subtle manner. The root-knot nematodes (RKNs) induce specialized feeding cells, giant cells (GCs). Those are immersed in root swellings, called galls, and are induced from vascular cell precursors suffering repeated mitosis with aborted cytokinesis by nematode effectors that transforms them into transfer cells assisting the nematode to complete his life cycle (Cabrera et al., 2014a). The control of RKNs constitutes an increasing problem worldwide, as they are polyphagous and the most effective chemical nematicides were banned. Thus, knowledge on the function of genes involved in these crucial processes will help developing tools for novel control strategies. We address the role in gall development of *LBD16*, a key component of the auxin pathway leading to the divisions in the xylem pole pericycle (XPP) during lateral root (LR) formation (Laplaze et al., 2005). Arabidopsis XPP marker lines (J0121 and J0192) were activated in early developing galls/GCs. The activation pattern of *LBD16::GUS*, resembled that of the G2/M-transition specific *ProCycB1;1:CycB1;1(NT)-GUS* line and *DR5::GUS* in early infection stages. *LBD16* was regulated by auxins not only in LR, but also in galls, and induced by root-knot nematode secretions. Infection tests of several independent *LBD16* loss of function lines showed a significant reduction in the infection rate of *Meloidogyne javanica* and *M. arenaria*, RKNs species with a high impact in Mediterranean areas (Cabrera et al., 2014b). The specific activation of two XPP marker lines and the function of *LBD16* during RKN infection connects LR initial cells identity with gall and GC formation. Hence, we show that RKN feeding sites share a clear common transducer, *LBD16*, with LR formation, supporting the hypothesis that they may at least partially 'hijack' plant transduction pathways leading to LR formation.

Cabrera et al., 2014a. *Frontiers in Plant Science*,5:107.Cabrera, J et al., 2014b. *New Phytol*, 203:632-45Laplaze et al., 2005. *J Exp Bot*, 56: 2433-2442.



PL-9-01517

MECANISMOS DE *Erwinia amylovora* PARA COMBATIR LA TOXICIDAD PRODUCIDA POR EL COBRE: EL PAPEL DEL GEN *copA*Aguila B.¹, Zeng Q.², Marco-Noales E.¹, Penyalver R.¹, López M.M.¹, Sundin G.W.²

1) Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias. Departamento de Protección Vegetal. Laboratorio de Bacteriología. 46113, Moncada, Valencia, España E-mail: baguila@ivia.es

2) College of Agriculture and Natural Resources. Department of Plant Pathology. Michigan State University, East Lansing, MI 48824-1311. USA

Los tratamientos con compuestos cúpricos constituyen la base de la gestión integrada del fuego bacteriano de las rosáceas causado por *E. amylovora*, en los países de la Unión Europea. La bacteria reacciona frente a dicho tratamiento poniendo en marcha distintas estrategias de supervivencia, y este trabajo pretende contribuir a dilucidar los mecanismos moleculares que la bacteria activa para hacer frente al estrés causado por dicho metal. El estudio transcriptómico mediante hibridación de *microarrays* ha revelado que *E. amylovora* expresa 44 genes de forma diferencial en presencia de cobre: 13 genes de transporte, 12 relacionados con el estrés, 5 genes de metabolismo, 1 de movimiento, 1 de muerte celular y 12 genes de función desconocida. Se validó la expresión de 25 de estos genes y se seleccionaron 8 de ellos para ser mutados: *copA*, *soxS*, *arcB*, *yjcE*, *ygcF*, *yhhQ*, *galF* y EAM_3469. Todos los mutantes presentaron menor cultivabilidad después del tratamiento con cobre, pero dado que el nivel de expresión del gen *copA* fue el más elevado, se seleccionó éste para comenzar a evaluar su papel en la respuesta de *E. amylovora* al estrés que sufre en presencia de dicho metal. Para ello se analizó la supervivencia del mutante *copA* en brotes de peral blanquilla tratados con sulfato de cobre a 10mM. Su cultivabilidad disminuyó drásticamente en comparación con la cepa salvaje después del tratamiento, y la complementación del gen restauró parcialmente dicha cultivabilidad. Por tanto, se infiere de los resultados que el gen *copA* contribuye a que *E. amylovora* sobreviva en forma cultivable *ex planta* tras la aplicación de cobre, y se confirma el importante papel que *copA* desempeña en el mantenimiento de la homeostasis de cobre como uno de los mecanismos empleados por *E. amylovora* para combatir su toxicidad.



PL-10-01304

META-ANÁLISIS DE LOS PROGRAMAS DE CONTROL DE LA MANCHA NEGRA DE LOS CÍTRICOS CAUSADA POR *Phyllosticta citricarpa*

Makowski D.¹, Vicent A.², Pautasso M.², Stancanelli G.³, Rafoss T.⁴

1) INRA, UMR 211 INRA AgroParisTech, 78850 Thiverval-Grignon, Francia

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

3) Forest Pathology and Dendrology, Institute of Integrative Biology, ETH Zurich, Suiza

4) Plant Health Unit, European Food Safety Authority (EFSA), 43127 Parma, Italia

5) Plant Health & Plant Protection Division, Bioforsk, 1432 Ås, Noruega

La mancha negra (CBS), causada por *Phyllosticta citricarpa*, es la enfermedad fúngica de los cítricos más importante a nivel mundial. Las regiones citrícolas del Mediterráneo están exentas de CBS y *P. citricarpa* está considerado como organismo de cuarentena en la UE. La legislación actual permite la importación de frutos cítricos procedentes de zonas afectadas por la enfermedad, siempre y cuando se apliquen los tratamientos adecuados para su control y no se detecten síntomas en fruta. Se han publicado numerosos ensayos de control de CBS, realizados en diferentes países, épocas y especies de cítricos. El análisis por separado de estos ensayos es poco informativo e incluso en ocasiones contradictorio. Las técnicas de meta-análisis realizan inferencia estadística de forma global sobre varios ensayos a la vez, lo que permite obtener estimadores más robustos. Esta información es de gran importancia, tanto para reducir el riesgo de entrada de *P. citricarpa* en la UE, como para diseñar los programas de contención en el caso de una posible introducción. En este estudio se analizaron conjuntamente todos los ensayos de control de CBS disponibles a nivel mundial. Para cada ensayo, se tomaron datos sobre su diseño experimental y la incidencia de CBS en los árboles tratados y los testigos. Los datos se analizaron mediante cuatro modelos, considerando la eficacia de los programas de control como un efecto fijo o aleatorio y estimando los parámetros mediante estadística frecuentista o bayesiana. Los modelos de efectos fijos subestimaron los intervalos de confianza respecto a los de efectos aleatorios. Debido a la gran variabilidad entre los ensayos, las distribuciones predictivas de la eficacia fueron más informativas que sus correspondientes estimadores puntuales. En general, los programas de control de CBS a base de estrobirulinas (QoI) y ditiocarbamatos se mostraron más eficaces que los que incluían únicamente fungicidas cúpricos.

Nota legal: este trabajo es responsabilidad exclusiva de los autores y su contenido no representa necesariamente la opinión de EFSA.



PL-11-01601

***Pochonia chlamydosporia*: ¿AGENTE DE CONTROL BIOLÓGICO DE NEMATODOS FITOPATÓGENOS O ENDÓFITO MEJORADOR DE CULTIVOS?: PISTAS AGRONÓMICAS, BIOLÓGICAS Y GENÓMICAS/METABOLÓMICAS**

Lopez-Llorca L.V.

Laboratorio de Fitopatología, Departamento de Ciencias del Mar y Biología Aplicada, Instituto Multidisciplinar para Estudios del Medio (IMEM) Ramon Margalef. Universidad de Alicante, E-03080 Alicante. E-mail: lv.lopez@ua.es

En esta charla se ofrece una perspectiva-resumen de los resultados que nuestro laboratorio ha generado sobre el modo de acción y uso práctico del hongo nematófago *Pochonia chlamydosporia*

Hemos utilizado aislados de *P. chlamydosporia* (Pc) de suelos supresivos a nematodos en localidades españolas y mundiales. Hemos aplicado técnicas de inoculación de Pc, sobre todo para fomentar la colonización de la rizosfera de cultivos por el hongo. Disponemos de una cepa de Pc transformada con la GFP, que hemos utilizado para analizar el parasitismo de huevos y la colonización endofítica radicular. También hemos estudiado dicha respuesta por micromatrices y RNA seq. Hemos analizado factores de patogenicidad de Pc como proteasas y quitinasas. Hemos analizado el genoma de Pc. Utilizando metabolómica hemos analizado el "diálogo" entre el cultivo, los nematodos fitopatógenos y Pc.

Pc suprime enfermedades radiculares por nematodos y hongos fitopatógenos. Pc forma apresorios, sintetiza enzimas extracelulares, penetra y destruye los huevos de nematodos. Pc también coloniza endofíticamente raíces de cultivos, induciendo defensas locales (ej. Papilas) y sistémicas (ej. fenoles). Se ha observado la inducción por Pc de defensas frente a estrés y genes de hormonas vegetales. Pc promueve el crecimiento radicular, aumentando la tolerancia a los nematodos. El genoma de Pc muestra una gran expansión de familias génicas de enzimas hidrolíticas, factores de transcripción y componentes de vías de transcripción de señales. Evolutivamente Pc está próximo a los hongos entomopatógenos y endófitos. Hemos identificado firmas espectrales del parasitismo del tomate por *Meloidogyne*. Pc no causa una variación significativa de la rizodeposición de dicho cultivo, cuando crece como endófito.

Pc parasita nematodos y es endófito de importantes cultivos, induciendo una respuesta moderada general al estrés y promoviendo el crecimiento vegetal.



PL-12-01313

BIOPELÍCULAS EN *Xanthomonas citri* subsp. *citri*: PAPEL DEL ADN EXTRACELULAR Y EXPRESIÓN DE GENES RELACIONADOS CON ADHESIÓN Y MOTILIDAD**Sena M.¹, Redondo C.¹, Ferragud E.¹, Cubero J.¹**

1) Laboratorio de Bacteriología. Departamento de Protección Vegetal, Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA)

Xanthomonas citri subsp. *citri* (*Xcc*) es una de las especies del género *Xanthomonas* que causa la cancrrosis de los cítricos, enfermedad caracterizada por la aparición de lesiones eruptivas en hojas, ramas y frutos que puede derivar en la caída prematura de estos últimos y ocasionar una acusada defoliación en el árbol.

Las biopelículas o biofilms se describen como comunidades bacterianas sésiles adheridas a superficies, con una estructura tridimensional, que protege a las bacterias de agentes externos. *Xcc* es capaz de producir dichas biopelículas tanto en superficies bióticas como abióticas, y su formación se ha relacionado en *Xcc* tanto con su supervivencia en superficie de hojas y frutos como con su capacidad infectiva.

La matriz extracelular que comprende el 90% de las biopelículas está compuesta de agua, polisacárido, lípidos, proteínas y ADN extracelular. En estudios anteriores hemos demostrado la diferente capacidad de cepas de *Xcc* para formar biopelículas *in vitro* e *in vivo* en función de la gama de huésped de las mismas. También se determinó la existencia de movimiento tipo *twitching* y la formación de pilus tipo IV. Además se encontraron diferentes patrones estructurales tanto en la formación de biopelículas como en el movimiento tipo *twitching* para distintas cepas de *Xcc* que infectaban a diferentes especies de cítricos.

En este trabajo se ha determinado la importancia del ADN extracelular en la formación de biopelículas de *Xcc* su influencia en procesos de motilidad y agregación. La presencia de ADN se ha evidenciado mediante diferentes técnicas, en distintas fases de la formación de la biopelícula, y en las distintas cepas de *Xcc* además de en otras *Xanthomonas* spp. Igualmente en el trabajo se mostrará la transcripción de genes relacionados con motilidad y adhesión así como *quorum sensing* durante la formación de biopelículas en dos cepas de *Xcc* con distinta gama de huésped.

Este trabajo ha sido financiado por el proyecto CRDF546 del "Citrus Advance Technology Program", Florida, EEUU.



PL-13-01457

VARIACIÓN EN EL GENOMA DE *Bursaphelenchus xylophilus* A NIVEL POBLACIONAL Y SU RELACIÓN CON CARACTERES ECOLÓGICOS**Palomares J.E.¹, Tsai I.J.², Mitsuteru A.³, Castillo P.¹, Takeuchi Y.⁴, Kikuchi T.⁵**

- 1) Instituto de Agricultura Sostenible (IAS), Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), Avenida Menéndez Pidal s/n, Apdo. 4084, 14080 Córdoba, España. E-mail: palomaresje@ias.csic.es
- 2) Biodiversity Research Center, Academia Sinica, Taipei 11529, Taiwan
- 3) Forestry and Forest Products Research Institute, Tsukuba, 305-8689 Japan
- 4) Laboratory of Terrestrial Microbial Ecology, Graduate School of Agriculture, Kyoto University, Kyoto, 606-8502 Japan
- 5) Division of Parasitology, Faculty of Medicine, University of Miyazaki, Miyazaki, 889-1692 Japan

Bursaphelenchus xylophilus es un nematodo fitopatógeno agente de la marchitez del pino. A pesar de los esfuerzos realizados para controlar su expansión con medidas de cuarentena, esta enfermedad se está en dispersando a nuevas áreas forestales.

En este estudio se aborda por vez primera la variación del genoma de este nematodo en poblaciones y líneas fijadas (cruzamientos entre hermanos y descendientes de una pareja de ambos sexos) que varían tanto en su capacidad patogénica como en algunas características ecológicas (i. e. reproducción sobre *Botrytis cinerea* y sobre pino). Para ello se ha utilizado la secuenciación masiva de sus genomas completos mediante Illumina y mapeando las lecturas al genoma de referencia (Ka4C1) (muy patogénico). Se han identificado alrededor de 3 millones de variantes (SNPs e Indels), siendo la mayoría de ellas homocigóticas (fijadas). Las secuencias no mapeadas se utilizaron para la creación de secuencias "de novo". La población C14-5 y la línea fijada OKD1-F7, ambas con escasa virulencia son las que presentaron mayores diferencias respecto a la población de referencia. Los tests de enriquecimiento de funciones mediante el cambio de lectura mostraron una posible mayor inactivación de genes en las actividades de endopeptidasas de ácido aspártico y ATPasa transportadoras de péptidos, mientras las actividades alfa-trehalosa y metalopeptidasa fueron enriquecidas con cambios de parada de lectura respecto al genoma de referencia. Las líneas fijadas S10-P3 y S10-P9, con menor y similar capacidad patogénica que su población original (S10), respectivamente, mostraron muy pocas diferencias genéticas entre ambas, siendo la mayoría de los cambios con dos alelos por posición genómica. Algunas de las posiciones homocigóticas pueden estar relacionadas con el reconocimiento del medio y patogenicidad. También se han identificado algunas diferencias entre efectores en las lecturas que no fueron mapeadas al genoma de referencia. No se observaron diferencias genómicas estructurales importantes entre las muestras estudiadas.

*Investigación y estancia del primer autor financiada por la Japan Society for Promotion of Science dentro del programa de becas posdoctorales para investigadores extranjeros.



PL-14-01331

PAPEL DE UNA REGIÓN CROMOSÓMICA DE *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* NCPPB 3335 EN LA VIRULENCIA EN PLANTAS DE OLIVO LIGNIFICADAS**Caballo E.¹, Van Dillewijn P.², Wittich R.M.², Ramos C.¹**

1) Instituto de Hortofruticultura Subtropical y Mediterránea (IHSM-UMA-CSIC)

2) Estación Experimental del Zaidín (CSIC)

El genoma del patógeno de olivo *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* (Psv) NCPPB 3335 (58.1% G+C) presenta una región cromosómica de aproximadamente 15 kb, denominada VR8 (60.4% G+C), ausente en los genomas de todos los patovares secuenciados del complejo *Pseudomonas syringae* que infectan plantas herbáceas, pero presente en los patovares patógenos de plantas leñosas. El análisis de esta región mediante retrotranscripción (RT)-PCR reveló la existencia de 4 posibles operones y el gen AER-1900 (posible receptor de aerotaxis).

Con el objetivo de analizar la función y el papel en virulencia de estos genes se construyeron mutantes en los 4 operones y el gen AER-1900 mediante intercambio alélico. El consumo/acumulación de antranilato y catecol se cuantificó mediante HPLC en los mutantes de los operones antABC y catBCA, confirmando la participación de los mismos en el catabolismo de antranilato y catecol, respectivamente. Los otros dos operones, denominados AER-1901/2/3 y AER-1904/5, presentan homología con genes relacionados con la degradación de otros compuestos aromáticos. Hemos determinado que el operón AER-1901/2/3 está implicado en la modificación de indol hasta un compuesto azulado que podría ser índigo, mientras que el operón AER-1904/5 podría intervenir en el catabolismo de derivados clorados del catecol. Los síntomas generados por las cepas mutantes de los operones antABC y catBCA en plantas de olivo no lignificadas son similares a los generados por la cepa silvestre. Sin embargo, los síntomas producidos en plantas lignificadas por los mutantes en ambos operones y el operón AER-1901/2/3 son significativamente menores que los inducidos por la cepa silvestre, sugiriendo un posible papel de estos operones en la degradación de compuestos derivados de la lignina. En la actualidad, estamos analizando el papel en virulencia en plantas no lignificadas del gen AER-1900 y los operones AER-1901/2/3 y AER-1904/5 y en plantas lignificadas del gen AER-1900 y el operón AER-1904/5.



PL-15-01474

INMUNIDAD INNATA, SILENCIAMIENTO GÉNICO Y DEFENSA ANTIVIRALHamada I.B.¹, Fernandez-Calvino L.¹, Donaire L.¹, Franco-Zorrilla J.M.¹, Llave C.¹

1) Departamento de Biología Medioambiental. Centro de Investigaciones Biológicas-CSIC. Ramiro de Maeztu, 9, 2804-Madrid.
E-mail: cesarllave@cib.csic.es

El objetivo de este trabajo es profundizar en el conocimiento de la interacción compatible planta (*Arabidopsis thaliana*)-virus (Virus del cascabeleo del tabaco, TRV) a través del estudio del silenciamiento génico como factor modulador de la infección. Hemos comprobado que el gen *BIR1*, un represor general del sistema inmune en plantas, está sujeto a una doble regulación que ocurre exclusivamente durante la infección. La presencia del virus estimula la actividad de su promotor favoreciendo la acumulación de transcritos de *BIR1*. Sin embargo, la sobreexpresión de *BIR1* lleva implícita una regulación negativa que ocurre a nivel post-transcripcional y disminuye los niveles de mRNA a una situación similar al control no infectado. Esta regulación negativa depende de la actividad de la proteína efectora AGO y de las enzimas de síntesis de pequeños RNAs interferentes (siRNAs) DCL2, DCL3, y DCL4. Además *BIR1* posee un patrón de degradación coherente con la actividad de siRNAs a lo largo del mRNA. El uso de líneas transgénicas que sobreexpresan el gen *BIR1* sugiere que su silenciamiento está asociado a niveles elevados de mRNA. La pérdida de función de *BIR1* en mutantes *bir1-1se* asocia con una mayor resistencia a la infección, probablemente debida a la activación constitutiva de la inmunidad innata regulada por *BIR1*. De hecho, la acumulación de virus parece depender de los niveles de expresión de *BIR1*. Hemos observado que algunos interactores clave de BIR1 en la respuesta inmune (*Pattern triggered immunity*, PTI) como *BAK1* y *SOBIR* se reprimen y se inducen, respectivamente, en presencia del virus. La pérdida de función de *BAK1*, un regulador positivo de PTI, favorece la acumulación de virus en plantas infectadas. Estos resultados sugieren un papel relevante en la cascada de señalización dependiente de *BIR1*, asociada tradicionalmente a infecciones por patógenos extracelulares como hongos y bacterias, en la defensa antiviral.



PL-16-01371

DOS HERRAMIENTAS BIOINFORMÁTICAS PARA EL ANÁLISIS DE GENOMAS DE BACTERIAS FITOPATÓGENAS

Martínez-García P.M.¹, Ramos C.¹, Río-Álvarez I.², Rodríguez-Herva J.J.², De Vicente A.¹, López-Solanilla E.², Rodríguez-Palenzuela P.²

- 1) Área de Genética, Facultad de Ciencias, Instituto de Hortofruticultura Subtropical y Mediterránea 'La Mayora', Universidad de Málaga, Consejo Superior de Investigaciones Científicas (IHSM-UMA-CSIC), 29071, Málaga
- 2) Centro de Biotecnología y Genómica de Plantas (CBGP), Universidad Politécnica de Madrid-Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria, Parque Científico y Tecnológico de la UPM. Campus de Montegancedo, Pozuelo de Alarcón, 28223, Madrid

Los avances en tecnología de secuenciación han supuesto una considerable reducción en costo y tiempo a la hora de obtener genomas bacterianos completos. Es cada vez más frecuente, pues, secuenciar los genomas de las cepas bacterianas que son de particular interés, creciendo a su vez la necesidad de desarrollar herramientas computacionales para el análisis de las secuencias obtenidas. En lo que a bacterias patógenas se refiere, son de especial relevancia herramientas de detección de genes implicados en virulencia. En este contexto presentamos TTFShunter y ViRfAt, dos aplicaciones bioinformáticas que tienen como objeto facilitar la identificación genómica del arsenal de virulencia de bacterias secuenciadas.

TTFShunter (<http://bacterial-virulence-factors.cbgp.upm.es/ttfsHunter>) es una herramienta online de predicción de sistemas de secreción de tipo III, IV y VI (T3SS, T4SS y T6SS, respectivamente). Mediante exhaustivas búsquedas en la bibliografía científica, se construyó una base de datos de las secuencias genómicas correspondientes a los distintos componentes de los T3SS, T4SS y T6SS. Dada la secuencia de ADN de un genoma bacteriano, TTFShunter hace uso de la base de datos anterior para localizar regiones enriquecidas en dichos componentes. ViRfAt es también una aplicación web, en este caso de anotación de factores genómicos asociados a virulencia en planta. ViRfAt busca en genomas bacterianos una batería de factores de virulencia que incluye efectores, fitotoxinas, antibióticos, enzimas extracelulares, hormonas vegetales, adhesinas o sideróforos. Estos factores están incluidos en una base de datos manualmente curada, en cuya elaboración han participado diversos grupos de investigación nacionales expertos en bacterias fitopatógenas.

Ambas herramientas presentan una sencilla interfaz web fácil de utilizar, donde una vez analizado el genoma de entrada los resultados se presentan gráficamente a través de un documento HTML intuitivo y fácilmente interpretable. TTFShunter y ViRfAt representan dos herramientas de gran ayuda a microbiólogos para la identificación de factores bacterianos de virulencia en planta.

Este trabajo ha sido financiado por el proyecto AGL2011-30343-C02-01 del Ministerio de Economía y Competitividad y el Campus de Excelencia Internacional Andalucía Tech.

Resúmenes de comunicaciones orales

*Sesión simultánea 1:
Etiología y Diagnóstico I
(SIM1-1 a SIM1-6)*





SIM1-1-01442

PUESTA A PUNTO DE UNA POLISONDA PARA LA DETECCIÓN SIMULTÁNEA DE 13 VIRUS Y 5 VIROIDES QUE AFECTAN AL CULTIVO DE LA VID

Sánchez-Navarro J.A.¹, Fiore N.³, Sánchez-Diana N.⁴, Marín M.⁵, Pallás V.¹

1) Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas (CSIC-UPV). 46022 Valencia

2) Instituto Agroforestal Mediterráneo (IAM), Universidad Politécnica de Valencia (UPV). 46022 Valencia

3) Departamento de Sanidad Vegetal, Universidad de Chile. 11315 Santiago de Chile

4) Escuela de Viticultura y Enología. 46340 Requena, Valencia.

5) Laboratorio Regional de La Rioja. Logroño.

El cultivo de la vid se ve afectado por diversos patógenos de origen viral y/o viroidal tales como: *Grapevine fanleaf virus* (GFLV), *Grapevine leafroll associated virus 1, 2, 3, 4, 5 y 6* (GLRaV-1, -2, -3, -4, -5, y -6), *Grapevine virus A* (GVA), *Grapevine rupestris vein feathering virus* (GRVfV), *Arabidopsis mosaic virus* (ArMV), *Grapevine fleck virus* (GFkV), *Grapevine virus B* (GVB), *Grapevine rupestris stem pitting-associated virus* (GRSPaV), *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).

Tradicionalmente, los ensayos de infección viral en vid se han basado en el bioensayo o la técnica serológica ELISA. Sin embargo, ambas técnicas presentan claros inconvenientes relacionados con el espacio/tiempo requerido, la incapacidad de identificar el patógeno (bioensayos) o la ausencia de anticuerpos contra importantes patógenos. En el presente trabajo hemos desarrollado tres polisondas para la detección de 5 viroides (poli5: HSVd, CEVd, AGVd, GYSVd-1 y GYSVd-2), 13 virus (poli13: GLRaV-1, -2, -3, -4, -5, -6, GFLV, GFkV, ArMV, GVA, GRVfV, GVB y GRSPaV) o todos los virus y viroides (poli18). El límite de detección de las polisondas (5-1 pg/μl de RNA viral/viroidal) fue similar para todos los patógenos y comparable al obtenido con las correspondientes sondas individuales. El análisis de 142 muestras de vid (sarmientos) permitió comprobar que todos los positivos obtenidos con las sondas individuales fueron detectados por las correspondientes polisondas. Los porcentajes de infección obtenidos fueron: GLRaV-1 (9,1), -2 (39,4), -3 (19,1), -4 (0,0), -5 (8,4) -6 (7,7), GFLV (23,9), GFkV (36,6), ArMV (2,8), GVA (12,7), GVB (3,5), GRSPaV (18,3), GRVfV (92,2), CEVd (0,0), HSVd (100), GYSVd-1 (89,4) y AGVd (0,7). El análisis comparado con el ensayo ELISA para 5 virus puso de manifiesto porcentajes de infección similares (GLRaV-3), superiores (GLRaV-1: 16,2; ArMV: 4,2) o inferiores (GFLV: 23,9; GFkV: 36,6) a los obtenidos con la técnica molecular.



SIM1-2-01531

DIVERSIDAD Y COMPLEJIDAD DE LAS POBLACIONES NATURALES DE *Botrytis cinerea* EN LOS VIÑEDOS DE CASTILLA Y LEÓN

Acosta W.¹, Costa T.M.M.¹, Durantez V., Pérez-Benito E.¹

1) Universidad de Salamanca

Botrytis cinerea (teleomorfo *Botryotinia fuckleiana*) es un hongo fitopatógeno necrotrofo que infecta más de 200 especies vegetales. Es el agente responsable de la “podredumbre gris” en numerosas especies de gran importancia económica, entre ellas la vid, *Vitis vinifera*. En Castilla y León el cultivo de la vid y la industria del vino han adquirido una enorme relevancia a lo largo de las últimas décadas. A pesar de la importancia de la enfermedad y de las pérdidas que determina año tras año, en particular si en las semanas previas a la vendimia se producen lluvias moderadas o intensas y temperaturas suaves, no existen trabajos centrados en la descripción de las poblaciones del patógeno presentes en los viñedos de Castilla y León.

Durante los últimos años nuestro grupo ha generado una colección de aislados muy numerosa representativa de las poblaciones naturales de *B. cinerea* de nuestros viñedos. Una muestra integrada por 275 aislados está siendo caracterizada desde las perspectivas fisiológica y genética. Los análisis en curso son indicativos de una población integrada por individuos de características fisiológicas muy distintas, en particular en relación con su capacidad para infectar a las variedades blancas y tintas de vid (y a la judía), y muy diversa en términos genéticos. Se han obtenido evidencias de que tanto la reproducción asexual como la reproducción sexual tienen lugar en campo y de que la diversidad genética en la población se organiza sin una estructura evidente, si bien el criterio geográfico impone un cierto nivel de estructuración, pequeño, pero no despreciable. Hemos podido describir, además, por primera vez en España la presencia de aislados de la especie *B. pseudocinerea* y de aislados de *B. cinerea* tipo S. Estas descripciones pueden ayudar a comprender la dinámica de las poblaciones del patógeno en campo y a diseñar estrategias de control apropiadas.

Este trabajo ha sido financiado por fondos del Instituto Tecnológico Agrario de Castilla y León (ITACyL SA-02-C2-1) y MINECO (proyecto AGL2012-39876-C02)



SIM1-3-01592

Tomicus piniperda*, PRINCIPAL VECTOR DE *Fusarium circinatum* EN EL NORTE DE ESPAÑA*Bezós D., Martínez-Álvarez P., Díez J.J., Fernández M.M.**

Instituto Universitario de Gestión Forestal Sostenible Universidad de Valladolid-INIA

E-mail: dianabezós@yahoo.es

Fusarium circinatum, agente causante de la enfermedad del chancro resinoso del pino (CRP), afecta actualmente a plantaciones de *Pinus radiata* en el norte de la Península Ibérica, provocando la aparición de chancros con abundante producción de resina. *Fusarium circinatum* necesita una herida para infectar al árbol, como son las provocadas por insectos. Especies de la Subfamilia Scolytinae, como por ejemplo *Pityophthorus pubescens* o *Hylurgops palliatus* entre otros, ya han sido descritas como vectores de este patógeno, aunque se desconoce el papel de *Tomicus piniperda* en la dispersión de esta enfermedad. Los objetivos de este trabajo son: (1) conocer la presencia de *Fusarium circinatum* en ramillos horadados por *T. piniperda* en áreas con chancro resinoso del pino, (2) estudiar la presencia de *F. circinatum* en el cuerpo de *T. piniperda*, (3) evaluar la capacidad de transmisión del CRP por *T. piniperda* en condiciones controladas en el laboratorio y (4) establecer la asociación existente entre *F. circinatum* y *T. piniperda* en relación a sus ciclos biológicos. Para ello se recogieron del suelo ramillos con galería de alimentación del insecto, galerías de cría en troncos atacados y se establecieron trampas multiembudo cebadas con etanol y α -pineno en parcelas de *P. radiata* afectadas por la enfermedad. También se dispuso un experimento en laboratorio en el que especímenes de *T. piniperda* fueron inoculados con el patógeno previamente a su alimentación en ramillos. *Fusarium circinatum* fue aislado tanto de los ramillos recogidos en campo (especialmente durante otoño e invierno) y de las galerías de cría, así como de los insectos recogidos del interior de las galerías y de los embudos. Además, mediante la experimentación en laboratorio se comprobó la capacidad de inocular la enfermedad en ramillos sanos por individuos de *T. piniperda* previamente inoculados con el patógeno. Estos resultados ponen de manifiesto la importante asociación existente entre *F. circinatum* y *T. piniperda*. Esta especie de escolítido es un firme candidato a ser el principal vector de la enfermedad en la zona de estudio ya que se comporta como una plaga primaria en copas, transmitiendo la enfermedad desde los troncos afectados por la enfermedad a las copas de árboles sanos.



SIM1-4-01583

DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE NUEVAS SONDAS DE PCR A TIEMPO REAL PARA LA DETECCIÓN DE *Phytophthora* spp. EN CARRASCALES MEDITERRÁNEOS

Catalá S.¹, Berbegal M.¹, Pérez-Sierra A.M.¹, Abad-Campos P.¹

1) Instituto Agroforestal Mediterráneo-Universitat Politècnica de València, Camino de Vera s/n, Valencia.

E-mail: pabadcam@eaf.upv.es

El decaimiento y muerte de *Quercus ilex*, fenómeno habitualmente denominado “seca de la encina”, es el principal problema fitosanitario de esta especie forestal. Durante décadas, este decaimiento se ha asociado a *Phytophthora cinnamomi* en suelos silíceos en el Suroeste español. Sin embargo, otras especies del mismo género como *P. quercina* y *P. psychrophila* se han asociado al decaimiento de *Quercus* en el Este de la Península, donde predominan los sustratos básicos. Los problemas ambientales y económicos crecientes asociados a *Phytophthora* spp. en ecosistemas naturales ponen de manifiesto la necesidad de desarrollar métodos eficaces y rápidos capaces de detectar estos patógenos. Con este objetivo, se han diseñado nuevas sondas de PCR a tiempo real para la detección de *P. quercina* y una especie de *Phytophthora* no cultivada, asociada a la presencia de carrascas sintomáticas, que se ha denominado de forma provisional como *P. taxon ballota*. La especificidad de las sondas se ha testado con ADNs de cultivos puros, y se han aplicado en muestras ambientales de suelos y raíces. La mayoría de las muestras analizadas procedentes de árboles sintomáticos resultaron positivas para una o ambas especies. Para la validación de los resultados, se ha pirosecuenciado de forma individual cada una de las muestras ambientales estudiadas. Los resultados revelaron una alta correlación entre los valores de corte (CT) en la PCR a tiempo real y el número de secuencias generadas por pirosecuenciación. Ambas técnicas mostraron una elevada sensibilidad en la detección. Sin embargo, en ciertas situaciones observadas en los resultados de PCR a tiempo real, como la presencia de curvas exponenciales tardías o la producción de un incremento no exponencial de la fluorescencia, la secuenciación masiva resultó de especial interés para confirmar la presencia/ausencia de las especies de *Phytophthora* en las muestras ambientales analizadas. Las nuevas sondas desarrolladas podrán utilizarse en el estudio de la implicación de *Phytophthora* spp. asociadas al decaimiento de *Quercus* en carrascales mediterráneos.

Esta investigación ha sido financiada por el Ministerio de Ciencia e Innovación (AGL2011-30748-C01).



SIM1-5-01340

DIAGNÓSTICO Y DISTRIBUCIÓN DE NEMATODOS LONGIDÓRIDOS EN OLIVO CULTIVADO Y SILVESTRE EN ANDALUCÍA**Archidona A.J.¹, Navas-Cortés J.A.¹, Cantalapiedra C.¹, Castillo P.¹**

1) Instituto de Agricultura Sostenible, Consejo Superior de Investigaciones Científicas

Las infecciones de olivo por nematodos fitoparásitos se han asociado con reducciones del crecimiento y vigor de la planta en varios países de la Cuenca Mediterránea. Sin embargo, no existen estudios sistematizados sobre la importancia y ecología de nematodos fitoparásitos que infectan/infestan olivar en Andalucía, así como sobre los factores climáticos, agronómicos o del cultivo, que determinan su distribución e interacción con la Verticilosis.

En este trabajo se han realizado prospecciones fitonematológicas sistematizadas en 60 de las 69 zonas biológicas de las ocho provincias Andaluzas establecidas por la Red de Información y Alerta Fitosanitaria del olivar de Andalucía, que delimita áreas de cultivo de olivar con características homogéneas de clima, orografía, hidrología, paisaje, etc., así como zonas de vegetación natural de olivo silvestre. Se han identificado infestaciones por más de un centenar de especies de nematodos fitoparásitos pertenecientes a diferentes grupos tróficos de los cuales, uno de los grupos con mayor extensión y biodiversidad fue el de los ectoparásitos migratorios del grupo de longidóridos que incluye los géneros *Longidorus* (10 especies) y *Xiphinema* (24 especies). La integración de caracterizaciones convencionales (morfológicas y morfométricas) junto con análisis moleculares y filogenéticos basados en ADN ribosómico (fragmentos D2-D3 del gen 28S, 18S, región ITS), y con análisis de datos multivariantes han demostrado una elevada diversidad críptica (especies morfológicamente indistinguibles pero filogenéticamente distantes) en el complejo del grupo *Xiphinema americanum* que comprende alrededor de 60 especies cosmopolitas y de difícil identificación. El diagnóstico preciso en este grupo es particularmente importante por incluir especies de cuarentena (grupos EPPO A1 y A2) y vectores de virus vegetales de importancia económica.

Este trabajo demuestra la importancia, distribución y diversidad de nematodos fitoparásitos en olivo en Andalucía así como la necesidad de integración de diferentes abordajes para el diagnóstico rápido y preciso de los mismos. La información generada permitirá determinar los mecanismos potenciales de dispersión de estos agentes y los factores que facilitan y/o determinan sus ataques en olivar, lo que facilitará el desarrollo y aplicación de estrategias eficientes para su manejo integrado.

Investigación financiada por AGL2012-37521-MINECO, ArimNET_ERANET-219262-INIA, P12-AGR 1486-CICE, y fondos FEDER (EU)



SIM1-6-01589

EVALUACIÓN DEL MANEJO FITOSANITARIO DEL OIDIO EN VIÑEDO

Ana M. Díez-Navajas, Amaia Ortiz-Barredo.

NEIKER-Tecnalia. Dpto. Producción y Protección Vegetal. Apdo. 46. E-01080 Vitoria-Gasteiz. adiez@neiker.net

El oidio de la vid, provocado por el ascomiceto *Erysiphe necator*, es un microorganismo endémico en viñedos con clima mediterráneo y oceánico templado. Su instalación en el racimo causa un aumento en el porcentaje de bayas de reducido tamaño, altera la relación de carbohidratos en el desarrollo de éstas y una elevada afección provoca grietas en la cutícula que conduce a la reducción del nivel hídrico en baya. El mosto y vino producidos de estos racimos muestran alteraciones que los deprecian respecto a uva libre de infección.

El control de la enfermedad en estadios tempranos supone una disminución en la presión infectiva del inóculo a lo largo de la campaña, lo que facilitaría su control y la disminución del número de aplicaciones fitosanitarias.

Con este fin, se analizaron diferentes metodologías para el control del oidio en viñedos de Rioja Alavesa que se compararon con la aplicación de tratamientos por parte del agricultor. (a) Se evaluó el riesgo de enfermedad emitido por una estación meteorológica, en base a los parámetros de humedad y temperatura, y (b) se comparó este riesgo con las poblaciones de esporas del hongo capturadas mediante dispositivos pasivos. Por otro lado, (c) se evaluaron diferentes fechas establecidas, siguiendo los métodos de Thomas *et al* (1994) y Carisse *et al* (2009), mediante el sumatorio de grados-día, a partir del estado fenológico de hoja expandida.

Los riesgos de enfermedad emitidos por la estación se ajustan a la aparición de esporas en el viñedo, y el momento de tratamiento podría ajustarse mejor en base al riesgo emitido. La fecha para la aplicación del primer tratamiento se ajusta mejor al método propuesto por Thomas *et al*, aunque requiere de ciertos ajustes.

La combinación de las tres metodologías supondría un mejor control del patógeno y una reducción de costes e insumos aportados al viñedo.

Resúmenes de comunicaciones orales

*Sesión simultánea 2:
Interacción Planta-Microorganismo I
(SIM2-1 a SIM2-6)*





SIM2-1-01219

SECUENCIA DEL GENOMA DE UNA CEPA ESPAÑOLA DE *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni* AISLADA DE ALMENDROGarita-Cambronero J.¹, Sena M.¹, Palacio-Bielsa A.², Cubero J.¹

1) Laboratorio de Bacteriología. Departamento de Protección Vegetal, Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA)

2) Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria de Aragón (CITA)

Xanthomonas arboricola pv. *pruni* (*Xap*), organismo de cuarentena en la UE, es el agente causal de la mancha bacteriana de frutales de hueso, almendro y ornamentales del género *Prunus*. En España se identificó por primera vez en 2002. Actualmente, la mancha bacteriana de los *Prunus* se considera una enfermedad emergente a nivel español y europeo.

En trabajos anteriores se caracterizó molecular y fenotípicamente una colección de cepas españolas de *Xap*. Una de ellas, CITA33 (aislada de almendro), se seleccionó como representativa de las cepas españolas, con el objetivo de realizar estudios comparativos con otras cepas de *Xap* así como con cepas de otros patovares de *X. arboricola*.

El genoma de CITA33 se obtuvo mediante la tecnología Ion Torrent. El ensamble *de novo* se realizó con el programa informático CLC Genomics Workbench 7.0, obteniéndose una secuencia de 5.104.864 pb (G+C, 65,43%), contenida en 501 "contigs". La anotación automática, se llevó a cabo mediante tres plataformas distintas (BASys, RAST, "Prokaryotic Genome Annotation Pipeline") y la predicción de los ARNr y ARNt mediante los programas RNAmmer 1.2 y tRNAscan-SE 1.2.1. De esta manera, se detectaron 4.348 secuencias codificantes, 3 ARNr y 50 ARNt, que representan 436 subsistemas. El análisis comparativo del ARNr 16S mediante BLASTn detectó 99-100% de similitud con otras especies de *Xanthomonas*. Asimismo, la comparación del genoma completo determinó que la secuencia obtenida tiene un 99% de similitud con las secuencias preliminares de tres genomas de *Xap* (MAFF301420, MAFF301427 y MAFF31562).

La información generada en este estudio contribuirá a una mejor comprensión de los mecanismos moleculares de la interacción planta-*Xap*, así como a la determinación de las relaciones existentes entre CITA33 y otras cepas españolas de *Xap* consideradas atípicas cuya secuenciación y análisis se está llevando a cabo actualmente.

Trabajo financiado por el Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria, proyecto RTA2011-00140-C03-02.



SIM2-2-01306

ANÁLISIS DE LOS GENOMAS DE DOS CEPAS DE *Pseudomonas* spp. ENDOFITAS NATURALES DE RAÍCES DE OLIVO (*Olea europaea* L.) Y EFICACES AGENTES DE CONTROL BIOLÓGICO DE LA VERTICILOSIS

Martínez-García P.M.¹, Schiliro E.², Gómez-Lama C.², Ruano-Rosa D.², Rodríguez-Palenzuela P.³, Mercado-Blanco J.²

1) Instituto de Hortofruticultura Subtropical y Mediterránea "La Mayora" (IHSM-UMA-CSIC)

2) Instituto Agricultura Sostenible (CSIC) 3) Centro de Biotecnología y Genómica de Plantas (UPM- INIA)

Pseudomonas fluorescens PICF7 y *Pseudomonas putida* PICP2 son dos cepas efectivas en el control biológico de la Verticilosis (*Verticillium dahliae* Kleb.), una de las enfermedades más devastadoras que afectan al olivar. Además, las cepas PICF7 y PICP2 pueden colonizar endofíticamente las raíces de olivo, estableciéndose de forma estable en los espacios intercelulares del córtex radical, incluso de forma simultánea. Sin embargo, nada se sabe de los determinantes bacterianos implicados en su actividad de biocontrol, ni de aquellos involucrados en el desarrollo de un estilo de vida endofítico. En este estudio hemos secuenciado y anotado los genomas completos de las cepas PICF7 (1 'contig', 6,14 Mpb) y PICP2 (63 'contigs', 5,60 Mpb). Se ha efectuado un análisis bioinformático comparativo dirigido a identificar genes que puedan estar implicados en (1) control biológico, (2) interacción planta-bacteria y (3) endofitismo. Este análisis ha revelado que, entre otros determinantes ampliamente estudiados como involucrados en biocontrol y/o interacción planta-bacteria, el genoma de la cepa PICF7 potencialmente codifica para dos sistemas de secreción T6SS y otro T3SS, los efectores T3SS avrE1 y hopB1, los sideróforos pioverdina y pioquelina, factores de adhesión y MDR, diversos enzimas degradadores de la pared celular vegetal (proteasa, celulasa y lipasa), así como sistemas de destoxificación tales como CopA, KatB, Dps y Cbb. Por el contrario, el genoma de PICP2 mostró, entre otras diferencias, ausencia de regiones codificantes para el sistema de tipo T3SS. Algunos de estos fenotipos se han comprobado mediante los correspondientes ensayos bioquímicos y microbiológicos. La disponibilidad de ambos genomas puede ayudar a comprender tanto la actividad de biocontrol como el modo de vida endófito que ambas cepas son capaces de desarrollar.

Financiado por los proyectos P07-CVI-02624 y P12-AGR667 de la Junta de Andalucía, con cofinanciación FEDER de la UE, y el Campus de Excelencia Internacional Andalucía Tech.



SIM2-3-01455

PAPEL DEL c-di-GMP EN LA VIRULENCIA DE LA BACTERIA PATÓGENA DE OLIVO *P. savastanoi* pv. *savastanoi* NCPPB 3335**Aragón I.M.¹, Pérez D.², Gallegos M.T.², Ramos C.¹**

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

2) Departamento 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 (PDE) específicas. La actividad DGC es dependiente de un dominio proteico GGDEF, mientras que la actividad PDE está asociada con dominios EAL. El objetivo principal de este trabajo ha sido estudiar el papel del este segundo mensajero en fenotipos relacionados con la virulencia en la cepa patógena de olivo *P. savastanoi* pv. *savastanoi* NCPPB 3335. Para ello se llevaron a cabo los siguientes abordajes en este patógeno: 1) Estudiar las respuestas debidas a la sobreexpresión de la DGC de *Caulobacter crescentus*, PleD*; 2) Determinar el papel en virulencia de una DGC (DgcP) y una PDE (BifA) codificadas en el genoma de NCPPB 3335. En todos los casos se observó que la alteración de los niveles de c-di-GMP tenía un efecto sobre la movilidad tipo *swimming*, la producción de EPS, la formación de biofilm, y el desarrollo de síntomas causados por esta bacteria en planta de olivo micropropagadas *in vitro*, y en planta de olivo leñosas.

Este trabajo ha sido financiado por el proyecto AGL2011-30343-CO2-01 del Plan Nacional I+D del Ministerio de Economía y Competitividad y cofinanciado con fondos FEDER (UE).



SIM2-4-01550

SUPRESIÓN DE LA RESPUESTA DE DEFENSA DISPARADA POR EFECTORES DE LA FAMILIA HopZ DE *Pseudomonas syringae*

Rufián J.S.¹, Lucía A.¹, Martín C.¹, Macho A.P.², Zumaquero A.¹, Ruiz J.¹, Beuzón C.¹

1) Instituto de Hortofruticultura Subtropical y Mediterránea, Universidad de Málaga, Consejo Superior de Investigaciones Científicas (IHSM-UMA-CSIC)

2) The Sainsbury Laboratory

El sistema de secreción tipo III permite a las bacterias fitopatógenas superar las respuestas de defensa de la planta mediante la translocación de efectores tipo III (T3E) al interior de la célula vegetal. Jones y Dangl en 2006 propusieron el modelo de zig-zag, que ha sido aceptado universalmente como patrón de evolución de los efectores bacterianos y la resistencia de las plantas. Sin embargo, la evolución de familias de efectores es raramente explicada teniendo en cuenta que la presión negativa debida a un disparo de defensa ETI (Effector Triggered Immunity) en un hospedador puede ser compensada por una actividad supresora de ETI de un efector de la misma estirpe.

La familia de efectores HopZ de *P. syringae* es una de las más diversas y mejor caracterizadas desde un punto de vista evolutivo. Esta familia muestra una alta tasa de transferencia horizontal entre patovares, y pequeños cambios en las secuencias de sus miembros permiten evitar el reconocimiento por parte de la planta sin alterar su función, un proceso llamado patoadaptación (Ma et al., 2006).

Nuestros resultados muestran que ciertos efectores de la familia HopZ no disparan inmunidad en sus respectivos patosistemas, mientras que su mutación normalmente provoca una pequeña atenuación en el crecimiento bacteriano. Sin embargo, la expresión heteróloga de esos efectores produce una respuesta de defensa en el mismo hospedador, indicando que el hospedador puede detectar su presencia y activar la inmunidad. De esta forma, la estirpe que codifica el efector HopZ impide el disparo de inmunidad probablemente mediante la actividad de supresión de otros efectores. Identificamos los efectores que suprimen la resistencia disparada por HopZ3 y proponemos la supresión cruzada de ETI como una fuerza alternativa que dirige la evolución de la familia de efectores HopZ.



SIM2-5-01613

PAPEL DE LOS PLÁSMIDO pEI70 Y pEA29 DE *Erwinia amylovora* EN LA EXPRESIÓN DE GENES CROMOSÓMICOS DURANTE EL DESARROLLO DE LOS SÍNTOMAS EN PERA INMADURA**Barbé S.¹, García F.², Conesa A.², Cock P.J.A.³, Pritchard L.³, Hedley P.E.³, Morris J.A.⁴, López M.M.¹, Llop P.¹**

¹Centro de Protección Vegetal y Biotecnología, Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA), 46113, Moncada, Valencia, España; ²Departamento de Bioinformática y Genómica, Centro de Investigaciones Príncipe Felipe (CIPF), 46012, Valencia, España; ³Plant Pathology Programme, The James Hutton Institute, Invergowrie, Dundee DD2 5DA, UK; ⁴Genetics Programme, The James Hutton Institute, Invergowrie, Dundee DD2 5DA, UK

Erwinia amylovora es el agente causal del fuego bacteriano y la secuenciación de diferentes cepas de esta especie ha demostrado que es muy homogénea genéticamente, y que la escasa diversidad observada radica principalmente en el diferente contenido plasmídico. Se han descrito siete plásmidos en las cepas patógenas y se ha demostrado que los plásmido pEA29 y pEI70 están implicados en la virulencia, ya que, al introducirlos en cepas que no los contienen e inocularlas en material vegetal, producen síntomas más rápidos e intensos que las cepas sin plásmidos. Por ello, se ha querido comprobar el efecto que estos dos plásmidos producen en la expresión de genes cromosómicos de la bacteria en su interacción con la planta, estudiando las diferencias en la expresión de genes de una cepa portadora del pEA29, la misma cepa sin plásmidos y transformada con el pEI70. El material estudiado ha sido el exudado producido en la infección en pera inmadura utilizando un *microarray* comercial con sondas del cromosoma de la cepa ATCC 49946 de *E. amylovora* y de los plásmidos pEA29, pEI70, pEA72, pEL60 y pEU30. Con los datos obtenidos se han realizado estudios de expresión diferencial entre las tres cepas, así como un análisis funcional basado en los términos GOs para obtener una respuesta biológica a la presencia de cada plásmido en la bacteria. Los resultados han mostrado que en la cepa con pEA29 el 2,16% de los genes cromosómicos evaluados (75 genes) estaban sobreexpresados, y el 7.79% (271 genes) estaban reprimidos, mientras que la presencia del pEI70 produjo la sobreexpresión del 2.5% de los genes (87 genes) y la represión de 138 genes (3.97%). El análisis funcional reveló que los genes diferencialmente expresados se podían agrupar en 11 categorías funcionales, siendo las más numerosas las relacionadas con el transporte, el metabolismo y proteínas hipotéticas.

* Este trabajo ha sido financiado por el Ministerio de Ciencia e Innovación (proyecto CYCIT AGL2008-05723-Co2-01/AGR), el Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente y el Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias.



SIM2-6-01314

ESTUDIO FUNCIONAL DE LAS MCPs ESPECÍFICAS IMPLICADAS EN EL PROCESO DE ENTRADA EN LA PLANTA A TRAVÉS DE HERIDAS

Muñoz-Gómez C.¹, Río-Alvarez I.¹, Navas M.J.¹, Martínez P.M.², Rodríguez-Palenzuela P.¹, López-Solanilla E.¹

1) Centro de Biotecnología y Genómica de Plantas. Departamento de Biotecnología. Universidad Politécnica de Madrid.

Campus de Montegancedo, Pozuelo de Alarcón, 28223, Madrid, Spain

2) Área de Genética, Facultad de Ciencias, Universidad de Málaga, Instituto de Hortofruticultura Subtropical y Mediterránea

"La Mayora" (CSIC), E-29071 Málaga, Spain

La quimiotaxis es la capacidad que tienen algunas bacterias para moverse hacia o en contra de un gradiente químico, y está implicada en el proceso de entrada de las bacterias a través de heridas en la planta. Las proteínas aceptoras de metilo o MCPs son los quimiorreceptores que detectan la presencia de ciertas sustancias químicas y alteran la función flagelar.

Nuestro laboratorio está interesado en el estudio funcional de las MCPs de *Dickeya dadantii* 3937 (*Dd3937*) y *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (*Pto*) implicadas en el proceso de entrada a través de heridas.

Análisis bioinformáticos previos en nuestro laboratorio nos han permitido identificar un total de 47 MCPs en el genoma de *Dd3937*. Del análisis de los dominios de unión a ligando de dichas MCPs hemos seleccionado un grupo de quimiorreceptores posiblemente implicados en la percepción de compuestos de plantas.

En respuesta a heridas, las plantas activan rutas de defensa mediadas por moléculas lipídicas denominadas oxilipinas, como por ejemplo el ácido jasmónico. En nuestro laboratorio estamos realizando ensayos de entrada de *Pto* y de *Dd3937* WT en diversas líneas de plantas transgénicas de *Arabidopsis thaliana* y de patata afectadas en la síntesis de lipoxigenasas y dioxigenasas, que son dos de las actividades enzimáticas implicadas en la síntesis de oxilipinas. El mismo tipo de ensayos se llevará a cabo con las cepas afectadas en MCPs. Presentaremos los resultados obtenidos con los mutantes afectados en estas proteínas respecto a su comportamiento quimiotáctico y a su capacidad de entrada en plantas. La información obtenida nos permitirá delimitar los posibles compuestos detectados por las MCPs analizadas.

Este trabajo ha sido financiado por el proyecto AGL2012-32516 del Ministerio de Ciencia e Innovación.

Resúmenes de comunicaciones orales

*Sesión simultánea 3:
Interacción Planta-Microorganismo II
(SIM3-1 a SIM3-6)*





SIM3-1-01406

THE MOVEMENT PROTEIN OF *Cucumber mosaic virus* (CMV) DETERMINES SYSTEMIC INFECTION IN THE MELON ACCESSION PI161375Guiu-Aragonés C.¹, Diaz-Pendón J.A.², Peña E.³, Heinlein M³, Martín-Hernández A.M.¹

- 1) IRTA-Centre for Research in Agricultural Genomics CSIC-IRTA-UAB-UB (CRAG), Campus UAB, Edifici CRAG, Bellaterra (Cerdanyola del Vallès), 08193 (Barcelona), Spain
- 2) 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, Spain.
- 3) Institut de Biologie Moléculaire des Plantes, UPR 2357, Centre National de la Recherche Scientifique, Strasbourg 67084, France.

The exotic melon accession PI161375 shows a complex mixture of qualitative and quantitative resistance to CMV infection, depending on the strain. Previously, we had reported the presence of a recessive gene (*cmv1*) in the linkage group XII conferring total resistance to CMV a set of strains, but not to others (Essafi et al., 2009). Strains of the first group are not able to complete the infectious cycle in presence of *cmv1*, whereas those of the second group can infect systemically.

Using infectious clones of strains CMV-LS (first group) and CMV-FNY (second group) we have made combinations between RNAs of both strains showing that the determinant of the virulence is located in RNA3. Chimaeras between CMV-FNY and CMV-LS have showed that the determinant of the virulence is in the N-terminal 209 amino acids of the movement protein (MP). By site-directed mutagenesis, we have identified four specific positions that confer to LS the ability to overcome *cmv1*-mediated resistance when exchanged for the corresponding FNY residues.

We have also analysed the mechanisms of the resistance provided by *cmv1*. The strain CMV-LS is able to replicate and to move cell to cell in the inoculated leaf of the resistant line. However, it is not able to invade the sieve elements since we haven't been able to detect the virus in the phloem of the resistant line. Moreover, by "in situ" hybridization, we have observed that the virus does not invade the phloem cells. Our current work is focused on identifying by electron microscopy the cell type of the phloem tissue where the virus invasion is interrupted.

Altogether, our results demonstrate that resistance determined by *cmv1* involves interruption of the virus entry into the vascular system and therefore, inability to develop a systemic infection.



SIM3-2-01506

LA PROTEÍNA P23 DEL VIRUS DE LA TRISTEZA DE LOS CÍTRICOS INTERACCIONA EN PLANTA CONSIGO MISMA Y CON LA GLICERALDEHÍDO 3-FOSFATO DESHIDROGENASA DEL HUÉSPEDRuiz-Ruiz S.¹, Spàno R.¹, Davino S.¹, Navarro L.², Moreno P.², Peña L.², Flores R.¹

1) Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas, Consejo Superior de Investigaciones Científicas-Universidad Politécnica de Valencia

2) Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias, Moncada, Valencia

El virus de la tristeza de los cítricos (CTV), género *Closterovirus*, codifica tres supresores del silenciamiento mediado por RNA en *Nicotiana* spp.. Una de ellos, p23, de 209 aminoácidos con un dedo de Zn flanqueado por motivos básicos, muestra afinidad por RNA y se acumula en nucléolo, cuerpos de Cajal y plasmodesmos. Además, p23 regula la acumulación asimétrica de los RNAs virales (+) y (-) y, al expresarla ectópicamente como un transgén en especies del género *Citrus*, induce síntomas similares a los de CTV. Para identificar proteínas del huésped con las que pudiera interactuar CTV-p23, rastreamos una genoteca de expresión de *N. benthamiana* (donde CTV se replica y causa infección sistémica sintomática) empleando el sistema de doble híbrido de levadura (Y2H). El cribado inicial identificó la gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) y una proteína con dominio transducina/WD40, cuyas interacciones con p23 se confirmaron por ensayos Y2H individualizados. Datos previos indican que la GAPDH (una enzima glicolítica) es co-optada por un tombusvirus para transformar las células del huésped en una factoría viral, sugiriendo que algo similar pudiera ocurrir con CTV. Para confirmar la interacción de GAPDH con p23, realizamos ensayos *in planta* mediante complementación por fluorescencia bimolecular (BIFC), incluyendo tres versiones truncadas de p23 (p23Δ50-86, p23Δ100-209, p23Δ158-209), y dos mutantes de sustitución por alanina en el dedo de Zn (p23-C68/C71/H75/C85) y en un dominio básico (p23-R143/K145/R147/R150/R151/R155). CTV-p23 mostró interacción consigo misma (una propiedad hasta ahora desconocida), confirmandose su localización en nucléolo, cuerpos de Cajal y plasmodesmos. Por otra parte, la interacción de GAPDH con p23 (en el citoplasma formando agregados y en plasmodesmos), solo se mantuvo en los mutantes p23Δ158-209 y p23C68/C71/H75/C85, indicando que la región C-terminal no está implicada en dicha interacción, al contrario de lo que sucede con los dominios básicos delimitados por las posiciones 50-86 y 143-155



SIM3-3-01187

DOS PROTEÍNAS DE ARABIDOPSIS PERTENECIENTES A LA FAMILIA PATELLIN (atPATL3 Y atPATL6) INTERACCIONAN CON LA PROTEÍNA DE MOVIMIENTO DEL VIRUS DEL MOSAICO DE LA ALFALFA E INTERFIEREN CON EL MOVIMIENTO VIRALPeiro A.¹, Izquierdo-Garcia A.C.¹, Sanchez-Navarro J.A.¹, Pallas V.¹, Mulet J.M.¹, Aparicio F.¹¹) Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas (UPV-CSIC). Ingeniero Fausto Elio s/n, 46022 Valencia, Spain

Para establecer una infección sistémica, los virus plantas se mueven a través de los plasmodesmos desde las células inicialmente infectadas a las vecinas hasta alcanzar el sistema vascular. Este movimiento intercelular es un proceso activo que requiere una o más proteínas de movimiento virales (MP) las cuales interactúan con otros factores virales (genoma y otras proteínas) y con proteínas de huésped. En los últimos años toda una serie de trabajos han permitido la identificación de diversas proteínas del huésped que interaccionan con MPs de diferentes virus las cuales en algunos casos favorecen mientras que en otros interfieren la dispersión del patógeno.

En este trabajo se presentan evidencias de la interacción in vivo, entre la MP del virus mosaico de la alfalfa (AMV) (Familia Bromoviridae) y dos proteínas de arabidopsis pertenecientes a una pequeña familia denominada Patellin, en concreto la Patellin 3 y la 6 (atPATL3 y atPATL6, respectivamente). Esta familia comprende 6 miembros que se caracterizan por presentar un dominio denominado Sec14. Las proteínas con dominios Sec14 están implicadas en tráfico de membrana, movimiento del citoesqueleto, metabolismo de lípidos y funciones reguladoras mediadas por lípidos. Nuestros estudios de sobreexpresión transitoria mostraron que ambas proteínas interfieren con la localización en los plasmodesmos de la MP conllevando una disminución del tamaño de los focos de infección. Asimismo, y de acuerdo con esta observación, la acumulación viral aumentó en plantas de arabidopsis *knockout* para atPATL3, atPATL6 y atPATL3-6. En resumen, nuestros resultados indican que la interacción MP-atPATL interfiere con el transporte de la MP hacia el PD lo que disminuye la eficiencia del movimiento célula a célula del AMV.



SIM3-4-01177

THE P25 PROTEIN OF *Potato virus X* IS THE MAIN PATHOGENICITY DETERMINANT RESPONSIBLE FOR SYSTEMIC NECROSIS IN PVX-ASSOCIATED SYNERGISMS

Aguilar E.¹, Almendral D.¹, Allende L.¹, Pacheco R.¹, Del Toro F.J.¹, Chung B.N.², Canto T.¹, Tenllado F.¹

1) Centro de Investigaciones Biológicas CIB-CSIC. Madrid.

2) National Institute of Horticultural & Herbal Science. Agricultural Research Center for Climate Change. Korea

Systemic necrosis (SN) that causes plant death in a few days is the most severe manifestation of viral synergism. In *Nicotiana tabacum*, PVX-potyvirus synergistic interactions show common features, such as i) the presence of a strong RNA silencing suppressor, HC-Pro, as the essential potyviral component involved in SN, and ii) an enhanced accumulation of all PVX RNAs in doubly infected plants. However, in *N. benthamiana*, PVX genomic (g)RNA does not increase greatly, pointing out that the enhancement of pathogenicity is not a consequence of more efficient PVX replication. Our aim was to establish the PVX pathogenicity factor(s) that, in combination with potyviral HC-Pro, could lead to SN.

We made use of *Agrobacterium*-mediated transient co-expression of potyviral and non-potyviral suppressors in combination with PVX, in order to evaluate their necrogenic potential alongside with the accumulation of both, gRNA and sgRNAs. A local HR-like response was associated with a higher accumulation of PVX triple gene block sgRNA, suggesting that the PVX P25 is a pathogenicity determinant involved in SN. As a confirmation of this hypothesis, leaf patches expressing P25 in combination with HC-Pro derived from *Plum pox virus* (PPV), tombusviral P19, closteroviral P23 and cucumoviral 2b, but not with a suppression-defective HC-Pro mutant, resulted in strong production of H₂O₂ and electrolyte leakage, indicatives of necrosis. Furthermore, the expression of P25 by a PPV vector was sufficient to induce an increase of PPV pathogenicity that led to necrotic mottling. A frameshift mutation in the P25 ORF of PVX did not lead to necrosis when co-expressed with either HC-Pro or P19. Finally, we studied the role of P25 as an avirulent determinant and the involvement of its suppressor activity in necrosis. Our data suggest that P25 is the main PVX determinant involved in eliciting a HR-like response in PVX-associated synergisms.

This project was funded by a cooperative grant from the Rural Development Administration (RDA) of the Republic of Korea, in cooperation with the Spanish Council for Scientific Research (CSIC).



SIM3-5-01231

TOMATO PROTEINS INTERACTING WITH THE *Pepino mosaic virus* (PepMV) CAPSID PROTEINRodríguez-Moreno L.¹, Navarro R.¹, Méndez-López E.¹, Ruíz-Ramón F.¹, Aranda M.A.¹

1) Grupo de Patología Vegetal. Centro de Edafología y Biología Aplicada del Segura (CEBAS)-CSIC, Apdo. correos 164, 30100 Espinardo, Murcia (Spain). E-mail: edu.mendez-lopez@cebas.csic.es

Pepino mosaic virus (PepMV; genus *Potexvirus*, family *Alphaflexiviridae*) causes significant economic losses in tomato crops. No good sources of genetic resistance to this virus have been described yet. In order to identify targets to engineer new resistance alleles, we have carried out genetic (Y2H, yeast-two-hybrid) and biochemical (affinity chromatography) screenings to identify tomato proteins that interact with the PepMV capsid protein (CP). For the Y2H, a PepMV-infected tomato cDNA normalized library was built and screened against the CP, providing three different interacting proteins in addition to the CP itself: a Glutathione-S-transferase (GST), a Receptor-like serine/threonine kinase (STK) and a Ribosomal protein L13 (L13). Using the commercial One-Strep-tag® fused to the CP of a PepMV agroinfectious clone, following affinity chromatography with tomato and *N. benthamiana* extracts, an additional interacting protein, the Heat shock cognate 70.3 (Hsc70.3), was identified. *In vivo* interactions were validated in *N. benthamiana* plants by bimolecular fluorescence complementation assay (BiFC) except for the STK/CP pair that did not produce yellow fluorescence emission. Finally, in order to identify a hypothetical role for each interactor in the viral infective cycle, all candidates were assessed in virus-induced gene silencing (VIGS) assays in tomato plants. Diverse phenotypes were observed for the different interactors, including repression of systemic PepMV accumulation.

Work was supported by grants AGL2012-37390 and PCIN-2013-43 (MINECO).



SIM3-6-01342

LA PROTEÍNA P1 DEL POTYVIRUS DEL GRABADO DEL TABACO SE ASOCIA CON LAS SUBUNIDADES 60S DE LOS RIBOSOMAS DE LAS CÉLULAS INFECTADAS Y ESTIMULA LA TRADUCCIÓN DE PROTEÍNAS

Martínez-García F.¹, Sancho D.¹, Darós J.A.¹

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

El género *Potyvirus* comprende aproximadamente el 30% de todas las especies de virus de plantas conocidos, muchos de las cuales causan enfermedades importantes en distintos cultivos agrícolas. El genoma de los potyvirus consiste en una molécula de RNA de 10000 nt y sentido positivo que, fundamentalmente, codifica una poliproteína que es procesada por tres proteasas virales en once productos génicos. La proteína P1, el producto más aminoterminal de la poliproteína viral, es una proteasa que cataliza su propio procesamiento y actúa como factor auxiliar durante la infección, estimulando la amplificación del virus. Para entender mejor el papel de P1 en el ciclo infectivo de los potyvirus, en este trabajo construimos clones infecciosos recombinantes del virus del grabado del tabaco (TEV) en los que la proteína P1 estaba etiquetada con una proteína fluorescente para poder seguir su expresión y localización subcelular o con una etiqueta de afinidad para poder identificar proteínas del huésped que forman parte de complejos en los que también está implicada P1 durante la infección. Los resultados de nuestros experimentos indicaron que la P1 del TEV se acumula en las células infectadas exclusivamente en una fase temprana de la infección y que muestra una localización subcelular dinámica, entrando y saliendo del núcleo de las células infectadas. Dentro de los núcleos, P1 se dirige al componente granular del nucléolo, que es donde se produce el ensamblaje de las partículas ribosomales. Consistentemente con esta observación, demostramos la presencia de señales de localización nuclear y de exportación nuclear en la secuencia de la P1 del TEV. Nuestros resultados también indicaron que la P1 del TEV se une a la subunidad ribosomal 60S de las células infectadas. Finalmente, mediante ensayos de traducción *in vitro* en un extracto de germen de trigo e *in vivo* en un sistema experimental de levadura *Saccharomyces cerevisiae* hemos demostrado que la P1 del TEV tiene actividad estimuladora en la traducción de proteínas.

Resúmenes de comunicaciones orales

*Sesión simultánea 4:
Interacción Planta-Microorganismo III
(SIM4-1 a SIM4-8)*





SIM4-1-01307

INACCESIBILIDAD INDUCIDA DEL GUISANTE A OIDIO (*Erysiphe pisi*): DINÁMICA TEMPORAL Y PAPEL DEL CITOESQUELETOMoral J.², Rubiales D.¹, Prats E.¹

1) CSIC. 2) Universidad de Córdoba

La inaccesibilidad inducida es un fenómeno por el cual una célula vegetal, tras sufrir un ataque fallido por un hongo biótrofo, se induce en ella resistencia a ataques subsecuentes. A pesar de que es conocida desde hace décadas, hay lagunas importantes sobre las bases moleculares que la regulan. El principal objetivo de este trabajo es dilucidar la importancia del citoesqueleto en la inaccesibilidad inducida.

Para confirmar la inaccesibilidad inducida en guisante y determinar la durabilidad y el alcance de la misma, se inocularon hojas de guisante cv. Messire (susceptible) con una especie inapropiada de Oidio (*Blumeria graminis* f. sp. *avenae*), con objeto de inducir la resistencia, y posteriormente, a diferentes tiempos, se inocularon con la especie apropiada (*E. pisi* f. sp. *psii*). Se compararon las respuestas frente a *E. pisi* tanto con controles sólo inoculados con *E. pisi*, como entre células que habían sufrido el doble ataque, células adyacentes y alejadas. Además, mediante tinciones con faloidina-488 y microscopía confocal comprobamos la organización y desmantelamiento del citoesqueleto a diferentes tiempos tras la inoculación *B. graminis* con el fin de correlacionarlo con los datos microscópicos. Finalmente para demostrar el papel del citoesqueleto en este tipo de resistencia, las hojas fueron tratadas, con citocalasina, un inhibidor de la polimerización de la actina, principal proteína del citoesqueleto y con cicloheximida, un inhibidor general de proteínas.

La inoculación con el *B. graminis* indujo resistencia a *E. pisi* mostrando un máximo a las 18 h de la inoculación y disminuyó al incrementar el periodo entre inoculaciones. La microscopia confocal mostró una actividad máxima del citoesqueleto en este mismo tiempo volviendo lentamente a su estado basal. La aplicación de cicloheximida o citocalasina revirtió la inaccesibilidad inducida. Estos resultados sugieren que el citoesqueleto, juega un papel crucial en la inaccesibilidad inducida del guisante.



SIM4-2-01326

ANÁLISIS TRANSCRIPTÓMICO DIFERENCIAL DE CULTIVARES DE OLIVO COMO RESPUESTA A LA INFECCIÓN POR PATOTIPOS DE *Verticillium dahliae* Y FACTORES AMBIENTALES ASOCIADOS AL CAMBIO CLIMÁTICO

Landa B.B.¹, Montes-Borrego M.¹, Beuzón C.², Navas-Cortés J.A.¹

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

2) Departamento de Biología Celular, Genética y Fisiología, Facultad de Ciencias, Universidad de Málaga, 29071, Málaga

La temperatura y la concentración de dióxido de carbono (CO₂) atmosférico son las variables ambientales asociadas al Cambio Climático que mayor impacto pueden ejercer sobre los patosistemas agrícolas, modificando hacia direcciones aún desconocidas la virulencia de los patógenos, así como el nivel de resistencia de las plantas a éstos. En este trabajo se ha realizado un estudio transcriptómico utilizando un microarray 12-plex 135K de 37.449 unigenes de olivo (Proyecto OLEAGEN) para determinar 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 *Verticillium dahliae* (VD) y la susceptibilidad del genotipo de olivo en momentos previos a la aparición de síntomas. Para ello plantones de olivo de los cvs. Picual y Arbequina, crecieron en suelo infestado por cada uno de los patotipos defoliante (D) y no defoliante (ND) de VD, con condiciones de temperatura y CO₂ representativas de los niveles actuales ambientales de ambos factores (20°C, 386 ppm) así como sus estimaciones por modelos globales de simulación de clima para los escenarios AR4 del ICPP para el sur de España B2 (24°C, 550 ppm) y A2 (28°C, 750 ppm).

Los resultados mostraron que, en las condiciones evaluadas, las principales diferencias en los perfiles de expresión son debidas al genotipo de olivo, seguidas de las condiciones ambientales y la infección por VD. Así, en plantas control (no inoculadas) se observaron grandes diferencias ($P < 0.001$; 8-fold) en los perfiles de expresión de 'Arbequina' frente 'Picual' que se acentuaron en los escenarios B2 a A2, en ese orden, con un 20% de genes con expresión diferencial entre ambos cultivares expresándose en los tres escenarios climáticos, mientras que estas diferencias se atenuaron en plantas infectadas por el patotipo D. Por otro lado, el número de genes que se expresaron diferencialmente ($P < 0.001$; 2-fold) en 'Arbequina' fue muy superior al observado en 'Picual' tanto en respuesta a cambios ambientales como a la infección por el patotipo D. Además, en 'Picual' se ha identificado la expresión de genes asociados diferencialmente a la infección por los patotipos D vs ND de VD. El estudio funcional de los genes inducidos y su validación mediante RT-PCR nos va a permitir su asociación, directa o indirecta, con la respuesta al estrés por la infección por el patógeno, la resistencia del cultivar o los estreses debidos a condiciones ambientales asociadas al cambio climático.

Financiado por Proyecto AGL2012-37521, fondos CICE-Junta de Andalucía (ayudas Grupo PAIDI AGR-136, P. Excelencia P08-AGR-03528) y cofinanciado por fondos FEDER (EU).



SIM4-3-01538

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR Y FISIOLÓGICA DE GENES DE FLAVOHEMOGLOBINAS DE *Fusarium oxysporum***Argotti E.¹, Pérez-Benito E.¹, Díaz-Mínguez J.M.¹**¹) Universidad de Salamanca

Fusarium oxysporum f. sp. *phaseoli* (FOP), es el agente causal de la marchitez vascular de *Phaseolus vulgaris* y está presente en todas los cultivos de judía a nivel mundial. El óxido nítrico (NO) es un regulador importante de muchos aspectos fisiológicos, entre ellos las respuestas al estrés biótico y abiótico. En particular, tiene un papel crítico en la inducción de la muerte celular programada y la respuesta hipersensible en plantas infectadas por fitopatógenos. Consecuentemente, una parte importante de la estrategia infectiva de los agentes fitopatógenos es limitar la acción del NO mediante su detoxificación, la cual está mediada principalmente por flavohemoglobinas. El análisis de los once genomas secuenciados de distintas formae speciales de *F. oxysporum* nos ha permitido establecer la existencia de 3-4 genes codificadores de flavohemoglobinas, de los cuales hemos identificado tres mediante hibridación Southern Blot en estirpes de *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli* (FOP). La adición de nitroprusiato sódico (SNP) 0.5 mM, que actúa como donador de NO, resulta en una reducción de la germinación en medios de cultivo con distintas fuentes de nitrógeno. En las mismas condiciones se determinó la expresión de los tres genes identificados, FOXG-13, FOXG-15 y FOXG-17. El análisis mediante hibridaciones Northern mostró que la adición de óxido nítrico exógeno (SNP) induce la expresión del gen FOXG-17 a las 9 y 18 h. de cultivo en todas las estirpes analizadas; el gen FOXG-13 muestra expresión diferencial en estirpes muy virulentas a determinados tiempos y medios de cultivo; por el contrario el gen FOXG-15 no muestra inducción de la expresión en ningún caso. Para determinar el papel de los dos genes principales se obtuvieron mutantes nulos en FOXG-13 y FOXG-17, utilizando la estrategia User Cloning. El reemplazamiento génico en ambos casos fue verificado mediante ensayos de PCR e hibridación Southern. Los resultados preliminares indican que ambos mutantes presentan deficiencias en el crecimiento y la germinación en presencia de SNP. Asimismo estamos determinando su capacidad patogénica y la virulencia en judía mediante ensayos de inoculación.

Este trabajo ha sido financiado por fondos de los proyectos MINECO AGL2009-08954 y AGL2012-39876-C02



SIM4-4-01533

DYNAMICS OF COLONIZATION OF COMMON BEAN BY HIGHLY VIRULENT AND WEAKLY VIRULENT STRAINS OF *Fusarium oxysporum*: MICROSCOPIC ANALYSIS AND GENE EXPRESSION PATTERNSNiño-Sánchez J.¹, Tello V.¹, Casado-del Castillo V.¹, Díaz-Mínguez J.M.¹

1) Instituto Hispano-Luso de Investigaciones Agrarias (CIALE), Departamento de Microbiología y Genética, Universidad de Salamanca. Villamayor, 37185 Salamanca, España

Fusarium oxysporum f. sp. *phaseoli* is the causal agent of Fusarium wilt of *Phaseolus vulgaris*. In former works we have shown that pathogenic strains of this *forma specialis* can be classified as weakly, highly and super virulent. The aim of the present study was to compare the colonization dynamics of weakly and highly virulent strains in a susceptible *P. vulgaris* cultivar and to find correlations with fungal and plant-induced gene expression patterns, in an effort to understand the genetic basis of virulence in the *F. oxysporum* species complex.

The highly virulent strain FOP-SP1 and the weakly virulent strain FOP-SP4 were selected to get transformants that express GFP under the control of GPDH constitutive promoter. Also, FOP-SP1 was engineered to express GFP under the control of *FTF1* promoter. *FTF1* is a virulence gene that encodes a transcription factor exclusive of highly and super virulent strains. Confocal laser scanning microscopy (CLSM) was used to compare colonization patterns of both strains. Quantitative analysis of colonization and gene expression were carried out by means RT-qPCR. CLSM analysis showed that FOP-SP1 penetrates the root epidermal cells, advances through intercellular spaces of the root cortex and reaches the central root system. At equivalent times, FOP-SP4 massively colonizes the root cortex but hardly grows inside the central root system. Fungal development inside the lower zone of hypocotyl is critical in plant colonization: FOP-SP4 needs more time to heavily colonize this region while FOP-SP1 quickly takes over xylem vessels and progresses upward the stem. Transcriptomic analysis of several fungal genes involved in virulence and plant genes involved in the defense response have revealed different expression patterns for both strains. It is worth to highlight that expression of *FTF1* takes place only inside the xylem vessels of hypocotyl and stem.

We conclude that virulence of strain FOP-SP1 can be specifically attributed to the ability to reach the central root cylinder and the fast progression inside the hypocotyl and stem xylem vessels, and is not related to the degree of global colonization of the root (higher in FOP-SP4 interaction than in FOP-SP1 one). We propose a main role in xylem colonization for the transcription factor *FTF1*, the first gene of *Fusarium* that is restrictively expressed in the stage of growth inside the vascular system whose colonization is the proof of concept of vascular pathogens.

JNS was supported by FPU grant (AP2009-3559) from the Spanish Ministry of Education, Culture and sport. VT held a postdoctoral contract financed by grant AGL2009-08954. VCdC FPU graduated fellowship (AP2010-2742) program. This work was financed by grant AGL2012-39876-C02-01 from the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness.



SIM4-5-01488

TWO HOMEBOX TRANSCRIPTION FACTORS PLAY CRITICAL BUT DISTINCT ROLES IN VIRULENCE IN THE VASCULAR PATHOGEN *Verticillium dahliae***Sarmiento-Villamil J.L.¹, Klosterman S.J.², M.D. García-Pedrajas M.D.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, Spain
2) United States Department of Agriculture – Agricultural Research Service, Salinas, California, USA

Verticillium wilt caused by *Verticillium dahliae* affects a large number of agronomically important crops around the world. *V. dahliae* is difficult to control due to its lack of host specificity and its production of melanized structures, the microsclerotia, which can survive for years in the soil, and to the systemic nature of the infection. Understanding the infection mechanisms used by this fungus, and the regulation of these mechanisms at the molecular level, may have implications for the development of novel control strategies based on the interference with these processes. In this work, we analyzed the role of two genes encoding putative homeobox transcription factors, *vph1* (VDAG_06555) and *vhb1* (VDAG_08786), as potential regulators of virulence in *V. dahliae*. Deletion mutants of *vph1* and *vhb1* were generated using the One Step Construction of Agrobacterium-Recombination-ready-plasmids (OSCAR) method. Deletion of either of these genes had little effect on vegetative growth; both $\Delta vph1$ and $\Delta vhb1$ grew similar to the wild-type, except that in liquid medium $\Delta vhb1$ showed reduced sporulation rates. In contrast, both mutations had a great impact on pathogenic development. Thus, neither $\Delta vph1$ nor $\Delta vhb1$ generated Verticillium wilt symptoms when inoculated in two different hosts, lettuce and *Nicotiana benthamiana*, and they could not be re-isolated from the vascular system of inoculated plants. An *in vitro* penetration assay showed that the $\Delta vph1$ strain was not able to penetrate cellophane sheets, while $\Delta vhb1$ showed an ability to penetrate cellophane sheets similar to that of the parental strain. Taken together, our results indicate that both homeobox proteins play critical roles in virulence, but that Vph1 is required at earlier stages of infection than Vhb1. We are currently using these mutant strains as tools to analyze global gene expression patterns associated with the penetration process and early stages of pathogenic development.

*This work was funded by the Spanish Ministry of Science and Innovation (Grant AGL2009-13445). J.L. Sarmiento-Villamil was recipient of a F.P.I. fellowship (BES-2010-033084)



SIM4-6-01541

A SUBTILISIN-LIKE SERINE PROTEASE HORIZONTALLY TRANSFERRED FROM PLANTS TO A PLANT PATHOGEN HAS A ROLE IN VIRULENCE

Sanz J.M.¹, Armijos V.D.¹, Shoji J.², Craven K.D.², Thon M.R.¹, Sukno S.A.¹

1) Instituto Hispano Luso de Investigaciones Agrarias, CIALE, Departamento de Microbiología y Genética, Universidad de Salamanca, Villamayor, 37185, Salamanca, España

2) The Samuel Roberts Noble Foundation, Ardmore, 73401, Oklahoma, United States

During the co-evolution of fungal plant pathogens and their hosts, there has been a constant interplay between pathogen virulence and host resistance, resulting in a large diversity of mechanisms and strategies used by the pathogen to establish infection.

Colletotrichum graminicola, an ascomycete hemibiotrophic fungus, is the causal agent of maize anthracnose, a disease responsible for large economic losses worldwide in this crop.

Previously, our group has discovered the presence of a subtilisin-like serine protease encoding gene (*Colletotrichum* plant-like subtilisin: CPLS) that was acquired by *Colletotrichum* spp. from plants through horizontal gene transfer (HGT). This family of enzymes has a wide range of functions in plants and fungi, with many members having roles in plant-microbe interactions. Phylogenetic analyses reveal that CPLSs are more closely related to plant subtilisins than fungal subtilisins. Moreover, at the structural level CPLS proteins are more similar to other plant subtilisins, sharing strong resemblance to SBT3 of tomato.

In this work, we analyzed CPLS gene expression using several strategies. We performed qPCR assays at different time points during infection and constructed transcriptional fusions of the gene promoter with GFP. We observed an increment in gene expression during the early stages of the infection (48 hpi) which is maintained during the later stage of infection (72 hpi until 96 hpi). Expression analysis of maize subtilisins shows that at least two are down-regulated when the CPLS is induced. These results suggest that CPLS may have a role in virulence.

Furthermore, we constructed CPLS null mutants by gene replacement. These mutants have similar growth rate, sporulation rate and colony morphology as the wild type strain. Preliminary characterization of the null mutants in leaf pathogenicity assays in maize shows that CPLS is involved in virulence.

This research was financed by funds from the Ministerio de Ciencia e Innovación (MICINN) of Spain (Grant: AGL2011-29446) and the Ministerio de Economía y Competitividad (Grant: AGL2012-34139).

JMSM was supported by FPU grant (AP2009-2656) from the Ministerio de Economía y Competitividad and VDAJ was supported by a graduate fellowship from the Secretaría Nacional de Educación Superior, Ciencia, Tecnología e Innovación of Ecuador.



SIM4-7-01530

EL ÓXIDO NÍTRICO MODULA LA GERMINACIÓN EN *Botrytis cinerea*: EFECTOS SOBRE REPLICACIÓN DE ADN Y CONTROL DE CICLO CELULAR.Santander D.¹, Alonso A.¹, Santamaría R.¹, Pérez-Benito E.¹

1) Universidad de Salamanca

Botrytis cinerea es un hongo fitopatógeno necrótrofo, generalista y muy versátil que puede hacer uso de diversos factores y mecanismos de patogenicidad. Puede modular, e incluso acentuar, la 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 coordina las respuestas defensivas de la planta y crea, además, unas condiciones de estrés nitrosativo que limitan el crecimiento de patógenos biótropos. Estas condiciones no limitan, sin embargo, el desarrollo de *B. cinerea*. Hemos podido comprobar que *B. cinerea* dispone de un sistema muy eficiente de detoxificación de NO basado en una enzima de tipo flavohemoglobina (BCFHG1) que confiere protección frente a estrés nitrosativo. Sorprendentemente, los análisis funcionales llevados a cabo demuestran que esta enzima no puede considerarse un factor de patogenicidad de *B. cinerea* y sugieren 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.

Aplicando una aproximación farmacológica y una aproximación basada en el análisis de expresión génica global en el mutante $\Delta Bcfhg1$ durante la exposición a NO exógeno hemos obtenido evidencias de que el óxido nítrico está implicado en la modulación de procesos morfogénicos, en particular en la regulación de la germinación de las esporas. El análisis de los cambios en el patrones de expresión génica en el mutante $\Delta Bcfhg1$ en respuesta a NO demuestra que la enzima juega un papel protector fundamental frente a estrés nitrosativo y que el retraso (o bloqueo) de la germinación que determina es consecuencia en gran medida de un bloqueo de ciclo celular mediado por el efecto del NO sobre la replicación del ADN. Los factores genéticos que median esta respuesta son objeto de estudio en nuestro laboratorio en la actualidad.

Este trabajo ha sido financiado por fondos de los proyectos MINECO AGL2009-08954 y AGL2012-39876-C02.



SIM4-8-01390

SECONDARY METABOLISM CLUSTERS AND PATHOGENICITY OF THE APPLE BLUE MOULD FUNGUS *Penicillium expansum*: GENOME, TRANSCRIPTOME AND FUNCTIONAL ANALYSIS

Ballester A.R.¹, Marcet-Houben M.², Levin E.³, Sela N.³, Selma-Lázaro C.¹, Carmona L.¹, Wisniewski M.⁴, Droby S.³, González-Candelas L.¹, Gabaldón T.²

1) Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos (IATA-CSIC)

2) Centre for Genomic Regulation (CRG)

3) Appalachian Fruit Research Station, USDA-ARS, USA

4) Department of Postharvest Science, ARO, The Volcani Center, Israel

Penicillium expansum is the causal agent of the blue mould rot of pome fruit, whereas *Penicillium italicum* causes blue mould in citrus fruit. Despite their economic importance, the genetic bases of their virulence mechanisms remain unclear. Here, we present the genome sequences of three *P. expansum* strains and one strain of *P. italicum*, and their comparison with 24 other Pezizomycotina. As compared with other *Penicillia*, *P. expansum* is particularly rich in secondary metabolism clusters, some of which seem to have been acquired by horizontal gene transfer. Patulin is the major mycotoxin produced by *P. expansum*, whose levels in foods are regulated due to health risks. Two of the three sequenced strains produced patulin under *in vitro* growth conditions. To further assess its role in pathogenesis, we have constructed knock out mutants for three genes of the patulin biosynthetic gene cluster. All knock out mutants were unable to produce the mycotoxin. However, no differences in virulence on apple fruits were observed among the three sequenced strains neither in the knock out mutants. We further examined fungal gene expression during the apple-*P. expansum* interaction by dual RNA-Seq. Among the predicted metabolic clusters in *P. expansum*, 9 of them were expressed during infection. Analysis of expressed genes at 24 hours post inoculation indicate the active growth of the fungus during the initial stage of colonization, the involvement of the exosomes, vesicles that have been related to the delivery of effectors by fungal pathogens, and the expression of putative pathogenicity factors. Our results showed that patulin does not play a role in infection of apple fruit, although we cannot rule out that other secondary metabolites may directly contribute to fungal pathogenicity.

Este trabajo ha sido financiado en parte por el MINECO (AGL2011-30519-C03-01) y por la Generalitat Valenciana (PROMETEO/2010/010). CSL es receptora de una ayuda FPI del MINECO y ARB de un contrato JAE-DOC del CSIC cofinanciado con fondos FEDER.

Resúmenes de comunicaciones orales

*Sesión simultánea 5:
Control de Enfermedades I
(SIM5-1-a SIM5-8)*





SIM5-1-01301

ASSESSMENT OF DIFFERENT METHODS IN THE BIOLOGICAL CONTROL OF CHESTNUT BLIGHT (*Cryphonectria parasitica*)Plana O.^{1,2}, Gómez-Gallego M.³, Castaño C.^{1,3}, Colinas C.^{1,3}

1) Departament de Producció Vegetal i Ciència Forestal, Universitat de Lleida-Agrotecnio (UdL). Av. Rovira Roure, 191, 25198, Lleida, Spain. E-mail: carlos.colinas@pvcf.udl.cat

2) Direcció actual: Parc Natural del Montseny. Diputació de Barcelona. E-mail: planapo@diba.cat
Centre Tecnològic Forestal de Catalunya

3) Centre Tecnològic Forestal de Catalunya. Ctra. de Sant Llorenç de Morunys km 2, 25280, Solsona, Spain. E-mail: mireia.gomez@ctfc.cat

Cryphonectria hypovirus 1 (CHV-1) is the causal agent of hypovirulence in the chestnut blight fungus, *Cryphonectria parasitica* (Murril) Barr, whose spread into European chestnut stands has resulted in high rates of chestnut mortality. CHV-1 is being used as a biocontrol agent against this introduced pathogen. Treatment intensity plays a major role in the success of biological control. Thus, treating as many cankers as possible can enhance the establishment of the introduced hypoviruses. Therefore, the method used to introduce the hypovirus in chestnut stands and orchards should be improved, in order to effectively increase the propagule pressure.

We compared the effect of three different inoculation methods in the decrease of canker growth: (i) inoculation by introducing hypovirulent mycelia around virulent cankers, (ii) inoculation by spraying a solution of conidia produced by hypovirulent strains in both scraped and (iii) non-scraped cankers. We selected 4 cankers in each of 6 stands in each of 3 different regions, in June of 2005. Of the 4 cankers, we inoculated each one with one of the treatments and left one as control. We monthly monitored the growth of a total of 60 cankers, from July 2005 to May 2006. Our results show that there are no significant differences in the accumulative increment of canker area among the three treatments. The area of uninoculated cankers increased significantly more than that of treated cankers. Our seasonal data show that growth of *Cryphonectria parasitica* is significantly reduced in autumn and winter. The inoculation with a conidial solution without scraping the canker offers the chance of large scale treatments thus improving the possibility of increasing the propagule pressure and the success of biological control.



SIM5-2-01549

INFECCIONES MIXTAS DE MITOVIRUS EN DISTINTOS AISLADOS DE *Botrytis cinerea* Y SU EFECTO SOBRE LA VIRULENCIA Y EL FENOTIPO DEL HONGOBlanco G.¹, Rodríguez-García C.¹, Donaire L.¹, Ayllón M.A.¹

1) Centro de Biotecnología y Genómica de Plantas

La presencia de micovirus se ha descrito en una gran variedad de hongos. En general, las infecciones son asintomáticas, pero la presencia de algunos micovirus produce cambios fenotípicos en el hongo, aumentando o disminuyendo su virulencia sobre la planta. *Botrytis cinerea* causa la podredumbre gris en más de 200 cultivos provocando importantes pérdidas económicas a nivel mundial. Entre las alternativas de control para la podredumbre gris se ha planteado la posibilidad de usar micovirus hipovirulentos. En este trabajo se han caracterizado molecularmente cuatro mitovirus de un aislado de *B. cinerea* procedente de pimiento. Uno de los mitovirus caracterizado es *Botrytis cinerea mitovirus 1* (BcMV1), que produce hipovirulencia en aislados de colza, y ha sido propuesto como posible agente de biocontrol. El efecto de los micovirus sobre la virulencia del hongo depende de la interacción micovirus-hongo pero también puede depender de la interacción con distintos micovirus en una infección mixta, y de éstos con su huésped. Estas interacciones pueden ser determinantes para la gravedad de la enfermedad que produce dicho hongo. En este trabajo se ha estudiado el efecto de distintas combinaciones virales sobre el fenotipo y la virulencia de tres aislados de *B. cinerea*. Se ha determinado la velocidad de crecimiento del hongo y la morfología de la colonia, considerando la formación de conidias y esclerocios; y la virulencia del hongo en hojas de pimiento. Los resultados obtenidos muestran que dependiendo del genotipo del hongo y de la presencia de un virus en infección simple o mixta, el fenotipo del hongo y la virulencia sobre la planta pueden verse modificados. Las estrategias de biocontrol con micovirus deberían considerar por tanto el efecto del virus en distintos aislados y en combinación con otros micovirus que puedan encontrarse infectando al hongo en campo.

MICINN AGL2009-11778.



SIM5-3-01439

IDENTIFICACIÓN DE UN MICOVIRUS EN *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* QUE INDUCE HIPOVIRULENCIA.Lemus-Minor C.G.¹, Cañizares M.C.², García-Pedrajas M.D.², Pérez-Artés E.¹

1) Instituto de Agricultura Sostenible - Consejo Superior de Investigaciones Científicas (IAS-CSIC)

2) Instituto de Hortifruticultura Subtropical y Mediterránea "La Mayora" - Universidad de Málaga - Consejo Superior de Investigaciones Científicas (IHSM-UMA-CSIC)

Los determinantes de virulencia en hongos fitopatógenos pueden estar asociados a factores cromosómicos y extracromosómicos. La presencia de moléculas de ARN de doble hebra (dsRNA) extracromosómicas en células fúngicas se ha asociado a la infección por virus (micovirus), algunos de los cuales inducen hipovirulencia en su hospedador. Los micovirus que inducen hipovirulencia tienen un gran potencial como herramientas de control biológico en enfermedades fúngicas, de ahí la importancia de identificar y caracterizar estos determinantes de virulencia en hongos fitopatógenos. *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* (*Fod*) es el agente causal de la marchitez vascular del clavel, la enfermedad más dañina de las que afectan este cultivo a nivel mundial. Las poblaciones de *Fod* muestran una alta diversidad genética y patogénica, que incluye la existencia de 10 razas fisiológicas, así como de grupos de virulencia dentro de algunas de ellas. El análisis de extractos de ácidos nucleicos totales de una amplia colección de aislados de *Fod* dio lugar a la identificación de un nuevo micovirus perteneciente a la familia *Chrysoviridae*, al que hemos denominado FodV1, en un aislado de raza 2 (*Fod* 116). Considerando que en la familia *Chrysoviridae* se han caracterizado miembros con capacidad de inducir hipovirulencia, en este trabajo hemos analizado el efecto que FodV1 ejerce sobre las características fenotípicas del hongo hospedador. Para ello se realizaron estudios comparados con las versiones con virus y sin virus (versión curada) del aislado *Fod* 116. Los resultados mostraron que la presencia de FodV1 tiene efectos importantes sobre el fenotipo del hongo, afectando la morfología y tamaño de la colonia, la pigmentación, y la tasa de conidiación. Más aún, los resultados de un test de patogenicidad con 5 cultivares de clavel (1 resistente y 4 susceptibles a *Fod* raza 2), indicaron que FodV1 induce hipovirulencia en *Fod*, aunque este efecto es cultivar-dependiente.

*Este trabajo ha sido financiado por fondos del Plan Nacional de Investigación otorgados por el Ministerio de Ciencia e Innovación (AGL2010-18279), cofinanciado con fondos FEDER (EU).



SIM5-4-00800

LA APLICACIÓN EXÓGENA DE ÁCIDO SALICÍLICO ATENÚA LOS CAMBIOS INDUCIDOS POR EL VIRUS X DE LA PATATA (PVX) EN LA FISIOLÓGÍA Y EN EL PROTEOMA EN TOMATE (*Solanum lycopersicum* L.)

Cueto-Ginzo A.I.¹, Ferrio J.P.^{1, 2}, Bostock R.M.⁴, Rodríguez R.³, Serrano L.^{1, 2}, Arcal L.¹, Achón M.A.^{1, 2}, Falcioni T.¹, Luzuriaga W.P.³, Medina V.^{1, 2}

1) Grupo INPLAMICVEC. Departament de Producció Vegetal i Ciència Forestal, Universitat de Lleida (UdL)

2) AGROTECNIO Center, Universitat de Lleida (UdL)

3) UdL-IMPULS Programme. Universitat de Lleida (UdL) 4) Plant Pathology Dept. UC Davis.

Está establecido que el ácido salicílico (AS) media en el proceso de respuesta sistémica adquirida (SAR) de las plantas contra patógenos, interviniendo en la producción de proteínas relacionadas con la patogénesis (PRs) y otros mecanismos bioquímicos de defensa. Tiene efectos beneficiosos en la fotosíntesis, transpiración, transporte iónico y el desarrollo. Aunque su acción sobre la infección viral ha sido demostrado en plantas modelo, su papel en el control de virosis sigue en discusión. En este trabajo se analiza y compara la fisiología y el proteoma de plantas de tomate inoculadas con virus X de la patata (aislado Sp2013, acc. KJ631111), previo tratamiento exógeno con AS a diferentes dosis, en diferentes tiempos post-tratamiento.

PVX reduce la tasa fotosintética e incrementa la transpiración de las plantas de tomate y el AS palía estos efectos provocando un aumento de la conductancia estomática (Gs). El AS retrasa la infección producida por la cepa PVX-Sp2013, pero no de forma tan acusada como lo hace con la cepa CP4 de PVX, utilizada en otros experimentos. Los efectos sobre el crecimiento y desarrollo en el porte y en volumen radicular son también significativos. El análisis del proteoma confirma que PVX-Sp2013 altera proteínas cloroplásticas implicadas en la fotosíntesis, la síntesis de carbohidratos, la maduración de proteínas y el transporte electrónico, e induce una fuerte reducción del complejo proteico RuBisCO. El tratamiento con AS atenúa todos estos efectos a los dos días del tratamiento, contribuyendo a la estabilización del fotosistema II, mejorando la capacidad antioxidante y termotolerante de las plantas, elicitando algunas PRs, afectando la regulación estomática y a la deposición de callosa y lignina. Este último efecto puede explicar el retraso en la infección. Junto con otros resultados obtenidos, se discute el uso del tratamiento exógeno con AS para el control de virosis.

* Trabajo financiado por el MICIN (proyecto número de referencia AGL2010-15691, subprograma AGR) y por el programa Udl-IMPULS



SIM5-5-01480

NUEVOS NEMATICIDAS: VALORIZACIÓN DE RESIDUOS DE LA PRODUCCIÓN SEMI-INDUSTRIAL DE ACEITES ESENCIALES.**Andrés M.F.¹, Julio L.F.¹, Burillo J.², Díaz C.E.³, González-Coloma A.¹**

1) ICA- CSIC. c/ Serrano 115, 28006. Madrid, email: mafay@ica.csic.es

2) CITA. Avda Montañana 930. 50059, Zaragoza. 3) IPNA-CSIC. Avda F, Sanchez 3, 38206, La Laguna. Tenerife.

Los aceites esenciales (AE) son sustancias volátiles que se encuentran en una gran variedad de plantas. Constituyen un grupo de productos naturales de gran valor comercial por sus aplicaciones en la industria cosmética, alimentaria, farmacéutica y como fuente alternativa de pesticidas. La producción estimada anual de aceites esenciales varía de 40.000 a 60.000 t a nivel mundial y de 400 a 600 t en España, con una clara tendencia al alza que implica también el aumento considerable de la generación de residuos asociados a su obtención. En este estudio se evalúa la actividad nematicida frente al nematodo formador de nódulos *Meloidogyne javanica* de los residuos acuosos (AQ) de la producción semi-industrial de aceite esencial de *Artemisia absinthium*, planta aromática domesticada y en fase de cultivo experimental, así como la caracterización de los compuestos activos. Los ensayos in vitro demuestran una alta toxicidad de los AQ que inducen el 100% de mortalidad en juveniles infectivos (J2) de *M. javanica* a 24, 48 y 72 h de tratamiento. Los fuertes efectos nematicidas se mantienen en diluciones de hasta el 50%. Así mismo, los AQ estudiados inducen la inhibición significativa de la eclosión de huevos y de la capacidad infectiva de los J2 en plántulas de tomate. Se está realizando el fraccionamiento biodirigido por técnicas cromatográficas con objeto de identificar por análisis químicos (HPLC-MS, GC-MS, RMN) las moléculas bioactivas. Los resultados obtenidos indican el gran potencial de estos residuos acuosos generados en la producción del aceite esencial del *A. absinthium* como fuente de compuestos nematicidas.

Este trabajo ha sido financiado por fondos del MINECO al Proyecto CTQ2012-38219-C03-01



SIM5-6-01494

IDENTIFICACIÓN DE SUELOS SUPRESIVOS A *Meloidogyne* spp. EN PARCELAS DE PRODUCCIÓN COMERCIAL DE HORTALIZAS BAJO PLÁSTICO

Giné A.¹, Martínez-Alonso M.², Gaju N.², Ornat C.¹, Sorribas F.J.¹

1) DEAB-UPC

2) Departament de Genètica i Microbiologia, UAB

Dos invernaderos de producción ecológica localizados en Tarragona (A) y Amposta (B) fueron monitorizados desde 10/2010 hasta 7/2013 para determinar la fluctuación de la población de *Meloidogyne* spp., el porcentaje de huevos parasitados por hongos y las especies fúngicas implicadas. Al inicio del estudio el porcentaje de parasitismo era del 14 y 60% en A y B, respectivamente; y las raíces mostraban niveles bajos de agallamiento para el tipo de cultivo y densidad de población en pretrasplante, sugiriendo que podrían ser suelos supresivos a la enfermedad. El porcentaje máximo de parasitismo alcanzó el 55 y 84,5% en las parcelas A y B, respectivamente, siendo *Pochonia chlamydosporia* y *Plectospharella cucumerina* las especies de hongos aisladas. Paralelamente, se comprobó la supresividad del suelo en condiciones controladas. Suelo de cada invernadero, esterilizado y no esterilizado, se mezcló con arena estéril (1:1) y se dispensó en macetas de 3L. Tomate susceptible cv. Durinta se trasplantó y se infestó con juveniles (J2) del nematodo para alcanzar 3000 J2/planta. Después que el nematodo completase una generación, el porcentaje de parasitismo de huevos en el suelo no esterilizado era del 33% (A) y 78% (B). El número de huevos por planta y el factor de multiplicación de la población del nematodo en suelos estériles eran mayores que en suelo sin esterilizar. La única especie de hongo aislada fue *P. chlamydosporia*. La capacidad para infectar huevos y J2 del nematodo de diez aislados de *P. chlamydosporia* procedentes de dichos suelos alcanzaron el 80 y 68%, respectivamente. Los perfiles genéticos, bacteriano y fúngico, de los suelos A y B mediante PCR-DGGE, comparados con los de un suelo conductivo mostraron diferencias superiores al 60%. Los suelos de ambas parcelas son supresivos a la enfermedad en condiciones de campo y al nematodo en condiciones controladas.

Agradecimientos a INIA y la Unión Europea (FEDER) por financiar el proyecto RTA2010-00017-C02-02



SIM5-7-01497

CONTROL DE *Colletotrichum gloeosporioides* (PENZ.) PENZ Y SACC. EN FRUTOS DE AGUACATE "HASS"**Talavera-Reyes M.M.¹, Gutiérrez M.¹, Lara M.B.N.¹, Vargas M.¹**¹) Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo

Las pérdidas económicas de fruta de aguacate provocadas por fitopatógenos que ocasionan antracnosis y pudrición del pedúnculo ("tem end rot" (SER)), pueden producir pérdida total en contenedores de fruta para exportación, siendo el objetivo evaluar productos con modo de acción distinto contra *C. gloeosporioides* en frutos de aguacate "Hass" en postcosecha. Los tratamientos fueron: A) Fungicidas químicos (T1 azoxistrobin y T2 thiabendazol) B) Sanitizantes y desinfectantes (T3 yodo, T4 cuaternario de amonio, T5 extracto de cítricos); C) Biológicos (T6 *Trichoderma* sp.) y D) Nutriente (T7 calcio y nitrógeno), control (T8 sin aplicación de producto). En dos etapas: La primera en empacadora, donde la fruta se selecciono y empacó con las técnicas tradicionales, empleando 40 frutos (10 por repetición); la fruta en sus cajas de empaque se asperjo con el tratamiento correspondiente, enseguida se colocó en un contenedor con atmosfera controlada y enviada a la procesadora de frutas Nature's Pride, Massdijk, en Holanda. En su destino se le aplicó etileno, los frutos de cada tratamiento fueron cortados y examinados para detectar la presencia de daños de antracnosis y pudrición del pedúnculo. La segunda etapa fue en laboratorio los frutos de los ocho tratamientos fueron inoculados con una suspensión de micelio de *C. gloeosporioides*, se mantuvieron bajo condiciones de cámara húmeda durante 24 h; después se asperjaron por separado con el producto correspondiente y colocaron nuevamente en cámara, sin generar humedad hasta la maduración. La evaluación de la severidad de antracnosis se hizo con la escala de Ávila-Quezada *et al.*, (2002), la severidad de pudrición de pedúnculo escala de Gutiérrez (2008) Los resultados indicaron que en frutos inoculados y no inoculados el azoxistrobin tubo una disminución significativa en los daños por *C. gloeosporioides* tanto en la incidencia como en la severidad, considerándose como una alternativo de control para este fitopatógeno en poscosecha.

*Financiado por Proyecto P/PIFI-2013-16MSU0014T-04 Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo



SIM5-8-01398

UTILIZACIÓN DE PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS EN EL CONTROL DE LA ESTEMFILOSIS DEL PERAL (*Stemphylium vesicarium*). DISEÑO Y EVALUACIÓN DE UNA ESTRATEGIA DE APLICACIÓN

Puig M.¹, Ruz L.¹, Moragrega C.¹, Montesinos E.¹, Llorente I.¹

1) INTEA-Universitat de Girona

La estemfilosis o mancha marrón del peral, causada por el hongo *Stemphylium vesicarium*, es una de las principales enfermedades fúngicas que afectan las zonas del cultivo del peral en Europa y es responsable de importantes pérdidas económicas. En la actualidad, el control de la enfermedad se realiza mediante la aplicación preventiva de fungicidas, o guiada con el modelo predictivo BSPcast, combinado con métodos culturales o de control biológico para la reducción del inóculo. No obstante, el número de materias activas eficaces es muy limitado, debido a las características de la enfermedad y a la reducción de fungicidas autorizados por la Unión Europea.

Los péptidos antimicrobianos han demostrado ser una alternativa o complemento a las materias activas utilizadas ya que presentan actividad contra hongos y bacterias fitopatógenas en diferentes patosistemas. Además, los péptidos antimicrobianos lineales sintéticos son biodegradables, y presentan baja probabilidad de selección de microorganismos resistentes y escasa toxicidad.

En este trabajo se ha evaluado la actividad de diversos péptidos de la biblioteca CECMEL11 (LIPPSO, Universitat de Girona), compuesta por undecapéptidos híbridos de cecropina A y melitina en la inhibición de *S. vesicarium in vitro* y de las infecciones en peral. Algunos de los péptidos evaluados mostraron capacidad de inhibición de la germinación de las conidias de *S. vesicarium*. Los péptidos más efectivos redujeron el crecimiento y esporulación del hongo a concentraciones inferiores a 50 μ M. Posteriormente en ensayos con hojas *ex vivo* se evaluaron diferentes estrategias de aplicación, preventiva o post-infección, determinándose el momento óptimo de aplicación. Se determinó que las aplicaciones preventivas no eran eficaces mientras que las aplicaciones realizadas hasta 18h desde el inicio de infecciones controlaban la enfermedad. Finalmente, se evaluó la capacidad de control de la enfermedad de un péptido seleccionado aplicado según el modelo de predicción BSPcast en finca experimental durante dos años, determinándose que tanto el péptido como la estrategia de aplicación seleccionada permitían un nivel alto de control de la enfermedad. La utilización de fluorocromos y técnicas biotecnológicas permitió el estudio de la interacción entre los péptidos eficaces y el hongo y proponer su modo de actuación.

Financiado por el proyecto AGL2009-09829/AGR del MEC y BR 10/17 de la Universitat de Girona.

Resúmenes de comunicaciones orales

*Sesión simultánea 6:
Epidemiología I
(SIM6-1 a SIM6-8)*





SIM6-1-01507

ANTAGONISTIC AND MUTUALISTIC RELATIONSHIPS AMONG *Tomato yellow leaf curl virus* AND ITS WHITEFLY VECTOR *Bemisia tabaci* THROUGH MANIPULATION OF HOST HORMONE HOMEOSTASIS.

Sánchez-Guzmán M.J., Moriones E., Flors V., Pozo M.J., Díaz J.

- 1) Instituto de Hortofruticultura Subtropical y Mediterránea "La Mayora", Consejo Superior de Investigaciones Científicas-Universidad de Málaga (IHSM-UMA-CSIC), 29750 Algarrobo-Costa, Málaga. Spain
- 2) Department of Soil Microbiology and Symbiotic Systems, Estación Experimental del Zaidin, (CSIC), Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Granada. Spain
- 3) Metabolic Integration and Cell Signaling Group, Plant Physiology Section, Department of CAMN, Universitat Jaume I, Avd Vicente Sos Baynat, Castellón 12071, Spain

Tomato yellow leaf curl disease (TYLCD) is currently considered one of the most devastating emerging viral diseases affecting tomato (*Solanum lycopersicum*) crops worldwide. The disease is caused by tomato yellow leaf curl virus (TYLCV)-like species, DNA plant viruses of the genus *Begomovirus* (family *Geminiviridae*), which are transmitted exclusively by the whitefly *Bemisia tabaci* Gennadius (*Hemiptera:Aleyrodidae*) in a persistent circulative manner. In addition, this polyphagous sap-sucking insect causes serious damage to plants through direct feeding. Phytohormones play important roles in the signaling networks regulating plant responses in these interactions, in particular jasmonic acid (JA) and salicylic acid (SA). In order to explore their relevance on this tripartite interaction, metabolomic and transcriptomic analyses have been used to monitor changes in JA and SA signaling pathways. A series of experiments were also performed to assess whitefly performance on healthy and infected plants of tomato lines impaired in the JA/SA signaling. We found that adult whitefly feeding induced JA signaling and increase the JA precursor 12-oxo-phytodienoic acid (OPDA) in the plant. This response negatively affected whitefly oviposition, as oviposition was higher on tomato lines impaired in JA biosynthesis or perception (*def1* and *jai1* mutants, respectively). Interestingly, the induction of JA-regulated defenses in response to whitefly feeding was downregulated in TYLCV infected plants. Thus, TYLCV appears to be able to interfere with JA signaling, modulating the plant-whitefly interaction to enhance the transmission of the virus. TYLCV infection also induced the expression of several SA-marker genes, increased the SA precursor shikimic acid concentration and reduced the survival rate of whitefly nymphs. Consistent with these findings, the salicylic acid-deficient tomato lines NahG exhibited augmented nymphs survival rates, while showing wild type levels for oviposition. Collectively, our data suggest that whitefly adults and nymphs are differentially affected by the JA and SA dependent pathways, respectively, and that TYLCV interferes with the regulation of both pathways in the plant. Finally, we demonstrated that whiteflies significantly preferred TYLCV-infected to uninfected plants. However, whiteflies performed poorly on infected plants and readily migrated to nearby healthy plants. This could be a mechanism by which the virus may ensure its spread. The possible contribution of the JA-SA signaling crosstalk to this pattern is under investigation.



SIM6-2-01492

DINÁMICA DE POBLACIÓN DE *Meloidogyne* spp. EN CULTIVOS PROTEGIDOS Y PÉRDIDAS DE PRODUCCIÓN DE PEPINO, CALABACÍN, SANDÍA Y TOMATE SUSCEPTIBLE Y RESISTENTE**Sorribas F.J.¹, Giné A.¹, López-Gómez M.², Vela M.D.³, Ornat C.¹, Talavera M.⁴, Verdejo-Lucas S.⁵**

1) DEAB-UPC

2) IRTA, Protección Vegetal Sostenible

3) IFAPA Chipiona

4) IFAPA Camino de Purchil

5) IFAPA Centro de La Mojonera

Se realizaron estudios en invernaderos infestados con *Meloidogyne incognita* o *M. javanica*, y que presentaban gradientes de infestación entre 0 y 11800 juveniles 250 cm⁻³ de suelo, para determinar la tasa máxima de multiplicación del nematodo (TMM), la densidad de equilibrio de la población (DE) y el efecto sobre la producción. El cultivar de sandía Sugar Baby se cultivaba de abril a julio, el calabacín cv. Amalthee HF1 de febrero a junio, y de octubre a enero, el tomate susceptible cv. Durinta o el cv. resistente Monika de marzo a julio, y el pepino cv. Dasher II de marzo a julio, y de julio a noviembre. La TMM del nematodo en sandía era menor que la del calabacín, pepino y tomate susceptible, mientras que la DE era menor. Ambos parámetros eran similares a la del tomate resistente. El límite de tolerancia de la sandía era mayor que el del resto de los cultivos, y las pérdidas máximas de producción menores. La fecha de plantación influyó la dinámica de población del nematodo así como la tolerancia del cultivo. En calabacín cultivado en otoño, la TMM y la DE fueron mayores que cultivado en primavera, pero la tolerancia disminuyó. Los resultados indican que la sandía es un huésped pobre del nematodo, similar a un huésped resistente, y a su vez tolerante al mismo. Calabacín, tomate y pepino son buenos huéspedes del nematodo pero tolerante, sensible e hipersensible, respectivamente. Respecto la época de cultivo, el calabacín es mejor huésped y menos tolerante cuando se cultiva en otoño que en primavera, posiblemente a causa de la temperatura del suelo en los días siguientes al trasplante. Esta información es relevante para diseñar secuencias de rotación que interfieran con el desarrollo de las poblaciones del nematodo y reduzcan las pérdidas de producción.

Agradecimientos a INIA y la Unión Europea (FEDER) por financiar el proyecto RTA2010-00017-C02



SIM6-3-01392

VALIDACIÓN DEL MODELO EPIDÉMICO DE LOS REPILOS DEL OLIVO**Romero J.¹, Roca L.F.¹, Moral J.², Trapero A.¹**

1) Grupo de Patología Agroforestal, Dpto. de Agronomía, Universidad de Córdoba, Campus de Rabanales, Edif. C4, 14071 Córdoba.

2) Dpto. Mejora Vegetal, Instituto de Agricultura Sostenible (IAS)-CSIC, 14080 Córdoba

El término genérico “Repilos” designa a las tres principales micosis que afectan a la parte aérea del olivo, el Repilo, el Emplomado y la Antracnosis causadas por *Spilocaea oleagina*, *Pseudocercospora cladosporioides* y *Colletotrichum* spp., respectivamente. El control de estas enfermedades se ha llevado a cabo tradicionalmente mediante la aplicación de compuestos cúpricos siguiendo un calendario fijo. La necesidad de racionalizar estos tratamientos, ajustándolos a la reducción de la cantidad de cobre por ha prevista para el olivar en la UE, ha motivado la realización del presente trabajo, cuyo objetivo principal es la validación de un modelo epidémico basado en los riesgos de infección en función de datos climatológicos, fenología, cultivar y niveles de inóculo (umbrales).

Se han seleccionado 14 olivares de los cvs. Arbequina, Hojiblanca, Manzanilla de Sevilla y Picual con distintos sistemas de cultivo (tradicional, intensivo y superintensivo) en Andalucía. Se están utilizando compuestos cúpricos y no-cúpricos (estrobilurinas y triazoles). En cada finca se incluyen tres tratamientos: uno convencional (estándar de la zona) y dos dirigidos (bajo y alto riesgo). Periódicamente se han evaluado la incidencia de infecciones latentes y visibles de las tres enfermedades y el nivel de cobre en hoja.

La aplicación del modelo epidémico “Repilos” está permitiendo un control adecuado de las tres enfermedades en varios de los olivares de estudio, así como una disminución de la cantidad de cobre aplicada al disminuir el número de tratamientos y al usar fungicidas alternativos al cobre. Asimismo, se están definiendo los umbrales de riesgo para las tres enfermedades y la época crítica para su determinación. Los datos generados en las diferentes fincas están siendo utilizados para reajustar el modelo original. Una vez validado el modelo “Repilos” será integrado en una interfaz amigable que ayude a los agricultores en la toma de decisiones.

Esta investigación está siendo financiada por la empresa Bayer Crop Science



SIM6-4-01511

DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE UN MODELO EPIDEMIOLÓGICO PARA PREDECIR EL MOTEADO CAUSADO POR EL HONGO *Fusicladium eriobotryae* SOBRE FRUTOS DE NÍSPERO

González-Domínguez E.¹, Armengol J.¹, García-Jiménez J.¹, Rossi V.²

1) Instituto Agroforestal Mediterráneo, Universidad Politécnica de Valencia, Camino de Vera s/n, 46022 Valencia. E-mail: elgondo2@gmail.com

2) Istituto di Entomologia e Patologia vegetale, Università Cattolica del Sacro Cuore, Via Emilia Parmense 84, 29122 Piacenza, Italia

El moteado del níspero, causado por el hongo *Fusicladium eriobotryae*, es la principal enfermedad que afecta a este cultivo en España. Sobre los frutos el hongo produce manchas pardo-oliváceas que impiden su comercialización. Hasta el momento, debido a la falta de información específica acerca de la enfermedad, las recomendaciones a los agricultores para su manejo se han realizado en función de la información existente para el moteado del manzano.

Sin embargo, en los últimos años se han llevado a cabo diversos estudios acerca de la biología de *F. eriobotryae* y la epidemiología del moteado del níspero, que han permitido mejorar el conocimiento del ciclo de la enfermedad. Los resultados de estos estudios se han utilizado para desarrollar un modelo dinámico y mecanístico, capaz de predecir la infección de frutos de níspero por conidios de *F. eriobotryae*. Este modelo simula los periodos de infección del moteado del níspero y su severidad a través de los sub-procesos de dispersión, infección y latencia. Los cambios de un estado a otro dependen de factores ambientales descritos por ecuaciones matemáticas.

Para su validación, durante tres campañas de cultivo se comparó la predicción del modelo con el progreso de la enfermedad observado en una parcela de níspero situada en Callosa d'En Sarrià. Como resultado, el modelo predijo de forma precisa el momento y severidad de los periodos de infección, así como el progreso de la enfermedad en los frutos (con coeficientes de correlación >0,95). Los resultados del modelo estuvieron de acuerdo con la valoración que un experto dio de la severidad de la enfermedad durante siete campañas de cultivo. El modelo se integrará en un sistema de avisos del moteado del níspero, que optimizará la aplicación de tratamientos fungicidas, reduciendo su número y optimizando los momentos de aplicación.

Este trabajo ha sido financiado por la Cooperativa Agrícola de Callosa d'En Sarrià (Alicante)



SIM6-5-01402

EFFECTO DEL CONTROL INTEGRADO EN EL DESARROLLO ESPACIO-TEMPORAL DE LA VERTICILOSIS DEL OLIVO: UN ESTUDIO COMPARATIVO A LARGO PLAZOOstos E.¹, Porras R.², López F.J.¹, Trapero A.¹, Moral J.³

1) Grupo Patología Agroforestal, Dpto. Agronomía, Unidad de Patología Agroforestal, Universidad de Córdoba, Campus de Rabanales, Edif. C4, 14071 Córdoba.

2) Biogeos, Estudios Ambientales, S.L. Rabanales 21. C/ Cecilia Payne, Edif. Centauro, 14014 Córdoba.

3) Dpto. Mejora Vegetal, Instituto de Agricultura Sostenible-CSIC, 14080 Córdoba.

El control de la Verticilosis del olivo, causada por *Verticillium dahliae*, está basado en la aplicación de una estrategia que integre todas las medidas de lucha disponibles, aunque no existen experiencias comerciales de esta aproximación. En este trabajo se estudia el efecto del control integrado de la VO aplicado durante 14 años en un olivar ("El Grañón", Jaén) mediante: control químico de malas hierbas, solarización y replantación de olivos afectados de 'Picual' (susceptible) por olivos de 'Frantoio' (resistente). Para ello, se ha comparado el desarrollo espacio-temporal de la VO en "El Grañón" y en una finca colindante "El Ancla" utilizando ortofotos digitales (1998-2010) analizadas con GvSIG. En ambas fincas, plantadas con 'Picual' en 1996, la presencia del patógeno fue diagnosticada mediante aislamientos y PCR. Además, se realizaron evaluaciones de la incidencia y severidad de la enfermedad y del inóculo en el suelo durante los dos últimos años de observación. El desarrollo epidémico de la VO fue más rápido en "El Ancla" que en "El Grañón". La tasa anual de mortalidad fue del 6.10% en 'Picual' en "El Ancla" y del 3.25 y 0.51% en 'Picual' y 'Frantoio' en "El Grañón". La densidad de inóculo del hongo en el suelo se mantuvo muy baja y sin diferencias entre ambas fincas. Los índices de agregación-dispersión y la distribución Beta-Binomial de los olivos muertos mostraron un patrón espacial agregado en ambas fincas. La replantación de olivos muertos influyó principalmente en la disminución de la intensidad de agregación de la VO. En conclusión, el control integrado de la VO aplicado en "El Grañón" durante los últimos 14 años ha logrado mantener la enfermedad por debajo de un umbral económico de daños, traducándose en la recuperación de la rentabilidad de la explotación, mientras que en "El Ancla" la enfermedad ha afectado gravemente a ésta.

Investigación financiada por el proyecto AGL2011-1037 del Ministerio de Economía y Competitividad



SIM6-6-01459

DINÁMICA ESPACIAL Y TEMPORAL DEL COMPLEJO MARCHITEZ DEL AGUACATEMorales J.G.¹, Ramírez J.G.¹, Castañeda D.A.¹

1) Universidad Nacional de Colombia sede Medellín, Departamento de Ciencias Agronómicas

La marchitez del aguacate es la enfermedad más importante de este cultivo en el mundo, cuyos agentes causales pueden ser de tipo biótico o abiótico. En Colombia se carece de información sobre el comportamiento epidemiológico de esta patología y los datos existentes son generales. El estudio de la dinámica espacial y temporal de una enfermedad es de gran importancia, ya que a partir de estos se podrá tener conocimiento de factores físicos, químicos, biológicos y climáticos implicados en su desarrollo, los cuales servirán de información para el diseño de mejores estrategias de manejo. En este trabajo se evaluó la dinámica espacial y temporal de la marchitez del aguacate, para lo cual se realizó el seguimiento de esta enfermedad durante 42 meses bajo condiciones de campo, evaluando la incidencia, severidad, clima y ubicación espacial de cada una de las plantas en un lote de 4 Ha. Los resultados encontrados en esta investigación sugieren que la incidencia y severidad de la marchitez del aguacate en el tiempo está influenciada por la susceptibilidad en las etapas iniciales en campo, donde ocurren las mayores tasas de estas dos variables, posterior la epidemia se estabiliza y los aumentos se dan como consecuencia de una mayor precipitación. Por su parte el análisis espacial sugiere que esta enfermedad presenta fuerte a mediana dependencia espacial y agregación, la cual se pierde con el transcurso del tiempo, consecuencia directa de la coalescencia de focos en las zonas de menor pendiente dentro del terreno. Con base en lo encontrado en este trabajo se sugiere que la calidad fitosanitaria de las plántulas que se siembran en campo y los niveles del agua en la zona de plateo como consecuencia de la acumulación o alta precipitación tienen una fuerte influencia en la dinámica espacial y temporal de la marchitez del aguacate.

Este trabajo fue financiado por la Universidad Nacional de Colombia sede Medellín y aportes de los autores y agricultores.



SIM6-7-01394

INFLUENCIA DE LA FRECUENCIA DE RIEGO EN LA VERTICILOSIS DEL OLIVO EN CONDICIONES SEMICONTROLADAS Y EN CAMPOPérez M.¹, Serrano N.², Lorite J.I.², Arquero O.², Orgaz F.³, López F.J.¹

1) Departamento de Agronomía, Universidad de Córdoba, Campus Universitario de Rabanales, Edificio Celestino Mutis (C4), 14071, Córdoba, Spain.

2) IFAPA, Centro 'Alameda del Obispo', 14080 Córdoba, Spain.

3) Instituto de Agricultura Sostenible, Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), Apartado 4084, 14080, Córdoba, Spain

El grupo AGR-216 de la Universidad de Córdoba (UCO) está desarrollando actualmente investigaciones para determinar la influencia del riego en la Verticilosis del Olivo (VO). En Diciembre 2011 se estableció un experimento (Exp. I) en microparcels con suelo naturalmente infestado por *Verticillium dahliae* procedente de marismas (Utrera, Sevilla). En éste se estudió la influencia de frecuencias de riego diario, semanal, quincenal y deficitario en el desarrollo de la VO en 'Picual' (susceptible), 'Arbequina' (moderadamente susceptible), y 'Frantoio' (resistente). La enfermedad comenzó en otoño 2012. El área bajo la curva de progreso de la enfermedad en el tratamiento riego diario-'Picual' fue significativamente mayor que en el resto de combinaciones frecuencia de riego-cultivar, desde Diciembre 2012 (14.8%) a Julio 2013 (42.8%). Un segundo experimento (Exp. II), se estableció en Junio 2013 en un campo naturalmente infestado en Arjona (Jaén), en el que se está evaluando la influencia de tres frecuencias de riego sobre el desarrollo de la enfermedad en 'Picual' en condiciones naturales. Hasta el momento, en los tratamientos de riego diario y quincenal se ha observado una incidencia (27.7%) y mortalidad (12.5%) mayores que en el de riego deficitario (7.1% y 5.3, respectivamente). A finales de 2013 se estableció un nuevo experimento de campo (Exp. III) similar al Exp. II, en una parcela del Campus de Rabanales (UCO) en cuyo suelo se practicaron grandes zanjas que se rellenaron con suelo infestado de la misma procedencia que el del Exp. I. En Junio 2014 no se habían detectado todavía plantas con síntomas en este tercer experimento. Hasta la fecha, los resultados indican que el riego diario favorece claramente el desarrollo de la VO en cultivares susceptibles y que la resistencia cultivar podría ser más relevante en una estrategia de control integrado que el efecto negativo del riego sobre la enfermedad.

Acuerdo entre la Universidad de Córdoba y la Interprofesional del Aceite de Oliva Español (UG 400544) y proyecto AGL2011-1037 del Ministerio de Economía y Competitividad.



SIM6-8-01336

SISTEMA DE APOYO A LA TOMA DE DECISIONES PARA EL MANEJO DE NEMATODOS FITOPARÁSITOS EN ZONAS DE CULTIVO DE VIÑEDO EN ANDALUCÍA

Navas-Cortés J.A.¹, Castillo P.¹

1) Instituto de Agricultura Sostenible, Consejo Superior de Investigaciones Científicas

Se ha desarrollado un Sistema de apoyo a la toma de decisiones (SATD) para nematodos fitoparásitos (NF) que infestan/infectan zonas de cultivo de viñedo en las tres principales zonas vitícolas de Andalucía: Condado de Huelva DO (Huelva), Montilla-Moriles DO (Córdoba), y Jerez-Sherry y Manzanilla-Sanlúcar de Barrameda DO (Cádiz) en base a factores agronómicos, edáficos, geográficos, y climáticos.

En cada una de las tres DOs se seleccionó un área representativa de la zona de cultivo de viñedo de 900 km² que se dividió en unidades de 4 km² en una malla regular y continua. Se han analizado 646 muestras de suelo y raíces en las que se determinó la identidad y densidad de población de NF en vid (263 muestras) y olivo (135 muestras). Se identificaron 173 especies de NF encuadradas en 10 grupos taxonómicos: Longidóridos (32 especies), Trichodoridos (17 especies), Hoplolaimidos (18 especies), Belonolaimidos (25 especies), Formadores de nódulos y reniformes (6 especies), Lesionadores de raíz (13 especies), Criconemátidos (14 especies), Paratilénchidos (9 especies), Tilenchoideos (31 especies), y Formadores de quistes (8 especies). La mayor riqueza de especies se detectó en Montilla-Moriles, seguida de Huelva y Jerez. El análisis del patrón de distribución espacial permitió identificar siete grupos funcionales de muestras en función de sus NF. Los análisis factorial multivariante, CART y canónico-discriminante indicaron como los parámetros físico-químicos de mayor influencia en la constitución de dichos grupos funcionales fueron la CIC, Ca, Carbonatos, Caliza, pH y textura. A partir de esta información se ha implementado un Índice de riesgo para cada uno de los grupos de NF en base a las características climáticas, agronómicas y del suelo. En todos los casos, los modelos seleccionados incluyeron variables agronómicas, climáticas, edáficas y de localización geográfica, a excepción de los hoplolaimidos cuya densidad de población únicamente dependió de su ubicación geográfica y contenido en arcilla. De forma individual, el cultivo huésped y el sistema de manejo fueron los que mostraron mayor peso, destacando la adecuación de los modelos para NF de relevancia como *Meloidogyne* spp., *Heterodera* spp. y *Pratylenchus* spp. La menor adecuación para los Longidóridos y Trichodoridos puede indicar su menor plasticidad y su distribución más restringida. Finalmente, con la información generada y utilizando herramientas de análisis espacial y de sistemas de información geográfica se ha implementado un SATD de aplicación para el manejo de NF en zonas de cultivo de viñedo de Andalucía.

Financiación: Proyecto AGL2009-06955-MICIN, fondos CICE-Junta de Andalucía (ayudas Grupo PAIDI AGR-136) y cofinanciación FEDER (EU)

Resúmenes de comunicaciones orales

*Sesión simultánea 7:
Interacción Planta-Microorganismo IV
(SIM7-1 a SIM7-8)*





SIM7-1-01469

LA ADAPTACIÓN A HUÉSPED DE UN VIRUS GENERALISTA, EL VIRUS DEL MOSAICO DEL PEPINO, INDICA COEVOLUCIÓN PLANTA-VIRUS

Montes N.¹, Fraile A.¹, Alonso-Blanco C.², García-Arenal F.¹

1) Universidad Politécnica de Madrid 2) Centro Nacional de Biotecnología, CSIC

La virulencia de los patógenos, y las medidas de defensa que sus huéspedes desarrollan contra ellos, afectan negativamente a la eficacia biológica de huésped y patógeno. De este modo, ambos ejercen una presión de selección sobre el otro miembro de la interacción, lo que puede dar lugar a un proceso de coevolución. Uno de los posibles efectos de este proceso es la adaptación del patógeno a su huésped. Los fenómenos de adaptación a huésped pueden tener una gran importancia en la dinámica evolutiva de los patógenos. Sin embargo, a penas existe evidencia experimental al respecto, especialmente en virus de plantas. Uno de los motivos de esta carencia es la falta de sistemas planta-virus bien caracterizados en los cuales, al contrario que en los cultivos, la dinámica evolutiva del huésped no está determinada por la acción humana. Por ello, en este estudio se ha analizado el fenómeno de adaptación a huésped utilizando el patosistema constituido por el virus del mosaico de pepino (CMV) y uno de sus huéspedes silvestre *Arabidopsis thaliana*. Con este objetivo, se ensayaron 4 aislados de CMV procedentes de *Arabidopsis* y 4 procedentes de cultivos de cucurbitáceas, en 21 genotipos silvestres de *Arabidopsis* y en una variedad de melón. En cada una de las interacciones se cuantificó la multiplicación y la virulencia de CMV. Los resultados muestran que, a pesar de que CMV es un virus generalista que infecta gran variedad de huéspedes, en *Arabidopsis* el nivel de multiplicación y de virulencia de los aislados de *Arabidopsis* es mayor que el de los aislados de melón. Además los aislados de *Arabidopsis* constituyen un grupo filogenético diferente al de los aislados de cucurbitáceas.

Por tanto, la adaptación de los aislados de *Arabidopsis* a su huésped de procedencia apoya la existencia de un proceso de coevolución en el sistema CMV-*Arabidopsis*.



SIM7-2-01157

Melon necrotic spot virus FACTORIES DERIVE FROM MITOCHONDRIA AND ARE PRIMARILY INDUCED BY VIRAL P29Gómez-Aix C.¹, García-García M.C.², Aranda M.A.¹, Sánchez-Pina M.A.¹

1) Centro de Edafología y Biología Aplicada del Segura (CEBAS)-CSIC, Apdo. correos 164, 30100 Espinardo, Murcia (Spain).

E-mail: spina@cebas.csic.es.

2) Servicio de Ayuda a la Investigación, Universidad de Murcia, Campus de Espinardo, 30100 Espinardo, Murcia (Spain).

Melon necrotic spot virus (MNSV; genus *Carmovirus*, family *Tombusviridae*) is a single stranded, positive-sense RNA virus that has become a singular experimental model for the analysis of cell-to-cell virus movement (Genovés *et al.*, *Mol. Plant-Microbe Interact.* 23:263) and translation of uncapped viral RNAs (Truniger *et al.*, 2008, *Plant Journal* 56:716). To place observations in a cellular context, we have characterised local MNSV lesions. Histological analysis, *in situ* hybridization of viral RNAs and TUNEL experiments identified three concentric sectors (S) in lesions, comprising infected and necrotised (S1), infected and non-necrotised (S2) and uninfected but metabolically altered (S3) cells. Analysis of cellular ultrastructure in S2 revealed the specific presence of multivesicular bodies (MVBs) evoking mitochondria. Immunolocalisation of glycine-decarboxylase P protein, specific of mitochondria (Palmieri *et al.*, 2010, *Plant Physiol.* 152: 1514), in MVBs confirmed their mitochondrial origin. *In situ* hybridisation and immunolocalisation showed the prevalent localization of positive-sense viral RNA, CP and dsRNA in MVBs. A reconstruction of the 3D structure of MVBs showed that they contain large internal interconnected dilations, and are possibly connected to the outside cytoplasmic environment through pores and/or complex structures, and also with lipid bodies. Transient expression of MNSV p29 revealed its specific mitochondrial targeting and its ability to induce similar alterations to those seen after MNSV infection. Therefore, our data suggest that MNSV viral replication factories are originated from mitochondria, primarily through the action of the MNSV p29 protein.

Work supported by grants AGL2009-07552/AGR and AGL2012-37390



SIM7-3-01415

EXPLORING POSSIBLE FUNCTIONS OF GENE PRODUCTS DERIVED FROM THE 5' GENOMIC REGION OF *Sweet potato feathery mottle virus* (SPFMV)

Mingot A.¹, Valli A.², Vilaplana L.¹, López-Moya J.J.¹

1) Centro de Investigación en Agrigenómica CRAG, CSIC-IRTA-UAB-UB, Campus UAB, Edifici CRAG, Bellaterra, Cerdanyola del Vallès, 08193 Barcelona

2) University of Cambridge, Downing Street, CB2 3EA, Cambridge, United Kingdom

Sweet potato feathery mottle virus (SPFMV) is a member of the genus *Potyvirus*, family *Potyviridae* that infects sweet potato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam., family *Convolvulaceae*). SPFMV causes significant yield losses in this crop, in particular when it is present in mixed viral infections with the unrelated crinivirus *Sweet potato chlorotic stunt virus*.

Potyriviruses are RNA viruses with a common genomic organization characterized by the presence of a large ORF translatable into a polyprotein that is processed into a set of functional mature gene products (P1, HCPro, P3, 6K1, CI, 6K2, VPg-Nla, NIb and CP), along with a short embedded ORF, PIPO, located within the P3 region, which could be translated through frameshift starting at a conserved G₁₋₂A₆₋₇ domain to produce an additional product P3N+PIPO. Recently, a novel ORF has been identified *in silico* in the genome of SPFMV and other related sweet potato viruses. This new ORF, tentatively named PISPO, can be found embedded within the P1 region, starting in a similar GGAAAAAA domain, and it could result in the production of a putative new gene product P1N+PISPO.

We have initiated our work characterizing the partial sequence of the 5' region of SPFMV isolates found in samples of commercial sweet potatoes. Analysis of the viral genomic sequences corresponding to two SPFMV isolates showed the presence of the conserved frameshift signature domain upstream of a 232-residues long PISPO sequence.

To gain insights about functions of the different gene products deriving from the 5' genomic region of SPFMV (P1, HCPro, and the putative P1N+PISPO), we have cloned into constructs adequate for transient expression in plant tissues the corresponding sequences of one SPFMV isolate. In other potyriviruses the essential RNA silencing suppressor (RSS) activity is found associated to HCPro, but in other members of the *Potyviridae* family the function of RSS is often shifted to P1. Considering these precedents, co-agroinfiltration assays to test for RSS activity will be performed initially with the different constructs, although other possible functions during the virus cycle of the gene products will be also explored

Funds provided by Mineco grants AGL2010-14949 and AGL2013-42537-R. AMM is recipient of FPI fellowship BES-2011-045699.



SIM7-4-01447

IDENTIFICACIÓN DE AMINO ÁCIDOS DE LA PROTEÍNA DE MOVIMIENTO NSm DEL VIRUS DEL BRONCEADO DEL TOMATE, CRÍTICOS PARA SUPERAR Y/O AUMENTAR LA EFICIENCIA, EN LA RESISTENCIA MEDIADA POR EL GEN Sw-5

Galindo S.¹, Pallás V.¹, Sánchez-Navarro J.A.¹

1) Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas (CSIC-UPV). 46022 Valencia

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. La comparación de secuencias entre aislados de TSWV que superaban la resistencia mediada por el gen *Sw-5*, sugerían que la resistencia estaba asociada a la proteína de movimiento NSm de TSWV y en concreto, a las sustituciones C118Y y T120N (López y col., 2011). Sin embargo, la ausencia de clones infectivos para TSWV ha condicionado la caracterización molecular del determinante viral responsable de superar la resistencia. Los resultados obtenidos mediante expresión transitoria y el sistema del *virus el mosaico de la alfalfa* (AMV), que permite el intercambio de proteínas de movimiento virales, han permitido concluir que el gen NSm es el responsable de superar la resistencia mediada por el gen *Sw-5* y que los cambios C118Y y T120N son los responsables de evitar la respuesta hipersensible, aunque su incorporación en el gen NSm, implica un coste en el ciclo viral (Peiró y col., 2014). En el presente trabajo, hemos utilizado el sistema de AMV para evolucionar diferentes genes de NSm de TSWV, con el objetivo de caracterizar residuos de amino ácidos críticos para superar la resistencia mediada por el gen *Sw-5* o para mejorar la eficiencia de variantes resistentes y que, en consecuencia, nos permitan predecir la aparición de nuevas variantes potencialmente peligrosas en campo, tanto por superar la resistencia como por competir con los aislados silvestres. Para ello, se han utilizado tres genes de NSm de TSWV correspondientes a un aislado silvestre, que difiere solo en dos amino ácidos con variantes que superan la resistencia (Gr1NL2-HM015513-), una variante del aislado silvestre que difiere solo en un amino ácido y un aislado que supera la resistencia (GRAU -FM163370-). Resultados preliminares han puesto de manifiesto que parte de las líneas ensayadas superan la resistencia (ausencia de respuesta hipersensible) con cambios de amino ácidos en el gen NSm diferentes de los descritos previamente (C118Y y T120N).

Peiró, A., Cañizares, M.C., Rubio, L., López, C., Moriones, E., Aramburu, J., Sánchez-Navarro, J. (2014) The movement protein (NSm) of Tomato spotted wilt virus is the avirulence determinant in the tomato *Sw-5* gene-based resistance. *Mol Plant Pathol.* DOI: 10.1111/mp.12142

López, C., Aramburu, J., Galipienso, L., Soler, S., Nuez, F. and Rubio, L. (2011) Evolutionary analysis of tomato *Sw-5* resistance-breaking isolates of Tomato spotted wilt virus. *J. Gen. Virol.* **92**, 210–215.



SIM7-5-01437

CARACTERIZACIÓN DE PEROXIDASAS RELACIONADAS CON LA EXPRESIÓN DE LA RESISTENCIA EN LA INTERACCIÓN TOMATE/ *Meloidogyne javanica*.**Emiliozzi M.¹, Cabrera J.², Escobar C.², Andrés M.F.¹**

1) ICA-CSIC. c/ Serrano 115, 28006. Madrid. Email: mafay@ica.csic.es

2) Fac. Ciencias Ambientales y Bioquímica. UCLM. Avda de Carlos III s/n, 45071, Toledo.

Uno de los principales mecanismos de defensa de las plantas al ataque de patógenos es la respuesta hipersensible (HR) caracterizada por la generación de un ambiente tóxico mediante la producción de H_2O_2 y especies reactivas de oxígeno (ROS). En tomate (*Solanum lycopersicum*) la producción de ROS en la respuesta a la infección de nematodos formadores de nódulos (*Meloidogyne* sppSPP.) difiere entre la interacción compatible e incompatible. Las peroxidasas de plantas de la Clase III (PRXs) han sido propuestas como enzimas claves en la regulación de H_2O_2 y la producción de ROS. En el presente trabajo se aborda el estudio comparativo de los patrones de expresión de genes de PRXs en las primeras fases de la infección por *Meloidogyne javanica* en tomate susceptible y resistente (gen *Mi-1*), y su posible relación con la expresión de la resistencia. A partir del análisis del transcriptoma de tomate en la interacción compatible obtenido en un trabajo previo, se han identificado 16 genes de peroxidasa con expresión diferencial. De ellos se han seleccionado 4 genes de PRXs cuyos cambios de expresión se han determinado mediante la monitorización de los niveles de los transcritos de ARNm por qRT-PCR en dos tiempos de infección (2 y 4 días) y en distintos tejidos radicales de tomate resistente (Motelle) y susceptible (Moneymaker). Los patrones de expresión obtenidos demuestran que, en la etapa más temprana de la infección, la transcripción global de los genes de PRXs estudiados se dispara en el genotipo resistente. Por el contrario en la interacción compatible se constata la tendencia opuesta, con la represión significativa de al menos dos de estos genes. Por otro lado es importante destacar que la expresión de algunos genes de PRXs en la interacción compatible puede inducirse de forma sistémica en raíces no infectadas directamente por los nematodos.

* Este trabajo ha sido financiado por fondos del MINECO al Proyecto AGL2010-17388.



SIM7-6-01135

EL AGENTE DE BIOCONTROL ENDOFÍTICO *Pseudomonas fluorescens* PICF7 INDUCE RESPUESTAS DE DEFENSA SISTÉMICAS EN TEJIDOS AÉREOS AL COLONIZAR RAÍCES DE OLIVOGómez-Lama C.¹, Schiliro E.¹, Valverde-Corredor A.¹, Mercado-Blanco J.¹

1) Instituto de Agricultura Sostenible (CSIC)

La cepa *Pseudomonas fluorescens* PICF7, endofita natural de raíces y eficaz agente de control biológico (ACB) de la Verticilosis (*Verticillium dahliae* Kleb.) del olivo, induce un amplio rango de respuestas defensivas en raíces de esta leñosa. Con objeto de comprobar si estas respuestas también se inducen de forma sistémica, se recogieron a lo largo de un intervalo temporal (21 días) tallos y hojas de plantones 'Arbequina' cuyas raíces habían sido inoculadas con PICF7. Se construyó una librería de cDNAs mediante la metodología 'Suppression Subtractive Hybridization', enriquecida en genes de olivo inducidos. Esta estrategia permitió identificar 376 'Expressed Sequence Tags' (ESTs) inducidas, muchos de ellas relacionadas con respuestas defensivas en plantas. Se seleccionaron cinco ESTs para llevar a cabo experimentos de PCR cuantitativa en tiempo real dirigidos a: (1) validar su inducción y (2) determinar su patrón de expresión a lo largo del tiempo (1, 3, 7 y 15 días después de la inoculación con PICF7). La inducción de los genes que codifican para lipoxigenasa 2, catalasa, 1-aminociclopropano-1-carboxilato oxidasa y fenilalanina amonio-liasa se confirmó para alguno de los tiempos ensayados. Asimismo se observó, al igual que previamente en raíz, la inducción de diferentes factores de transcripción (jerf1, wrky, bHLH) implicados en respuestas de defensa. Los resultados confirman que la colonización de raíces de olivo por parte de este ACB no sólo induce genes implicados en respuestas defensivas en este órgano, sino que también lo hace en tejidos distantes. Esto indica que la planta responde de forma sistémica a la colonización de este endofito, al menos transitoriamente, y que dichas respuestas podrían explicar su capacidad de biocontrol.

Financiado por los proyectos P07-CVI-02624 y P12-AGR667 de la Junta de Andalucía y AGL2009-07275 del MICINN/MINECO, con cofinanciación FEDER de la UE.



SIM7-7-01438

EFFECTO DEL MODO DE TRANSMISIÓN EN LA EVOLUCIÓN DE LA VIRULENCIA DE UN VIRUS DE PLANTASPagán I.¹, Montes N.¹, Milgroom M.G.², García-Arenal F.¹

1) Centro de Biotecnología y Genómica de Plantas (UPM-INIA)

2) Cornell University

Uno de los principales objetivos de la fitopatología es entender cuales son los factores que determinan la virulencia de los patógenos. Algunos de estos factores se han identificado en base a modelos teóricos. Sin embargo, la validez de estas modelizaciones raramente se ha analizado experimentalmente. En este estudio se ha investigado el papel de dos de estos factores –el modo de transmisión, y la adaptación del huésped en respuesta a la evolución del patógeno– en la evolución de la virulencia del virus del mosaico del pepino (CMV) en su huésped natural *Arabidopsis thaliana*. Para ello, se realizaron pases seriados en los que tres aislados de CMV se transmitieron (1) verticalmente, (2) horizontalmente, (3) alternando ambos modos de transmisión. Posteriormente, en los virus evolucionados y en los no evolucionados se cuantificó: la tasa de transmisión por semilla, la acumulación viral, la virulencia y el efecto de la infección sobre el crecimiento del huésped en plantas de *A. thaliana* provenientes del stock de semillas original. Estos datos se compararon con el valor de los mismos parámetros en plantas provenientes de semillas derivadas del último pase de transmisión vertical. Los resultados indicaron que durante los pases de transmisión vertical CMV aumentó su tasa de transmisión por semilla, disminuyendo su acumulación viral y su virulencia. Estos cambios se debieron tanto a la evolución de los aislados de CMV como a la adaptación del huésped en respuesta a la evolución del virus, lo que concuerda con la existencia de un fenómeno de coevolución. Finalmente, la adaptación del huésped a los virus evolucionados implicó una reducción de la resistencia frente a los virus no evolucionados. Este trabajo proporciona evidencia del papel clave que juega la interacción entre el modo de transmisión y la coevolución huésped-patógeno en la evolución de la virulencia.



SIM7-8-01348

IDENTIFICACIÓN DE FACTORES DE PATOGENICIDAD EN *Penicillium digitatum* MEDIANTE TRANSFORMACIÓN ALEATORIA CON T-DNA.

Selma C.¹, Carmona L.¹, Teixidó N.², De la Fuente B.¹, Viñas I.³, Usall J.², Torres T.², Ballester A-R.¹, González-Candelas L.¹

1) Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos (IATA-CSIC). Avda. Catedrático Agustín Escardino 7, Paterna, 46980-Valencia. España.

2) IRTA, XaRTA-Postcosecha. Avda. Rovira Roure 191, 25198-Lleida, Cataluña. España.

3) Departamento de Tecnología de Alimentos, Universidad de Lleida, XaRTA-Postcosecha, Centro Agrotecnio. Avda. Rovira Roure 191, 25198-Lleida, Cataluña. España.

El hongo *Penicillium digitatum*, causante de la podredumbre verde, es el principal patógeno postcosecha de frutos cítricos. Aunque las pérdidas provocadas por este hongo tienen un gran impacto económico, todavía existe un gran desconocimiento acerca de sus factores de virulencia y patogenicidad. La reciente secuenciación del genoma de *P. digitatum* facilitará la identificación de posibles genes implicados en patogénesis. En el presente trabajo hemos emprendido una aproximación de genética directa encaminada a la identificación de factores de patogenicidad en *P. digitatum*. Para ello hemos construido un plásmido binario que contiene el gen que codifica una proteína verde fluorescente modificada bajo el control del promotor del factor de elongación de la transcripción de *P. digitatum*. Para facilitar el rescate del T-DNA insertado como plásmido, incluimos en el mismo el origen de replicación y el marcador de resistencia a ampicilina a partir del plásmido Bluescript. Empleando la transformación mediada por *Agrobacterium tumefaciens* hemos generado una colección de más de 4000 mutantes de *P. digitatum* resistentes a higromicina. Se ha estimado que en el 65% de ellos solo hay una copia de T-DNA integrada en el genoma, lo cual facilita el análisis de los transformantes seleccionados. Posteriormente, se realizaron ensayos de patogenicidad de 1920 transformantes mediante inoculación *in vivo* de frutos cítricos y, tras dos rondas de infección, nueve transformantes mostraron una reducción significativa en virulencia. Para localizar el sitio de integración del T-DNA se secuenció el genoma de los nueve transformantes candidatos mediante tecnología Illumina HiSeq2000. El mapeo de las lecturas obtenidas contra la secuencia del T-DNA insertado y contra el genoma de *P. digitatum* facilitó la localización del sitio de integración del T-DNA, así como la determinación de los eventos de recombinación que habían tenido lugar durante la integración.

Resúmenes de comunicaciones orales

*Sesión simultánea 8:
Control de Enfermedades II
(SIM8-1 a SIM8-8)*





SIM8-1-01462

ESTRATEGIA DE MANEJO INTEGRADO PARA *Phytophthora cinnamomi* RANDS EN AGUACATE Y SU ANÁLISIS ECONÓMICORamírez J.G.¹, Castañeda D.A.¹, Morales J.G.¹

1) Universidad Nacional de Colombia sede Medellín, Facultad de Ciencias Agrarias-Departamento de Ciencias Agronómicas.
Medellín Colombia

Phytophthora cinnamomi Rands, es el agente causal más frecuente del complejo marchitez del aguacate. Se considera que las pérdidas económicas pueden estar entre el 45 y 90%. Actualmente existen diferentes estrategias de manejo de esta enfermedad, las cuales han permitido la reducción de la severidad y la recuperación de las plantas, pero muchas de estas prácticas no se realizan periódicamente, dada la poca viabilidad y su reducida disponibilidad, por lo cual se recurre frecuentemente al uso de productos químicos. Esta investigación tuvo como objetivo evaluar el efecto de diferentes estrategias de manejo de esta enfermedad bajo condiciones de campo, para lo cual se diseñaron 8 tratamientos los cuales fueron: T0: plantas enfermas; T1: aspersión al suelo de metalaxyl + mancozeb; T2: inyecciones al tallo de fosfito de potasio; T3:T1 +T2; T4: aspersión al suelo de silicato de potasio; T5: adición en la raíz de mantillo orgánico; T6: incorporación al suelo de 10 kg de un sustrato compostado; T7: T4+T5+T6 y T8: T1+T2+ T4+T5+T6. Se utilizó un diseño en bloques al azar, con cinco repeticiones por tratamiento, las evaluaciones se realizaron por un periodo de 36 meses. Los resultados encontrados sugieren que los tratamientos T1, T2, T4, T5 y T6, aplicados en forma individual no presentan buenos resultados de control, en comparación con el T8, donde se logra reducir hasta un 52% la AUDPC de la enfermedad, incrementar en un 44% la calidad extra de la fruta y aumentar en un 59%, el porcentaje de raíces viables. Además la propuesta de T8, presentó la mejor relación Beneficio/Costo. Con el fin de disminuir los efectos negativos de *P. cinnamomi*, se hace necesario que su manejo se haga bajo un enfoque de manejo integrado, donde las practicas de manejo sean económicamente viables y de fácil consecución y adopción por parte de los productores.

Este trabajo fue financiado por la Universidad Nacional de Colombia sede Medellín y aportes de los autores y agricultores.



SIM8-2-01436

PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS SINTÉTICOS. PERSPECTIVAS EN EL CONTROL DE ENFERMEDADES DE LAS PLANTAS

Montesinos E.¹, Badosa E.¹, Montesinos L.¹, Cabrefiga J.¹, Pla M.², Nadal A.², Feliu L.³, Planas M.³, Bardají E.³

1) Patología Vegetal-CIDSAV-XaRTA, Instituto de Tecnología Agroalimentaria, Universidad de Girona

2) Tecnología de Alimentos-XaRTA, Instituto de Tecnología Agroalimentaria, Universidad de Girona

3) LIPPSO, Departamento de Química, Universidad de Girona

Los péptidos antimicrobianos (PAMs) pueden constituir un complemento a los productos fitosanitarios existentes, ya que se pueden obtener variantes sintéticas optimizadas mediante métodos de diseño y química combinatoria.

Nuestros laboratorios han generado diversas librerías peptídicas de PAMs. En total se han desarrollado 324 PAMs de pequeño tamaño (<3 KDa) incluyendo 155 lineales (librería CECMEL11), 50 cíclicos (librería CYCLO10), 11 péptidos conteniendo una 5-arilhistidina, 51 ciclolipopéptidos, 54 peptidotriazoles y 3 estructuras multivalentes. A partir del undecapéptido lineal BP100 procedente de la librería CECMEL11, se generaron derivados conteniendo D-aminoácidos (BP143), una arilhistidina (BP284), un anillo de triazol (BP250) y secuencias adaptadas para ser expresadas en plantas. A partir del decapéptido cíclico BPC194, se sintetizaron ciclopeptidotriazoles (BPC552) y ciclolipopéptidos (BPC500). Dichos péptidos leader presentan concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) en un rango de 1 a 10 micromolar, similar al de los antibióticos convencionales

Una selección ha sido evaluada contra *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* en peral, *Xanthomonas vesicatoria* en pimiento, *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* en nogal, *Erwinia amylovora* en peral y manzano, *Stemphylium vesicarium* en peral, *Colletotrichum* spp. y *Botrytis cinerea* en fresón, y *Penicillium expansum* en manzana. BP100 y BP143 han sido ensayados en campo para el control del fuego bacteriano con eficacia similar a productos comerciales.

Varios péptidos de la librería CECMEL11 han sido expresados con éxito en arroz utilizado como biofactoría, mediante promotores constitutivos e inducibles, generando los productos activos esperados.

Este trabajo ha sido subvencionado parcialmente por los proyectos AGL2001-2354, AGL2003-03354, AGL2006-13564, PPT-060000-2008-2, ERA-NET FP7 PLANT-KBBE EUI2008-03572, AGL-2009-13255, AGL2012-39880, AGL2010-17181 y FP7 KBBE.2013.1.2-04.



SIM8-3-01573

SUSTANCIAS BIOACTIVAS CON ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA SOBRE *Burkholderia glumae* DEL CULTIVO DE ARROZ OBTENIDAS A PARTIR DE RIZOBACTERIAS ANTAGONISTAS NATIVASRueda E.A.¹, Oliveros D.F.¹, Mosquera G.²

1) Grupo de Investigación en Productos Naturales de la Universidad del Tolima

2) Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT)

En Colombia, la producción de arroz fue de 1.435.184 toneladas, para el segundo semestre de 2013, sin embargo las enfermedades causadas por fitopatógenos afectan la competitividad de este sistema productivo. Uno de los problemas emergentes en los últimos años en Colombia y que viene causando un gran impacto entre los productores, es el añublo bacterial, causado por la bacteria *Burkholderia glumae*, la cual no ha podido ser controlada con los métodos tradicionales. Los intentos de control presentan un escenario complicado, puesto que los agricultores recurren desesperadamente al uso de diferentes ingredientes activos que presentan baja o nula actividad del *B. glumae*. El objetivo de este estudio fue la obtención de sustancias aisladas a partir de rizobacterias antagonistas nativas aisladas de suelos de vocación arrocera, con actividad antimicrobiana sobre tres cepas *B. glumae* (3883-8; 3866B-10; 3890-2), para lo cual se realizaron aislamientos microbianos de la rizosfera en zonas arroceras del departamento del Tolima - Colombia. Posteriormente se realizó un tamizaje de los aislamientos basándose en su capacidad antagonica, mediante ensayos duales rizobacteria-patógeno. Los microorganismos que presentaron mayor supresión de los patógenos se fermentaron en medio líquido, para la posterior obtención de los metabolitos secundarios bacterianos. Al evaluar la actividad de 5 extractos obtenidos de los aislamientos codificados como S11B2, S12A1, S21A1, S12B2, P21C5 se observó inhibición de las cepas de *B. glumae*. La cepas de *B. glumae* 3866B-10 y 3883-8 presentaron inhibiciones entre 75,52-100% y 77,23-100% respectivamente. Finalmente extractos de S21A1, S12B2, P21C5 presentaron inhibición entre 11,84-29,07% frente a la cepa 3890-2. Este estudio permitió la selección preliminar de aislamientos de rizobacterias antagonistas nativas, con potencial para su uso en control biológico y para la obtención de compuestos de origen natural bioactivos para el control de *B. glumae*.



SIM8-4-01445

***Lactobacillus plantarum*, NUEVOS AGENTES DE BIOCONTROL DE ENFERMEDADES CAUSADAS POR BACTERIAS FITOPATÓGENAS**Roselló G.¹, Bonaterra A.¹, Badosa E.¹, Francés J.¹, Montesinos L.¹, Mora I.¹, Daranas N.¹, Montesinos E.¹

1) Instituto de Tecnología Agroalimentaria-CIDSAV, Universidad de Girona

Las limitaciones en el uso de los métodos de control químico y la escasa disponibilidad de productos alternativos eficaces contra bacterias causantes de enfermedades en plantas, han estimulado el interés en el desarrollo de agentes de biocontrol como ingredientes activos de productos fitosanitarios. Las bacterias del ácido láctico (BAL) son buenas candidatas a agentes de biocontrol de bacteriosis ya que presentan actividad antimicrobiana debida a diversos mecanismos como antibiosis (producción de ácidos orgánicos, bacteriocinas y otros compuestos de bajo peso molecular), competencia por nutrientes, y colonización del huésped. Además se trata de bacterias cuya bioseguridad ha sido aceptada al considerarse QPS por la EFSA (UE) y GRAS por la EPA (USA).

Durante varias campañas se constituyó una colección de 600 aislados de BALs, obtenidos a partir de plantas y productos vegetales cosechados. Los aislados se sometieron a un estudio de su actividad antibacteriana *in vitro* frente a *Erwinia amylovora*, *Pseudomonas syringae* y *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria*. La colección de aislados se cribó mediante PCR utilizando cebadores específicos para el género *Lactobacillus*, identificándose posteriormente las especies *L. plantarum*, *L. pentosus* y *L. paraplantarum*. Las 45 cepas identificadas como *L. plantarum* (Lp) mostraron actividad antagonista frente a las tres bacterias fitopatógenas estudiadas. Las cepas de Lp se caracterizaron más en detalle para determinar la presencia de genes que intervienen en la síntesis de plantaricinas y conocer su heterogeneidad genotípica. Posteriormente se evaluó su eficacia en el control de infecciones causadas por *E. amylovora* en ensayos *ex vivo* (hojas, flores y frutos inmaduros), en planta y en condiciones de semi-campo, mostrando las cepas TC92 y PM411 eficacias similares a otros agentes de biocontrol de referencia. Estas cepas fueron caracterizadas más en detalle mediante RAPDs y secuenciación del genoma, constituyendo el objeto de una patente. Con el objetivo de mejorar la eficacia en el biocontrol, se seleccionaron cepas de Lp con perfiles genéticos distintos para su utilización combinada (mezclas), desarrollando estrategias para aumentar su aptitud ecológica y confirmando la producción de plantaricinas tras su purificación e identificación mediante técnicas analíticas por FPLC, Western y MALDI-TOF. Actualmente se está evaluando su aplicabilidad en el control de la bacteriosis del kiwi causada por *P. syringae* pv. *syringae* y de los frutales de hueso (*X. arboricola* PV. *pruni*) y del fresón (*X. fragariae*).

Este trabajo ha sido financiado por los proyectos AGL-2009-13255-C02-01, AGL-2012-39880-C02-01-Fondos FEDER, FP7 KBBE.2013.1.2-04 613678 y por una beca FPI BES-2010-035738



SIM8-5-01513

EL VANILLILNONANOATO INDUCE RESISTENCIA SISTÉMICA EN PIMIENTO FRENTE A *Phytophthora capsici*

García T.¹, Veloso J.¹, Díaz-Varela J.¹

1) Grupo de Investigación de Fisiología das plantas, Departamento de Bioloxía Animal, Bioloxía Vexetal e Ecoloxía, Facultade de Ciencias, Universidade da Coruña, Campus de A Coruña, 15071 A Coruña, Spain

Phytophthora capsici Leon. es uno de los principales patógenos del pimiento. El objetivo de este trabajo ha sido comprobar si el vanillilnonanoato, un análogo sintético del capsiato, induce resistencia sistémica frente a *Phytophthora capsici* en pimiento e indagar en su mecanismo de acción. El compuesto se aplicó en los cotiledones y al día siguiente las plantas se inocularon añadiendo al sustrato una suspensión de zoosporas de *Phytophthora capsici*. Se realizó un seguimiento de los síntomas y se cuantificó por qPCR la biomasa del patógeno presente en la planta. También se estudió la señalización inducida por vanillilnonanoato mediante la medida de los niveles de peróxido de hidrógeno y la expresión génica relacionada con la síntesis de hormonas. Los genes elegidos fueron *CaPAL* y *CaICS* (ácido salicílico), *CaAOS* (jasmonato) y *CaACO* (etileno). Así mismo, se midió la expresión de seis genes implicados en la defensa de la planta (proteínas PR y biosíntesis de fitoalexinas). Además se realizaron ensayos usando el inhibidor de percepción del etileno MCP, así como medidas de actividad peroxidasa, lignina y fenoles. El tratamiento con vanillilnonanoato reduce los síntomas de la infección y la colonización por *P. capsici*. Se observó un pico de peróxido de hidrógeno en las plantas tratadas con el compuesto significativamente mayor que en las control. El vanillilnonanoato indujo la expresión de *CaACO* e inhibió la de *CaAOS* antes de la inoculación, y el MCP inhibió el efecto inductor de resistencia del vanillilnonanoato. En los genes de defensa también se detectaron cambios de expresión en varios de los tiempos analizados. Los niveles de lignina y actividad peroxidasa eran mayores en las plantas tratadas con el inductor, pero no hubo cambios en los fenoles.

Este trabajo ha sido financiado por la Xunta de Galicia (Proyecto 10MRU103009PR).



SIM8-6-00661

BIOCONTROL DE LA CENICILLA (*Leveillula taurica*) EN CULTIVOS DE CHILE (*Capsicum annuum*) CON HONGOS ANTAGONISTAS, EN CHIHUAHUA, MÉXICO.Guigón C.¹, Muñoz L.N.²

1) Centro de Investigación para los Recursos Naturales (CIRENA/SEP)

2) Facultad de Ciencias Químicas. Universidad Autónoma de Chihuahua

En este trabajo se ha hecho una selección de hongos antagonistas a *L. taurica* para reducir daños por cenicilla en cultivos de chile. Para ello, se evaluó el antagonismo *in vitro* de *Trichoderma asperellum* (TC74), *Metarhizium anisopliae* (Ma70) y *Beauveria bassiana* (Bb32). Se realizaron pruebas de antibiosis y confrontaciones contra diferentes hongos fitopatógenos. Se determinó producción de enzimas hidrolíticas en diferentes tiempos e inhibición de la germinación de conidias de *L. taurica*. Se evaluó el establecimiento de los hongos sobre el follaje de 3 tipos de chile (jalapeño, chilaca, árbol). Se realizaron aplicaciones foliares de los antagonistas en parcelas comerciales de chiles jalapeño y árbol. Se analizó el comportamiento temporal de incidencia y severidad y se realizó análisis de varianza de ambas variables.

Los 3 hongos antagonistas desarrollaron actividad quitinolítica (N-acetilglucosaminidasa, quitobiosidasa y endoquitinasa) y glucanolítica (β -1,3-glucanasa). El TC74 mostró la mayor actividad enzimática e inhibición de la germinación. La antibiosis solo fue desarrollada por TC74 y Ma70, este último desarrolló mayor actividad antibiótica contra diferentes hongos fitopatógenos y TC74 mostró mayor actividad micoparásita. Las poblaciones de los hongos sobre las hojas de las plantas fueron en promedio 5×10^4 UFC/ hoja (TC74), 3×10^4 (Bb32) y 1×10^4 (Ma70). En campo los mejores resultados se obtuvieron con TC74 y Ma70. Comparado con el control del agricultor en chile árbol redujeron la incidencia (31% Ma70, 34% TC74) y la severidad (41% Ma70, 42% TC74) de cenicilla. En chile jalapeño la incidencia no se redujo, sin embargo la severidad fue 15% menor con Ma70 y 37% menos con TC74.

T. asperellum y *M. anisopliae* redujeron la incidencia y la severidad de cenicilla en cultivos de chile en mayor proporción al control convencional del agricultor, por lo que representan una buena alternativa para el biocontrol de la enfermedad.



SIM8-7-01535

EVALUACIÓN DE ESPECIES DE *Trichoderma* y *Bacillus* COMO AGENTES DE CONTROL BIOLÓGICO DE ENFERMEDADES DE FRESA**Pastrana A.M.¹, Aguado A.¹, Sánchez M.C.¹, García J.¹, Akdi K.², Salgado D.², Capote N.¹**

1) IFAPA Centro Las Torres-Tomejil, Apdo Oficial, 41200 Alcalá del Río, Sevilla.

2) AMC Chemical, Avda. Río Viejo nº 40, 41703 Dos Hermanas, Sevilla

Macrophomina phaseolina y *Fusarium solani* son hongos de suelo patógenos para el cultivo de la fresa. Los métodos químicos utilizados para el control de estos patógenos son ineficientes para *M. phaseolina* y desconocidos para *F. solani*, debido a su reciente aparición como patógeno de fresa. La prohibición por parte de la UE del uso de la mayoría de los fungicidas químicos y sus efectos adversos sobre el medio ambiente y la salud humana han impulsado la búsqueda de alternativas ecológicas, entre las que se encuentra el uso de agentes de control biológico.

El objetivo de este estudio fue evaluar la eficiencia de cepas comerciales de *Trichoderma asperellum* (T18, Prodigy®) y de dos especies de *Bacillus* (*B. megaterium* B157 y *B. laterosporus* B197, Fusbact®) en el control de las enfermedades provocadas por *M. phaseolina* y *F. solani* *in vitro*, en condiciones de invernadero, y finalmente en campo. En los ensayos de invernadero y campo se llevaron a cabo tratamientos preventivos (antes de la inoculación artificial con el hongo) aplicados por inmersión de raíces o riego, y tratamientos curativos (después de la inoculación). Se evaluó la incidencia de la enfermedad como porcentaje de plantas muertas, el progreso de la enfermedad como ABCPEE, la necrosis en corona en el caso de *M. phaseolina* y el rendimiento de producción de fruto en el ensayo en campo. *T. asperellum* y *Bacillus* spp. fueron capaces de inhibir el crecimiento *in vitro* de *F. solani* y *M. phaseolina*. Los ensayos de invernadero y campo demostraron una reducción significativa de la incidencia y el progreso de la enfermedad mediante la aplicación preventiva por inmersión de raíces de *T. asperellum* (el mejor tratamiento contra *F. solani*) y *Bacillus* spp. (el mejor tratamiento contra *M. phaseolina*). Estos tratamientos produjeron un aumento de la producción de fruto con respecto al control.

* Este trabajo ha sido financiado por el proyecto INIA: RTA2011-00011-00-00 con un 70% de Financiación FEDER: 'Operational Programme 'Knowledge-based Economy'. Ana M^a Pastrana disfruta de una beca-contrato IFAPA predoctoral



SIM8-8-01330

***Azospirillum brasilense* ESTIMULA EL DESARROLLO A LA VEZ QUE AUMENTA LA CARGA VIRAL EN PLANTAS DE TOMATE Y MAÍZ INFECTADAS CON VIRUS.**

Román C.¹, Cueto-Ginzo A.I.^{1,2}, Rodríguez R.¹, Serrano L.^{1,3}, Meler P.⁴, Achón M.A.^{1,3}, Sin E.^{1,3}, Arcal L.^{1,2}, Medina V.^{1,3}

1) Grupo INPLAMICVEC. Departament de Producció Vegetal i Ciència Forestal, Universitat de Lleida (UdL)

2) Programa UdL-IMPULS. Universitat de Lleida

3) AGROTECNIO Center, Universitat de Lleida

4) Programa ITINERA

Azospirillum brasilense (Tarrand *et al.*, 1978) (Sp245), rizobacteria promotora del crecimiento (PGPR) e inductora de resistencia (ISR) en plantas, palía el efecto nocivo inducido por parásitos necrotrófos. Su posible acción indirecta en el control de biotrofos está en discusión.

Se ha analizado mediante proteómica diferencial la interacción tomate (cv. Boludo)/*Potato virus X* (PVX, KJ631111) y maíz (cv. B73)/*maize dwarf mosaic virus* (MDMV, AM110558), a diferentes tiempos post-inoculación y adicionando previamente o no la PGPR a las semillas.

Las plantas con *A. brasilense* (AZ) presentan un aumento significativo en su desarrollo, que se mantiene incluso establecida la infección viral. Los parámetros de intercambio gaseoso no muestran diferencias significativas en tomate. En los grupos de maíz tratados con la rizobacteria las tasas fotosintéticas y la eficiencia en el uso del agua son mayores y se produce un retraso de 7 días en la detección mediante ELISA de MDMV.

La discriminación por PDQuest de proteomas de diferentes tratamientos y réplicas, a partir de 277 spots en tomate y 227 en maíz, resolvió un total de 105 y 78 spots diferenciales, de los que se identificaron, 92 y 76 respectivamente. La mayor variación se da en proteínas relacionadas con la energía y el metabolismo y la fotosíntesis. En ambas especies los niveles de proteína de cubierta viral se disparan con la adición de AZ. Enzimas implicados en el metabolismo muestran diferencias significativas tanto por la inoculación con virus como con AZ. Proteínas relacionadas con la fotosíntesis descienden por la infección viral e, inicialmente, con AZ, pero, en este caso se estabilizan o aumentan con el tiempo. La respuesta inicial a virus se detecta en la elicitación de diferentes ROS y ascorbato peroxidasa en tomate pero no en maíz. Otras comparaciones son discutidas.

* Trabajo financiado por el MICIN (referencia AGL2010-15691, subprograma AGR) y por el programa UdL-IMPULS

Resúmenes de comunicaciones orales

*Sesión simultánea 9:
Epidemiología II
(SIM9-1 a SIM9-8)*





SIM9-1-01393

TRANSFERENCIA CON ALTA FRECUENCIA DE GENES DE RESISTENCIA ENTRE BACTERIAS PATÓGENAS DE PLANTAS**Bardaji L., Echeverría M., Murillo J.**

Laboratorio de Patología Vegetal, ETS Ingenieros Agrónomos, Universidad Pública de Navarra, 31006 Pamplona; leire.bardaji@unavarra.es

El control químico de las bacteriosis de plantas es poco efectivo. Además sólo hay unas pocas materias activas disponibles, destacando el cobre y, en algunos países, el antibiótico estreptomicina, y se ha documentado la aparición de resistencia a ambos productos en muchos países. En ensayos de coinoculación in planta, hemos observado la transferencia con alta frecuencia ($\approx 5 \times 10^{-4}$) de determinantes de resistencia a cobre y a estreptomicina desde *P. syringae* pv. *syringae* UPN800 a *P. syringae* pv. *phaseolicola* 1448A, ambos patógenos de judía. La secuenciación del genoma del donante y de un clon receptor, ha mostrado que la adquisición de resistencia se asocia con la adquisición de ≈ 280 kb de DNA, designado en conjunto e800A. En comparación Blastn, e800A muestra amplias regiones de similitud, y con muy alta identidad, con el plásmido pSTY de *Pseudomonas* sp. y DNA genómico de bacterias de suelo de diversos géneros. Aunque la mayoría de las CDSs de e800A corresponden a proteínas hipotéticas, hay un buen número de genes típicos de plásmidos para funciones de replicación, mantenimiento y conjugación. Igualmente, e800A contiene seis posibles operones homólogos a genes de resistencia a metales pesados, incluyendo cobre, mercurio, arsénico, plomo, cadmio, cobalto y zinc; sin embargo, sólo hemos podido demostrar la adquisición de resistencia a cobre y arsénico en Pph 1448A. Por último, e800A contiene una copia del transposón Tn5393, que confiere resistencia a estreptomicina, y que se transfiere junto con e800A sin transponerse al genoma de la bacteria receptora. La transferencia de e800A entre bacterias medioambientales y patógenas se asemeja a la distribución masiva de plásmidos con múltiples resistencias a antibióticos ocurrida en el siglo XX en ambientes sanitarios.



SIM9-2-01385

CAPACIDAD DE SUPERVIVENCIA Y TRANSMISIÓN POR SEMILLA DE *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni* EN ALMENDRO

Palacio-Bielsa A.¹, Cambra M.A.², Berruete I.M.¹, Collados R.², Palazón M.², Cubero J.³, Garita-Cambronero J.³, Roselló M.⁴, López M.M.⁵

1) Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria de Aragón

2) Centro de Sanidad y Certificación Vegetal

3) Laboratorio de Bacteriología. Departamento de Protección Vegetal. Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria

4) Laboratorio del Servicio de Análisis Agroalimentario, Generalitat Valenciana

5) Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias

Xanthomonas arboricola pv. *pruni* (*Xap*), agente causal de la mancha bacteriana de los frutales de hueso y del almendro, está considerada un patógeno de cuarentena en la Unión Europea. La enfermedad puede tener graves consecuencias para los cultivos más sensibles del género *Prunus* y todavía hay aspectos poco conocidos de su epidemiología, como la posibilidad de transmisión de *Xap* por semilla. Por ello, se evaluó la capacidad de supervivencia y transmisión de dicha bacteria en almendras naturalmente infectadas, tanto después del proceso de estratificación como en las plántulas obtenidas. La detección de *Xap* se realizó mediante PCR en tiempo real del ADN extraído de lavados del material vegetal y aislamiento de la bacteria.

Mediante PCR en tiempo real se detectó *Xap* prácticamente en todas las muestras procedentes de árboles infectados, tanto en las almendras estratificadas como en las plántulas (100% de muestras positivas antes y después de la estratificación, 98% del cotiledón y 99% de la parte aérea de las plántulas). Tras la estratificación, se logró aislar *Xap* en el 32% de las almendras, aunque en las plántulas el porcentaje de aislamientos positivos aumentó hasta el 80% y 74% en cotiledón y parte aérea, respectivamente. La dificultad del aislamiento de *Xap* en las almendras podría estar relacionada con la presencia de microbiota que interfería en su crecimiento, aunque tampoco pueda descartarse la posible inducción de un estado viable no cultivable. Se confirmó que las cepas aisladas de las plántulas eran similares a las de las almendras estratificadas y que mantenían su patogenicidad.

Estos resultados demuestran por primera vez la supervivencia de *Xap* en las almendras y su transmisión a través de las mismas, lo que supone un nuevo riesgo de diseminación del patógeno.

*Este trabajo ha sido financiado por el Instituto Nacional de Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA), proyecto RTA2011-00140-C03-03.



SIM9-3-01542

DIVERSIDAD GENÉTICA DE CEPAS ESPAÑOLAS DE *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni*, AGENTE CAUSAL DE LA MANCHA BACTERIANA DE LOS FRUTALES DE HUESO Y DEL ALMENDRO

López-Soriano P.¹, Boyer K.², Grygiel P.², Palacio-Bielsa A.³, Marco-Noales E.¹, Vernière C.², López M.M.¹, Pruvost O.²

1) Centro de Protección Oficial. Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA). Carretera Moncada-Náquera km 4,5, 46113 Moncada, Valencia. E-mail: plopez@ivia.es

2) UMR Peuplements Végétaux et Bioagresseurs en Milieu Tropical (PVBMT), CIRAD, Pôle de Protection des plantes 7, chemin de l'Irat, 97410 Saint Pierre, La Réunion, France

3) Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria de Aragón (CITA). Av. Montañana 930, 50059 Zaragoza.

Xanthomonas arboricola pv. *pruni* (*Xap*) es el agente causal de la mancha bacteriana de los frutales de hueso, almendro y diversas especies ornamentales del género *Prunus*. Desde que en el año 2002 se detectara *Xap* por primera vez en España, se han identificado brotes de la enfermedad en diferentes regiones productoras, afectando a varios huéspedes (melocotonero, ciruelo japonés, albaricoquero y almendro), tanto en plantaciones como en viveros.

En este trabajo se pretende evaluar la diversidad genética de una selección de 255 cepas españolas de *Xap*, procedentes de 10 provincias y aisladas de diversos huéspedes, y 12 cepas de referencia obtenidas de colecciones internacionales, para conocer la epidemiología molecular de los brotes de la enfermedad en España. Para ello, se ha seleccionado la técnica de análisis "multilocus variable-number tandem repeat analysis" (MLVA), por ser rápida, reproducible, con un elevado poder diferenciador y haberse revelado como un método adecuado para la tipificación y el estudio de relaciones epidemiológicas de cepas de *X. arboricola*. Para llevar a cabo el análisis se han utilizado 22 microsatélites previamente descritos y 5 minisatélites diseñados para este estudio.

La técnica ha permitido identificar un elevado número haplotipos entre las 267 cepas de *Xap* estudiadas, pudiendo agrupar algunas de ellas en función de su origen geográfico, lo que sugiere distintas introducciones de la bacteria. El análisis integrado de los resultados obtenidos con las distintas secuencias contribuirá a establecer hipótesis sobre la epidemiología de la mancha bacteriana en España.

Trabajo financiado por el Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA), proyecto RTA2011-00140-C03-01.



SIM9-4-01476

FEEDING BEHAVIOR ASSOCIATED TO THE TRANSMISSION OF *Candidatus Liberibacter solanacearum* BY ITS VECTOR *Bactericera trigonica*.Antolínez C.A.¹, Moreno A.¹, Fereres A.¹

1) Instituto de Ciencias Agrarias, Consejo Superior de Investigaciones Científicas

Candidatus Liberibacter solanacearum (CaLso) is a phloem limited bacteria causing the “Zebra chip”, one of the most important diseases in *Solanaceae* crops. Interestingly the bacterium has been recently detected in Europe causing disease in carrots and celery. CaLso is transmitted by different species of psyllids, a group of phloem feeders that have been always correlated causing leaf yellows and yield reduction. In Spain, the bacteria has been associated with the occurrence of the psyllid *Bactericera trigonica*, which is found at high densities on CaLso infected fields. Because of the importance of CaLso as an emerging plant pathogen, it is very important to characterize the transmission efficacy by its vector *B. trigonica* as well as the probing behavior activities related to the transmission of the pathogen. In this study, the feeding behavior of *B. trigonica* males and females have been characterized using the Electrical Penetration Graph technique (EPG). We also performed transmission assays to estimate the transmission efficiency of the disease by adults of *B. trigonica* to carrots at several inoculation access periods. Differences in transmission between males and females were also tested. Six distinct waveforms were identified for *B. trigonica* and behavioral activities of each were correlated with the electrical origin and compared with those of other hemipterans. Exposure of a plant to psyllids (20/plant) carrying the bacteria for a period as short as six hours resulted in 85% of transmission. Females spent more time feeding, probed more times and reached phloem tissues more frequently than males. There is no difference in transmission rates of CaLso between males and females when 20/plant are used. Our results show that *B. trigonica* is a highly efficient vector and, short inoculations periods are enough to infect carrots and develop the disease. This information is key to develop effective integrated pest management practices against CaLso.

Antolinez C A, es becario predoctoral del Departamento Administrativo de Ciencia y Tecnología e Innovación COLCIENCIAS, Colombia.



SIM9-5-01478

TRANSMISIÓN DE '*Candidatus Liberibacter solanacearum*' POR SEMILLAS DE ZANAHORIA

Bertolini E.¹, Teresani G.¹, Loiseau M.², Tanaka F.³, Barbé S.¹, Martínez C.¹, Gentit P.², López M.M.¹, Cambra M.¹

1) Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias

2) ANSES-Laboratoire de la Santé des Végétaux

3) Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo

'*Candidatus Liberibacter solanacearum*' es una bacteria no cultivable, restringida al floema, asociada a distintas enfermedades en patata, tomate, pimiento, berenjena, zanahoria y apio. Se transmite de manera persistente (transovarial) por diferentes especies de psílidos y por tubérculos en patata. La transmisión por semillas verdaderas no se ha demostrado en ninguna especie de '*Ca. Liberibacter*' hasta la fecha. La aparición de desarreglos vegetativos en cultivos de zanahoria en distintas regiones de Europa en la misma época ha hecho sospechar la transmisión por semillas de esta bacteria.

Mediante PCR en tiempo real, se detectó la bacteria en 23 de los 54 lotes de semillas comerciales de zanahoria analizados. Además, se cuantificó el número de células bacterianas en semillas individuales y se determinó la viabilidad celular usando monoazida de propidio. El número de células bacterianas varió de 4,8 a 210/semilla pero solo un 5 % de ellas fueron viables. En estudios de transmisión realizados durante 5 meses, la bacteria se detectó a partir de los 90 días en 24 de 500 plantas del cultivar Maestro. A los 5 meses el 12 % de las plantas positivas presentaron síntomas típicos de la enfermedad. Se observaron células tipo *Liberibacter* por microscopia electrónica en la cubierta de las semillas y en plántulas infectadas. Para prevenir la introducción de '*Ca. L. solanacearum*' en nuevas áreas y evitar la transmisión por psílidos a otros cultivos es imprescindible el uso de semillas de zanahoria libres de células bacterianas viables.

Trabajo financiado por los proyectos INIA (RTA2011-00142) y FP7-ERANET EUPHRESKO (266505/PHYLIB).



SIM9-6-01303

ESPECIES DE *Planococcus* (Homoptera: Pseudococcidae) Y TRANSMISIÓN DE GLRaV-3Cabaleiro C.¹, Pesqueira A.M.¹

1) Universidad de Santiago de Compostela

El enrollado de la vid es una enfermedad compleja: huéspedes leñosos, de un solo género (*Vitis*), virus del floema con distribución temporal y espacial irregular, muchas especies (Grapevine leafroll associated viruses, GLRaV), algunos transmitidos por múltiples vectores que, a su vez, pueden transmitir varios GLRaV y son plagas del viñedo. Recientemente, la plaga conocida como “melazo” que se asociaba a *Planococcus citri* (Homoptera: pseudococcidae), ha resultado ser, en viñedos mediterráneos, mayoritariamente, *P. ficus*. En este trabajo se plantea a) la identificación molecular de poblaciones de melazo de viñedos gallegos y b) la realización de ensayos de transmisión de GLRaV-3 por *P. ficus* y *P. citri* para determinar si ambas especies de cochinilla son vectores igualmente eficaces de distintos aislados de GLRaV-3. Los análisis de poblaciones de cochinillas de viñedos de Ribeiro y Rías Baixas confirman que también en Galicia la especie predominante es *P. ficus* aunque se encontraron poblaciones mixtas con *P. citri*, y otros pseudococcidos. Una población utilizada en ensayos de transmisión anteriores que había sido identificada como *P. citri* en base a sus características morfológicas, resultó ser *P. ficus* y transmitió con diferente eficiencia (Ps entre 0,014 y 1) tres aislados de GLRaV-3; otra población, identificada previamente como *P. ficus* resultó ser mixta, con predominio de *P. citri* y no transmitió ningún aislado, al igual ocurrió con una población control de *P. citri*. Se concluye que la determinación de la especie de Pseudococcido presente en un viñedo es esencial para estimar el riesgo de dispersión de GLRaV-3 por no ser vectores igualmente eficaces todos los pseudococcidos causantes de “melazo”; la diferente eficacia de transmisión de aislados de GLRaV-3 por *P. ficus* explicaría algunos comportamientos epidemiológicos del virus, pero es un extremo que necesita ser verificado con ensayos de transmisión adicionales.

Trabajo parcialmente financiado a través de los proyectos RTA2008-00078-C03-03 INIA y CN 2012/321 (Xunta de Galicia)



SIM9-7-01386

EFFECTOS DE LA TEMPERATURA Y HUMEDAD RELATIVA Y EL ESTADO DE MADURACIÓN DEL FRUTO SOBRE LA GERMINACIÓN DE *Monilinia* spp. EN CONDICIONES DE POST-COSECHAGarcía-Benítez C.¹, Melgarejo P.¹, De Cal A.¹

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

La podredumbre parda es una de las enfermedades más importantes del melocotonero, causando marchitez en yemas y brotes, chancros en ramas y podredumbre en frutos. Las mayores pérdidas se registran en los frutos, pudiendo llegar hasta un 80% en años con condiciones climatológicas favorables para el desarrollo de la enfermedad, sobre todo en huertos de variedades tardías. La infección de fruta requiere de la adhesión y germinación de las conidias y su posterior penetración en el fruto a partir de tubos germinativos o apresorios, según el estado de la planta huésped y de las condiciones ambientales. En este trabajo se estudia el proceso de adherencia y germinación de las conidias de *Monilinia* spp. en las condiciones de post-cosecha con el objetivo de determinar las condiciones óptimas y mejorar el almacenamiento y conservación de la fruta.

Se evaluó la germinación de las conidias y la formación de apresorios de *Monilinia laxa* y *Monilinia fructicola* en distintos bioensayos, en los que se combinaban los siguientes factores: Extracto de melocotón (verde o maduro), Temperatura (4, 10, 25 o 35°C) y Humedad Relativa (60, 80 o 98%), durante 0, 24, 48 y 72 horas de incubación. Posteriormente se evaluó el efecto de las condiciones de post-cosecha sobre la germinación y formación de apresorios en las dos especies patógenas. Para ello los procesos post-cosecha se asimilaron a días de pre-refrigeración (0, 1 ó 3 días a 4°C), procesamiento de la fruta (20 minutos a 15°C) y días de post-refrigeración (0, 3 ó 10 días a 4°C). Todos los ensayos fueron repetidos al menos dos veces para cada una de las dos especies y condiciones ensayadas.

Los resultados demuestran que existen diferencias en la germinación y formación de apresorios según el estado de maduración del fruto y las condiciones ambientales. Aspectos que pueden ayudar a discutir las diferencias observadas en la germinación de las dos especies de *Monilinia* en las condiciones de post-cosecha, especialmente en cuanto al tiempo que se refrigera la fruta antes y después de su confección en la central hortofrutícola.

Este trabajo ha sido financiado por el proyecto AGL2011-30472-C02-02



SIM9-8-01556

BAYESIAN ANALYSIS OF THE PREVALENCE OF *Cucumber mosaic virus*, *Tomato mosaic virus* AND *Tomato spotted wilt virus* IN ORGANIC TOMATO AND PEPPER CROPS IN THE VALENCIAN COMMUNITY, SPAIN**Lázaro E.¹, Armero C.², Roselló J.³, Serra J.³, Muñoz M.J.⁴, Rubio L.¹**

- 1) Departamento de Virología, Centro de Protección Vegetal, Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias. Moncada, Valencia, Spain
- 2) Departament d'Estadística i IO. Universitat de Valencia, Burjassot, Valencia, Spain
- 3) Estació Experimental Agraria de Carcaixent. Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA.), Carcaixent, Valencia, Spain
- 4) Laboratorio de Virología, Servicio de Análisis Agroalimentario, Generalitat Valenciana, Silla, Valencia, Spain

Agriculture is evolving towards a more sustainable productivity and protection of the environment and human health. Organic farming is a holistic production management system which promotes agro-ecosystem health including biodiversity, biological cycles, and soil biological activity. It is the fastest growing agricultural sector, and the demand is increasing by about 10% every year. One aspect poorly studied is the risk or susceptibility of organic crops to disease in comparison to conventional or intensive agriculture. In this work, we collected 240 plants from 30 plots (15 organic and 15 non-organic) of tomato and pepper (eight plants randomly selected in each plot) in the Valencian Community in the summer of 2012. These samples were analyzed by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) to detect *Cucumber mosaic virus*, *Tomato mosaic virus* and *Tomato spotted wilt virus*. Although data of the plants within the same plot are not independent, a naïve description of them presents results favorable to the organic crops, which had a sample proportion of infected plants of 0.21, nearly half of the observed proportion in the conventional crops, which was 0.41. Statistical analysis was performed by using Bayesian hierarchical logistic regression models with Markov Chain Montecarlo methods to approximate the posterior distribution of the model parameters. These models showed a lower proportion of virus-infected plants in organic than in conventional crops, as well as in greenhouse versus open field. Virus prevalence decreased with altitude, more significant in organic crops. In order to confirm if these results followed general trend and to test the possible factors involved, we are undertaking further research such as: increasing the sample size, follow-up of the plots to obtain longitudinal information, addition of more specific covariates such as plot management, organic and chemical fertilizers, diversity in adjacent and environmental plants, insect populations (vectors and predators), and soil classification, etc.

This work was supported by grant RTA2013-00047-C02 from INIA

Resúmenes de pósteres

*Etiología y diagnóstico
(P-001 a P-053)*





P-001-01343

***Pseudomonas asturiensis*, UNA NUEVA ESPECIE AISLADA EN SOJA Y MALAS HIERBAS**González-Fernández A.J.¹, Fernández-Sanz A.M.¹

1) Servicio Regional de Investigación y Desarrollo Agroalimentario (SERIDA)

Pseudomonas asturiensis es una nueva especie que ha sido aislada tanto en muestras sintomáticas de soja forrajera (*Glycine max*) recogidas en la zona oriental de Asturias (concejo de Villaviciosa), como en muestras de malas hierbas asintomáticas (*Solanum nigrum* y *Rumex obtusifolius*) recogidas en dos plantaciones de judía situadas en la zona occidental (concejos de Valdés y Tineo).

Esta especie se sitúa en el linaje *P. fluorescens* dentro del grupo *P. syringae* y tiene como especie más próxima a *P. viridiflava*.

Las cinco cepas estudiadas han mostrado variabilidad en algunos caracteres como la fluorescencia (en una es negativa), la pectinólisis de la patata (en una es positiva) y la asimilación de D-melibiosa que diferenciaría los dos aislamientos procedentes de malas hierbas (negativos) respecto a los tres procedentes de soja.

Para comprobar su patogenicidad se realizaron inoculaciones experimentales en soja y judía mediante pulverización de una suspensión bacteriana de aproximadamente 10^8 ufc/ml en el envés de las hojas con un aerógrafo, las plantas se mantuvieron durante 48 h con una humedad del 100% y posteriormente a 25° C y un 80% de humedad relativa. Las inoculaciones realizadas en soja han mostrado que los tres aislamientos procedentes de soja reprodujeron los síntomas observados en campo mientras que en judía sólo produjeron algunas manchas en las hojas. La cepa aislada en *Solanum nigrum* se ensayó en soja y produjo los mismos síntomas que las anteriores; sin embargo, en este caso, causó daño en las judías inoculadas experimentalmente.

Los resultados de estos primeros ensayos de patogenicidad indican que la especie *P. asturiensis* puede ser patógena tanto en soja como en judía, por lo que es necesario profundizar en el estudio del rango de huésped y de los factores de virulencia que pueda portar esta especie.



P-002-01345

***Clavibacter michiganensis* subespecie *phaseoli*, UN NUEVO PATÓGENO DE JUDÍA**González-Fernández A.J.¹, Trapiello E.¹

1) Servicio Regional de Investigación y Desarrollo Agroalimentario (SERIDA)

De una muestra de semilla de judía conservada en el CRF durante 10 años, multiplicada en Galicia, se obtuvo un aislamiento identificado como *Clavibacter michiganensis* (LPPA-982) en base a la secuencia del ARNr 16S (HE608962). Dado que el rango de hospedador de la especie no incluía la judía, se realizaron las pruebas de patogenidad utilizando dos cultivares diferentes de judía (cvs. *Andecha* y *Maximina*) y dos métodos alternativos de inoculación, por una parte sumergiendo las semillas de judía en una suspensión bacteriana y por otra, inyectando la suspensión en tallos de plántulas de judía. Todos los ensayos se repitieron más de dos veces y se pudo comprobar que se producían daños en las plantas consistentes en amarilleamiento, clorosis y marchitez vascular. El análisis MLSA utilizando los genes *recA*, *rpoB* y *gyrB* situó la cepa LPPA-982 dentro del grupo *C. michiganensis*, siendo las más próximas las subespecies *insidiosus* y *nebraskensis*.

Las características bioquímicas estudiadas, tanto mediante pruebas clásicas como mediante API 50CH y APIZYM, mostraron que el aislamiento se diferenciaba también bioquímicamente de las cinco subespecies descritas.

Los iniciadores específicos descritos para diferenciar las cinco subespecies se utilizaron con esta cepa y se obtuvo banda en cuatro de las cinco amplificaciones. No se observó amplificación con los iniciadores específicos de *C.m.* subsp. *insidiosus* y la banda obtenida con los cebadores específicos de *C.m.* subsp. *sepedonicus* era menor que la descrita, pero en los otros tres casos se obtuvo la banda esperada.

La restricción *in silico* del fragmento *recA* con los enzimas FnuDII y Hin6I nos permitió diferenciar las cinco subespecies y LPPA-982.

Por todo ello, basándonos en las diferencias feno y genotípicas y la patogenidad hemos descrito la nueva subespecie, denominada *phaseoli* por el huésped en el que ha sido encontrada (CECT 8144^T = LMG 27667^T).



P-003-01422

UNA NUEVA ENFERMEDAD BACTERIANA DE LOS BULBOS DE AJO (*Allium sativum*): LA PODREDUMBRE ROSA**Gálvez L.¹, García-Díaz M.², Gil-Serna J.¹, Benito S.¹, Palmero D.¹**

1) Universidad Politécnica de Madrid, E.U.I.T. Agrícola, Avda. Puerta de Hierro, 4 (28040) Madrid. E-mail: laura.galvez@upm.es

2) Centro de Recursos Fitogenéticos. INIA, Autovía de Aragón Km 36, (28800) Alcalá de Henares

En julio de 2013, se observaron síntomas de podredumbre rosácea en bulbos de ajo blanco (*Allium sativum* L.) recogidos de Tembleque (Toledo, España). El cincuenta por ciento de los bulbos examinados mostraron síntomas de podredumbre blanda con coloración rosácea en al menos un diente de todas las cabezas. Se realizaron análisis microbiológicos para identificar el agente causal de la enfermedad e inoculaciones en dientes de ajo para comprobar su patogenicidad. A partir de los tejidos sintomáticos previamente desinfectados se aislaron consistentemente bacterias Gram negativas, nitrato reductasa y oxidasa negativas y catalasa positiva. Las colonias individuales obtenidas se caracterizaron por tener un color beige claro, márgenes enteros convexos circulares y ser productoras de pigmento rosa difusible en PDA. La comparación de las secuencias del gen *16S rDNA* con el programa BLAST mostró una identidad de nucleótidos del 99% con el gen correspondiente de *Erwinia aphidicola*, *E. persicina* y *E. rhapontici*. Los resultados obtenidos en las pruebas de fermentación con sorbitol (resultado positivo) y xilitol (negativo) permitió clasificar definitivamente las cepas como *E. persicina*.

Las pruebas de patogenicidad se realizaron en dientes de ajo cv. *Morado de Cuenca* utilizando dos cepas de *E. persicina*. Se inocularon diez dientes tras realizarse heridas (profundidad 5 mm) con 10 microlitros de las suspensiones bacterianas y se incubaron en cámara húmeda. De la misma forma fueron inoculados diez dientes a modo de testigo con caldo TSB estéril. Posteriormente, los dientes de ajo inoculados se incubaron a 28 ° C durante 10 días. Los primeros síntomas de podredumbres rosas se observaron en los dientes inoculados después de sólo 5 días de incubación. Hasta donde sabemos, este es el primer informe de podredumbre de dientes rosácea causado por *E. persicina* en bulbos de ajo.



P-004-01408

DETECCIÓN DE *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni* MEDIANTE INMUNOCAPTURA MAGNÉTICA Y PCR EN TIEMPO REAL

Garita-Cambronero J.¹, Ferragud E.¹, Gorris M.T.², López M.M.², Palacio-Bielsa A.³, Cambra M.⁴, Mitidieri M.⁵, Cubero J.¹

1) Laboratorio de Bacteriología. Departamento de Protección Vegetal, Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA), Madrid, España

2) Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA), Valencia, España

3) Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria de Aragón (CITA), Zaragoza, España

4) Centro de Sanidad y Certificación Vegetal (CSCV), Zaragoza, España

5) Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), Buenos Aires, Argentina

Xanthomonas arboricola pv. *pruni* (*Xap*), organismo de cuarentena en la Unión Europea, causante de la mancha bacteriana de los frutales de hueso y almendro, fue detectada por primera vez en España en 2002. En el análisis multilocus de secuencias de las cepas españolas de *Xanthomonas* asociadas a esta enfermedad, se han identificado algunas de ellas que no presentaban un patrón típico de *Xap* y que no se consideraron pertenecientes a dicho patovar (denominadas *Xap* "look-a-like").

En estas cepas, sin embargo, el gen de un transportador tipo ABC, generalmente usado para la identificación de *Xap*, fue amplificado por PCR en tiempo real con cebadores específicos de su secuencia. Por otro lado, en un análisis de efectores de virulencia de los patovares de la especie *X. arboricola* se determinó que un efector de tipo III (*xopE3*) estaba presente únicamente en *Xap*.

Combinando la PCR basada en el transportador ABC para la detección de *Xap* y diseñando cebadores para el gen *xopE3*, se desarrolló un nuevo protocolo de PCR en tiempo real para el diagnóstico de la enfermedad y la detección e identificación de *Xap*. Para evitar el efecto de inhibidores de la PCR, se incluyó un paso previo de separación inmunomagnética con antisueros obtenidos frente a *Xap*.

En este trabajo se presentan los resultados de la selección de los antisueros utilizados en la inmunocaptura, así como los de la sensibilidad y especificidad del protocolo de PCR en tiempo real desarrollado, que resultó apropiada para la detección de *Xap*, ya que amplificaron las 48 cepas ensayadas procedentes de distintos orígenes.

Trabajo financiado por el Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA), proyecto RTA2011-00140-CO3-02 y por la Red CYTED FRUT-SAN 112RT0441..



P-005-01563

DETECCIÓN DE *Erwinia amylovora* EN PLANTAS ASINTOMÁTICAS: EVALUACIÓN DE MUESTRAS GLOBALESMarco-Noales E.¹, Peñalver J.¹, Navarro I.¹, Gorris M.T.¹, López M.M.¹

1) Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias

Ciertos aspectos del ciclo biológico y de las estrategias de supervivencia de *Erwinia amylovora*, causante del fuego bacteriano, todavía son desconocidos, dificultando tanto su detección como el avance en el conocimiento de la epidemiología de la enfermedad. La capacidad de *E. amylovora* para sobrevivir en planta y producir infecciones latentes puede llevar a falsos resultados negativos en protocolos rutinarios de diagnóstico, debido a que el patógeno se encuentra en poblaciones muy bajas en ciertas condiciones. En el contexto del proyecto Euphresco Phytfire, se diseñó un plan de evaluación de material vegetal asintomático mediante varias técnicas, con el fin de determinar la cantidad mínima necesaria de material que permita la detección de *E. amylovora* con cada técnica. Para ello, se inocularon muestras de peral con distintas concentraciones de la bacteria ('spiked samples') y se analizaron individualmente mediante aislamiento, ELISA y PCR. A continuación, utilizando las muestras que resultaron positivas por alguna de las técnicas empleadas, se prepararon nuevas muestras globales ('bulk samples') añadiendo más cantidad de material vegetal no infectado (de 2, 4, 9 ó 19 plantas). Los resultados revelan que, con todas las técnicas ensayadas, se puede llegar a un límite de detección de 10^2 ufc/ml de extracto vegetal, tras enriquecimiento, incluso analizando conjuntamente muestras de 20 plantas de un mismo tipo de huésped. El enriquecimiento se confirma como una etapa necesaria en el protocolo de análisis de muestras globales para conseguir la mayor sensibilidad, ya que se favorece la multiplicación del patógeno cuando éste se halla en números muy bajos. La comparación de los resultados de los seis grupos europeos implicados permitirá optimizar el proceso de detección de *E. amylovora* en material vegetal asintomático, con el objetivo final de poder proporcionar bases científicas a las decisiones fitosanitarias.

Trabajo financiado por el proyecto ERA-Net EUPHRESCO "Phytosanitary diagnostic, on-site detection and epidemiology tools for *Erwinia amylovora* (Phytfire)"



P-006-01470

DETECCIÓN EN PATATA EN ESPAÑA DE UN HAPLOTIPO DE '*Candidatus Liberibacter solanacearum*' NO DESCRITO EN SOLANÁCEASPalomo J.L.¹, Bertolini E.², Martín-Robles M.J.¹, Teresani G.², López M.M.² Cambra M.²

1) Centro Regional de Diagnóstico, Junta de Castilla y León. Apdo. 61, 37080 Salamanca. Correo-e: palgomjo@jcyLes

2) Centro de Protección Vegetal y Biotecnología, Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA). Ctra. Moncada-Náquera Km. 5, 46113 Moncada (Valencia). Correo-e: mcambra@ivia.es

La enfermedad conocida como “zebra chip” de la patata produce bandas oscuras en el interior del tubérculo, y causa importantes pérdidas económicas en patatas destinadas a frito. Está asociada a los haplotipos A y B de '*Candidatus Liberibacter solanacearum*', descritos en Centroamérica, Norteamérica y Nueva Zelanda. Estos haplotipos, no detectados en Europa, han sido incluidos en la lista A1 de la OEPP. En Europa se han descrito nuevos haplotipos (C, D y E) en zanahoria y apio, presentes en España. La bacteria se transmite eficazmente por semilla de zanahoria y de forma persistente transovárica por diferentes psílidos.

Para evaluar el riesgo de transmisión natural de '*Ca. L. solanacearum*' a patata a partir de cultivos de zanahoria y apio infectados, se analizaron 1.987 lotes de patata de siembra y consumo de diferentes orígenes geográficos mediante PCR en tiempo real con el kit CaLsol/100 (Plant Print Diagnostics). En una primera fase, los análisis de extractos procedentes de prospecciones oficiales dieron resultado negativo. En una segunda fase se inspeccionaron visualmente 1.772 lotes, seleccionando tubérculos con posibles síntomas de “zebra chip” en 12 lotes. Se obtuvo resultado positivo en 9 casos en los cultivares Fontane, Arran Banner, Kennebec (4) y Red Pontiac (3). Al sembrar estos tubérculos, no se produjo brotación o dieron lugar a plantas débiles con anomalías vegetativas y casi nula tuberización. Se identificó el haplotipo E, típico de zanahoria y apio. Estos datos indicarían que este haplotipo podría haber infectado esporádicamente la patata, y no tendría repercusión epidemiológica ni económica, aunque exista el riesgo de infección natural de solanáceas por otros haplotipos.

* Trabajo financiado por los proyectos INIA (RTA2011-00142) y FP7-ERANET EUPHRESKO (266505/PHYLIB).



P-007-01569

DETECCIÓN DE '*Candidatus Liberibacter solanacearum*' EN CHIRIVÍA EN ESPAÑA

Alfaro-Fernández A.¹, Hernández-Llopis D.¹, Cebrián M.C.¹, Villaescusa F.J.¹, Ferrándiz J.C.², Sanjuán S.², Font-San-Ambrosio M.I.¹

1) Instituto Agroforestal Mediterráneo/Universidad Politécnica de Valencia

2) Agrícola Villena Coop. V.

Durante el año 2008, se observó una nueva sintomatología en los cultivos de chirivía (*Pastinaca sativa* L.) de Villena (Alicante) que se caracterizaba por amarilleos y proliferación de hojas, deformación y proliferación de raicillas secundarias unido a una temprana senescencia de las raíces. En esta misma zona y año también se observaron desórdenes vegetativos en los cultivos de apio y zanahoria, asociados posteriormente a la bacteria '*Candidatus liberibacter solanacearum*'. En plantas de chirivía sintomáticas analizadas entre 2008 y 2013, se detectó la bacteria '*Ca. L. solanacearum*' en un 86% de las muestras analizadas y un 14% de ellas presentaron infección mixta con el fitoplasma Aster yellows. Para la detección de la bacteria '*Ca. L. solanacearum*' se empleó la técnica molecular PCR convencional utilizando las parejas de cebadores OA2/OI2c y CL514F/R que amplifican un fragmento de los genes 16S ADNr y rplJ/rplL de la proteína ribosómica, respectivamente. La detección de fitoplasmas se realizó empleando la técnica molecular nested-PCR convencional utilizando la pareja de cebadores P1/P7 seguida de R16F2n/R16R2n y la secuenciación posterior del fragmento amplificado. La identificación de '*Ca. L. solanacearum*' en plantas de chirivía se realizó mediante la secuenciación del fragmento amplificado en todas las muestras positivas. En cultivos de zanahoria y apio españoles se han identificado los haplotipos LsoD y LsoE de '*Ca. L. solanacearum*'. En este trabajo se demuestra que la chirivía puede ser un nuevo hospedante de esta bacteria emergente. En la actualidad se están haciendo los estudios pertinentes para determinar cuál es el haplotipo que está presente en los cultivos de chirivía en España.

Los haplotipos de '*Ca. L. solanacearum*' que afectan a solanáceas (LsoA y LsoB) están incluidos en la lista A1 de la EPPO y por lo tanto son considerados por este organismo como patógeno de cuarentena.



P-008-01568

***Spiroplasma citri* EN APIO: AVANCES EN SU IDENTIFICACIÓN**

Alfaro-Fernández A.¹, Ibáñez-Torrent I.¹, Hernández-Llopis D.¹, Ferrándiz J.C.², Sanjuán S.², Font-San-Ambrosio M.I.¹

1) Insituto Agroforestal Mediterráneo/ Universidad Politécnica de Valencia

2) Agrícola Villena Coop. V.

Durante el año 2008, se iniciaron los estudios para determinar la etiología de un problema fitosanitario que se estaba observando en algunos cultivos de apio (*Apium graveolens* L.) de Villena (Alicante). Se podían encontrar plantas de apio con falta de desarrollo, hojas con mosaico, enrojecimiento y enrolladas hacia el haz; otras presentaban mosaico en hojas y estrías amarillas en pencas, así como pencas más delgadas, retorcidas y con una excesiva brotación de las mismas. Esta nueva patología depreció significativamente la producción de apio para su comercialización. Los estudios llevados a cabo permitieron asociar a la bacteria '*Candidatus Liberibacter solanacearum*' con el desarrollo de pencas delgadas, retorcidas y una excesiva brotación de las mismas; aunque también se podía detectar en un bajo porcentaje de plantas sintomáticas el fitoplasma Aster yellows en infección mixta con la bacteria. En plantas que presentaban falta de desarrollo, mosaico en hojas y estrías amarillas en pencas se detectó el virus del mosaico de apio (*Celery mosaic virus*, CeMV). En cambio, en las plantas con falta de desarrollo, hojas con mosaico, enrojecimiento y enrolladas hacia el haz se detectó *Spiroplasma citri*. La detección de *S. citri* en apio se realizó mediante PCR con cebadores específicos del gen putativo p89 de la adhesina. Para confirmar la identificación de *S. citri* se secuenciaron los productos de la PCR (707 pb) obteniendo una identidad nucleotídica del 95% con un aislado de *S. citri* de cítricos de Italia (nº de Acceso en el GenBank HE649967). Con la finalidad de identificar a este espiroplasma se procedió a su cultivo *in vitro*, seleccionando fragmentos de nervios de partes jóvenes de las plantas y sembrándolas en medio LD8 líquido. A los 20 días después del aislamiento se observó el cultivo al microscopio electrónico de transmisión, confirmándose la presencia de células similares a las de un espiroplasma. El análisis de una alícuota de este cultivo mediante PCR convencional con cebadores específicos del gen putativo p89 de la adhesina, previa extracción de DNA, confirmó la presencia de *S. citri* en el mismo. En este momento, se está realizando la secuenciación masiva de este organismo a partir del cultivo puro aislado de apio



P-009-01565

DISTRIBUCIÓN DE LA ENFERMEDAD "AMARILLOS Y ENROJECIMIENTOS DE LA ZANAHORIA", DE SU AGENTE ETIOLÓGICO "*Candidatus Liberibacter solanacearum*"González de Chaves M.Q.^{1, 2}, De la Rosa F.S.¹

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

2) Dpto. Biología Vegetal. Facultad de Biología, Universidad de La Laguna. 38206 La Laguna, Tenerife

"*Candidatus Liberibacter solanacearum*" causa amarillos y enrojecimientos en la zanahoria, ocasionando importantes pérdidas económicas. Esta bacteria se detecta también en el psílido *Bactericera trigonica* (Hodkinson, 1981) (Hemiptera: Triozidae) que actúa como vector.

En este trabajo se han buscado parcelas de cultivo de zanahoria en Tenerife en las que se recogieron muestras de plantas y psílicos para confirmar si "*Ca. Liberibacter solanacearum*" está presente en ellas. En el estudio se incluyeron muestras de las islas de Gran Canaria, La Palma y Lanzarote en las que no se había estudiado esta enfermedad. Las muestras se prepararon utilizando dos procedimientos de extracción de ADN con cada tipo de muestra (planta e insecto) antes de su análisis mediante PCR a tiempo real para la detección del patógeno. Se estudiaron 45 parcelas y se recogieron 133 muestras de plantas y 463 psílicos, que una vez analizados permitieron confirmar la presencia de "*Ca. Liberibacter solanacearum*" en diez de los once municipios de Tenerife visitados y en las islas de Gran Canaria y La Palma (35 parcelas positivas de las 45 parcelas visitadas; y 77 y 33 detecciones positivas en 120 plantas y 116 insectos analizados, respectivamente).

Se valoró la especificidad y sensibilidad de los procedimientos de preparación de las muestras combinados con la PCR a tiempo real. La preparación de muestras de plantas para su análisis mediante PCR a tiempo real para la detección de "*Ca. Liberibacter solanacearum*" mediante impresiones en membrana permitió detectar la bacteria en un 59,7% de plantas analizadas frente al 69,5% detectado por el procedimiento de extracción con CTAB. Las extracciones de ADN realizadas para la detección de "*Ca. Liberibacter solanacearum*" en insectos enteros, conservando la estructura del exoesqueleto para su identificación morfológica posterior, permitieron detectar el patógeno en una proporción equivalente al protocolo de referencia mediante escachado en membrana.



P-010-01311

Peronospora EN Papaver: FILOGENIA, TAXONOMÍA, NUEVA NOMENCLATURA Y GAMA DE HUÉSPEDESVoglmayr H.¹, Montes-Borrego M.², Landa B.B.²

1) Dep. Systematic Evolutionary Botany, U. of Vienna, Austria

2) Instituto de Agricultura Sostenible, CSIC, Apdo. 4084

El género *Papaver* (*Papaveraceae*) alcanza aproximadamente 80 especies de plantas distribuidas en el centro y el suroeste de Asia, Europa Central y del Sur y el Norte de África. La especie más conocida es el opio o adormidera (*Pav. somniferum*), planta medicinal ancestral cultivada por su semilla comestible, así como para la producción de opio, única fuente de morfina, tebaína, codeína, papaverina y noscapina, para uso farmacéutico.

Una de las enfermedades más importantes de la adormidera es el Mildiu, causado por dos especies de *Peronospora*, y responsable de pérdidas sustanciales en los cultivos de todo el mundo. Varias especies de *Papaver* se han descrito como huéspedes de *Peronospora*, identificándose hasta cuatro especies diferentes. Sin embargo, la situación taxonómica de estas especies de *Peronospora*, la sinonimia, así como la gama de huéspedes han sido aspectos controvertidos, lo que ha llevado a cierta confusión en la literatura sobre el número de especies presentes en *Papaver* y su denominación correcta.

En este trabajo basado en estudios de las secuencias de la región ITS del ADNr y de la citocromo oxidasa I (cox1) y II (cox2): (i) se han caracterizado seis especies filogenéticamente diferentes de *Peronospora* sobre diferentes especies de *Papaver*; (ii) se han definido los rangos de huéspedes de las cuatro especies ya descritas (i.e., *P. arborescens*, *P. argemones*, *P. cristata* y *P. meconopsidis*); (iii) adicionalmente basados en la morfología se han descrito dos nuevas especies *P. apula* y *P. somniferi* sobre *Pav. apulum* y *Pav. somniferum* respectivamente; y (iv) finalmente se ha podido clarificar que la otra especie de *Peronospora* causante del Mildiu en adormidera referida incorrectamente como *P. cristata* en Australia y no descrita hasta la fecha sobre los cultivos de adormidera en España se debe denominar como *P. meconopsidis* ya que fue originalmente descrita en *Meconopsis cámbrica*.

La información filogenética generada revela la alta especificidad del género *Peronospora* sobre *Papaver*, lo cual tiene importantes implicaciones fitopatológicas ya que con este trabajo se confirma que las especies silvestres de *Papaver* no tienen ningún papel como fuente de inóculo primario en las epidemias de Mildiu en los cultivos de adormidera.

Financiado por Incentivos a Proyectos de Excelencia (P10-AGR-6497), CICE-Junta de Andalucía y cofinanciado por fondos FEDER (EU) y Austrian Science Fund (FWF, project P22739-B20, <http://www.fwf.ac.at/>)

Voglmayr H, Montes-Borrego M, Landa BB (2014) Disentangling *Peronospora* on *Papaver*: Phylogenetics, Taxonomy, Nomenclature and Host Range of Downy Mildew of Opium Poppy (*Papaver somniferum*) and Related Species. PLoS ONE 9(5): e96838.



P-011-01522

PATOGENICIDAD EN AGUACATE DE AISLADOS LOCALES DE ESPECIES DE *Phytophthora* Y *Phytopythium*. PRIMERA DESCRIPCIÓN DE *Phytophthora niederhauserii* COMO PATÓGENO DEL AGUACATE.**Rodríguez C.¹, Rodríguez A.², De la Rosa F.S.¹**

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

2) Dpto. Bioquímica, Microbiología, Biología Celular y Genética. Facultad de Farmacia, Universidad de La Laguna. 38206 La Laguna, Tenerife.

En un estudio sobre *Phytophthora* spp. en cultivos de aguacate de las Islas Canarias se aisló *P. cinnamomi*, cuya capacidad patogénica y presencia en las Islas es bien conocida, y *P. nicotianae*, *P. palmivora*, *P. multivora* y *P. niederhauserii*. Así mismo, se aisló de forma consistente *Pythium vexans*, especie incluida en el clade k de *Pythium* cuyos miembros han sido recientemente clasificados en el género *Phytopythium*. La patogenicidad de las distintas especies fue evaluada en plántulas de aguacate inoculadas en raíces y en tallos, utilizando un aislado de *P. cinnamomi* como control. Los resultados obtenidos con *P. nicotianae* y *P. palmivora* fueron los esperados de acuerdo con la literatura, que describe a estas especies como responsables de podredumbres radiculares y chancros en aguacate, respectivamente. De los cuatro aislados de *P. multivora* ensayados, dos causaron daños moderados en el sistema radicular, mientras que los otros dos no mostraron diferencias significativas con respecto al control no inoculado. Los resultados con *Py. vexans* fueron dispares ya que uno de los aislados ensayados produjo una necrosis radicular tan severa como *P. cinnamomi*, otro fue moderadamente patogénico y los cuatro restantes no causaron daños. Por último, los tres aislados de *P. niederhauserii* ensayados causaron en las plantas inoculadas una destrucción del sistema radicular comparable a la producida por *P. cinnamomi*, además de chancros en tallo de la misma magnitud que *P. palmivora*. La especie *P. niederhauserii*, que ha sido recientemente descrita como un patógeno polífago, se cita en este trabajo por primera vez como patógeno del aguacate. El aislamiento de *P. niederhauserii* de árboles de aguacate que mostraban síntomas severos de enfermedad y los resultados del ensayo de patogenicidad ponen de manifiesto la amenaza que supone para este cultivo.

* Investigación financiada por el proyecto RTA2009-00157 (Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria. INIA).



P-012-01523

ESPECIES DE *Phytophthora* Y *Phytophythium* ASOCIADAS A CULTIVOS DE AGUACATE EN LAS ISLAS CANARIAS

Rodríguez C.¹, De la Rosa F.S.¹, Rodríguez A.²

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

2) Dpto. Bioquímica, Microbiología, Biología Celular y Genética. Facultad de Farmacia, Universidad de La Laguna. 38206 La Laguna, Tenerife.

El género *Phytophthora* incluye numerosas especies patógenas de vegetales. En el aguacate, la podredumbre de raíz causada por *P. cinnamomi* es la principal enfermedad de este cultivo, en el que también se han descrito otras especies responsables de podredumbres radicales y chancros como *P. nicotianae*, *P. palmivora* y *P. menzei*. El objetivo de este estudio ha sido evaluar la presencia de *P. cinnamomi* y otras especies de *Phytophthora* en los cultivos de aguacate de las Islas Canarias. Se analizaron muestras de cultivos comerciales de las islas de Tenerife, La Palma, Gran Canaria, La Gomera y El Hierro mediante siembra de raíces en medio selectivo y trapeo de suelo con hojas de aguacate. Los aislados obtenidos fueron identificados morfológicamente y mediante secuenciación de la región ITS. Se aislaron distintas especies de *Phytophthora* en 41 de las 99 fincas analizadas. La especie que se aisló con más frecuencia fue *P. cinnamomi*, que se detectó en 20 de las 36 fincas prospectadas en La Palma. En Tenerife su incidencia fue menor (5 de 32 fincas analizadas), en Gran Canaria se aisló únicamente en una de las 12 fincas muestreadas y no se encontró en La Gomera y El Hierro. Otras especies de *Phytophthora* aisladas fueron *P. multivora* (en 6 fincas de Tenerife y 4 de La Palma), *P. nicotianae* (en 3 fincas de Tenerife y una de La Gomera), *P. palmivora* (en una finca de Tenerife) y *P. niederhauserii* (en una finca de Tenerife, otra de La Gomera y dos de Gran Canaria). Además, en 20 fincas se obtuvieron aislados morfológicamente compatibles con el clade k de *Pythium*, cuya clasificación en el género *Phytophythium* gen. nov. ha sido recientemente propuesta. El análisis filogenético de estos aislados basado en secuencias ITS los incluye en el complejo *Py. vexans*.

* Investigación financiada por el proyecto RTA2009-00157 (Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria. INIA).



P-013-01594

PATOGENICIDAD DE *Phytophthora alni* Y *P. plurivora* EN PLÁNTULAS DE *Alnus glutinosa***Zamora-Ballesteros, C.¹, Martín-García, J.^{1,2}, Haque, M.^{1,2}, Díez, J.J.^{1,2}**¹ Departamento de Producción Vegetal y Recursos Forestales. E. T. S. de Ingenierías Agrarias. Universidad de Valladolid. Campus "La Yutera", Avda. Madrid 44. 34004. Palencia.² Instituto Universitario de Investigación en Gestión Forestal Sostenible UVA-INIA. Campus "La Yutera", Avda. Madrid 44. 34004. Palencia. E-mail: jorgemg@pvs.uva.es

Phytophthora alni ha sido asociada al decaimiento y mortandad de *Alnus glutinosa* en Europa desde principios de los noventa, pero en España fue identificada a principios de esta década. Del mismo modo, también se ha demostrado muy recientemente la implicación de otra especie, *P. plurivora*, como corresponsable del decaimiento del aliso común en España. Los síntomas generales de este decaimiento son el amarilleamiento y escasez de las hojas, la muerte progresiva de las ramas y la necrosis de la corteza en el cuello y la parte inferior del tronco. El objetivo de este estudio fue evaluar la patogenicidad de aislamientos españoles de *P. alni* subsp. *alni* y *P. plurivora* en plántulas de una savia de *Alnus glutinosa*, compararlos entre sí y con aislamientos franceses de las tres subespecies de *P. alni* (*P. alni* subsp. *alni*, *P. alni* subsp. *uniformis* y *P. alni* subsp. *multiformis*). Para ello se utilizó el método de inoculación en tronco con inóculo de micelio agarizado. La necrosis del tronco y los síntomas de marchitamiento fueron visibles desde las primeras semanas del ensayo en todas las plántulas, excepto en las control. La tasa de supervivencia difirió significativamente entre las plantas inoculadas con *P. alni* y *P. plurivora* respecto al control, mientras que no se encontraron diferencias entre *P. alni* y *P. plurivora* y entre los aislamientos de *P. alni* españoles frente a los aislamientos franceses. El mismo patrón fue encontrado en las longitudes de necrosis y el crecimiento de las plántulas. En cuanto a la biomasa, en la parte aérea se encontraron diferencias significativas entre las plantas inoculadas y las plantas control, sin embargo no hubo ninguna significación a nivel radicular.



P-014-01615

INTRODUCCIÓN A LA PATOGÉNESIS DE LA PODREDUMBRE DEL TALLO DEL BRÓCOLI: MICROORGANISMOS IMPLICADOS Y SUS INTERACCIONES

Parra, M.A.¹, Ibarra, A.², Cifuentes, D.¹, Martínez, J.A.¹

¹ Grupo Protección de Cultivos, Departamento de Producción Vegetal, Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica (ETSIA), Universidad Politécnica de Cartagena (UPCT), 30205, Cartagena (Murcia). E-mail: juanantonio.martinez@upct.es

² SAKATA SEED IBÉRICA, S.L.U., Plaza Poeta Vicente Gaos, 6 bajo, 46021 Valencia. E-mail: antonio.ibarra@sakata.eu

La podredumbre interna del tallo del brócoli se asociada comúnmente a la enfermedad denominada podredumbre blanda bacteriana por *Erwinia carotovora*. Sin embargo, se aisló *Pythium ultimum* junto con varias bacterias del suelo del tejido interno del tallo de brócoli maduro afectado de podredumbre blanda en cultivos del sureste de España durante 2012. *P. ultimum* causa “damping-off” en brócoli y no se describe como causante de enfermedad en tallos de pellas maduras de esta especie. Las piezas estaban afectadas de pardeamiento y descomposición. Los análisis revelaron que, además de *P. ultimum*, crecían varias bacterianas. Entre éstas, se identificaron dos especies del rizoplasma: *Pseudomonas putida* y *Ochrobactrum* sp. El estudio de la interacción *in vitro* entre *P. ultimum* y las dos bacterias se realizó por medio de confrontación sobre placas Petri con agar de patata o agar de recuento total, creciendo durante 5 días a 26°C. Las áreas de las colonias de *P. ultimum* y las tasas de crecimiento se midieron durante la fase lineal y de desaceleración. El crecimiento se ajustó a una típica ecuación de crecimiento de hongos en placa Petri. *Ochrobactrum* sp. retardó el crecimiento del micelio de *P. ultimum* durante la fase lineal de éste. Esto sugiere que esta bacteria es capaz de sintetizar toxinas difusibles frente a *P. ultimum*. *Ochrobactrum* sp. indujo daños en sus hifas. Los resultados sugieren que las especies bacterianas encontradas dentro del tejido afectado procedían de la rizosfera y penetraron al interior por el proceso de infección y colonización del hongo a partir del suelo. Estas bacterias pueden interferir con el hongo durante la colonización de los tejidos. La inoculación sobre fragmentos de plantas sanos apoya esta hipótesis. Se está llevando a cabo la prueba de inoculación sobre plantas para reproducir los síntomas y comprobar los postulados de Koch.

* Este trabajo ha sido financiado por SAKATA SEED IBÉRICA



P-015-01420

ETIOLOGÍA DE LA PODREDUMBRE RADICULAR Y DAMPING OFF DE LA AZUCENA DE MAR (*Pancratium maritimum* L.)**Palmero D.¹, García M.³, Gálvez L.¹, Vicedo J.², Martín I.³**

1) Universidad Politécnica de Madrid (UPM), EUIT Agrícola, Ciudad Universitaria s/n. 28040 Madrid, Spain

2) Instituto Universitario de Biodiversidad CIBIO. Universidad de Alicante, Alicante, Spain

3) Centro Nacional de Recursos Fitogenéticos, CRF. Instituto Nacional de Investigación Agraria y Tecnología Agroalimentaria INIA, Madrid. Spain.

La azucena de mar (*Pancratium maritimum* L. *Amaryllidaceae*) es un bulbo perenne geófito que crece silvestre en las dunas de arena y las playas de la costa mediterránea y está considerada una especie amenazada en esta área. En 2012, en ensayos de germinación llevados a cabo con semillas procedentes del parque del Saler y la Albufera (Valencia, España), se observaron plántulas sintomáticas con una coloración rojiza tanto en los hipocótilos como en las raíces que, finalmente, producían podredumbre radicular y dificultaban el desarrollo de la semilla. Porciones de hipocótilos y raíces sintomáticas se cultivaron, tras desinfección en NaOCl 0.5%, en medios PDA y Komada. Entre 5 y 7 días después, se pudieron observar colonias fúngicas creciendo de los tejidos afectados. La observación microscópica reveló características propias de la especie *Fusarium proliferatum* (Matsushima) Nirenberg con cadenas de microconidios surgiendo de polifálidas y macroconidios con 3-5 septos. La identificación de los aislados se corroboró mediante la secuenciación del gen del factor de elongación 1- α .

Posteriormente, se realizaron ensayos de patogenicidad. Para ello, 12 plántulas de cinco semanas de *P. maritimum* fueron sumergidas durante 24 h en una suspensión de conidios de cada uno de los tres aislados de *F. proliferatum* seleccionados. Las plántulas fueron plantadas de nuevo y se mantuvieron durante tres semanas en invernadero. Al final del ensayo se comprobaron los síntomas característicos calculando un índice de severidad de la enfermedad y se obtuvo el peso seco de las plantas. Los resultados mostraron diferencias significativas ($p < 0.0001$) tanto en el índice de severidad de la enfermedad como en el peso seco de las plantas con respecto al testigo sin inocular. Este es el primer trabajo en el que se muestra a *F. proliferatum* como patógeno de la azucena de mar.



P-016-01299

***Rhizoctonia* sp. BINUCLEADA ASOCIADA A RAÍCES MICORRIZADAS POR *Tuber melanosporum* VITTAD.**Solis Z.K.², Garcés A.¹, Martín M.¹, Sénchez S.¹, Barriuso J.J.¹

1) Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria de Aragón. CITA, España

2) Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias. INIAP-SENESCYT-Ecuador

La trufa negra (*Tuber melanosporum*) es un hongo hipogeo, apreciado en la gastronomía por su aroma y sabor, con un alto potencial de comercialización. Las trufas se producen por simbiosis ectomicorrícica fundamentalmente en raíces de las encinas (*Quercus ilex*) y robles (*Quercus spp*). En el suelo, existen microorganismos cosmopolitas, que compiten con *T. melanosporum*, reduciendo la producción de trufas. En este trabajo se estudió parte de la microbiota fúngica asociada a ápices micorrizados obtenidos de raíces (encina y roble), para establecer la acción patogénica o la posible simbiosis entre los microorganismos colectados. Se probaron dos métodos de desinfección de ápices micorrizados, posteriormente se cultivaron en sustrato artificial estándar y en medios selectivos. Se obtuvieron colonias de hongos filamentosos, con un micelio estéril, de color oscuro, septado e hifas creciendo en ángulo recto. Mediante la tinción de núcleos con Safranina se observó la presencia de dos núcleos, identificándose a la colonia obtenida como una especie de *Rhizoctonia* binucleada. Además, mediante inoculaciones directas del micelio en plántulas de melón (*Cucumis melo*) se confirmó su inocuidad, propia de la especie binucleada. Finalmente, los análisis moleculares confirmaron la identificación morfológica. En invernadero, se efectuó una prueba de patogenicidad sobre quercíneas, utilizando propágulos de *Rhizoctonia* sp. binucleada creciendo en granos de avena. Las inoculaciones se efectuaron en el sustrato conjuntamente con *T. melanosporum* y semillas pre germinadas de encina, las cuales se desarrollaron sin presentar síntomas de enfermedad después de cinco meses desde la inoculación. En cultivo *in vitro* en medio selectivo del sustrato, se observó la presencia de rizomorfos y la estructura típica del micelio de *Rhizoctonia* sp. binucleada. A la vista de estos resultados se puede considerar que el hongo *Rhizoctonia* sp. binucleada se encuentra estrechamente asociado a la rizosfera de una planta trufera en forma natural, siendo no patogénico para las encinas.

*Trabajo financiado por Gobierno Nacional de la República del Ecuador, a través del Programa de Becas Convocatoria Abierta 2012 de la Secretaría de Educación Superior, Ciencia, Tecnología e Innovación SENESCYT



P-017-01496

CARACTERIZACIÓN DEL AGENTE CAUSAL DE LA SECADERA DEL GLADIOLO *Gladiolus grandiflorus* L.Olalde G.G.¹, Lara M.B.N.¹, Ávila T.C.¹, Vargas M.¹, Gutiérrez M.¹, Aguirre S.¹, Guillén H.¹

1) Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo

En México, la gladiola ocupa el tercer lugar en importancia con 2,200 ha. Sembradas. Sin embargo es afectada por diversos fitopatógenos que ocasionan grandes pérdidas económicas a los productores. Destaca por su importancia la "secadera", reportándose varios agentes causales. Por lo anterior el objetivo de la presente investigación fue caracterizar el agente causal de la secadera en gladiola. Se realizaron colectas en Villa Guerrero, Estado de México, de plantas de gladiola enfermas, se obtuvieron aislamientos del género *Fusarium*. De los cuales se produjeron cultivos monospóricos en los medios SNA y AA, los conidios formados se almacenaron en glicerol 25 % a -70 °C. Con estas soluciones se realizó una caracterización cultural y morfológica depositando 5 µL en los medios de cultivo. Se evaluó el tipo de crecimiento, color de la colonia, estructuras reproductivas presentes y tasa de crecimiento evaluada a las 72 horas. La extracción de ácidos nucleicos se realizó a partir del protocolo de Cenis, para la reacción en cadena de la polimerasa se utilizó el gen factor de elongación y el espaciador interno de la transcripción 3-4. Las colonias presentaron micelio abundante con coloración blanco a rosa-violeta, una gran cantidad de microconidios ovoides y clamidosporas, macroconidios escasos e hifas enrolladas. Las secuencias obtenidas se compararon con *Fusarium sterilihyphosum*, *Fusarium circinatum*, *Fusarium pseudocircinatum* y *Fusarium mexicanum* por compartir el carácter de hifas enrolladas mientras que *Fusarium oxysporum* y *Fusarium oxysporum* f. sp. *gladioli* se utilizaron por sus antecedentes. El análisis filogenético se hizo para máxima verosimilitud y bayesiano. Donde se observó que la especie de *Fusarium* aislada de gladiola no se asocia con ninguna de las otras especies, las cuales se agrupan perfectamente de acuerdo a sus características morfológicas y moleculares. En base a los resultados de la caracterización se determinó a este aislamiento como una nueva especie *Fusarium*.

*Financiado por Proyecto P/PIFI-2013-16MSU0014T-04 Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo



P-018-01591

Fusarium circinatum*, PORTADOR DE DOS NUEVAS ESPECIES DE MITOVIRUS*Martínez-Álvarez, P.¹, Vainio, E.J.², Botella, L.³, Hantula, J.², Diez, J.J.¹**

¹ Instituto Universitario de Investigación en Gestión Forestal Sostenible, Universidad de Valladolid – INIA, Avenida de Madrid 44, 34071 Palencia, España. pmtnez@pvs.uva.es

² Finnish Forest Research Institute, Vantaa Research Unit, PO Box 18, 01301 Vantaa, Finland.

³ Department of Forest Protection and Wildlife Management, Faculty of Forestry and Wood Technology, Mendel University in Brno, Zemědělská 1, 61300 Brno, Czech Republic.

Fusarium circinatum Nirenberg & O'Donnell (teleomorfo = *Gibberella circinata*) es el hongo ascomicete causante de la enfermedad del chancro resinoso de los pinos. El patógeno está presente en Europa desde el año 2004, particularmente en el norte de la Península Ibérica afectando a plantaciones de *Pinus radiata* y *P. pinaster*, y causando graves pérdidas en viveros forestales. Otros países europeos tales como Francia, Italia y Portugal también han detectado al patógeno en su territorio. En este trabajo se describen tres nuevas cepas víricas pertenecientes a dos especies nuevas del género *Mitovirus*, obtenidas a partir de un aislamiento español de *F. circinatum*: *Fusarium circinatum* mitovirus 1 (FcMV1), FcMV2-1 y FcMV2-2. El genoma completo de FcMV1 posee 2419 pares de bases y codifica para una ARN polimerasa dependiente de ARN (RdRp) de 731 aminoácidos, con un contenido de guanina y citosina de en torno al 30%. Los genomas parciales de las cepas FcMV2-1 y FcMV2-2 (2193 y 1973 pares de bases, respectivamente) mostraron un 48% de similitud a nivel de aminoácidos, por lo que se considera que pueden pertenecer a la misma especie. Por el contrario, son claramente diferentes a FcMV1, que presenta una similitud máxima a nivel de aminoácidos del 32-35% con otras cepas, y un 46% a nivel proteínico con *Thielaviopsis basicola* mitovirus. Este es el primer estudio que encuentra virus en *F. circinatum* y *Mitovirus* en *Fusarium* spp.

* Este trabajo ha sido financiado por el Ministerio de Economía y Competitividad (proyecto AGL2012-39912), una ayuda de estancia de investigación STSM de la EU COST Action FP1002 (PERMIT), y por ayudas de la Universidad de Valladolid, the Academy of Finland (decision number 251193), y The Finnish Forest Research Institute.



P-019-01532

PATOGENICIDAD DE AISLADOS DE *F. oxysporum* f. sp. *fragariae* Y *F. solani* EN CUATRO CULTIVOS HORTÍCOLAS DE INTERÉS ECONÓMICO EN ANDALUCÍA**Pastrana A.M.¹, Capote N.¹, Sánchez A.¹, Calleja M.C.¹, Basallote-Ureba M.J.¹**

1) IFAPA Centro Las Torres-Tomejil, Apdo Oficial, 41200 Alcalá del Río, Sevilla.

Fusarium oxysporum y *F. solani* son hongos de suelo referidos recientemente como patógenos de fresa. Para conocer la reacción de estos hongos en otros cultivos hortícolas de importancia económica en Andalucía, se llevaron a cabo ensayos de patogenicidad en plantas de ajo, espárrago, fresa y tomate. Cada huésped se inoculó con una suspensión de inóculo ajustada a 10^6 - 10^7 con/ml de un aislado de *F. oxysporum* procedente del propio cultivo y de uno de *F. oxysporum* f. sp. *fragariae* (Fof) y otro de *F. solani* (Fs), ambos patógenos de fresa. Todos los aislados se inocularon a su vez en plantas de fresa para determinar si eran capaces de infectar a este cultivo. En cada ensayo se incluyeron 8-16 plantas (repeticiones) de cada huésped: ajo 'Morado de Castilla la Mancha', espárrago 'Ciprés', fresa 'Camarosa' y tomate 'Marmande Cuarenteno'. Los ensayos se llevaron a cabo en condiciones controladas en plantas *in vitro* y en maceta. Los resultados de ambos han demostrado la especificidad de hospedador de los aislados de *F. oxysporum*, que infectaron a todos los cultivos, pero sólo ocasionaron síntomas en su correspondientes huéspedes y no en fresa. Por el contrario, *F. solani* infectó e indujo síntomas similares en los cuatro huéspedes testados, dichos síntomas consistieron en necrosis de raíces, disco basal (ajo), rizoma (espárrago), corona (fresa); marchitez y necrosis del sistema aéreo y, enanismo, con la consiguiente pérdida de vigor de las plantas.

* Este trabajo ha sido financiado por el proyecto INIA: RTA2011-00011-00-00 con un 70% de Financiación FEDER: 'Operational Programme 'Knowledge-based Economy'. Ana M^a Pastrana disfruta de una beca-contrato IFAPA predoctoral



P-020-01321

LA CAÍDA DE PLÁNTULAS Y NECROSIS RADICULAR DE PIMIENTO CAUSADA POR *Fusarium oxysporum*Pérez A.¹, Serrano Y.¹, Aguilar M.I.¹, Gómez-Vázquez J.M.¹

1) IFAPA Centro La Mojonera (Almería)

El pimiento es extensamente cultivado en invernaderos de Almería. En el verano de 2013, en plántulas de pimiento de varios cultivares crecidas en un semillero de dicha provincia, se observaron síntomas de necrosis de la raíz principal y retraso del crecimiento en el 30-35% de las plántulas y *Fusarium* sp. se aisló consistentemente de las raíces con síntomas. Ocho aislados fueron identificados como *Fusarium oxysporum* en base a su morfología y por comparación de sus secuencias de una porción del factor de elongación 1-alfa con la base de datos del Fusarium-ID y del GenBank. Los ocho aislados tuvieron una homología del 99% con otros aislados de *Fo* pertenecientes a las formas especializadas *vasinfectum*, *lilii*, *lycopersici* y *radicis-lycopersici*. Las secuencias de los aislados FC6 y FC12 se depositaron en el GenBank con los códigos KF928930 y KF928931, respectivamente.

El poder patógeno fue ensayado en dos experimentos realizados en invernadero en agosto y octubre sobre pimiento cv. Melchor en contenedores de 1 L con vermiculita. Cada contenedor fue inoculado a la siembra con 50 ml de una suspensión de los diferentes aislados conteniendo entre $5.0 \cdot 10^5$ y $9.4 \cdot 10^6$ conidias/ml. El diseño fue en bloques completos al azar con cuatro repeticiones y 5-6 plantas por repetición. En ambos experimentos, un mismo número de plántulas sin inocular sirvieron como testigos. Las plantas se mantuvieron durante 40 días después de la inoculación.

Cinco de los aislados inoculados FC1, FC5, FC6, FC11 y FC12 resultaron patógenos, produciendo síntomas entre el 60 y 90% de las plantas en el primer experimento y entre el 87,5 y 100% en el segundo. Las plantas testigo permanecieron asintomáticas. Los síntomas fueron de caída de plántulas, en ocasiones con estrías necróticas en el tallo y de necrosis de la raíz principal, y el patógeno se reaisló de todas las plantas con síntomas.



P-021-01534

CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA, PATOGENICA Y MOLECULAR DE *Fusarium* spp. DEL CULTIVO DE LA FRESA. TRES AÑOS DE PROSPECCIONES EN VIVEROS DE ALTURA Y CAMPOS DE PRODUCCIÓN DE FRUTO**Pastrana A.M.¹, Aguado A.¹, Basallote-Ureba M.J.¹, Sánchez M.C.¹, García-Baquero J.¹, Capote N.¹**¹) IFAPA Centro Las Torres-Tomejil, Apdo Oficial, 41200 Alcalá del Río, Sevilla.

España es el cuarto país productor mundial de fresa (*Fragariae* × *ananassa* Duch.). Este cultivo es altamente susceptible a enfermedades causadas por hongos de suelo. *Fusarium oxysporum* f. sp. *fragariae* (*Fof*) es el agente causal de la enfermedad conocida como 'Fusarium wilt' detectada en Australia, Japón, Korea, China, EEUU, México y España. *Fof* es un hongo difícil de controlar porque sobrevive como clamidosporas en el suelo durante años. Por ello, la detección temprana en plantas y en suelo es esencial para el desarrollo de medidas de control efectivas. Para conocer la incidencia y distribución de *Fof* en el cultivo de la fresa se hicieron prospecciones en tres viveros de producción de planta de fresa (viveros de altura) de Ávila, Valladolid y Segovia y en tres fincas de campos de producción de fresa de Palos de la Frontera, Moguer y Cartaya (Huelva), durante 3 años consecutivos. En viveros de altura, se tomaron muestras de suelo, plantas-madre y plantas-hija. En campos de producción se analizaron muestras de suelo y de plantas muertas a lo largo de las campañas de producción. Se obtuvieron 94 aislados monospóricos de *Fusarium* procedentes de estas muestras, se caracterizaron morfológica y molecularmente mediante la secuenciación y análisis filogenético de un fragmento del gen *EF-1α*. Se testó la patogenicidad de 49 aislados identificados como *F. oxysporum*, *F. solani*, *F. proliferatum*, *F. commune*, *F. equiseti* y *F. avenaceum*. Los aislados de *Fof*, *Fp*, *Fc*, *Fe* y *Fa* no fueron patogénicos para fresa. *Fs* fue la única especie capaz de ocasionar síntomas, consistentes en enanismo, marchitez, escasa producción de nuevas raíces y en ocasiones coloración castaño-rojiza de los tejidos internos de la corona. Estos aislados patogénicos procedían de muestras de suelo y plantas muertas de campos de producción de fresa y de plantas-hija procedentes de viveros de altura.

* Este trabajo ha sido financiado por el proyecto INIA: RTA2011-00011-00-00 con un 70% de Financiación FEDER: 'Operational Programme 'Knowledge-based Economy'. Ana M^a Pastrana disfruta de una beca-contrato IFAPA predoctoral



P-022-01327

***Mycosphaerellaceae* ASOCIADAS A LA MANCHA GRASIENTA DE LOS CÍTRICOS EN DIFERENTES REGIONES CLIMÁTICAS**

Aguilera-Cogley V.¹, Berbegal M.², Armengol J.², Vicent A.³

1) Laboratorio de Protección Vegetal, Instituto de Investigaciones Agropecuarias de Panamá (IDIAP). Los Canelos – Santa María, Panamá

2) Instituto Agroforestal Mediterráneo, Universidad Politécnica de Valencia. 46022-Valencia

3) Centro de Protección Vegetal y Biotecnología. Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA). Moncada 46113, Valencia

La mancha grasienta (greasy spot) de los cítricos está ampliamente distribuida en las regiones húmedas del Caribe y América Central. La enfermedad se caracteriza por la aparición de pústulas necróticas en las hojas e induce graves defoliaciones en los árboles afectados, siendo necesaria la aplicación de fungicidas para su control. Se han detectado también síntomas de la enfermedad en las regiones citrícolas semi-áridas del Mediterráneo, aunque por lo general con escasa severidad. El hongo *Zasmidium citri* (sin. *Mycosphaerella citri*) se ha identificado de forma consistente como agente causal de la mancha grasienta en las regiones citrícolas del Caribe y América Central. Sin embargo, no existe ningún estudio etiológico de la enfermedad en la cuenca del Mediterráneo. El objetivo de este trabajo fue la caracterización fenotípica y molecular de una colección de 42 aislados representativos obtenidos en prospecciones de la enfermedad realizadas en Panamá, Ghana, España y Marruecos. Los aislados se sembraron en medio de cultivo NA, PDA, MEA y OA, donde se determinaron sus características fenotípicas tales como color, margen de crecimiento y pigmentación. Además, se determinó el ratio de crecimiento de todos los aislados entre 5 y 35°C. En algunos casos fue posible medir también el tamaño de las ascosporas a partir de pseudotecios presentes en la hojarasca. Se amplificó y secuenció la región ITS del ADNr utilizando los cebadores ITS1F-ITS4. Los resultados del análisis filogenético separaron los aislados en dos grupos bien definidos: los procedentes de Panamá y Ghana (24) que se identificaron como *Z. citri*, y los de España y Marruecos (20) que se identificaron como *Amicosphaerella* sp. Los dos grupos identificados también se diferenciaron sobre la base de sus caracteres fenotípicos ya que sólo los aislados de *Z. citri* crecieron a 35°C. Estos resultados indican que la mancha grasienta de los cítricos en las regiones Mediterráneas estudiadas está asociada a *Amicosphaerella* sp. La detección de *Z. citri* en Ghana supone la primera cita de este patógeno en África.

INIA RTA2010-00105-00-00-FEDER



P-023-01544

DECAY FUNGI RELATED TO "ROIG" RED STAIN OF *Castanea sativa* IN CATALONIAYurkewich J.I.¹, Castaño C.², Colinas C.¹

1) BSc Forest Management University of Alberta

2) Universitat de Lleida- Centro Agrotecnio

Fungal pathogens have reduced the overall productivity of *Castanea sativa* and continue to reduce the economic feasibility of forestry operations. Red stain of chestnut in northeastern Spain is a difficult to detect heart rot fungus capable of decreasing the market value of chestnut timber to the point of rendering chestnut coppices uneconomical. Yet, to this day, we still do not know which species are involved. With the objective of identifying the fungus or fungi causing this heart rot, we used molecular techniques to detect and identify fungi within the red stained zones of 37 chestnut stumps collected from 8 recently harvested stands in Montseny Natural Park, Barcelona. The sections of wood with the distinct discolouration were processed to obtain 1cm³cubes. The cubes were surface sterilized and cultured on water agar. Subsequent isolations onto PDA were used as a means of obtaining pure cultures for DNA extraction. The ITS region was amplified with the primer pair fITS1 and ITS4 and screened by gel electrophoresis. From each growth form successfully isolated on PDA we selected 3 isolates for DNA purification and sequencing. The resulting DNA sequences were aligned and blasted against the NCBI database. The results provide insight into the fungal community inhabiting tissues and producing red stain in chestnut. Knowing the identity of the causal agent of "Roig" red stain will be valuable when managing to minimize its impact in chestnut stands.



P-024-01383

INFECCIONES LATENTES DE *Colletotrichum* spp. EN ACEITUNAS: MEJORA DEL MÉTODO DE DETECCIÓN Y EFECTO SOBRE LA CALIDAD DEL ACEITE**Romero-Rodríguez J.¹, Santa Bárbara A.E.¹, Moral J.², Roca L.F.¹, Moreda W.³, Trapero A.¹**

1) Dpto. de Agronomía, Unidad de Patología Agroforestal, Universidad de Córdoba, Campus de Rabanales, Edif. C4, 14071 Córdoba.

2) Dpto. Mejora Vegetal, Instituto de Agricultura Sostenible (IAS)-CSIC, 14080 Córdoba.

3) Instituto de la Grasa, CSIC, Avda. Padre García Tejero, 4, Sevilla, España.

La detección temprana de infecciones latentes de *Colletotrichum* spp. es esencial para establecer estrategias racionales de control de la Antracnosis del olivo. Es bien conocido que los aceites procedentes de aceitunas afectadas muestran una pésima calidad organoléptica, pero se desconoce si durante la fase de latencia el patógeno afecta a la calidad del aceite. Los objetivos del presente trabajo son: i) desarrollar un método de detección de infecciones latentes que sustituya al método estándar del Paraquat (dicloruro de 1,1'-dimetil-4,4'-bipiridilo) debido a los problemas de manejo que implica el uso de este herbicida; y ii) cuantificar la influencia de las infecciones latentes sobre la calidad del aceite.

Aceitunas inoculadas y asintomáticas de los cvs. Arbequina, Hojiblanca y Picual fueron sometidas a 12 tratamientos: cámara húmeda, desinfección secuencial con alcohol y lejía, congelación, inmersión en Paraquat con y sin herida en la aceituna, pulverización de etileno, pulverización de etanol al 70% e inmersión en hidróxido sódico al 5%, 0.5%, 0.1%, 0.05%, 0.01%. Además, aceitunas infectadas naturalmente fueron sometidas a los tratamientos de detección más efectivos. La eficacia de los tratamientos se evaluó según la incidencia de infecciones y el tiempo necesario para detectar el 50% de las infecciones (T_{50}). En los ensayos de calidad, se evaluaron niveles de acidez, peróxidos, K232 y K270 mediante protocolos estandarizados de aceites procedentes de aceitunas inoculadas y asintomáticas.

La aplicación de hidróxido sódico al 0.05% permitió detectar el 99.4% de las infecciones latentes con una eficacia similar a la conseguida con Paraquat. Además, permitió disminuir la T_{50} en 4.4 días. El patógeno produjo un deterioro marcado de la calidad del aceite durante la fase de latencia en el cv. Arbequina, pero este efecto no se observó en los cvs. Hojiblanca y Picual.

Esta investigación ha sido cofinanciada por el proyecto de excelencia AGR 08-3635 de la Junta de Andalucía y la empresa Bayer Crop Science



P-025-00698

ETIOLOGÍA DE LAS ENFERMEDADES DE POSCOSECHA DEL CAQUI (*Diospyros kaki* L. CV. ROJO BRILLANTE) EN ESPAÑA**Palou L.¹, Taberner V.¹**

1) Laboratori de Patologia, Centre de Tecnologia Postcollita (CTP), Institut Valencià d'Investigacions Agràries (IVIA)

En los últimos años, la superficie cultivada de caqui (*Diospyros kaki* L.) se ha multiplicado en España hasta unas 10.000 ha, que son mayoritariamente del cultivar 'Rojo Brillante' y se encuentran en la provincia de Valencia (85%). Esto se debe a la creciente demanda que existe en los mercados europeos por este cultivar autóctono de alta calidad que se consume duro tras ser sometido en poscosecha a un tratamiento de desastringencia con CO₂. El objetivo de este trabajo fue identificar los hongos patógenos causantes de enfermedades de poscosecha en este cultivar en nuestras condiciones ambientales.

Durante dos campañas consecutivas, se utilizaron caquis 'Rojo Brillante' de dos parcelas distintas de la zona de L'Alcudia (Valencia) para determinar la etiología de enfermedades tanto en frutos intactos como en frutos heridos artificialmente. Para ello, los frutos se mantuvieron en cámaras húmedas a 25°C hasta 9 semanas. Se determinaron también las enfermedades en caquis manejados comercialmente (no existen tratamientos fungicidas de poscosecha autorizados) y conservados a 1°C hasta 5 meses. Los hongos aislados se incubaron en medio patata dextrosa agar (PDA) a 25°C para su purificación y posterior identificación. En algunos casos se realizaron pruebas de patogenicidad.

El principal hongo causante de enfermedad en frutos intactos fue *Alternaria alternata* (mancha negra), para el que se estableció un índice de enfermedad específico para el cultivar 'Rojo Brillante'. Otros hongos patógenos aislados más esporádicamente, tanto de frutos intactos como de frutos conservados en frío, fueron *Pestalotiopsis clavispora*, *Lasiodiplodia theobromae*, *Neofusicoccum mediterraneum*, *N. luteum* (podredumbres pedunculares), *Botrytis cinerea* (podredumbre gris) y *Colletotrichum gloeosporioides* (antracnosis). La mancha negra, la podredumbre azul causada por *Penicillium expansum* y, en mucha menor medida, podredumbres causadas por *Rhizopus stolonifer*, *Cladosporium* spp. y *Trichoderma* spp. fueron las más frecuentes en frutos heridos artificialmente.



P-026-01384

DETECCIÓN DE INFECCIONES LATENTES DE *Monilinia fructicola* EN FLORES DE MELOCOTONERO MEDIANTE q-PCR

García-Benítez C.¹, Martínez-García F.¹, Melgarejo P.¹, De Cal A.¹

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

La podredumbre parda causada por *Monilinia* spp. es una enfermedad fúngica con importantes repercusiones económicas en la fruta de hueso. Tras la infección de flores o frutos y si las condiciones no son favorables para su desarrollo, *Monilinia* puede permanecer en estado de latencia a lo largo del cultivo e incluso después de la recolección. El objetivo de este trabajo es poner a punto la PCR en tiempo real (qPCR) para poder identificar rápida y correctamente cada una de las especies de *Monilinia* que causan las infecciones latentes en flores de melocotonero.

Para ello se generaron infecciones latentes en flores de melocotonero en condiciones de laboratorio, inoculando 20 flores previamente desinfectadas superficialmente con diferentes suspensiones de conidias del hongo *M. fructicola* (0, 10², 10³, 10⁴, 10⁵ y 10⁶ c/ml). Tras una incubación a 25°C durante 24h y nueva desinfección se incuban a 4°C durante 4 días. La mitad de las flores inoculadas con cada una de las suspensiones (10 flores) se utilizaron para estimar el porcentaje de infecciones latentes inducidas. Con el resto de las flores se procedió a la detección de infecciones latentes mediante qPCR. Se extrajo el ADN total de las flores utilizando el kit de Quiagen "DNeasy Plant Mini Kit" y posteriormente se realizó una qPCR con cebadores específicos de género basados en la región ITS y sondas fluorescentes TaqMan específicas, utilizadas previamente en la identificación por qPCR de infecciones visibles del patógeno. Las condiciones de amplificación utilizadas fueron: 10 min a 95°C seguido de 45-55 ciclos de 15 s 95°C y 1 min a 60°C. Se consideraron resultados positivos aquellas muestras que ampliaban antes del ciclo 40. El porcentaje de incidencia de infecciones latentes estimada por qPCR es significativamente superior al obtenido mediante el método tradicional en todos los niveles de infección. Por otra parte se discute el límite de detección del método.

Este trabajo ha sido financiado por el proyecto AGL2011-30472-C02-0



P-027-01416

COMPARACIÓN DE DOS TÉCNICAS DE MUESTREO PARA EVALUAR LA MICROBIOTA FÚNGICA DEL SUELO TRAS UNA DESINFECCIÓN

Marín J.I.¹, Boix A.¹, Gómez-Tenorio M.A.¹, Ruíz C. A.¹, Rodríguez P.¹, Lupión B.¹, Moreno S.¹, Velasco V.¹, Tello J.C.¹

1) Grupo de Investigación AGR-200. Departamento de Agronomía. Universidad de Almería.

La necesidad de conocer los efectos de la materia orgánica sobre la microbiota fúngica del suelo es un tema relevante para establecer la fertilidad de suelos agrícolas. Desde ese punto de vista las técnicas analíticas actuales son deficientes y poco reproducibles.

El ensayo se llevó a cabo en un suelo arenado en el que un año antes se aplicaron diferentes enmiendas orgánicas mediante biofumigación y biosolarización. En total se contó con 32 unidades experimentales de 40 m². El propósito fue evaluar la representatividad del método de muestreo para la determinación de la microbiota fúngica del suelo. Se realizaron muestreos durante y tras finalizar un ciclo de cultivo de tomate: 1) muestras de suelo (M_{suelo}) (3 muestreos) y 2) muestras de solución de suelo ($M_{\text{solución}}$) (9 muestreos). Las evaluaciones en M_{suelo} , tras el secado, triturado y tamizado de las mismas, se realizaron mediante el método de las diluciones sucesivas, mientras que en $M_{\text{solución}}$ fueron realizadas a partir de la siembra directa de la muestra.

Los resultados establecieron diferencias cualitativas y cuantitativas. El número de géneros expresados durante el ciclo de cultivo en suelos biofumigados y biosolarizados (máximo 17) difiere poco entre M_{suelo} y $M_{\text{solución}}$. Sin embargo, al finalizar el cultivo M_{suelo} duplicó a $M_{\text{solución}}$.

Atendiendo a los géneros que se expresaron en todos los muestreos realizados, M_{suelo} presentó 11, 5 de ellos coincidentes con $M_{\text{solución}}$, que solamente expresó 1 género no incluido en M_{suelo} . Así mismo, M_{suelo} expresó en algún muestreo 6 géneros que no fueron detectados en ninguno de $M_{\text{solución}}$, frente a los 4 géneros expresados en $M_{\text{solución}}$ y no en M_{suelo} . Considerando el género *Fusarium* spp., *F.oxysporum* fue detectado en todos los casos y muestreos, mientras que *F.solani* únicamente se expresó en M_{suelo} , y *F.proliferatum* en $M_{\text{solución}}$.

Trabajar con $M_{\text{solución}}$ simplificó las labores para su análisis, no obstante los resultados no fueron ventajosos en comparación con el muestreo clásico (M_{suelo}).

Palabras clave: Biofumigación, Biosolarización, Enmienda orgánica, Microbiota edáfica, Hongos.



P-028-01417

FITOPATÓMETRO VS ANÁLISIS DE SUELO E INOCULACIONES ARTIFICIALES EN LA EVALUACIÓN DE LA SANIDAD DE SUELOS CULTIVADOS CON TOMATE

Marín J.I.¹, Boix A.¹, Martínez-Beltrán C.D.¹, De Cara M.¹, Ruíz C.A.¹, Gómez-Tenorio M.A.¹, Palmero D.², Tello J.C.¹

1) Grupo de Investigación AGR-200. Departamento de Agronomía. Universidad de Almería. 2) Universidad Politécnica de Madrid. E.U.I.T. Agrícola.

Fusarium oxysporum f. sp. *radicis-lycopersici* (Forl) y *Phytophthora parasitica* son dos de los patógenos del suelo más importantes que afectan al cultivo del tomate. Para evaluar su presencia en un determinado suelo se emplean técnicas analíticas cuantitativas y cualitativas, pero estas técnicas solo permiten medir su capacidad saprofitaria, siendo necesaria la inoculación sobre plantas para determinar su patogeneidad. Una alternativa sería la Fitopatometría de suelos, una técnica que consiste en sembrar directamente en el suelo o sustrato mezclado con el suelo a analizar para averiguar si existe algún patógeno capaz de afectar a una especie vegetal en concreto.

Para determinar la efectividad de cada técnica se estudiaron 20 suelos, analizando la microbiota fusárica en medio selectivo y presencia de oomicetos mediante trampas vegetales. Diferentes aislados obtenidos de dichos análisis se inocularon sobre plantas de tomate cv San Pedro sembradas en macetas, evaluando su patogeneidad durante 30 días. Las mismas muestras se analizaron mediante Fitopatometría de suelos, mezclando 10 g del suelo a evaluar con 100 g de vermiculita, incorporando la mezcla en macetas de 1 L, donde se sembró tomate cv San Pedro, evaluando los síntomas durante 60 días.

Mediante análisis selectivos, 18 de las 20 muestras mostraron *F. oxysporum*, aunque únicamente 15 se revelaron como Forl tras las inoculaciones artificiales. Con el Fitopatómetro 13 de las 20 muestras analizadas corroboraron la presencia de Forl. Únicamente 12 de las muestras coincidieron por ambas técnicas. Respecto a *P. parasitica*, las trampas vegetales capturaron al oomiceto en 7 de los 20 suelos, mientras que en el Fitopatómetro 6 de las muestras expresaron *P. parasitica*; 4 de ellas fueron coincidentes mediante ambas técnicas. Las diferencias observadas podrían ser imputables a las imprecisiones de las propias técnicas analíticas, destacando las limitaciones del análisis del suelo en medio microbiológico selectivo y las trampas vegetales.

Palabras clave: *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*, *Phytophthora parasitica*, Fitopatómetro.



P-029-01520

LOS CLONES PC-2 Y PC-3 DE PAULOWNIA SON INMUNES A LA INFECCIÓN POR EL PATOTIPO DEFOLIANTE DE *Verticillium dahliae*Jiménez D.¹, Olivares C.¹, Trapero J.L.², Requena J.³, Moreno J.³, Jiménez-Díaz R.M.^{1,2}

1) Universidad de Córdoba

2) Instituto de Agricultura Sostenible

3) Plantas Continental S.A.

Paulownia (*Paulownia* spp.) es una dicotiledónea leñosa de origen asiático que ha generado interés en el sector forestal por su rápido crecimiento y eficiencia en la producción de biomasa. El uso de paulownia puede ser comprometido por la susceptibilidad a patógenos residentes en suelos agrícolas, entre los que *Verticillium dahliae* es particularmente relevante en Andalucía por la devastación que causa el patotipo defoliante (D) en extensas áreas oliveras. *V. dahliae* es uno de los hongos de más amplio espectro de plantas huésped, con más de 400 especies cultivadas y arvenses susceptibles, a las que hay que sumar aquéllas en que ocurren infecciones endofíticas. Sin embargo, la reacción de paulownia a *V. dahliae* es desconocida. Los resultados de este trabajo indican que los clones PC-2 de *P. elongata* y PC-3 (*P. elongata* x *P. fortunei*) de Plantas Continental S.A. son verdaderos no-huésped de *V. dahliae* D. Plantas de ambos clones crecieron asintomáticas durante más de 1 año tras su inoculación con una suspensión de conidias del hongo por inyección en el tallo o inmersión del sistema radical, mediante trasplante a suelo infestado, o conjuntamente por estos dos últimos métodos, con densidades de inóculo de *V. dahliae* D y condiciones de incubación en cámaras de crecimiento, umbráculo y microparcels que determinaron enfermedad severa en olivo 'Picual' y sandía 'Sugar Baby' en tres experimentos independientes. Además, *V. dahliae* D no estableció infecciones en el tallo de las paulownias inoculadas, según los resultados negativos de ensayos de aislamiento en medio selectivo y 'nested' PCR específica de dicho patotipo utilizando ADN total extraído de tallos de plantas inoculadas, que fueron positivos con tallos de olivos sintomáticos. *V. dahliae* se aisló en limitada extensión de raíces de dichas plantas 30 semanas después de la inoculación por trasplante a suelo infestado, pero no de aquéllas que se inocularon solo por inmersión radical. En consecuencia, paulownia parece poseer la resistencia completa propia de un verdadero no-huésped de *V. dahliae* D, lo cual puede ser de aplicación práctica en el uso de suelos fértiles infestados por *V. dahliae* en Andalucía.

*Trabajo financiado por los proyectos P10-AGR 6082, Consejería de Economía, Innovación y Ciencia, Junta de Andalucía y fondos FEDER; e IDI-20120047, CEDETI, Ministerio de Economía y Competitividad.



P-030-01528

RANGO DE HOSPEDANTES DE *Verticillium dahliae* DE GIRASOLHerrera-Mármol M.², Cordovilla M.P.³, García-Carneros A.B.¹, Molinero-Ruiz L.¹

1) Instituto de Agricultura Sostenible, CSIC

2) Laboratorio de Producción y Sanidad Vegetal. Agencia de Gestión Agraria y Pesquera de Andalucía. Consejería de Agricultura, Pesca y Desarrollo Rural. Junta de Andalucía.

3) Departamento de Biología Animal, Biología Vegetal y Ecología, Facultad de Ciencias Experimentales, Universidad de Jaén.

En los últimos años se han detectado focos de Verticilosis en varios campos de girasol de la provincia de Cádiz. En este trabajo se estudia la capacidad de aislados de *V. dahliae* (Vd) procedentes de plantas de girasol para causar enfermedad en diversos cultivos, algunos de ellos incluidos con frecuencia en las rotaciones de la zona. Se llevaron a cabo dos experimentos, en condiciones controladas y en invernadero respectivamente, en los que las raíces de plántulas genéticamente susceptibles de alcachofa, algodón, berenjena, girasol, lechuga y tomate, de cuatro semanas de edad, se inocularon por inmersión en suspensiones de conidias. Se utilizaron cinco aislados de Vd (tres de girasol y dos de olivo, uno del patotipo defoliante D y otro del no defoliante ND). Las plantas se incubaron durante ocho semanas y los síntomas se evaluaron semanalmente como porcentaje de tejido aéreo afectado. El diseño fue factorial 6 x 6 (incluido el control no inoculado) completamente aleatorizado con 6 repeticiones (plantas). Se calculó el área bajo la curva de progreso de la enfermedad y los datos se sometieron a análisis de varianza. En ambos experimentos la severidad de los síntomas dependió de forma significativa del aislado de Vd y de la especie hospedante, así como de la interacción entre ambos factores. Los tres aislados de girasol y el de olivo ND fueron altamente virulentos en alcachofa, mientras que en girasol, algodón, berenjena y tomate mostraron virulencias moderadas. El aislado D de olivo presentó máxima virulencia en algodón y fue moderadamente virulento en otras especies. Los resultados obtenidos muestran que *V. dahliae* de girasol es patógeno en otras especies agrícolas, lo que debe ser tenido en cuenta en el suroeste de España al elegir los cultivos en rotación con girasol.

Trabajo financiado por el proyecto AGL2010-17909 (Ministerio de Economía y Competitividad, Gobierno de España). Los autores agradecen a la empresa Semillas Fitó y a IFAPA - Centro Las Torres-Tomejil la cesión de semillas utilizadas en los experimentos.



P-031-01505

ESTRUCTURA GENÉTICA DE LAS POBLACIONES DE *Cadophora luteo-olivacea* EN ESPAÑA Y SUDÁFRICAGramaje D.¹, León M.², Crous P.³, Armengol J.²

1) Instituto de Agricultura Sostenible, CSIC, Apdo. 4084, 14080-Córdoba. E-mail: dgramaje@ias.csic.es.

2) Instituto Agroforestal Mediterráneo, UPV, Camino de Vera s/n, 46022-Valencia.

3) CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre, Uppsalalaan 8, 3584 CT Utrecht, The Netherlands.

Cadophora luteo-olivacea se ha considerado tradicionalmente como un hongo patógeno asociado a la enfermedad de Petri en vid joven, pero de importancia menor. Sin embargo, en los últimos años se ha incrementado su incidencia en numerosas zonas vitivinícolas en el mundo. El objetivo de este trabajo fue analizar la estructura genética de poblaciones de *C. luteo-olivacea* a partir de una colección de aislados obtenidos de plantas de vid joven así como en diferentes fases del proceso de producción de planta injertada en viveros de vid en España y Sudáfrica. Para ello, a partir de 65 aislados procedentes de 6 provincias españolas (Badajoz, Ciudad Real, Granada, Mallorca, Valencia y Zaragoza), y 15 aislados procedentes de Sudáfrica, se identificaron 40 genotipos multilocus (GML) mediante cuatro marcadores ISSR (inter simple sequence repeats). Una vez identificados los GMLs, se analizó la diversidad genotípica y la relación evolutiva entre los GMLs, construyendo "minimum spanning networks" (MSN) a partir de la distancia de disimilaridad relativa. En cuanto a las poblaciones estudiadas, se realizó un análisis Bayesiano con el programa Structure y un análisis de componentes principales (PCA) para estimar el número más probable de poblaciones que podían diferenciarse sin considerar criterios geográficos. Asimismo, la estructura genética de las poblaciones se evaluó mediante el análisis molecular de la varianza.

Los resultados de los MSNs identificaron 4 GMLs con alta frecuencia en España: GML13, GML14, GML29 y GML31. El GML13 también se encontró con alta frecuencia en los aislados de Sudáfrica. En las poblaciones españolas estudiadas y en los aislados de Sudáfrica se observó una estructura clonal y se separaron claramente dos grupos, incluyendo el grupo 1 el GML13, y el grupo 2 los restantes GMLs más frecuentes. 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 material vegetal de propagación infectado. Asimismo, la presencia de un mismo GML en España y Sudáfrica indicaría la dispersión de este GML mediante material de propagación entre ambos países o su introducción en España y Sudáfrica a través de un país tercero.

Financiado por el proyecto RTA2010-00009-C03-03 (INIA), cofinanciado con fondos FEDER (EU).



P-032-01359

HERRAMIENTAS MOLECULARES PARA LA RECLASIFICACION TAXONÓMICA DEL AGENTE DE BIOCONTROL *Penicillium oxalicum* 212 COMO *Penicillium chrysogenum*

Villarino M.¹, Herranz Y.¹, Melgarejo P.¹, Larena J.¹, Espeso E.A.²

1) SGIT-INIA, Departamento de Protección Vegetal, Carretera de La Coruña Km 7, 28040 Madrid. ilarena@inia.es

2) CIB-CSIC, Departamento de Biología Celular y Molecular, Ramiro de Maeztu 9, 28040 Madrid. eespeso@cib.csic.es

El conocimiento de la genética y la biología molecular de la cepa de biocontrol PO212, hasta el momento clasificada como *Penicillium oxalicum*, permitirá la investigación de su interacción con el huésped y el patógeno dentro de su entorno, así como mejorar su utilidad como agente de biocontrol (ACB). Por ello nos planteamos el desarrollo de herramientas moleculares que nos permitan la rápida detección y seguimiento tras su liberación.

La búsqueda de mutantes de la cepa en la ruta de biosíntesis de pirimidinas permitió identificar mutaciones en los genes *pyrG* y *pyrF*. La caracterización molecular de los genes *pyrG* y *pyrF* del ACB PO212 mostró que la secuencia era idéntica a la descrita para esos mismos genes en el genoma de *P. chrysogenum* Wisconsin 54-1255 (ATCC 28089/DSM 1075). La posterior secuenciación de los restantes genes de la ruta, *pyrD* y *pyrE*, confirmó la identidad de secuencia entre ambos *Penicillium* mientras que dicha identidad de secuencia se perdía con los homólogos en *P. oxalicum* 114-2 (CGMCC 5302, antiguamente *P. decumbens*).

La identificación del género *Penicillium* sobre la base de características morfológicas y fenotípicas puede ser un reto y a veces conduce a resultados contradictorios ya que por ejemplo algunas características distintivas pueden variar según las condiciones de crecimiento y medios de cultivo. Los genes que codifican para funciones metabólicas y estructurales también se han explorado como herramientas para la rápida diferenciación de algunas especies de hongos. Por ello se procedió a generar cebadores para el gen *pyrF* de las dos especies (*PcpyrF* y *PopyrF*) mediante las secuencias depositadas en la base de datos para *P. chrysogenum* Wisconsin 54-1255 y *P. oxalicum* 114-2. También se llevaron a cabo comparaciones de las secuencias de ITS y perfiles moleculares de BOX-PCR y REP-PCR de aislados de colección del laboratorio, con los cuales se han re-caracterizado los diferentes aislados de colección del laboratorio algunos de los cuales, incluido PO212, se han anotado como miembros de la especie *Penicillium chrysogenum*.

Los resultados obtenidos con estos cebadores junto con los dendrogramas generados a partir de las secuencias y los perfiles nos permite clasificar de forma fiable y rápida a cualquier aislado natural dentro de tres grupos, los similares a la especie i) *Penicillium chrysogenum*, ii) *P. oxalicum* y iii) otros *Penicillium*.

* Este trabajo ha sido financiado por el proyecto RTA 2010-00093 (INIA).



P-033-01485

IDENTIFICACION MOLECULAR ESPECIE Y CEPA DEL AGENTE DE BIOCONTROL *Penicillium frequentans* CEPA 909 EFICAZ FRENTE A LA PODREDUMBRE PARDAS DEL MELOCOTONERO EN FRUTALES DE HUESOGujjarro B.¹, Larena I.¹, Melgarejo P.¹, De Cal A.¹

1) Departamento de Protección Vegetal, subunidad Hongos Fitopatógenos. Instituto Nacional de Investigación Agraria y Alimentaria (INIA), Carretera de La Coruña Km 7,5, 28040, Madrid

El registro de un agente de control biológico requiere el desarrollo de métodos de monitorización que permitan su detección y trazabilidad en el ambiente así como su diferenciación de otras cepas naturales y patógenas. El género *Penicillium* comprende 225 especies diferentes de difícil identificación morfológica, debido a su alta similitud en caracteres macro y micro morfológicos. La caracterización molecular requiere el empleo de técnicas muy restrictivas para poder discriminar entre especies cercanas y cepas. Dentro del género *Penicillium*, *P. frequentans*, pertenece la serie glabra (sinónimo *P. glabrum*), caracterizado por su rápido crecimiento y conidióforos monovérticilados. Esta serie agrupa ocho especies diferenciadas filogenéticamente por el gen de la β -tubulina, cuatro de ellas presentes en la filósfera de frutales (*P. Thomii*, *P. frequentans*, *P. spinulosum* y *P. glabrum*)

El objetivo principal de este estudio es proporcionar una herramienta de identificación rápida, sensible y específica de *P. frequentans*, diferenciándola inequívocamente de las especies patógenas de la serie glabra y el resto de especies de hongos presentes en la filósfera de la planta.

Se diseñaron 3 parejas de cebadores (PFA-f /PfA-r, PFB-f /PfB-r y PFC-f /PfC-r) para la detección específica mediante PCR de cepas de la serie *glabra*, basándose en las regiones ITS1 -5.8S-ITS2 del ADN ribosómico. Fueron seleccionadas dos de ellas como los más sensibles y específicos. Las cuales son evaluadas sobre fruto con el fin de seleccionar la más adecuada. La discriminación entre especies de la serie glabra se realizó mediante el método PCR β -tubulina-RFLP, amplificación por PCR con los cebadores BT2a/BTB2b y el análisis del producto de la digestión enzimática del gen de la β -tubulina con las endonucleasas SduI, HinfI, MseI y HaeII.

Este estudio proporcionará una herramienta de diagnóstico de *P. frequentans* ultra-sensible por PCR rápida y precisa, diferenciando inequívocamente las especies de la serie glabra y la cepa Pf909, que nos permite estudiar su permanencia en planta, detección y trazabilidad.

Investigación financiada por 612713 BIOCOTES fondos FP7



P-034-01590

ENSAYO SOBRE LA PATOGENICIDAD DE AISLADOS ESPAÑOLES DE *Heterobasidion annosum* EN PLÁNTULAS DE *Pinus pinaster*

Prieto-Recio, C.^{1, 2}, Martín-García, J.^{1, 2}, Díez, J.J.^{1, 2}

¹Departamento de Producción Vegetal y Recursos Forestales. E. T. S. de Ingenierías Agrarias. Universidad de Valladolid. Campus "La Yutera", Avda. Madrid 44. 34004. Palencia.

² Instituto Universitario de Investigación en Gestión Forestal Sostenible UVA-INIA. Campus "La Yutera", Avda. Madrid 44. 34004. Palencia. E-mail: cristina.prieto@pvs.uva.es

El decaimiento del Pino Negral asociado a la presencia del hongo patógeno *Heterobasidion annosum* (Fr.) Bref., se ha observado recientemente en varias masas de *Pinus pinaster* Ait. del 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. El objetivo de este estudio es el de testar la patogenicidad de dos aislados españoles de *H. annosum* en plántulas de dos años de edad de *P. pinaster*. Para ello se utilizaron dos tipos de inóculo (chips de madera y serrín en polvo, ambos colonizados por *H. annosum*) para infectar las plántulas por dos vías diferentes (inoculación en tallo y en suelo). Las tasas de mortalidad de las plántulas inoculadas en el tallo difirieron significativamente de las plantas control, sin embargo esto no ocurrió para las plántulas infectadas a través de la inoculación vía suelo. Para ambos tipos de inoculación, la longitud de la necrosis y los síntomas de marchitamiento fueron mayores en las plántulas inoculadas con *H. annosum* que en plantas control. En cuanto a la asignación de biomasa de la parte aérea y radicular de las plántulas inoculadas en el tallo, no se observaron diferencias significativas entre las plántulas infectadas y plantas control. Sin embargo, el porcentaje de raíces finas fue menor en las plántulas inoculadas vía suelo, que en las plantas control. Hasta donde sabemos, esta es la primera prueba de patogenicidad realizada con aislados españoles de *H. annosum* sobre planta joven de *P. pinaster*.



P-035-01593

SUSCEPTIBILIDAD DE CINCO REGIONES DE PROCEDENCIA DE *Pinus halepensis* A *Gremmeniella abietina***Romeralo C.¹, Santamaría O.², Witzell J.³, Díez J.J.¹**¹ Instituto Universitario de Investigación Forestal Sostenible, Universidad de Valladolid-INIA. Departamento de Producción Vegetal y Recursos Forestales, Avda Madrid 44, 34004 Palencia. Correo electrónico: carmen.romeralo@pvs.uva.es² Departamento de Ingeniería del Medio Agronómico y Forestal. Universidad de Extremadura. Avda. Adolfo Suárez s/n. 06007 Badajoz.³ Southern Swedish Forest Research Centre, Swedish University of Agricultural Sciences, Box 49, 23053, Alnarp, Suecia.

Gremmeniella abietina (Lagerb.) Morelet es un hongo responsable de la destrucción de muchas plantaciones y bosques de coníferas en varios países del hemisferio norte. En nuestro país, se detectó por primera vez en el año 1929 sobre *Pinus pinaster* aunque no se aisló hasta 1999 en masas reforestadas de *Pinus halepensis* de la provincia de Palencia. En la actualidad, las zonas afectadas por esta enfermedad se concentran en las provincias de Palencia y Valladolid. El pino carrasco, es una especie termófila que debido a su rusticidad, se ha utilizado para repoblar amplias zonas de la región mediterránea ya que puede soportar las condiciones más adversas. Sin embargo, es aconsejable tener en cuenta las regiones de procedencia de la especie, ya que puede asegurar el éxito de la repoblación. En España, se han definido 19 regiones de procedencia para el pino carrasco cuya delimitación está basada en la variación de los caracteres ambientales de los territorios en los que habita la especie. Por ello, el objetivo principal de este trabajo consistió en analizar la susceptibilidad al ataque de *G. abietina* de plántulas de *P. halepensis* de cinco regiones de procedencia (Alcarria, Cazorla, Bético, Sudeste e Ibérico). Se procedió a inocular de forma artificial el hongo *G. abietina* en las plántulas de *P. halepensis*. Seis meses después de las inoculaciones, y una vez que habían aparecido los primeros síntomas de la enfermedad, las plántulas se llevaron al laboratorio, se abrieron con un bisturí y se midió la longitud de la necrosis provocada por el avance del patógeno por la plántula. Los resultados del experimento mostraron que las plantas inoculadas con aislados de *G. abietina* presentaron mayores necrosis con respecto a las plantas control. Entre las procedencias, también hubo diferencias significativas entre ellas en las necrosis producidas por el hongo. La región de procedencia Ibérico presentó menor susceptibilidad a la enfermedad en comparación con Alcarria, Cazorla, Bético y Sudeste. La procedencia Bético, registró la mayor mortalidad de plántulas. Las procedencias más resistentes son las más recomendables para repoblar las zonas donde se encuentra establecida la enfermedad.

Palabras clave: *Brunchorstia pinea*, pino carrasco, regiones de procedencia, plántulas.



P-036-01421

PATÓGENOS FÚNGICOS DE LA MADERA ASOCIADOS A LA MUERTE DE PLANTAS DE MELINA EN COSTA RICA

Gálvez L.¹, Gil-Serna J.¹, García-Díaz M.², Galante E.³, Marcos-García M.A.³, Iglesias C.¹, Palmero D.¹

1) Universidad Politécnica de Madrid, E.U.I.T. Agrícola, Avda. Puerta de Hierro, 4 (28040) Madrid. E-mail: laura.galvez@upm.es

2) Centro de Recursos Fitogenéticos. INIA, Autovía de Aragón Km 36, (28800) Alcalá de Henares

3) Centro Iberoamericano de la Biodiversidad, CIBIO. Instituto de Investigación. Universidad de Alicante

En Costa Rica, en los últimos 10 años, se han detectado serios problemas de mortalidad en plantaciones de 2 a 5 años de Melina (*Gmelina arborea* Roxb.). La Melina es un árbol de la familia Verbenaceae, originaria del sudeste asiático e introducido recientemente en Costa Rica con fines maderables en monocultivo. La muerte de árboles se asocia a altas densidades de plantación y suelos mal drenados. A lo largo de 2013 y 2014, se ha detectado la presencia de chancros en troncos y la necrosis del follaje y ramillas de los árboles en una explotación comercial costarricense (El Kaminal, Sarapiquí). Se procedió a determinar la presencia e importancia de especies de insectos barrenadores en los árboles afectados así como al análisis microbiológico de las muestras (insectos y porciones de raíces y tronco).

Los resultados mostraron la presencia de dos especies de coleópteros pertenecientes a Platypodinae y Scolytidae. Los análisis de la microbiota asociada a la sintomatología permitieron identificar 11 géneros fúngicos. Los análisis morfológicos de los aislados monospóricos junto con la secuenciación de la región ITS1-5,8S-ITS2, revelaron la presencia de *Fusarium solani* y *Lasiodiplodia theobromae* como especies dominantes en las muestras de madera. También se han identificado especies de hongos pertenecientes a *Neurospora*, *Gelasinospora*, *Ogataea* o *Chaetomium* entre otros, géneros de común aparición en suelos de regiones tropicales y subtropicales. En todos los coleópteros Platypodinae se aisló *F. solani* y estos resultados concordaban con la presencia del hongo en las muestras de madera con galerías producidas por dicho insecto. Por otro lado, en los insectos y muestras de madera con galerías de Scolytidae se aislaron consistentemente hongos de los otros géneros mencionados, habitualmente presentes en el suelo. Estos resultados permiten señalar la importancia de las plagas y enfermedades sobre la mortalidad de los árboles de Melina.



P-037-01539

Patogenicidad de hongos de la madera asociados al decaimiento de almendros en Mallorca

Olmo D.¹, Mora J.¹, Gramaje D.², Armengol J.³

1) SEMILLA, C/ Esperanto, nº 8 07198. Palma de Mallorca, Islas Baleares.

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

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

Desde el año 2008 se viene observando un decaimiento y muerte de almendros en Mallorca, con síntomas internos de necrosis sectoriales y oscurecimiento vascular. En prospecciones realizadas entre 2009 y 2012 se aislaron diversos hongos de la madera asociados a estos síntomas: *Eutypa lata*, *E. leptoplaca* y varias especies de Botryosphaeriaceae.

El papel de estos hongos como agentes causales de la sintomatología descrita en almendro es poco conocido. Por ello, en abril de 2013 se inocularon almendros de dos años de edad, de cuatro variedades distintas (Ferragnes, Jordi, Pons y Vivot) con un aislado de las especies: *Neofusicoccum australe*, *N. luteum*, *N. mediterraneum*, *N. parvum*, *Diplodia seriata*, *D. olivarum*, *Eutypa lata* y *E. leptoplaca*.

El ensayo se realizó en una parcela que se dividió en cuatro bloques con distribución al azar de las variedades de almendro en cada uno de ellos. En cada bloque, con un diseño en parcelas divididas, se inocularon 3 árboles de cada variedad por cada una de las especies fúngicas y tres árboles inoculados con agar estéril como controles.

En los árboles inoculados se desarrollaron chancros con emisión de goma. Nueve meses después de la inoculación se cortaron fragmentos de madera de cada árbol, incluyendo todo el chancro generado, midiéndose la longitud de las lesiones necróticas internas.

Los resultados mostraron que la interacción variedad x hongo fue significativa, indicando que existen diferencias de susceptibilidad entre variedades de almendro dependiendo del patógeno inoculado. Todos los hongos causaron lesiones de longitud significativamente mayor que las obtenidas en los controles, exceptuando las variedades Jordi y Pons inoculadas con *E. leptoplaca* y la variedad Pons inoculada con *D. olivarum*. En todas las variedades se observó que las especies del género *Neofusicoccum* fueron las más virulentas, mientras que las especies *D. olivarum* y *E. leptoplaca* fueron las menos virulentas.



P-038-01547

HONGOS DE LA MADERA DE LA VID DETECTADOS EN PLANTACIONES JÓVENES CON SÍNTOMAS DE DECAIMIENTO EN CASTILLA LA MANCHA EN EL PERIODO 2009-2013

Muñoz R.M.¹, Lerma M.L.¹, Armengol J.²

1) Servicio de Diagnóstico y Asistencia Fitosanitaria (SEDAF), Instituto Técnico Agronómico Provincial de Albacete (ITAP), Avda. Gregorio Arcos s/n. 02006 Albacete. E-mail: rmg.itap@dipualba.es

2) Instituto Agroforestal Mediterráneo, Universidad Politécnica de Valencia, Camino de Vera s/n, 46022-Valencia. E-mail: jarmengo@eaf.upv.es

Desde el año 2002, las consultas relativas a plantas de jóvenes vid con síntomas de decaimiento han sido frecuentes en el Servicio de Diagnóstico y Asistencia Fitosanitaria (SEDAF) del Instituto Técnico Agronómico Provincial de Albacete (ITAP). En este trabajo se presentan los resultados del diagnóstico de hongos de madera en muestras de vides plantadas a partir del año 2000, recibidas en el SEDAf en los años 2009 a 2013.

El total de muestras analizadas fue de 116, detectándose hongos de la madera en el 96% de ellas. Las especies encontradas fueron *Botryosphaeria dothidea*, *Diplodia seriata*, *Fomitiporia mediterranea*, *Ilyonectria* spp., *Lasiodiplodia theomobrae*, *Neofusicoccum luteum*, *N. parvum*, *Phaeoacremonium aleophilum*, *Pm. iraniana* y *Phaeomoniella chlamydospora*, siendo *Ilyonectria* spp. (agentes causales del “pie negro” de la vid) las detectadas con mayor frecuencia, aislándose en más del 80% de las muestras. Las especies *Pa. chlamydospora*, *D. seriata* y *Pm. aleophilum*, fueron encontradas en el 27%, 25% y 15% de las muestras, respectivamente. El resto de hongos se detectó en un porcentaje inferior al 5%.

Ilyonectria spp. se aisló más frecuentemente en raíces (80%), mientras que *Pa. chlamydospora* fue aislada con mayor frecuencia en la parte baja del portainjerto (por encima de raíces) (29%), en el nudo de injerto (22%) y por encima de éste (20%). *D. seriata* se detectó sobre todo en el nudo de injerto (48%) y en la zona justo por debajo de éste (24%), mientras que *Pm. aleophilum* fue aislado de la zona baja del portainjerto (49%) y en la zona alta del portainjerto (por debajo del nudo de injerto).



P-039-01362

DESARROLLO DE UN MÉTODO DE DETECCIÓN DE LOS PRINCIPALES PATÓGENOS EMERGENTES DE FRESA EN ESPAÑALarena I.¹, Herranz Y.¹, Morales M.T.¹, Melgarejo P.¹, De Cal A.¹

1) SGIT-INIA, Departamento de Protección Vegetal, Carretera de La Coruña 7, 28040, Madrid. ilarena@inia.es

España es uno de los principales productores mundiales de fresas (más de 350.000 tm) y de plantas de vivero (más de 700 millones). Las fresas se ven principalmente afectadas por enfermedades causadas por hongos, oomicetos, y bacterias, que pueden ser responsables de importantes pérdidas económicas. Patógenos emergentes como *Fusarium oxysporum* f. sp. *fragariae*, *F. solani* y *Macrophomina phaseolina* tras la retirada del bromuro de metilo requieren la puesta a punto de métodos de diagnóstico sensibles, específicos y fiables.

El objetivo principal de este trabajo será desarrollar protocolos eficaces de detección y/o cuantificación de *F. oxysporum* f. sp. *fragariae*, *F. solani*, y *Macrophomina phaseolina* en plantas de fresa por PCR clásica y/o en tiempo real, que sean trasladables a otros países de la Unión Europea.

Para ello se partió de 13 aislados de *F. solani*, 8 aislados de *F. oxysporum* f. sp. *fragariae* y 14 aislados de *Macrophomina phaseolina* obtenidos desde plantas de fresa infectadas. Todos ellos fueron identificados por sus caracteres morfológicos excepto los aislados de *F. solani* cuya identificación también se hizo mediante la secuenciación de una porción del gen TEF-1 α (Pastrana et al 2014).

Para la detección por PCR de *F. oxysporum* f. sp. *fragariae* (Suga et al 2013), *F. solani* (Arif et al 2012) y *M. phaseolina* (Babu et al 2007) se han utilizado los protocolos y cebadores ya descritos en la bibliografía, de los cuales sólo los de *M. phaseolina* han dado resultados positivos en nuestro laboratorio tras el ajuste de las condiciones previamente descritas. Finalmente se ha procedido al diseño de nuevos cebadores para la detección de *F. solani* y *F. oxysporum* f. sp. *fragariae*.

Se discute la fiabilidad de los métodos disponibles para los 3 patógenos.

Suga et al 2013, Plant Dis. 97: 619-625; Arif et al 2012, African J. of Biotech. 11: 444-447; Babu et al 2007, Mycologia 99: 797-803.

*Este trabajo ha sido financiado por el proyecto 266505 FP7-ERANET EUPHRESO II. European phytosanitary Research coordination" (Coordinación Europea de Investigación Fitosanitaria).



P-040-01183

VIROSIS QUE AFECTAN AL CULTIVO DE PIMIENTO EN EL SUDESTE PENINSULAR ESPAÑOL (2010-2013)Villanueva F.¹, Navas-Castillo J.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

El cultivo del pimiento en el sudeste peninsular español ha experimentado en los últimos años un cambio drástico en relación al manejo de plagas. Así, se ha pasado de un control basado esencialmente en la utilización de insecticidas químicos al manejo integrado con un papel preponderante de la utilización de enemigos naturales. Como consecuencia de la generalización de la lucha biológica pueden emerger o re-emerger plagas que no eran un problema grave con anterioridad. En este trabajo se ha determinado el estado sanitario, en cuanto a infecciones virales, del cultivo de pimiento en las principales zonas productoras del sudeste peninsular (Málaga, Almería y Murcia) mediante muestreos sistemáticos durante tres temporadas consecutivas (2010-2011 a 2012-2013), analizándose mediante técnicas serológicas y moleculares la presencia de 16 virus con diferente modo de transmisión, los cuales habían sido descritos previamente en la región Mediterránea. Los virus transmitidos por mosca blanca o trips apenas están presentes en las zonas estudiadas y aquellos transmitidos por pulgones sólo parecen tener cierta importancia en la provincia de Málaga, donde coexisten los cultivos protegidos con los cultivos al aire libre y el control biológico con el control químico tradicional. En conclusión, la extendida utilización del control biológico de insectos en los cultivos protegidos de pimiento en el sudeste peninsular español parece limitar significativamente la presencia de virus en este cultivo. Es de destacar la primera detección en España del polerovirus *Pepper vein yellows virus* (PeVYV), que podría ocasionar daños serios en la producción de pimiento si las infecciones se hacen endémicas en la zona estudiada.



P-041-01341

IDENTIFICACIÓN DE UN NUEVO ENAMOVIRUS (Citrus vein enation virus, CVEV) MEDIANTE SECUENCIACIÓN MASIVA DE PEQUEÑOS RNAs Y DESARROLLO DE MÉTODOS DE DETECCIÓN MOLECULARVives M.C.¹, Velázquez K.¹, Pina J.A.¹, Moreno P.¹, Guerri J.¹, Navarro L.¹

1) Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA), Centro de Protección Vegetal y Biotecnología.

El síndrome de las protuberancias nerviales de los cítricos (citrus vein enation, CVE) es una enfermedad transmisible por injerto que se ha descrito en diversos países citrícolas de los cinco continentes. La enfermedad se transmite de forma natural mediante diferentes especies de áfidos de modo persistente y se caracteriza por la formación de protuberancias nerviales en hojas y agallas en la madera en ramas y tronco de especies sensibles. Debido a que se desconocía el agente causal de la enfermedad, su diagnóstico se realizaba mediante inoculación en plantas indicadoras, método que resulta caro y lento. Para identificar el agente causal y desarrollar métodos específicos de detección molecular, la fracción de pequeños RNAs (sRNAs) extraídos de plantas de cidro *Eurocitrus* sanas e infectadas con CVE se secuenció usando la plataforma Solexa-Illumina. El ensamblaje de los sRNAs permitió la obtención de varios fragmentos de secuencia que mostraban homología con *Pea enation mosaic virus 1* (PEMV-1), la especie tipo del género *Enamovirus*, familia *Luteoviridae*. A partir de estas secuencias se diseñaron cebadores específicos que se utilizaron para amplificar y clonar la totalidad del genoma de un nuevo virus, Citrus vein enation virus (CVEV). El RNA genómico de CVEV tiene 5983 nt y, al igual que PEMV-1, está organizado en 5 marcos de lectura abierta. El análisis filogenético de la secuencia aminoacídica de los dominios de la RNA polimerasa RNA dependiente de diferentes miembros de la familia *Luteoviridae* mostró una agrupación clara de CVEV con PEMV-1, por lo que se ha propuesto la inclusión de CVEV en el género *Enamovirus*. La obtención de la secuencia completa del genoma viral ha permitido desarrollar métodos específicos y rápidos de detección molecular de CVEV mediante hibridación molecular y RT-PCR.



P-042-01536

***Lettuce chlorosis virus*, NUEVO CRINIVIRUS QUE INFECTA A CULTIVOS DE JUDÍA.**Ruiz L.¹, Simón A.¹, Pascual F.¹, García M.C.¹, Janssen D.¹

1) IFAPA Centro La Mojonera, Camino de San Nicolás 1, 04745 La Mojonera (Almería)

Durante la campaña de otoño de 2011 se observaron en cultivos de judía (*Phaseolus vulgaris* L.) de las provincias de Almería y Granada, síntomas asociados a la presencia de *Bean yellow disorder virus* (BnYDV), como son amarilleo internervial en hojas viejas e intermedias y deformación en el fruto.

Las muestras infectadas fueron analizadas mediante RT-PCR usando primers específicos para BnYDV, sin embargo, no se observó ningún producto de amplificación. El análisis de ARN cd reveló la presencia de una banda de aproximadamente 8.5 Kb, similar a la que produce el Crinivirus *Lettuce chlorosis virus* (LCV). Su extracto, se utilizó como molde en una reacción de RT-PCR usando primers diseñados a partir de la secuencia de LCV y homólogos al gen que codifica para la RNA polimerasa dependiente de RNA (RdRp) correspondiente al RNA 1 y a la Hsp70 del RNA 2. La secuenciación de los fragmentos de PCR y posterior análisis nos revelaron zonas parciales que codifican para las proteínas RdRp y Hsp70 y que presenta un 95 y 98% de homología con las ya descritas para LCV. Basados en estas secuencias se diseñaron dos sets de primers que produjeron amplicones de tamaño esperado en muestras de campo infectadas (KC602376, KC602375). Los síntomas y la infección fueron también confirmados mediante inoculaciones de *B. tabaci* previamente alimentadas en plantas de judía infectadas con LCV. Los adultos de mosca blanca fueron alimentados en plantas de judía y lechuga. Todas las plantas de judía reprodujeron los síntomas de amarilleo y fueron positivas mediante RT-PCR, mientras que ninguna planta de lechuga resultó positiva para la infección. LCV-SP es un nuevo virus que infecta plantas de la familia *Leguminosae* en el sureste de España.

Leticia Ruiz tiene un contrato cofinanciado al 80% por el Programa Operativo FSE de Andalucía 2007-2013. "Andalucía se mueve con Europa"



P-043-01433

EL VIRUS DEL RIZADO DE LAS HOJAS DEL TOMATE DE NUEVA DELHI, UNA NUEVA AMENAZA PARA LA AGRICULTURA INTENSIVA ESPAÑOLA: DIVERSIDAD GENÉTICA Y BIOLOGÍAFortes I.M.¹, Sánchez-Campos S.¹, Fiallo-Olivé E.¹, Díaz-Pendón J.A.¹, 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"

Desde el año 2013, en cultivos de calabacín de las provincias de Almería, Murcia y Málaga, se han venido produciendo daños económicos considerables como consecuencia de las infecciones causadas por el virus del rizado de la hoja del tomate de Nueva Delhi (*Tomato leaf curl New Delhi virus*, ToLCNDV), un begomovirus (género *Begomovirus*, familia *Geminiviridae*) con genoma bipartito de DNA circular de cadena sencilla recientemente introducido en España. En condiciones naturales, este virus se dispersa a través de la mosca blanca *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae) y los daños afectan de forma importante a la producción por un menor cuajado de frutos y la pérdida de valor comercial de los mismos al deformarse su superficie. Las plantas infectadas manifiestan síntomas acusados de rizado y abarquillado en hojas jóvenes, engrosamiento de las venas y entrenudos cortos. Tras la caracterización molecular de tres aislados españoles (Juárez y col. 2014 Plant Dis. 98:857), en este trabajo se ha estudiado la diversidad genética de las poblaciones de este virus a nivel mundial y en España, detallando las propiedades genéticas diferenciales de la variante española. Asimismo, se ha obtenido un clon infectivo de un aislado de dicha variante, cuyas propiedades biológicas y gama de huésped se han estudiado y se discutirán por cuanto condicionarán las epidemias de esta nueva virosis. La disponibilidad de un clon infectivo facilitará la búsqueda de estrategias de control frente a ToLCNDV para limitar los daños ocasionados por esta virosis.



P-044-01526

DETECTION OF VIRUSES AFFECTING *Punica granatum* PLANTS IN ITALYRubies Autonell C.¹, Poggi Pollini C.¹, Ratti C.¹, Dall'Ara M.¹, Zucchini G.¹, Babini A.R.², Mirotti A.²

1) Dipartimento di Scienze Agrarie(DipSA), Alma Mater Studiorum Università di Bologna, Viale Fanin 44 – 40127 - Bologna, Italy

2) Servizio Fitosanitario Regionale, via di Saliceto 81 – 40128 – Bologna, Italy

Consumption of pomegranate (*Punica granatum* L.) fruit and its products is increasing around the world particularly due to the high content of healthy beneficial compounds in the fruits. Researches related to this crop recently intensified significantly but sustainable production is possible only if diseases are properly managed. Several studies were performed on insect pest as well as on bacterial and fungal diseases, however the potential threat of virus and phytoplasmas on this species is still poor understood. In 2013-2014, virus-like symptoms including chlorosis, rings or line patterns and several malformations (curling, dwarfing, shoestring) on the leaves have been observed on pomegranate grown in two commercial plantations as well as ornamental plants in Bologna, Ferrara and Ravenna provinces (Emilia-Romagna, Northern Italy). Total DNA and RNA was extracted from leaf samples collected from symptomatic (50) and symptomless (20) pomegranate trees. Universal and specific primers were used to investigate, by RT-PCR, the presence of viral agents belonging to the *Betaflexiviridae*, *Bromoviridae*, *Luteoviridae*, *Potyviridae* and *Secoviridae* families. The presence of phytoplasmas was also investigated by nPCR.

Results showed a significant presence of *Cherry leaf roll virus* (CLRV) in ornamental plants (10% of sample tested) showing leaf deformation symptoms. Phytoplasmas were never found in all the plants tested. At present there is no evidence of air- or soil- borne transmission of CLRV, however this pathogen has worldwide distribution and a wide natural host range. In Italy it has been reported especially on elderberry, olive and walnut. As pomegranate is propagated by hardwood cuttings, healthy propagation material could help the growers to avoid virus epidemics. Further studies are required to confirm the viral ethology of leaf symptoms in this species and to characterize the viral strain of CLRV that, to our knowledge, we identified for the first time in *Punica granatum* L.



P-045-01527

Viral Agents Role in Cherry Decline: a preliminary investigation in Emilia Romagna (Italy)

Rubies Autonell C.¹, Poggi Pollini C.¹, Dall'Ara M.¹, Lanzoni C.¹, Babini A.R.², Ratti C.¹

1) Dipartimento di Scienze Agrarie(DipSA), Alma Mater Studiorum, Università di Bologna, Viale Fanin 44 – 40127 - Bologna, Italy.

2) Servizio Fitosanitario Regionale, via di Saliceto 81 – 40128 – Bologna, Italy.

Sweet cherry plants (*Prunus avium*) presenting general decline associated with foliar symptoms (narrow and asymmetric leaves, rolled leaves, marginal reddening, yellow mosaic and red spots leading to necrosis) have been observed, in the last years, on trial and commercial orchards in the Emilia-Romagna region in Italy.

Cherry trees are prone to many graft-transmissible diseases and symptoms describing the new cherry disorder observed in Emilia-Romagna can be associated to viral agents. A preliminary investigation of the new disorder has been performed using molecular detection assays such as RT-PCR with specific primer for *Prune dwarf virus* (PDV), *Prunus necrotic ring spot virus* and *Cherry leaf roll virus* (CLRV) and nested RT-PCR followed by sequencing for members of *Trichovirus*, *Capillovirus*, *Foveavirus* and *Vitivirus* genera (*Betaflexiviridae* family). Surveys have been conducted during the season 2013 and symptomatic (66) as well as non symptomatic (83) leaf and branches samples were collected and analyzed. Interestingly, our results showed a high incidence (50.3%) of *Betaflexiviridae* in the samples analyzed even if with no clear indication of a direct relationship between symptoms observed and presence of the viral agents.

Characterization of *Betaflexiviridae* agents infecting sweet cherry in Italy has been successfully conducted. Sequence analyses showed that the amplicons obtained by nested RT-PCR share high levels of nucleotide identity with five different members of the family such as *Cherry virus A* (CVA), *Cherry necrotic rusty mottle virus* (CNRMV), *Apple chlorotic leaf spot virus* (ACLSV), *Cherry green ring mottle virus* (CGRMV) and *Apple stem pitting virus* (ASPV). This study also allowed to identify five isolates sharing a low level of nucleotide identity (~ 70%) with the GeneBank reference isolates of *Citrus leaf blotch virus* (CLBV) that, after further investigation, will be probably ascribed to a new virus species never reported in literature.



P-046-01423

DETECCIÓN DE VIRUS DE ALIÁCEAS MEDIANTE HIBRIDACIÓN MOLECULAR USANDO SONDAS DE DIG-RNA

Fraile A.¹, Castillo P.², García A.M.², Ayllón M.A.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 28223, Madrid, Spain

2) Laboratorio Saneamiento, COOPAMAN, SCL. Albacete, Spain

España es uno de los principales países productores de aliáceas del mundo, pero estos cultivos están siendo amenazados por la aparición de nuevas enfermedades ya que la apertura de los mercados y la globalización están facilitando la entrada de nuevos patógenos. Entre las enfermedades víricas económicamente más importantes están las que afectan a cebolla y ajo, siendo los virus más frecuentes los potyvirus del enanismo amarillo de la cebolla (*Onion yellow dwarf virus*, OYDV) y del rayado amarillo del puerro (*Leek yellow stripe virus*, LYSV), los carlavirus latente común del ajo (*Garlic common latent virus*, GCLV) y latente de la chalota (*Shallot latent virus*, SLV), los allexivirus del ajo (*Garlic virus*, GarV), y el tospovirus de las manchas amarillas del iris (*Iris yellow spot virus*, IYSV) que han sido detectados en España en ajo, puerro o cebolla. La detección precoz de estos virus es esencial para establecer medidas de control más eficaces. Actualmente, la mayoría de los métodos usados para la detección de virus en aliáceas están basados en RT-PCR del RNA, ya sea mediante el uso de PCR convencional o en tiempo real. Sin embargo, estos métodos son todavía demasiado caros y requieren personal especializado para su realización. Como alternativa, hemos desarrollado un método de detección, de los virus mencionados, basado en hibridación molecular. Es un método sencillo, rápido y fiable, que permite la detección del RNA viral mediante el uso de ribosondas marcadas con digoxigenina. El método se ha simplificado para la detección de los virus en improntas de tejido de hoja o diente de ajo, eliminando la extracción del RNA viral a partir del material vegetal, lo que permite hacer las improntas de un gran número de muestras directamente en el campo o invernadero. El método de detección está actualmente bajo patente P201231965.



P-047-01414

STANDARDIZATION OF VECTOR INOCULATION BY WHITEFLIES AND MOLECULAR DIAGNOSTIC OF THE CRINIVIRUS *Cucumber yellow stunting disorder virus* (CYSDV) IN CUCURBITS

Vilaplana L.¹, Mingot A.¹, Gómez-Guillamón M.L.², Díaz-Pendón J.A.², López-Moya J.J.¹

- 1) Centro de Investigación en Agrigenómica CRAG, CSIC-IRTA-UAB-UB, Campus UAB, Edifici CRAG, Bellaterra, Cerdanyola del Vallès, 08193 Barcelona.
- 2) Instituto de Hortofruticultura Subtropical y Mediterránea "La Mayora", Universidad de Málaga-Consejo Superior de Investigaciones Científicas, (IHSM-UMA-CSIC), 29750 Algarrobo-Costa, Málaga.

Cucurbit yellow stunting disease virus (CYSDV) is a whitefly-transmitted virus that affects cucurbit crops in many different temperate areas. This virus induces yellowing symptoms usually accompanied by reductions on fruit yield and quality, resulting in an economically important impact in our country. CYSDV is a member of the genus *Crinivirus*, family *Closteroviridae*, and its genome includes two molecules of single-stranded RNA of positive polarity (RNAs 1 and 2). CYSDV presents a narrow host range restricted to species of the family *Cucurbitaceae*, where it is often found in multiple infections with other viruses, as shown in different field surveys. Indeed, criniviruses are frequently found in natural conditions together with other unrelated viral pathogens, and the presence of multiple viruses may cause important specific complex diseases in certain hosts. However, being phloem-restricted pathogens that only can be maintained through vector inoculation or grafting, the experimental management of criniviruses results rather challenging, and it may cause serious difficulties for both the identification of host resistances and the analysis of vector transmission parameters that could be latter used for strategies of virus control. The study of mixed infections, and how they could affect virus dissemination, is driving our interest on these viruses, and particularly on CYSDV.

Here we present the development of a standardized inoculation method of CYSDV, combined with the use of efficient molecular tools for the detection of the virus based on a previously described quantitative real time PCR assay. To standardize the process of virus inoculation into susceptible plants, we have designed a double clip-on cage device that allows an easy transfer of insect vectors from the infected viral source to individual test plants, minimizing the risk of possible contaminations and providing an easy way to control the number of insects used in each assay. The timing for sampling the inoculated plants, and the subsequent viral RNA extraction to apply the detection system are also optimized to simplify the maintenance of a reference inoculum. The described experimental procedures will be used in the frame of a project focusing on mixed viral infections of cucurbit crops.

Funds provided by grants AGL2010-14949, AGL2011-29516-C02-02, and AGL2013-42537-R (Mineco, Spain)



P-048-01562

DETECCIÓN Y TRANSMISIÓN DE *Tomato leaf curl New Delhi virus* (ToLCNDV)**Simón A.¹, Ruíz L.¹, Velasco L.², García C.¹, Janssen D.¹**

1) IFAPA Centro La Mojonera, Consejería de Agricultura, Pesca y Desarrollo Rural de la Junta de Andalucía, Camino de San Nicolás, 1, 04745 La Mojonera, Almería.

2) IFAPA Centro Churriana, Cortijo de la Cruz s/n, 29140 Churriana, Málaga.
Email: almudena.simon@juntadeandalucia.es

Tomato leaf curl New Delhi virus (ToLCNDV), miembro de la familia *Geminiviridae* y del género *Begomovirus*, fue descrito por primera vez en la India en 1995. Progresivamente, se ha detectado en zonas de Asia y China afectando a numerosas especies, tanto de solanáceas (tomate, pimiento y patata) como de cucurbitáceas (pepino, melón, sandía, calabaza, luffa y lagenaria). En verano de 2013, ToLCNDV es detectado por primera vez en España en cultivos de calabacín de las provincias de Almería y Murcia (Juárez et al., 2014). En poco tiempo ha sido detectado en Málaga, Sevilla y el resto del levante español. Como parte fundamental en el estudio de la epidemiología y enfermedad provocada por ToLCNDV, se han realizado ensayos de transmisión con su vector, *Bemisia tabaci*, entre calabacín y tomate. Asimismo, se han comparado técnicas de caracterización, diagnóstico y detección serológicas (ELISA) y de ácidos nucleicos virales (hibridación molecular con sondas no radioactivas y PCR a tiempo real). Posteriormente, estas técnicas han sido validadas en muestras procedentes de cultivos de calabacín y tomate afectados por ToLCNDV. La observación de los primeros síntomas ha oscilado entre 9 y 15 dpi; dependiendo de las especies ensayadas, todas presentaron síntomas comunes de ToLCNDV (moteado clorótico, mosaico y rizado). El resultado de la detección de ToLCNDV el primer día de observación de síntomas ha sido diferente en función de la técnica y el huésped. La mejor técnica de diagnóstico y caracterización ha sido PCR a tiempo real, seguida de hibridación molecular, en las especies estudiadas. La técnica ELISA, con antisuero SCLV, no es un buen método de análisis de diagnóstico. Los resultados obtenidos sugieren diferencias en la susceptibilidad a ToLCNDV de los cvs. estudiados.

Referencias: Juárez et al, (2014) Plant Disease, 98: 857.

Este estudio ha sido financiado por FEDER y FSE en el proyecto IFAPA AVA 201301.8 "Virus en horticultura".



P-049-01567

COMPARACIÓN DE TÉCNICAS PARA LA DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN DE UN NUEVO VIRUS EMERGENTE EN ESPAÑA: *Tomato leaf curl New Delhi virus* (ToLCNDV)Alfaro-Fernández A.¹, Hernández-Llopis D.¹, Font-San-Ambrosio M.I.¹, Sánchez-Navarro J.A.²

1) Instituto Agroforestal Mediterráneo/ Universidad Politécnica de Valencia

2) Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas/Universidad Politécnica de Valencia

En 2013 se detecta por primera vez en España el virus del rizado del tomate de Nueva Delhi (*Tomato leaf curl New Delhi virus*, ToLCNDV) en cultivos calabacín y en otras cucurbitáceas. Los síntomas causados por ToLCNDV en tomate son similares a los desarrollados por las especies virales que causan la enfermedad del rizado amarillo del tomate (*Tomato yellow leaf curl virus* -TYLCV- y *Tomato yellow leaf curl Sardinia virus* -TYLCSV-). Por otro lado, es indispensable la disponibilidad de técnicas que permitan una rápida detección e identificación del virus a gran escala y a bajo coste. En este trabajo, abordamos tanto la puesta a punto como la comparación de diferentes técnicas moleculares para la detección e identificación del ToLCNDV. Concretamente, se evaluaron tres técnicas moleculares: i) hibridación molecular mediante sonda específicas de ToLCNDV, TYLCSV y TYLCV marcadas con digoxigenina, ii) PCR con cebadores degenerados que detectan especies virales dentro del género *Begomovirus* seguidos de análisis RFLPs con dos enzimas de restricción que discriminan entre ToLCNDV y las especies presentes en España causales del rizado amarillo del tomate y iii) PCR con cebadores específicos descritos en bibliografía, que amplifican un fragmento de la CP de ToLCNDV.

Los resultados preliminares obtenidos hasta el momento indican que la detección de ToLCNDV mediante hibridación molecular, utilizando sondas marcadas con digoxigenina correspondientes a la replicasa viral o a la proteína de cubierta, permiten detectar específicamente ToLCNDV, no observándose reacción cruzada en tejido infectado con TYLCSV o TYLCV. El límite de detección de las dos sondas, obtenido con transcritos complementarios fue similar (5-1 pg/μl de RNA viral) aunque en tejido infectado se obtuvieron mejores resultados con la sonda que reconoce la replicasa viral. Finalmente, se ha comprobado que la hibridación molecular permite el análisis de extractos vegetales crudos aplicados directamente sobre la membrana de nylon, lo que permite la detección de ToLCNDV en un gran número de muestras de forma rutinaria y con un bajo coste. La PCR con cebadores degenerados permite detectar ToLCNDV en todas las muestras positivas por hibridación molecular, pero la restricción con RFLPs puede presentar problemas cuando hay sospecha de infecciones mixtas de ToLCNDV con TYLCSV y/o TYLCV. La PCR con los cebadores específicos ensayados en este trabajo detectan ToLCNDV en un menor número de muestras que con las otras técnicas ensayadas.



P-050-01449

SECUENCIA COMPLETA DEL GENOMA DE *Grapevine leafroll associated virus 9* Y ANÁLISIS CUANTITATIVO DE LAS POBLACIONES DE VIRUS-DERIVED SMALL INTERFERING RNA**Velasco L.¹, Cretazzo E.¹, Padilla C.V.², Alcalá M.J.¹, Janssen D.³**

1) IFAPA Churriana

2) IMIDA

3) IFAPA La Mojonera

Recientemente se ha propuesto que el subgrupo II del género *Ampelovirus*, familia *Closteroviridae*, consiste en un grupo de variantes que representan diferentes linajes de la especie *Grapevine leafroll-associated virus 4* (GLRaV-4). En 2011 se detectó en España un aislado de GLRaV-4 variante -9 (GLRaV-9 Man086) en una vid de la variedad Mantúa. La secuencia completa del genoma del aislado Man086 de GLRaV-9 se determinó a partir de un borrador que se obtuvo mediante el ensamblaje de una biblioteca de micro RNAs obtenidos de la planta infectada a un genoma de referencia (GLRaV-5), tras lo cual se corrigió mediante secuenciación convencional a partir de amplicones obtenidos mediante RT-PCR.

El genoma de GLRaV-9 Man086 (Acc. No. KJ810572) consiste en 13.123 nucleótidos y contiene siete marcos de lectura abierta (ORFs). Este genoma ha resultado el menor de los pertenecientes al grupo II de los ampelovirus. El extremo 5' no codificante contiene 218 nt y es seguido por el ORF1a, que codifica para la replicasa metiltransferasa/helicasa. A continuación, a través de un desplazamiento de marco de lectura +1, se encuentra el ORF1b que codifica para la ARN polimerasa dependiente de ARN. Los siguientes ORFs codificarían para la proteína P5, la proteína Hsp70h, la proteína Hsp90h, la proteína de la cápside y, finalmente, la proteína p23 seguida de un extremo 3' no codificante de 127 nt. El ORF1a de GLRaV-9 Man086 es menor en unos 200 aminoácidos que el correspondiente a los otros miembros del grupo II de los ampelovirus. Por otro lado, la clase de vsiRNAs de 21-nt específicos de GLRaV-9 Man086 mostró un claro predominio, lo que sugiere la participación preferente de DCL4 en el silenciamiento del virus. Por último, el análisis Blast de los vsiRNAs permitió la identificación adicional de los virus GRSPaV y GFLV, además de los viroides HpSVd y GYSVd-1.

* Este trabajo ha sido financiado por los proyectos AVA201301.3 y TRA201300.2 de IFAPA, cofinanciados con fondos FEDER (EU).



P-051-00825

CARACTERIZACIÓN PARCIAL DE UN AISLADO DEL VIRUS X DE LA PATATA (PVX) PROCEDENTE DEL NORTE DE ESPAÑACueto-Ginzo A.I.¹, Aparicio F.³, Achón M.A.², Pallás V.³, Arcal L.¹, Medina V.²

1) Grupo INPLAMICVEC. Departament de Producció Vegetal i Ciència Forestal, Universitat de Lleida (UdL)

2) AGROTECNIO Center, Universitat de Lleida (UdL)

3) Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas, Consejo Superior de Investigaciones Científicas-Universidad Politécnica de Valencia

Las diferentes cepas del virus X de la patata (PVX) provocan enfermedades importantes en solanáceas, ya sea en infecciones simples o asociadas con otros virus. Sin embargo, algunas son asintomáticas. En este trabajo se compara un aislado de PVX (Sp2013), recolectado de patata (*Solanum tuberosum* L.) en el Norte de España y propagado en tomate (*Lycopersicum esculentum* L.), con la cepa CP4 (a.n. AF172259.1). Las dos cepas se detectan mediante ELISA, pero a diferencia de la CP4, asintomática, las plantas inoculadas con Sp2013 presentan mosaico e hiperplasia en hojas.

A fin de establecer su filogenia y explicar su diferente sintomatología, se secuenció el gen de su proteína de cubierta (CP) y se comparó con un total de 91 secuencias de genes para CPs de PVX disponibles en las bases de datos. El árbol filogenético se obtuvo a partir de los métodos del NJ-Vecino más cercano y Máxima parsimonia. Los fenómenos de posible recombinación génica se determinaron mediante RDP4 por 8 métodos diferentes.

El árbol filogenético indica que la población de PVX, tiene una estructura homogénea, con baja variabilidad y casi nula presencia de recombinantes en el gen de la CP y que está distribuida en cuatro grupos. Uno está formado mayoritariamente por aislados europeos y los otros tres por una mezcla de subgrupos de continentes diferentes.

PVX-Sp2013 se encuentra, junto con otro aislado procedente de Almería, en el grupo más variable con aislados mayoritariamente procedentes de América y Australia, y podría ser resultante de la recombinación de parentales procedentes de Escocia ubicados en ramas diferentes.

La homología entre el gen de la CP de PVX-Sp2013 y el resto de secuencias es elevada (90-98.6%), indicando que este gen está muy conservado. No obstante, con el aislado CP4, tiene sólo un 77% lo que podría explicar la diferencia en sintomatología detectada.

* Trabajo financiado por el MICIN (proyecto número de referencia AGL2010-15691, subprograma AGR) y por el programa Udl-IMPULS



P-052-01451

PUESTA A PUNTO DE UNA POLISONDA PARA LA DETECCIÓN SIMULTÁNEA DE 13 VIRUS Y 4 VIROIDES QUE AFECTAN AL CULTIVO DEL TOMATE

Sánchez-Navarro J.A.¹, Font-San-Ambrosio M.I.², Alfaro-Fernández A.², Pallás V.¹

1) Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas (CSIC-UPV). 46022 Valencia

2) Instituto Agroforestal Mediterráneo (IAM), Universidad Politécnica de Valencia (UPV). 46022 Valencia

El tomate (*Solanum lycopersicum*) es uno de los cultivos más importantes en la zona mediterránea, con una producción mundial que alcanzó 145,75 millones de toneladas métricas en 2010 (FAO, 2012). Entre los principales patógenos virales y/o viroidales que afectan al tomate encontramos: *Tomato spotted wilt virus* (TSWV), *Tomato mosaic virus* (ToMV), *Pepino mosaic virus* (PepMV), *Cucumber mosaic virus* (CMV), *Potato Y virus* (PVY), *Parietaria mottle virus* (PMoV), *Alfalfa mosaic virus* (AMV), *Tobacco etch virus* (TEV), *Tomato torrado virus* (ToTV), *Tomato chlorosis virus* (ToCV), *Tomato infectious chlorosis virus* (TICV), *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV), *Eggplant mottled dwarf virus* (EMDV), *Citrus exocortis viroid* (CEVd), *Tomato planta macho viroid* (TPMVd), *Tomato apical stunt viroid* (TASVd) y *Potato spindle tuber viroid* (PSTVd).

Trabajos previos realizados en nuestro laboratorio pusieron de manifiesto la aplicabilidad de la hibridación molecular no radioactiva y el uso de una única sonda o 'polisonda' que contiene, fusionadas en tandem, las diferentes secuencias virales y/o viroidales, para la detección rutinaria de seis virus de tomate (TSWV, ToMV, PepMV, CMV, PVY y PMoV; Aparicio et al., 2009; Eur. J. Plant Pathol. 123:117-123). En el presente trabajo hemos desarrollado tres polisondas con capacidad para detectar simultáneamente 4 viroides (Poli4: CEVd, TPMVd, TASVd y PSTVd), 13 virus (Poli13: TSWV, ToMV, PepMV, CMV, PVY, PMoV, AMV, TEV, ToTV, ToCV, TICV, TYLCV y EMDV) o todos los virus y viroides (poli17). El límite de detección de las polisondas (5-1 pg/μl de RNA viral/viroidal) fue similar para todos los patógenos y comparable al obtenido con las correspondientes sondas individuales. Para evaluar la reproducibilidad de la tecnología de polisondas en el análisis rutinario de muestras de tomate se procedió a realizar un ensayo tipo 'ring-test' entre 8 laboratorios de toda España (Almería, Badajoz, Barcelona, Huelva, Tenerife, y Valencia). El análisis puso de manifiesto un índice Kappa que osciló entre 0,78-1, indicando una alta reproducibilidad. Finalmente se analizó la capacidad de detectar la presencia de semillas infectadas con PepMV o ToTV en pool de semillas sanas. Los resultados obtenidos pusieron de manifiesto que tanto las sondas individuales como las polisondas (poli13 y poli17) permitieron la detección de hasta 1 semilla infectada en pool de 250 sanas.



P-053-01165

DNA BARCODING AS IDENTIFICATION TOOL FOR EU REGULATED PLANT PESTS AND INVASIVE PLANTS: THE PREPARATION AND VALIDATION OF AN EPPO STANDARD

Van de Vossenbergh B.¹, Hodgetts J.², Maes M.³, Grausgruber-Groeger S.⁴, Kopina M.⁵, Poliakoff F.⁶, Cubero J.⁷, Dreo T.⁸, Riedel M.⁹

- 1) NPPO-NL (The Netherlands)
- 2) FERA, (United Kingdom)
- 3) ILVO, (Belgium)
- 4) AGES, (Austria)
- 5) FGBU VNIIR (Russian Federation)
- 6) ANSES (France)
- 7) INIA (Spain)
- 8) NIB (Slovenia)
- 9) LELF (Germany)

The EUPHRESKO DNA barcoding project aims to collect, harmonise and validate DNA barcode protocols for the identification of EU regulated arthropods, bacteria, fungi, invasive plants, nematodes and phytoplasmas. DNA barcoding is a generic diagnostic method that uses a short standardised genetic marker in an organism's DNA to aid species identification. In case of plant pests and invasive plants one or multiple loci are used for identification. DNA barcoding protocols for arthropods, bacteria, fungi, nematodes and phytoplasmas were developed within the Quarantine organisms Barcoding Of Life (QBOL) project financed by 7th framework program of the European Union. After the finalisation of the QBOL project, DNA barcoding protocols were made available through the regulated plant pest and invasive plants database Q-bank (www.q-bank.eu). New protocols for bacteria, invasive plants and fungi were added to Q-bank. Within the EUPHRESKO DNA barcoding project, a diagnostic European and Mediterranean Plant Protection Organization (EPPO) standard with the available DNA barcoding protocols will be prepared. DNA barcoding protocols will be optimised and harmonised to make them more user-friendly. Apart from test specific information, guidelines for consensus sequence preparation and output interpretation of database searching will be provided. The usability of the EPPO standard will be determined through an international interlaboratory test performance study (TPS). Diagnostic sensitivity, repeatability and robustness will be determined to demonstrate if the EPPO standard is fit for purpose.

This project is supported by Euphresco Phytosanitary ERA-NET

Resúmenes de pósteres

*Interacción planta-microorganismo
(P-054 a P-100)*





P-054-01236

FORMACIÓN DE BIOFILMS EN *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni***Sabuquillo P.¹, Ferragud E.¹, Cubero J.¹**

1) Laboratorio de Bacteriología. Departamento de Protección Vegetal, Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA), Madrid.

Xanthomonas arboricola pv. *pruni* (*Xap*) es una bacteria de cuarentena que causa la mancha bacteriana de los frutales de hueso y el almendro. La importancia de la enfermedad se debe a que los frutos con síntomas pierden valor comercial. Además la bacteria puede ser causante de severas defoliaciones que debilitan los árboles y disminuyen su productividad. *Xap* ha sido detectada en la última década en ocho provincias españolas. La relevancia que tiene la mancha bacteriana para nuestro país es evidente puesto que España es el tercer productor de melocotones y nectarinas y el segundo de almendras a nivel mundial.

En este trabajo se ha determinado que *Xap* forma comunidades multicelulares, biofilms o biopelículas, que tienen como objetivo facilitar la supervivencia de la bacteria. Para ello, se han realizado estudios de formación de agregados tanto en superficies abióticas como bióticas (hojas y frutos) y en un entorno con nutrientes a alta y baja concentración. Además se ha estudiado la formación de biofilms en presencia de apoplasto procedente de diferentes especies de *Prunus*. Las técnicas utilizadas en el estudio han sido: tinción en placas multipocillo y microscopía electrónica o confocal. Los estudios realizados demuestran la diferente agregación de la bacteria dependiendo de las condiciones que la rodean así como se ha evidenciado la presencia de estructuras fibrosas que conforman la estructura basal del biofilm.

La transición de células planctónicas a biofilms ocurre en respuesta a cambios medioambientales y supone cambios en la expresión de genes que median procesos de motilidad, adhesión, virulencia, etc. Los estudios sobre niveles de transcripción de genes de *Xap* involucrados en estos procesos confirman este hecho.

Este trabajo ha sido financiado por fondos del Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA), proyecto RTA2011-00140-C03-02.



P-055-01456

ANÁLISIS FUNCIONAL DE EFECTORES DEL SISTEMA DE SECRECIÓN TIPO III DE LAS FAMILIAS HopAO y HopAF EN *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* NCPPB 3335Castañeda-Ojeda M.P.¹, López-Solanilla E.², Ramos C.¹

1) Instituto de Hortofruticultura Subtropical y Mediterránea "La Mayora"

2) Centro de Biotecnología y Genómica de Plantas (CBGP)

Pseudomonas savastanoi pv. *savastanoi* (Psv) es el agente causal de la tuberculosis del olivo. El análisis bioinformático del borrador de la secuencia de nucleótidos del genoma de Psv NCPPB 3335 identificó 33 posibles efectores (T3E) del sistema de secreción tipo III (T3SS). Ensayos de translocación llevados a cabo con 12 de ellos revelaron que 7 se translocan a través del T3SS de Psv. La secuenciación de los tres plásmidos de esta cepa reveló que los genes codificantes de dos de ellos, HopAF1 y HopAO1, se localizan en los plásmidos pPsv48A y pPsv48B, respectivamente, codificándose en el cromosoma un homólogo de HopAF1 (HopAF1-2). Análisis posteriores revelaron que el cromosoma de Psv NCPPB 3335 también codifica un T3E (HopAO2) que contiene un dominio enzimático tirosina fosfatasa (PTP), similar al que posee HopAO1. Los 4 T3E pertenecientes a estas dos familias se translocan a través del T3SS de Psv NCPPB 3335, y su transcripción es dependiente del factor sigma alternativo HrpL. Aunque los síntomas inducidos por un mutante $\Delta hopAF1$ en plantas de olivo son similares a los producidos por la cepa silvestre, la pérdida de función de HopAO1 (mutante $\Delta hopAO1$) tiene un efecto negativo sobre el tamaño tumoral. Además, los tumores inducidos por $\Delta hopAO1$ muestran una necrosis temprana del tejido vegetal. La expresión heteróloga de 3 de estos 4 T3E, excepto HopAF1, tiene como consecuencia la supresión de la respuesta de defensa primaria en *Nicotiana tabacum*, que implica una reducción de la deposición de calosa y de la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS). Así mismo, estos 3 T3E interfieren con las respuestas de defensa asociadas con la muerte celular programada. Actualmente, estamos analizando la localización subcelular de estos 4 T3E.

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



P-056-01572

EVALUACIÓN DEL PAPEL DE LOS SISTEMAS TOXINA-ANTITOXINA DEL PLÁSMIDO pPsv48C DE *Pseudomonas syringae* pv. *savastanoi* EN MANTENIMIENTOAñorga M.¹, Bardaji L.¹, Murillo J.¹,

1) Laboratorio de Patología Vegetal, E.T.S. Ingenieros Agrónomos, Universidad Pública de Navarra. 31006 Pamplona. E-mail: jesus.murillo@unavarra.es

Pseudomonas syringae pv. *savastanoi* NCPPB 3335 (Psv48), gammaproteobacteria causante de la tuberculosis del olivo, es un modelo para el estudio de la patogénesis de *P. syringae* en leñosas. La secuencia del genoma y de sus tres plásmidos nativos permitió identificar factores de virulencia cromosómicos y plasmídicos de Psv48. Cepas derivadas de Psv48 y curadas de pPsv48A (73 kb) o curadas de pPsv48A y pPsv48B (45 kb), son capaces de producir enfermedad en olivo *in vitro* pero generan tumores notablemente atenuados en tamaño. La obtención de derivados de Psv48 con diversas combinaciones de los plásmidos nativos, o curados de los tres plásmidos, permitiría discriminar el papel de cada uno de ellos en virulencia. Sin embargo, no nos ha sido posible curar pPsv48C, probablemente debido a que estos plásmidos poseen genes que contribuyen a su mantenimiento estable. Hemos identificado tres sistemas toxina-antitoxina de pPsv48A y otros tres de pPsv48C que funcionan como sistemas de mantenimiento en un sistema plasmídico artificial. Queremos saber cuál es el papel cuantitativo de cada uno de estos sistemas *in vivo*, así como inactivarlos para poder obtener derivados de Psv48 que carezcan de los tres plásmidos. La cepa UPN827 es una cepa derivada de Psv48 libre de pPsv48A y pPsv48B y que contiene pPsv48C:Tn5GDYN1, que confiere resistencia a kanamicina y sensibilidad a sacarosa. Con el fin de curar pPsv48C, las tres antitoxinas de este plásmido se clonaron en pRK415 (Tc^R), expresadas constitutivamente debido a *Plac*, y se transfirieron a UPN827, seleccionando en medios con sacarosa. La frecuencia de aparición de clones suc^R fue significativamente mayor cuando UPN827 contenía la construcción con las tres antitoxinas ($3,8 \pm 0,3 \times 10^{-3}$) que en UPN827 con pRK415 ($7,7 \pm 4,4 \times 10^{-5}$). Todos los clones analizados seguían manteniendo pPsv48C y con un número de copia aparentemente más elevado, pero habían perdido Tn5GDYN1 debido a la delección de un fragmento de 8315 nt, probablemente por recombinación entre dos copias de MITEPsy2 (228 nt). El fragmento delecionado contiene uno de los tres sistemas toxina-antitoxina, que probablemente funciona *in vivo* evitando esta delección. Actualmente estamos cuantificando las variaciones del número de copia de pPsv48C y su influencia en el ciclo de vida de la bacteria.



P-057-01308

EL ÁCIDO HEXANOICO, INDUCTOR DE RESISTENCIA EN PLANTAS, MODULA LA RESPUESTA DE *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 EN TOMATE

Scalschi L.¹, Camañes G.¹, Llorens E.¹, Fernandez-Crespo E.¹, Lapeña L.¹, López M.M.², García P.¹, Vicedo B.¹

1) Universitat Jaume I

2) Institut Valencià d'investigacions Agràries (IVIA)

La eficacia del ácido hexanoico (Hx) como inductor de resistencia en plantas de tomate frente a *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 (*Pst*DC3000) ha sido demostrada y caracterizada previamente por nuestro grupo (1), sin embargo no se conoce su efecto sobre la bacteria. El objetivo del trabajo ha sido determinar cómo afectan los cambios causados por el inductor en el sistema de defensa de la planta frente al comportamiento del patógeno.

Para llevar a cabo este estudio, se trataron con Hx 0,6mM plantas de tomate de cuatro semanas, inoculándose 72h después con la bacteria (1). Para el análisis de la expresión génica bacteriana, se extrajo el ARN bacteriano de las hojas infectadas (2) y se analizó el cDNA por RT-qPCR usando cebadores específicos. El análisis del efecto del tratamiento a largo plazo (30 días) se realizó en las mismas condiciones descritas anteriormente.

La eficacia del tratamiento se confirmó por la reducción tanto de los síntomas de la enfermedad como del número de UFC del patógeno en las plantas tratadas. Además, se observó que la expresión de genes bacterianos relacionados con establecimiento del quorum sensing y la patogénesis fue significativamente menor o más tardía en las bacterias de las plantas tratadas. El estudio del comportamiento de *Pst*DC3000 a largo plazo mostró la imposibilidad de la bacteria de superar la resistencia inducida en tomate, ya que no aumentaron los síntomas y disminuyeron notablemente las poblaciones bacterianas en plantas tratadas.

Los resultados demuestran que la activación de las defensas en plantas coincide con una respuesta del patógeno, basada en la inactivación o un retraso en la expresión de los genes relacionados con la virulencia, que conduce al menor desarrollo de síntomas así como a la disminución de la capacidad de las bacterias para multiplicarse, lo cual puede poner en peligro su supervivencia a largo plazo, resultado que abre una puerta al control bacteriano.

(1) Scalschi L et al (2013) Mol. Plant Pathol, 14 (4), 342-355.

(2) Yu, X et al. (2013) Proc. Natl. Acad. Scienc. EE.UU. 110, 425-434.

* Este trabajo está subencionado por el "Projecte d' Investigació i Desenvolupament Científica Tecnològic del Pla de promoció de la investigació de la Universitat Jaume I (P1 • 1B2013 -75)"



P-058-01558

ANÁLISIS DEL SOLAPAMIENTO FUNCIONAL ENTRE LA RESPUESTA DE LA PLANTA FRENTE A EFECTORES SECRETADOS POR *Pseudomonas syringae* Y EL SILENCIAMIENTO GÉNICOZumaquero A.¹, López D.¹, Rodríguez E.¹, Beuzón C.R.¹, Bejarano E.R.¹

1) Instituto de Hortofruticultura Subtropical y Mediterránea-Universidad de Málaga-Consejo Superior de Investigaciones Científicas (IHSM-UMA-CSIC)

Las plantas están continuamente sometidas a infecciones por diferentes patógenos. Los patógenos bacterianos usan un complejo sistema de secreción para translocar proteínas efectoras al interior del huésped y suprimir así las respuestas de defensas.

En los últimos años, se ha demostrado la participación de ciertos microRNAs en respuestas de defensas de la planta frente a patógenos bacterianos, así como la actuación de efectores bacterianos en rutas reguladas por miRNAs.

Sin embargo poco se sabe acerca de cómo la regulación por microRNAs afecta a las respuestas de defensas de la planta frente a patógenos bacterianos, y de hecho menos es conocido sobre el impacto de la supresión de defensas mediada por efectores sobre las rutas reguladas por microRNAs. En este estudio, hemos realizado comparaciones entre análisis de microarrays, con el objetivo de identificar genes expresados diferencialmente (DEGs) en *Arabidopsis*, comunes entre la respuesta de defensa frente a efectores de *Pseudomonas syringae* y mutantes afectados en la biogénesis de miRNAs.

El análisis de la anotación funcional de los DEGs comunes identificados, seguidos de un análisis de expresión mediante RT-*q*PCR nos ha servido para identificar procesos biológicos regulados por rutas de miRNAs en la interacción planta-patógeno.



P-059-01551

DIVERSIDAD DE INTERACCIONES EN POBLACIONES HETEROGÉNEAS DE *Pseudomonas syringae* DENTRO DEL TEJIDO VEGETAL**Rufián J.S.¹, Macho A.P.², Corry D.³, Mansfield J.W.⁴, Arnold D.L.³, Beuzón C.R.¹**

1) Instituto de Hortofruticultura Subtropical y Mediterránea, Universidad de Málaga, Consejo Superior de Investigaciones Científicas (IHSM-UMA-CSIC)

2) The Sainsbury Laboratory

3) The University of the West of England

4) Imperial College London

Las poblaciones bacterianas han sido consideradas durante mucho tiempo clonales, y como tales, genética y fenotípicamente idénticas. Sin embargo, trabajos realizados durante las últimas décadas han demostrado que en condiciones de estrés, como las que se encuentra una bacteria fitopatógena en su hospedador, se pueden formar distintas subpoblaciones bacterianas. Estos cambios se han asociado en bacterias patógenas de animales a modificaciones epigenéticas que causan heterogeneidad fenotípica reversible sin alterar el genotipo (Casadesús y Low, 2013).

Otro ejemplo de cambio genético reversible que puede afectar a la virulencia bacteriana se produce en *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*, el agente causal de la grasa de la judía. Cuando esta bacteria es inoculada en cultivares resistentes de judía, se produce la escisión del cromosoma de PPHGI-1, una isla genómica en la que está codificado el efector que produce la respuesta de defensa, AvrPphB (Pitman et al, 2005). En los últimos años, se ha estudiado extensamente la interacción entre una estirpe bacteriana y la planta (Dodds y Rathjen, 2010). Sin embargo, son muy pocos los estudios que han abordado como se produce dicha interacción entre poblaciones bacterianas heterogéneas y la planta hospedadora.

En este trabajo analizamos cómo es el desarrollo de poblaciones bacterianas mixtas isogénicas. Utilizando microscopía confocal, estudiamos las bases celulares que determinan cómo interfieren estirpes de *P. syringae* con diferente capacidad de virulencia con el crecimiento de la otra cuando se encuentran en proximidad física. Además, analizamos las consecuencias de estas interferencias en el desarrollo de la enfermedad y en la activación de respuestas de defensa de la planta.



P-060-01401

INTERACCIÓN DEL PATÓGENO HUMANO *Bacillus cereus* CON PLANTAS DE INTERÉS AGRONÓMICOCaro J.¹, Pérez-García A.¹, De Vicente A.¹, Romero D.F.¹

1) Universidad de Málaga

Uno de los grandes retos de la industria agroalimentaria es reducir los continuos casos de intoxicaciones alimentarias causadas por el consumo de frutas y verduras contaminadas con patógenos de humanos, y las consecuentes pérdidas económicas. *Bacillus cereus* es una bacteria patógena de humanos responsable de intoxicaciones alimentarias que en ocasiones pueden ser letales.

El ciclo de vida de esta bacteria se caracteriza por la formación de biopelículas y la esporulación. Las biopelículas son comunidades de bacterias difíciles de erradicar, y para su formación las bacterias ensamblan una matriz extracelular formada principalmente por exopolisacáridos y proteínas. En este trabajo, nos planteamos estudiar las bases moleculares que dirigen la formación de biopelículas en *B. cereus*, y su posible implicación en la interacción con diferentes plantas hortofrutícolas. Para ello, nos hemos centrado en el análisis de los componentes estructurales de la matriz extracelular, y más concretamente en posibles adhesinas de naturaleza proteica.

B. cereus tiene dos ortólogos del gen *tasA* de *B. subtilis* que codifica para una proteína que polimeriza en la forma de fibras amiloides y es indispensable para la formación de las biopelículas. Mediante estudios de expresión heteróloga demostramos que el alelo de *tasA* de *B. cereus* rescata la formación de biopelículas de una cepa de *B. subtilis* que carece de su propio *tasA*. De la misma forma, un mutante de *B. cereus* en este alelo presenta un fenotipo defectuoso en la formación de biopelículas tanto *in vitro* como en la interacción con plantas. Finalmente estudios bioquímicos y morfológicos preliminares de esta proteína apuntan a su naturaleza tipo amiloide como su ortólogo de *B. subtilis*.



P-061-01317

RESPUESTAS CITOLÓGICAS DE DEFENSA EN VARIEDADES DE PAPA CON DIFERENTES NIVELES DE RESISTENCIA A *Phytophthora infestans*Patiño L.F.¹, Gaviria A.E.², Morales J.G.²

1) Profesor de fitopatología, Facultad de Ciencias Agrarias, Politécnico Colombiano Jaime Isaza Cadavid luisferph@gmail.com

2) Universidad Nacional de Colombia

En los Andes de Sur América el control del Tizón tardío requiere de 15 o más aplicaciones de fungicidas lo cual afecta significativamente la salud de las familias de los agricultores. En este estudio se midió la expresión de respuestas celulares de defensa en variedades de papa con resistencia contrastante a *Phytophthora infestans*. Bajo condiciones de laboratorio, se inocularon folíolos de las variedades Pastusa Suprema y Diacol-Capira, clasificadas respectivamente como altamente resistente (AR) y altamente susceptible (AS) a la enfermedad. 12, 24, 48, 72 y 96 hdi con el patógeno, se determinó el porcentaje de expresión de H_2O_2 , callosa y respuesta hipersensible (HR). La tinción de folíolos con gotas de agua se utilizó como testigo. En la variedad AR, se observó una mayor velocidad en el tiempo y porcentaje de la expresión de las respuestas de defensa hacia el ataque de *P. infestans*. En esta variedad a partir de 24 hdi, comenzaron a expresarse las respuestas, las cuales fueron restringidas a los sitios de intento de penetración del patógeno. En la variedad AS, la formación de HR y callosa se detectaron en tiempos más tardíos (48 hdi) y con una menor intensidad. La acumulación de H_2O_2 , aunque fue detectada al mismo tiempo observado para la variedad AR (24 hdi), su intensidad también fue menor. En la variedad AS, la expresión de las respuestas se observó más allá de los sitios de inoculación. Los máximos niveles de expresión ocurrieron a partir de las 72 hdi para las dos variedades. Se concluye que el nivel de resistencia de las variedades hacia el ataque por *P. infestans* está relacionado con la velocidad e intensidad en la expresión de H_2O_2 , callosa, y HR. Estos resultados poseen un uso potencial como biomarcadores en la obtención de material vegetal resistente a la enfermedad.

Palabras clave: Especies reactivas de oxígeno (ROS), peróxido de hidrógeno, respuesta hipersensible (HR), callosa.



P-062-01581

TRANSGENERATIONAL TRANSMISSION OF RESISTANCE IN *Quercus ilex* TO *Phytophthora cinnamomi*Solla A.¹, Hernández J.¹, Corcobado T.¹, Mora B.², Abad-Campos P.², Cubera E.¹

1) Ingeniería Forestal y del Medio Natural, Universidad de Extremadura, Avenida Virgen del Puerto 2, 10600 Plasencia, Spain. E-mail: asolla@unex.es

2) Instituto Agroforestal Mediterráneo, Universitat Politècnica de València, Camino de Vera s/n, 46022 Valencia, Spain. E-mail: pabadcam@eaf.upv.es

The resistance of trees to diseases is increasingly recognised as being impacted by maternal effects, given that environmental conditions experienced by parent (mother) trees affect stress tolerance in offspring. We hypothesised that environmental maternal effects may mediate the resistance of *Quercus ilex* seedlings to *Phytophthora cinnamomi*. In December 2010, acorns from 15 declining *Q. ilex* trees infected with *P. cinnamomi* and from 15 non-declining trees free of infection were collected and weighted (40 acorns per tree). Pots (0.3 l vol) containing peat and sand were used and distributed in a randomized block design (N = 1200). In September 2011 seedlings were inoculated with *P. cinnamomi*. Acorns from non-declining trees were heavier than acorns from declining trees (4.4 and 4.2 g, respectively), and germination rates and dates did not differ significantly between acorns from declining and non-declining trees. Mortality rates, however, were lower and slower in seedlings from declining-infected trees in comparison to seedlings from healthy trees. The more resistant seedlings to *P. cinnamomi* were those collected from the more declining stand. Results indicate a transgenerational induction of resistance, possibly through epigenetic mechanisms non-dependant to acorn weight.

* The study was funded by the Spanish Ministry of Science and Innovation (AGL2011-30438-C02).



P-063-00773

EVALUACIÓN DEL EFECTO DE NUEVAS CEPAS DE *Trichoderma* SOBRE TOMATE Y PIMIENTOGaleano M.¹, Moreno J.¹, Belda J.E.¹

1) KOPPERT ESPAÑA, S.L.

En un semillero comercial de la provincia de Almería, se trataron antes del trasplante, plántulas de pimiento tipo Lamuyo (cv. Buke) y tomate de ramo (cv. Razymo) con distintas cepas de *Trichoderma* spp. solas y combinadas (3 cepas distintas de *Trichoderma harzianum*, una cepa de *Trichoderma* SP, y otra de *Trichoderma atroviridae*).

En total se ensayaron 16 tratamientos en bandejas de semillero diferentes, usando las plántulas de cada bandeja como repeticiones, y haciendo uso de la dosis estándar de la cepa comercializada de 1,5 g de producto cada 100 plantas ($1,0 \times 10^9$ UFC por gramo), dosis que recibían las plántulas ya fuese mediante formulados de una sola cepa o combinación de dos de ellas.

Se evaluaron los siguientes parámetros: estado BBCH, altura, diámetro tallo, peso foliar y radicular, tanto fresco como seco.

Las plántulas de tomate del tratamiento basado en la combinación de las cepas KV452 + KV821, mostraron valores significativamente más altos en casi todos los parámetros analizados (altura, diámetro tallo, peso foliar fresco y seco, y peso radicular fresco) que el resto de los tratamientos.

Por otro lado, en el caso de las plántulas de pimiento, ha resultado ser el tratamiento basado únicamente en la cepa KV821, el que ha presentado significativamente los mayores valores de casi la totalidad de los parámetros analizados, a excepción del peso fresco radicular.

Con los datos obtenidos se puede concluir que la cepa KV821 ofrece ventajas en el semillero de plantas hortícolas frente al resto, como promotor de crecimiento y obteniendo plantas más fuertes frente a los posibles patógenos de los cultivos hortícolas en campo.

Posteriormente se evaluará en un ensayo de campo, el efecto de estas cepas de *Trichoderma* durante el desarrollo y la cosecha de los cultivos.

Los autores agradecen al semillero Laimund, S.L. (El Ejido, Almería) y al Centro Tecnológico de Tecnova por la colaboración prestada para llevar a término dichos ensayos.



P-064-01370

INDUCCIÓN DE FALSA SEÑAL DE QUÓRUM EN CAÑA DE AZÚCAR PARA EVITAR LA INFECCIÓN POR EL PATÓGENO *Sporisorium scitamineum*Sánchez E.¹, Díaz-Peña E.M.¹, Legaz M.E.¹, Vicente C.¹

1) Departamento de Biología Vegetal. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Complutense de Madrid.

La enfermedad del carbón en la caña de azúcar es producida por el hongo *Sporisorium scitamineum*. Estudios comparativos entre Mayarí cv. 5514, variedad resistente a la infección, y Barbados cv. 42231, susceptible, revelan que una de las principales defensas de la planta es la producción de un conjunto de glicoproteínas de alto y mediano peso molecular (HMMG por High-Molecular Mass Glycoproteins y MMMG por Mid-Molecular Mass Glycoproteins, respectivamente). La fracción HMMG contiene diversas proteínas que colaboran en el mecanismo defensivo de la planta. Entre ellas se encuentra una proteína o conjunto de proteínas quimioattractantes que favorecen el movimiento de las teliosporas hacia la caña, y una o varias proteínas con actividad arginasa, que, tras la quimioatracción, facilitan la aglutinación de las células fúngicas e inhiben eficazmente su germinación. Se conoce recientemente que, durante su germinación, las teliosporas producen un conjunto de proteínas muy semejante al conjunto de proteínas encontrado en la fracción HMMG. Así, la activación metabólica de las células fúngicas en sus primeras etapas invasivas conlleva la producción de una o varias proteínas con capacidad quimioattractante y citoaglutinante sobre otras esporas, con el fin de que la población vea facilitada su penetración en la planta.

La producción por parte de la caña de un conjunto de proteínas de actividad tan semejante a la encontrada en las teliosporas al comienzo de su desarrollo podría tener como fin el de crear una señal de “falso quórum” con lo que las teliosporas, sufrirían quimioatracción y citoaglutinación (como es lo natural), pero verían finalmente interrumpida su germinación por la presencia eficaz de la arginasa de la planta. El poder quimioattractante encontrado en las HMMG de Mayarí (y posiblemente todo el proceso desencadenado posteriormente) es más fuerte al encontrado en las HMMG de Barbados, lo cual debe estar relacionado con la capacidad defensiva de la variedad resistente.



P-065-01412

ALTERACIONES MORFOLÓGICAS EN LAS CÉLULAS DE *Sporisorium scitamineum* ANTE LA PRESENCIA DE CONCAVALINA A

Díaz-Peña E.M.¹, Sánchez E.¹, Legaz M.E.¹, Vicente C.¹

1) Departamento de Biología Vegetal I, Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Complutense de Madrid

La Concanavalina A (ConA) es una la lectina de *Canavalia ensiformis* de especificidad manosa-glucosa dependiente de Ca^{2+} , con capacidad citoaglutinante, también capaz de desarrollar actividad arginasa en presencia de Mn^{2+} . La ConA parece actuar como agente aglutinante y estimulador de mitosis en numerosos tipos celulares.

El patógeno *Sporisorium scitamineum* es el agente causante de la enfermedad del carbón en la caña de azúcar. Como intento de profundización en el conocimiento estructural de las células fúngicas durante su desarrollo patogénico, se analizaron los efectos producidos por la lectina sobre las teliosporas de *Sporisorium scitamineum*. La exposición de las células a diferentes concentraciones de ConA demuestra que, aunque el porcentaje de germinación no aumenta de manera significativa al incrementarse la concentración de ConA, la presencia de la lectina provoca numerosos cambios morfológicos en las células. Éstas, al comienzo de la germinación, aparecen alargadas, ramificadas, con ensanchamientos en algunos extremos e intensamente aglutinadas. Al aumentar la dosis de ConA la aglutinación se hace más evidente y la actividad mitótica, altamente estimulada, da lugar a una gran cantidad de esporidios. Todas estas alteraciones son visibles por microscopía óptica. En relación a lo encontrado a lo bibliografía, la ConA parece actuar favoreciendo las etapas del ciclo del patógeno relacionadas con la división mitótica de las células. La alta concentración de ConA parece estimular exageradamente la gemación de las esporas, pudiendo estar alterando el desarrollo normal del ciclo del patógeno.

Además, el hecho de que las teliosporas de *S. scitamineum* respondan a la ConA sugiere que éstas deben presentar, al menos en determinadas etapas de su ciclo vital, un ligando glicopeptídico susceptible de unir moléculas de estructura similar a la lectina sobre su pared celular, conteniendo este ligando, presumiblemente, restos glucosa y/o manosa. Estudios recientes demuestran que, en las primeras etapas de infección, las células de *S. scitamineum* sintetizan proteínas con actividad arginasa que podrían actuar como efectores para estos ligandos.



P-066-01380

COMPORTAMIENTO DE VARIEDADES COMERCIALES DE FRESA FRENTE A *Fusarium oxysporum* f. sp. *fragariae* Y *Fusarium solani* EN PLANTAS DE VIVEROSDe Cal A.¹, Castillo R.¹, Morales M.T.¹, Larenas J.¹, Soria C.², Martínez-Trecheño A.³, Melgarejo P.¹

1) INIA-Dpto. Protección Vegetal, Ctra. de La Coruña Km 7. Madrid.

2) CIFA Málaga, IFAPA Juna de Andalucía, Churriana, Málaga

3) Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente, Madrid

Desde la retirada del Bromuro de Metilo (BM), la incidencia de plantas enfermas con *Fusarium oxysporum* f. sp. *fragariae* y *Fusarium solani* ha aumentado significativamente, reduciéndose las de *Verticillium*, *Phytophthora cactorum* y *Fusarium* spp. han pasado a ser los hongos patógenos de suelo con mayor incidencia en viveros de fresa. 1-3 DDicloropropeno: cloropicrina (DD:PIC) y Metan Na, las dos principales alternativas utilizadas desde la retirada del BM, muestran menor reducción de la población de *Fusarium* spp. en el suelo. Desarrollar nuevas variedades de calidad y resistentes a *Fusarium* supondría un gran avance estratégico del sector de fresa en España. Con ésta finalidad, se ha caracterizado la resistencia frente a las dos especies emergentes de *Fusarium* tras la retirada del BM de 24 nuevas selecciones de fresa obtenidas en los convenios de colaboración entre INIA, IFAPA, IVIA, asociaciones y empresas del sector, y 4 variedades comerciales.

Para ello se realizaron al menos 2 ensayos en cámara de cultivo (22°C, 80% humedad, 16 horas fotoperiodo) para cada selección y variedad, en los cuales se evaluaba la resistencia de las plantas frente a *Fusarium oxysporum* f.sp. *fragariae* y *Fusarium solani* y se comparaba con otras variedades comerciales como 'Camarosa', 'Elsanta', 'Candonga' o 'Ventana'. En los ensayos de resistencia las plantas se mantenían en solución nutritiva durante 30-45 días después de la inoculación con una suspensión de microconidias del patógeno (10⁷ microconidias/ml). Se evaluaba la gravedad de la enfermedad a lo largo del ensayo.

Las nuevas selecciones 2684, 3090-4, 3117-1 y 3118-1 junto a las variedades comerciales 'Candonga' y 'Ventana' son significativamente menos susceptibles *Fusarium* que las variedades 'Camarosa' o 'Elsanta'.

El trabajo ha sido financiado por el Convenio INIA CC10-009-C02-01



P-067-1605

ENZYME SECRETION OF SOME PATHOGENIC ISOLATES OF *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis*, CAUSAL AGENT OF FUSARIUM WILT OF DATE PALM IN NORTH AFRICA**Sahouli, S.¹, Sánchez, J.^{2,3}, Gallego, E.^{2,3}, Khelil, A.⁴**

¹ Dept. Biology, Faculty of Natural and Life Sciences, University Ziane Achour Djelfa, route Moudjbara, B.P. 3117, Djelfa, Algeria. E-mail: safia-nice@hotmail.com.

² Dept. Biology and Geology, University of Almeria, Ctra. Sacramento, s/n, E-04120 Almeria, Spain. E-mails: josanche@ual.es, egallego@ual.es.

³ Andalusian Centre for the Assessment and Monitoring of Global Change (CAESCG), University of Almeria, Ctra. Sacramento, s/n, E-04120 Almeria, Spain. E-mails: josanche@ual.es, egallego@ual.es.

⁴ Ecosystem in Arid and Semi-arid Protection Laboratory, University Kasdi Merbah, Ouargla, Algeria.

Fusarium wilt is the most serious disease of date palm in North Africa. It is caused by a soil-borne fungus, *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis*. Several phytopathogenic microorganisms secrete active toxins and hydrolytic enzymes against the tissue structures of the host plant. They are mainly cellulases and pectinases, whose role in fungal disease has been discussed. Studies have shown that these hydrolases are capable of degrading in vitro cellulosic and pectic compounds. In this study, we compared both cellulase and pectinase enzymes activities from four isolates of *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis* that have already shown an aggressiveness on date palm seedlings in inoculation tests. An isolates culture in a liquid medium to give a filtrate was performed. The determination of cellulolytic and pectinolytic activities were performed according to the technique described by Miller. This technique quantifies the reducing sugars released in the reaction medium. Enzyme assays revealed in these filtrates a significant cellulolytic and pectinolytic activities for strain 15, whereas the strain 52 has a significant pectinase activity. Nevertheless, the strain 13 shows a high cellulase activity compared to others.



P-068-01603

MONITORING EVOLUTION OVER TIME IN THE FUSARIUM WILT OF DATE PALM (*Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis*) ON VARIOUS VARIETIES FROM ARID ZONES IN ALGERIA AND SPAIN**Sahouli, S.¹, Sánchez, J.^{2,3}, Gallego, E.^{2,3}**

¹ Dept. Biology, Faculty of Natural and Life Sciences, University Ziane Achour Djelfa, route Moudjbara, B.P. 3117, Djelfa, Algeria. E-mail: safia-nice@hotmail.com.

² Dept. Biology and Geology, University of Almeria, Ctra. Sacramento, s/n, E-04120 Almeria, Spain. E-mails: josanche@ual.es, egallego@ual.es.

³ Andalusian Centre for the Assessment and Monitoring of Global Change (CAESCG), University of Almeria, Ctra. Sacramento, s/n, E-04120 Almeria, Spain. E-mails: josanche@ual.es, egallego@ual.es.

Fusarium wilt is the most serious disease of date palm in North Africa. It is caused by a soil-borne fungus, *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis*. The objective of this work is to monitor the disease over time. An experiment was conducted to study the effect of inoculation of spore suspension of two isolates of *F. oxysporum* f. sp. *albedinis* on three well known Algerian varieties (DN TAN, TIM) and a Spanish variety Elche (VE) at two stages of young seedlings. At first, the results indicate that the most sensitive variety is the variety DN whatever the strain tested. In addition, TIM and TAN varieties have a difference of sensitivity with respect to the strain used. However, the variety (VE) has a very low sensitivity. Moreover, the second observation, two-leaf stage, shows that the variety TIM is the most susceptible variety, comes after the DN range, and the other two varieties (TAN, VE) have a tolerance of the disease.



P-069-01604

TOLERANCE TO FUSARIUM WILT OF DATE PALM (*Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis*) IN A LOCAL VARIETY FROM ARID ZONES IN SOUTHEASTERN SPAIN**Sahouli, S.¹, Sánchez, J.^{2,3}, Gallego, E.^{2,3}**

¹ Dept. Biology, Faculty of Natural and Life Sciences, University Ziane Achour Djelfa, route Moudjbara, B.P. 3117, Djelfa, Algeria. E-mail: safia-nice@hotmail.com.

² Dept. Biology and Geology, University of Almeria, Ctra. Sacramento, s/n, E-04120 Almeria, Spain. E-mails: josanche@ual.es, egallego@ual.es.

³ Andalusian Centre for the Assessment and Monitoring of Global Change (CAESCG), University of Almeria, Ctra. Sacramento, s/n, E-04120 Almeria, Spain. E-mails: josanche@ual.es, egallego@ual.es.

Fusarium wilt (Bayoud disease) is the most serious disease of date palm in North Africa. It is caused by a soil-borne fungus, *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis*. For instance, this disease is not known in date palms in Spain. A Spanish local date palm variety from Elche (Alicante, Southeastern Spain) was tested to know its resistance profile. An experiment was conducted to study the effect of inoculation of spore suspension of two Algerian isolates of *F. oxysporum* f. sp. *albedinis* to a local Spanish variety from Elche (Alicante, SE Spain) (VE) at two stages of young seedlings. This variety have a local human and animal consum. At first, the results indicate that the variety VE has a very low sensitivity. Moreover, the second observation, two-leaf stage, shows that the variety VE shows tolerance to this disease. Then, Fusarium wilt symptoms in Spanish date palms could be present and would be confussed with others abiotic factors.



P-070-01557

ANÁLISIS TRANSCRIPTÓMICO DE LA INTERACCIÓN PLANTA-PATÓGENO DURANTE LA INFECCIÓN POR *Verticillium dahliae* DE RAÍCES DE OLIVO CULTIVADO (*Olea europaea* L. var. Picual)

Jiménez-Ruiz J.¹, Leyva-Pérez M.O.¹, Schilirò E.², Barroso J.B.¹, Mercado-Blanco J.², Bombarely A.³, Mueller L.³, Luque F.¹

1) Departamento de Biología Experimental, Universidad de Jaén

2) Departamento de Protección de Cultivos del IAS-CSIC-Córdoba

3) Boyce Thompson Institute for Plant Research, Tower Road, Ithaca USA, NY, 14853-1801, USA

El olivar andaluz y de otras zonas de la cuenca mediterránea sufre anualmente la pérdida de un número considerable de árboles debido a enfermedades producidas por patógenos del suelo, entre los que destaca el hongo *Verticillium dahliae*.

Comprender los mecanismos implicados en la interacción planta-patógeno, sobre todo en las raíces, punto de entrada del mismo, resulta de gran interés y por ello hemos analizado la expresión génica en ambos organismos durante su interacción.

Para ello, se ha realizado un estudio transcriptómico mediante RNAseq usando la plataforma Illumina Hiseq1000, donde hemos obtenido 445 millones de lecturas pareadas de muestras sometidas a la infección por *V. dahliae* a diferentes tiempos tras la infección (0 y 48 horas, 7 y 15 días) y de sus respectivos controles. Estas se añadieron a otras secuencias hasta hacer un total de 792 millones de lecturas y se realizó la optimización del ensamblaje del transcriptoma, que se llevó a cabo comparando el resultado de los programas de ensamblaje SOAPdenovo-Trans, ABySS y Trinity. Una vez seleccionado el de mayor calidad, se ha obtenido una anotación parcial del mismo y se ha realizado la separación de las secuencias de transcritos del olivo y del hongo, para finalmente realizar el análisis durante la interacción planta-patógeno. El análisis transcriptómico dio como resultado un total de 6.747 unigenes diferencialmente expresados; 2.360 en *O. europaea*, que se agruparon según sus perfiles de expresión, pudiendo diferenciar entre unigenes sobre-expresados de forma temprana (27) y tardía (1.131 y 1.096), además de unigenes reprimidos (133); mientras que en *V. dahliae* se han seleccionado 4.387, agrupándose también en una respuesta temprana (183), tardía (302) y una expresión sostenida (3.902).

El estudio de la anotación funcional de los grupos genes permitirá una mejor comprensión de la interacción planta-patógeno que ocurre durante la infección.



P-071-01489

REGULATORS OF INFECTION IN THE SOILBORNE PATHOGEN *Verticillium dahliae***Sarmiento-Villamil J.L.¹, García-Pedrajas M.D.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, Spain

Verticillium dahliae, the causal agent of Verticillium wilt, has a worldwide distribution and a plethora of hosts of agronomic value. Morphological changes are critical aspects in the disease cycle of many fungal pathogens. *V. dahliae* is a systemic pathogen that survives in the soil in the form of melanized resistant structures, the microsclerotia. Germination of microsclerotia produces hyphae that penetrate the root cortex and reach the vascular vessels, where the fungus proliferates and eventually disease symptoms are developed. We are using T-DNA random insertional mutagenesis to analyze the molecular mechanisms controlling morphogenesis, and its role in virulence, in *V. dahliae*. One of the random mutants generated, D-10-8f, exhibited aberrant conidiophores and a dramatic reduction in the pigmentation of colonies which indicated alterations in microsclerotium development. Pathogenicity assays in *Nicotiana benthamiana* revealed that D-10-8f was also affected in pathogenic development; the temporal expression of symptoms and disease severity were greatly reduced. Additional evidence of the alterations of D-10-8f in pathogenic growth was obtained by performing an *in vitro* penetration assay on cellophane paper. In this conditions *V. dahliae* formed numerous short branches with swollen tips, which resembled the rudimentary appressoria observed on root surfaces. The mutant did not form these structures, and by contrast grew producing long straight filaments. To identify the gene(s) whose mutation gave rise to the observed phenotypic alterations, the DNA sequences flanking T-DNA insertion(s) were amplified, through an inverse PCR approach, and sequenced. In this way it was determined that in D-10-8f two genes, VDAg_09546, which codes for a putative kinase, and VDAg_01263, similar to beta-glucosidase genes, presented T-DNA insertions. We are currently using this mutant as a tool to analyze global gene expression patterns in *V. dahliae* associated to the formation of infection structures and the penetration process.

This work was funded by the Spanish Ministry of Science and Innovation (Grant AGL2009-13445). J.L. Sarmiento-Villamil was recipient of a F.P.I. fellowship (BES-2010-033084).



P-072-01338

TOXINAS DE *Rosellinia necatrix* ASOCIADAS A LA PODREDUMBRE BLANCA DEL AGUACATEArjona-Girona M.I.¹, Ariza-Fernández T.¹, López C.J.¹¹) Instituto de Agricultura Sostenible, CSIC

El objetivo de este trabajo fue determinar si *R. necatrix* es un hongo vascular en plantas de aguacate, o por el contrario son las toxinas generadas por el hongo las que se traslocan por la planta y son las responsables de la aparición de síntomas de la enfermedad.

Para estudiar la posible migración del micelio de *R. necatrix* desde las raíces a la parte aérea de la planta, se realizaron cortes transversales del tallo de plantas de aguacate inoculadas con 70 diferentes aislados virulentos de *R. necatrix*. Adicionalmente, se inocularon plantas de aguacate con el aislado patogénico Rn400 y se realizaron PCRs de las hojas para evaluar si existía amplificación con primers específicos para el patógeno.

Para el efecto de las toxinas, se extrajeron dos toxinas (Citocalasina E y Rosnecatrone) generadas por seis aislados de *R. necatrix*, que fueron inoculadas en plantas de aguacate por inmersión de hojas (con peciolo cortado) y de raíces de planta en soluciones de toxinas, midiendo el daño en hojas visualmente e indirectamente sobre el proceso de fotosíntesis a través del aumento de emisión de fluorescencia a 680 nm.

Los resultados pusieron de manifiesto la ausencia de *R. necatrix* en la parte aérea de la planta (tallo y hojas) y que las plantas inoculadas con toxinas mostraron progresión de la enfermedad a las 24 (marchitez) y 48 horas (comienzo necrosis), así como menor eficiencia fotosintética.

Se puede concluir que el micelio de *R. necatrix* no se trasloca a través de la planta desde las raíces a la parte aérea, indicando que no es un hongo vascular, en cambio los síntomas observados en esta parte están relacionados con la migración de toxinas que ejercen un efecto negativo sobre el proceso de fotosíntesis.

* Este trabajo ha sido financiado por fondos CICE-Junta de Andalucía, ayudas Grupo PAIDI AGR-235 e Incentivos al Plan Nacional I+D+I del Ministerio de Ciencia e Innovación (AGL 2011-030354-CO2-02), cofinanciado con fondos FEDER (EU).



P-073-01378

SUSCEPTIBILIDAD DE LAS HERIDAS DE PODA DE LA VID A LA INFECCIÓN POR CONIDIOS DE *Diplodia seriata* Y *Phaeomoniella chlamydospora*

Elena G.¹, Luque J.¹

1) IRTA

En el viñedo, la dispersión de las enfermedades de la madera de la vid depende habitualmente de la infección de los cortes de poda por esporas aerovagantes de los patógenos. El objetivo de este estudio fue el de evaluar el periodo durante el cual las heridas de poda permanecen susceptibles a la infección de los hongos *Diplodia seriata* y *Phaeomoniella chlamydospora*. Para ello, en un viñedo de 'Tempranillo' de la zona del Penedès (Barcelona) se efectuó una poda temprana, a principios de Noviembre y otra tardía, a principios de Febrero. En ambos casos, los cortes de poda se inocularon artificialmente con una suspensión de conidios de cada uno de los patógenos, por separado, en distintos periodos posteriores a la poda (1 día, 1 semana, y después de 2, 4, 8 y 12 semanas). Para el tratamiento control, los sarmientos podados se trataron con agua destilada estéril. A los cuatro meses de cada inoculación se reaclaron los hongos de los sarmientos y se determinó el porcentaje de infección correspondiente a cada período y hongo.

El porcentaje de reaclaramiento de *D. seriata* cayó por debajo del 35% con posterioridad a las 2 semanas de la poda temprana, mientras que una disminución comparable en la poda de Febrero no se observó hasta pasadas las 8 semanas. *Phaeomoniella chlamydospora* tuvo un comportamiento similar; el porcentaje de reaclaramiento disminuyó drásticamente después de 4 semanas de la poda temprana, mientras que la susceptibilidad en poda tardía tan sólo cayó por debajo del 25% una vez pasadas las 8 semanas. Los resultados obtenidos parecen indicar que las heridas de poda permanecen menos tiempo susceptibles a la infección por estos patógenos cuando se realiza una poda temprana, sugiriendo con ello que adelantar la poda a otoño permitiría reducir el riesgo de infección patógena en comparación con una poda tardía.

* Financiado por INIA (Proyecto RTA2010-00009-C03) y fondos FEDER (UE). Georgina Elena recibe financiación de INIA para la realización de su tesis doctoral.



P-074-01546

ESTUDIO DEL EFECTO DE FITOHORMONAS EN SEMILLAS Y PLANTAS DE TOMATE INOCULADAS CON *Botrytis cinerea* SOBRE LA RESPUESTA DE DEFENSA

Aguado A.¹, Fernández de Ayala M.A.¹, Reyes P.², Martín R.², Fernández E.², De Los Santos-García B.¹, Romero F.¹, Álvarez R.²

1) IFAPA

2) Universidad de Sevilla, Facultad de Biología

En la actualidad existen numerosos estudios sobre interacciones entre el ácido salicílico (SA) y el ácido jasmónico (JA) en la señalización de los mecanismos de defensa, pero aún falta por elucidar los componentes implicados y la forma en que estas interacciones se llevan a cabo. En este trabajo se ha estudiado el efecto del ácido salicílico (SA) y del ácido jasmónico (JA) sobre el estado de germinación de la semilla de tomate (*Solanum lycopersicum* L. var. Money Maker) y sobre la respuesta de planta inoculada con *Botrytis cinerea* e inducida en estado de semilla. Las dos fitohormonas fueron aplicadas en semillas de tomate produciendo un retraso en la germinación en tiempos cortos (72 h y 96h), JA produjo un ligero aumento en el porcentaje final de germinación, y una disminución en la longitud de la raíz primaria de la plántula (a los 7 días). A las 48 h de la imbibición de las semillas, el JA es capaz de inducir un aumento en la expresión de genes de defensas: endo- β -1,3-glucanasa y endoquitinasa (relacionadas con la germinación de las semillas) y fenilamonioliasa (PAL), mientras que el SA solo induce la expresión de la endoquitinasa a las 24 h y 48h. Se ha determinado en semillas la actividad catalasa, observándose un incremento por el tratamiento con JA y una disminución con el SA. En planta inoculadas, no se observa respuesta de defensa cuantificada como expresión de la PAL pero con el tratamiento de SA en semillas si se detectó una disminución de la cantidad de ADN de *B. cinerea* por PCR a tiempo real dentro de la planta a los 7 días de la inoculación. Sin embargo, mientras que el JA induce expresión de genes de defensas en semillas, no disminuye la cantidad de ADN de hongo en plantas inoculadas.



P-075-01516

EFECTO DE ÁCIDO SALICÍLICO Y ÁCIDO JASMÓNICO SOBRE LA RESISTENCIA A *Botrytis cinerea* Y LA LIGNIFICACIÓN EN *Zinnia elegans*

Díaz-Varela J.¹, Miranda J.¹, Veloso J.¹

1) Grupo de Investigación de Fisiología das plantas, Departamento de Biología Animal, Biología Vexetal e Ecoloxía, Facultade de Ciencias, Universidade da Coruña, Campus de A Coruña, 15071 A Coruña, Spain.

Botrytis cinerea Pers.:Fr. es un modelo de patógeno necrotrofo que ha sido utilizado para estudiar la regulación hormonal de la resistencia a patógenos en varias plantas, particularmente en *Arabidopsis*. En general se asume que la resistencia a patógenos biotrofos está regulada por salicilatos y la resistencia a necrotrofos por jasmonatos y etileno. Por otro lado, *Zinnia elegans* Jacq. es a su vez una planta modelo en el estudio de la lignificación, por presentar una única isoenzima peroxidasa en varios estados de desarrollo y órganos, codificada por el gen *ZePrx*. La lignina supone una barrera de defensa estructural de las plantas frente a los patógenos. En el presente trabajo hemos observado que tanto el ácido salicílico como el ácido jasmónico inducen resistencia a *Botrytis cinerea* en hojas de *Zinnia elegans*. Además, ambas fitohormonas inducen la actividad peroxidasa, la expresión del gen *ZePrx* y la acumulación de lignina en dichas hojas. Sin embargo, ninguna de las dos fitohormonas induce la actividad β -1,3-glucanasa ni la acumulación de fenoles solubles. Los resultados apuntan a la lignina como mecanismo de defensa inducido por salicilatos y jasmonatos.



P-076-01515

LAS HERIDAS INDUCEN UNA RESPUESTA SISTÉMICA EN PIMIENTO DIFERENTE A LA RESPUESTA LOCAL RELACIONADA CON LA RESISTENCIA A *Botrytis cinerea*

Díaz-Varela J.¹, García T.¹, Gutiérrez J.¹, Gago-Fuentes R.¹, Veloso J.¹

1) Grupo de Investigación de Fisiología das plantas, Departamento de Bioloxía Animal, Bioloxía Vexetal e Ecoloxía, Facultade de Ciencias, Universidade da Coruña, Campus de A Coruña, 15071 A Coruña, Spain.

Botrytis cinerea Pers.:Fr. es un modelo de patógeno necrotrofo que ha sido utilizado para estudiar la resistencia inducida por heridas, en particular en *Arabidopsis* y tomate. En el presente estudio hemos estudiado los procesos de respuesta a heridas en pimiento, tanto a nivel local (cotiledones) como a nivel sistémico (hojas). Las heridas causaron la generación temprana de peróxido de hidrógeno tanto a nivel local como sistémico. Sin embargo, la resistencia a *Botrytis cinerea* se incrementó a nivel local y se redujo a nivel sistémico. Esta diferente respuesta a la infección se pudo correlacionar con una diferente respuesta de los niveles de enzimas, expresión génica, lignina y fenoles solubles. La actividad peroxidasa y la expresión de *CAPO1* (una peroxidasa) aumentaron a nivel local tras las heridas, pero no a nivel sistémico. La lignina aumentó a nivel local y disminuyó a nivel sistémico, mientras que los fenoles solubles disminuyeron a nivel sistémico sin variar a nivel local. La expresión de *CABPR1* y *CASC1* (genes involucrados en defensa) también se vio alterada por las heridas de un modo diferente a nivel local y sistémico. Además, se emplearon ibuprofeno (inhibidor de síntesis de jasmonatos) y metilciclopropeno (MCP, inhibidor de percepción de etileno) para averiguar si estas hormonas participan en la respuesta a heridas. El MCP no afectó a la respuesta local ni a la sistémica, mientras que el ibuprofeno afectó solamente a la sistémica. Los resultados sugieren una regulación compleja y diferencial de la respuesta a heridas en pimiento, en la que sobresale el descubrimiento de la susceptibilidad sistémica inducida por las mismas.



P-077-01381

DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD ENZIMÁTICA DE LAS ESPECIES DE *Monilinia* spp.García-Benítez C.¹, Morales M.T.¹, Castillo R.¹, Usall J.², Melgarejo P.¹, De Cal A.¹

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

2) IRTA, Postcollita-XaRTA. Parc Científic i Tecnològic Agroalimentari de Lleida. Parc de Gardeny, edifici Fruitcentre. 25003 Lleida

La podredumbre parda es una enfermedad fúngica con importantes repercusiones económicas en la fruta de hueso. La enfermedad está causada por *Monilinia* spp. en melocotón es responsable de pérdidas tanto en pre-cosecha como en post-cosecha, donde la incidencia puede llegar a alcanzar pérdidas de un 80% en años favorables. *Monilinia* spp. es un hongo necrótrofo que 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. Muchos hongos fitopatógenos secretan enzimas hidrolíticas para degradar la pared celular de las plantas en los procesos de penetración e infección. Así *Monilinia* spp. puede causar daños a las células y tejidos del melocotón mediante la acción individual o combinada de enzimas degradativas. En este trabajo se estudia la capacidad enzimática de las tres especies de *Monilinia* patógenas del melocoton.

Con este objetivo se desarrollaron ensayos de crecimiento de distintos aislados de las tres especies del patógeno sobre diferentes sustratos para determinar la presencia de cutinasas, celulasas, pectinasas (poligalacturonasas y pectin-esterasas), xilanasas, β -glucosidasas y proteasas. Diez aislados de *Monilinia laxa*, 9 de *M. fructigena* y 10 de *M. fructicola* se situaron respectivamente, en placas Petri sólo con medio Yeast o con Yeast suplementado con 1% de cutina, metilcelulosa, callosa, ácido poligalacturónico, pectina, xilano, sacarosa o caseína hidrolizada. Todas las placas se incubaron a 25 °C durante 7 días en la oscuridad. Se evaluó el crecimiento, la densidad y la capacidad de esporulación de cada aislado en tres repeticiones de cada uno de los medios, comparándolo con el medio sin ningún sustrato añadido. Posteriormente se evaluó el efecto directo de cada una de las enzimas sintéticas sobre tres nectarinas desinfectadas superficialmente, con y sin herida; evaluándose el diámetro de la lesión producida por cada una de ellas a lo largo de 7 días de incubación en cámara de cultivo a 20-25°C durante 4 días a 98% HR con fotoperiodo de 16 horas. Todos los ensayos se repitieron dos veces.

Las tres especies producen xilanasas, poligalacturonasas, pectin-esterasas, β -glucosidasas y proteasas. Adicionalmente las enzimas purificadas pectin-esterasas y poligalacturonasas, producían una lesión en el fruto que aumentaba con el tiempo, mientras que las xilanasas purificadas no producían ninguna lesión visible.

Este trabajo ha sido financiado por el proyecto AGL2011-30472-C02-02



P-078-01425

ANÁLISIS TRANSCRIPTÓMICO DE MANZANAS EN RESPUESTA A LA INFECCIÓN POR *Penicillium expansum* (PATÓGENO COMPATIBLE) Y *Penicillium digitatum* (PATÓGENO NO-HUÉSPED)Vilanova L.¹, Wisniewski M.², Norelli J.², Viñas I.³, Torres R.¹, Usall J.¹, Droby S.⁴, Teixidó N.¹

1) IRTA, XaRTA-Postcollita, 25003, Lleida. E-mail: rosario.torres@irta.cat

2) US Department of Agriculture-Agricultural Research Service (USDA-ARS), Appalachian Fruit Research Station, 25430, Kearneysville, USA.

3) Universitat de Lleida, XaRTA-Postcollita, Agrotecnio, 25198, Lleida.

4) Department of Postharvest Science, ARO, the Volcani Center, 50250, Bet Dagan, Israel.

A pesar del uso de los fungicidas químicos, *Penicillium expansum* continua siendo uno de los patógenos responsables de importantes pérdidas económicas en todo el mundo durante el almacenaje y la poscosecha de frutos de pepita. Para mejorar el conocimiento de los mecanismos de resistencia de las manzanas, en este trabajo se llevó a cabo un análisis transcriptómico de la expresión de los genes involucrados en la respuesta a un patógeno compatible (*Penicillium expansum*) y a un patógeno no-huésped (*Penicillium digitatum*) a diferentes tiempos de infección (24 y 48 h) usando una micromatriz de 40.000 oligos. Los datos resultantes indicaron que las manzanas inoculadas con *P. expansum* exhiben una inducción significativa de los genes relacionados con la defensa y de los implicados en la detoxificación de especies reactivas al oxígeno. Por el contrario, las manzanas inoculadas con *P. digitatum*, mostraron una inducción de los genes implicados en el metabolismo de los fenilpropanoides. Utilizando los resultados de la micromatriz, se evaluó a diferentes tiempos la expresión de cuatro genes implicados en la ruta de los fenilpropanoides: *PAL1*, *PAL2*, *COMT2* y *POX64*. El mayor nivel de expresión de estos genes se detectó 48 h después de la inoculación con *P. expansum*, tanto en manzanas inmaduras como en manzanas de madurez comercial. Por lo que sabemos hasta ahora, este es el primer estudio de manzanas en el que se han mostrado los cambios globales en la expresión de los genes en respuesta a dos patógenos poscosecha. Estos resultados sugieren que las manzanas se defienden de una manera distinta ante un patógeno compatible y uno no-huésped. Los resultados obtenidos en respuesta a patógenos poscosecha aumentan el conocimiento sobre los mecanismos de defensa de las manzanas y se pueden aplicar para diseñar estrategias más eficaces de control de las enfermedades poscosecha.

* Este trabajo ha sido financiado por el proyecto AGL2008-04828-C03-01/AGR y por el INIA (Beca pre-doctoral L. Vilanova).



P-079-01424

CARACTERIZACIÓN DE *Pest12* (FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN) DE *Penicillium expansum* DURANTE LA INFECCIÓN DE FRUTOS DE MANZANA

Sánchez-Torres P.¹, Vilanova L.³, Torres R.³, Teixidó N.³, Viñas I.⁴, Ballester A.R.², González-Candelas L.²

- 1) Departamento de Protección Vegetal y Biotecnología, Instituto Valenciano de Investigaciones Agraria (IVIA), 46113 Moncada, Valencia.
- 2) Departamento. Ciencia de los Alimentos Instituto de Agroquímica y Tecnología de los Alimentos (IATA-CSIC). Av. Agustín Escardino 7, 46980-Paterna (Valencia)
- 3) IRTA, XaRTA-Postcollita. Parc Científic i Tecnològic Agroalimentari de Lleida. Parc de Gardeny, edifici Fruitcentre 25003, Lleida.
- 4) Universitat de Lleida, XaRTA-Postcollita, Agrotecnio, 25198, Lleida

Penicillium expansum es el principal agente patógeno de herida causante de podredumbre en frutos de pepita durante la post-cosecha. El conocimiento de los mecanismos de virulencia constituye un paso importante para dirigir la búsqueda de nuevos tratamientos de control. Dentro de los factores de transcripción fúngicos implicados en patogenicidad/virulencia uno de los más estudiados es *Ste12*, por su papel primordial en la virulencia del patógeno.

Se ha identificado el factor de transcripción en *P. expansum*, homólogo a *ste12* que 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 la disrupción del gen *PeSt12*. Los resultados obtenidos apuntan a la posible implicación de este gen en patogénesis/virulencia ya que los mutantes nulos analizados presentaron una leve reducción en la capacidad infectiva, afectando sobre todo a la severidad de lesión más que a la incidencia de la infección de frutos de manzana.

Los estudios de expresión de *Pest12* mediante qRT-PCR mostraron un incremento con el tiempo en la cepa parental virulenta (CMP1), un menor nivel de expresión en la cepa de menor virulencia (NRRL1) y la ausencia de expresión en los mutantes disruptos. Por otro lado, se ha llevado a cabo la caracterización de *PeSt12* analizando los niveles de expresión de diferentes genes de *P. expansum* previamente identificados tanto *in vitro* como durante la infección de frutos de manzana, con el fin de establecer los posibles mecanismos de regulación y la implicación en diversos procesos de relevancia para el patógeno.

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, la especificidad de huésped y la posible implicación en el estrés oxidativo.

*Este trabajo ha sido financiado por fondos del Ministerio de Ciencia e Innovación enmarcados en el proyecto AGL2011-30519.



P-080-01465

INCREASED ATMOSPHERIC CARBON DIOXIDE CONCENTRATION REDUCES THE SEVERITY OF *Ceratocystis* WILT, RUST AND LEAF-SPOT IN *Eucalyptus* PLANTLETSGhini R.¹, Mac Leod R.E.O.², Santos M.S.², Silva C.E.O.²

1) Embrapa 2) UNESP/FCA

The rising atmospheric carbon dioxide concentrations projected for the coming decades will result in changes in host-pathogen interactions. The objective of this study was to evaluate the effects of high air CO₂ concentration on the severity of eucalypt rust (*Puccinia psidii*), *Ceratocystis* wilt (*Ceratocystis fimbriata*) and leaf-spot (*Cylindrocladium candelabrum*) and on eucalypt plantlets growth. The experiments for each pathogen were performed in open-top chambers and closed chambers. Two clones with different levels of rust resistance were studied in the experiments with rust and *Ceratocystis* wilt: a *Eucalyptus urophylla* x *E. camaldulensis* hybrid (VM 01) and an *E. urophylla* (clone MN 463). For leaf-spot, seedling of *E. urophylla* were tested. The experiments were repeated twice. The plantlets were cultivated under ambient (395 ppm, approximately) and high CO₂ concentrations (ranging from 520 to 1,147 ppm) for at least 30 days before the inoculation of the pathogens. Increased atmospheric CO₂ concentrations resulted in a decrease in diseases severity. Plant growth was stimulated and carbon content of the plants was greater at higher CO₂ concentrations. In this study, increased concentrations of atmospheric CO₂ favourably affected eucalypt growth and reduced diseases severity. This effect could potentially compensate for negative impacts from other environmental variables that are affected by climate change and should be considered in the development of adaptation strategies to address climate change.



P-081-01458

EXPRESIÓN GÉNICA DURANTE EL PROCESO DE ECLOSIÓN EN DIAPAUSA Y QUIESCENCIA EN EL NEMATODO DE LA PATATA, *Globodera pallida*

Palomares J.E.¹, Hedley P.E.², Cock P.J.A.², Castillo P.¹, Jones J.T.², Blok V.²

1) Instituto de Agricultura Sostenible (IAS), Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), Avenida Menéndez Pidal s/n, Apdo. 4084, 14080 Córdoba, España

2) James Hutton Institute, Invergowrie, Dundee, DD2 5DA, United Kingdom

En condiciones ambientales subóptimas para el desarrollo de una especie, la capacidad de supervivencia es uno de los factores más importantes para su mantenimiento y expansión. Los nematodos fitoparásitos especializados en determinadas plantas huésped necesitan sincronizar su ciclo biológico con la presencia de su huésped o detener su desarrollo. En particular, los nematodos formadores de quistes presentan dos estrategias biológicas para adaptarse a su huésped: i) quiescencia o estado reversible de dormancia cuando se dan las condiciones óptimas; ii) diapausa, estado de dormancia que persiste incluso en condiciones óptimas. En el nematodo de la patata, *Globodera pallida*, la diapausa se rompe después de un periodo de exposición a frío (condiciones de invierno) y es seguida de quiescencia.

En este trabajo se ha estudiado la expresión génica de huevos de *G. pallida* en quiescencia (E-2009) y en diapausa (E-2010) procedentes de una misma población pura. Estos dos estados se han comparado, por una parte con huevos rehidratados en agua durante 7 días (E2009-H2O y E2010-H2O), y huevos expuestos posteriormente a exudados radicales de patata durante 4 días (E2009-RD y E2010-RD). Las diferencias de expresión génica se estudiaron mediante hibridación en microarray. Los resultados mostraron diferencias significativas entre los diferentes tratamientos y tipos de huevos utilizados: i) E2009-H2O vs E2009-RD mostró 368 genes con incrementos significativos de expresión y 179 genes con disminuciones de la expresión; ii) E2010-H2O vs E2010-RD mostró 523 genes con incrementos de expresión y 185 con disminuciones de la expresión; iii) E2009-H2O vs E2010-H2O mostró 760 genes con mayor expresión en E2010-H2O, mientras 1588 genes mostraron menor expresión en comparación a E2009-H2O; iv) E2009-RD vs E2010-RD mostró 245 genes con mayor expresión en E2010-H2O, mientras 742 genes mostraron menor expresión en comparación a E2009-H2O. Este trabajo ha permitido identificar genes implicados en la eclosión de huevos de nematodos en diapausa y quiescencia que permiten mejorar el conocimiento de los procesos eclosión y el diseño de estrategias de control integrado de este nematodo.

*Estancia del primer autor has sido financiada por el Ministerio de Educación, estancias de movilidad posdoctoral en centros en el extranjero.



P-082-01560

ANÁLISIS DE LOS CAMBIOS METABÓLICOS INDUCIDOS EN LA INTERACCIÓN TOMATE/*Meloidogyne javanica* COMPATIBLE E INCOMPATIBLEJulio L.F.¹, Choi Y.H.², González-Coloma A.¹, Verpoorte R.², Andres M.F.¹

1) ICA-CSIC. c/ Serrano 115, 28006. Madrid. Email: mafay@ica.csic.es

2) Section Metabolomics, Institute of Biology, Leiden University, Leiden, The Netherlands

Los nematodos formadores de nódulos del género *Meloidogyne*, incluyen las especies de mayor importancia patogénica por su impacto en un gran número de cultivos a nivel mundial. En la interacción compatible, estos nematodos inducen la modificación de células radicales de la planta huésped para formar una estructura a la que se fijan y de la que se alimentan hasta el final de su ciclo vital. Por el contrario en la interacción incompatible, la expresión de la resistencia induce de una serie de mecanismos de defensa (ROS, respuesta hipersensible) y se activan diversas rutas metabólicas con la consiguiente producción de metabolitos secundarios, lo que impide el establecimiento y la infección del nematodo. En el presente trabajo se aborda el estudio comparativo de los cambios metabólicos inducidos por *M. javanica* en tomate resistente (gen *Mi-1*) y susceptible y su relación con la respuesta de defensa. Los perfiles metabólicos se han obtenido mediante el análisis espectroscópico (RMN) de extractos de distintos tejidos (tallo y raíz) de tomate resistente (Motelle) y susceptible (Moneymaker) en dos tiempos de infección (7 y 15 días) por *M. javanica*. El análisis multivariante de los datos (PCA) permite constatar la discriminación significativa entre la interacción compatible e incompatible así como entre tiempos de infección y tejidos vegetales. Destaca en el genotipo resistente la existencia de diferencias significativas entre los perfiles metabólicos de sistema radical infectado y el control. La identificación por HPLC-MS de los metabolitos diferenciales permitirá caracterizar marcadores metabólicos de la expresión de la resistencia y conocer las rutas metabólicas implicadas en la respuesta de defensa a la infección de nematodos formadores de nódulos.



P-083-01434

SUSCEPTIBILIDAD DIFERENCIAL DEL CALABACÍN FRENTE A POBLACIONES DE *Meloidogyne*López-Gómez M.¹, Flor-Peregrín E.², Talavera M.², Verdejo-Lucas S.³

1) IRTA

2) IFAPA- Camino de Purchil 3) IFAPA - La Mojonera

En la producción hortícola bajo cubierta, las cucurbitáceas (pepino, calabacín, sandía y melón) se cultivan en rotación con las solanáceas (tomate, pimiento y berenjena). Aunque las cucurbitáceas son susceptibles a *Meloidogyne*, existen diferentes grados de susceptibilidad los cuales podrían explotarse para el manejo sostenible de la enfermedad. Así, el calabacín es menos susceptible que el pepino o el melón. En este estudio, se comparó la reproducción de *M. incognita* y *M. javanica* en cinco cultivares de calabacín que representaban frutos con diferentes formas y colores. Se realizaron ensayos repetidos en contenedor y se evaluó la reproducción del nematodo después de una generación. Los cultivares de calabacín no diferían entre sí en cuanto a los parámetros reproductivos del nematodo. Sin embargo, esos parámetros fueron significativamente inferiores en los calabacines inoculados con *M. incognita* en lugar de *M. javanica*. La disección de las agallas producidas por el nematodo indicó que las condiciones para el desarrollo de *M. incognita* en calabacín eran sub-óptimas ya que solo un 22% de las hembras producían masas de huevos en comparación con el 95% de las hembras de *M. javanica*. Para determinar la variación en la capacidad parasítica de las poblaciones de *Meloidogyne* en calabacín, se compararon 13 poblaciones del nematodo que incluían las especies *M. arenaria*, *M. incognita* y *M. javanica*. La formación de agallas variaba considerablemente entre poblaciones oscilando desde 27 a 101 agallas/ planta. Las poblaciones de *M. incognita* causaban mayor daño pero mostraban menor potencial reproductivo que las de *M. javanica*. Se concluye que la idoneidad del calabacín como huésped de *M. incognita* es menor que para *M. javanica* o *M. arenaria*.

Este trabajo ha sido financiado por INIA Proyecto RTA 2010-00017-C02 y Fondos FEDER. M. López-Gómez ha recibido financiación del INIA a través de una beca pre-doctoral.



P-084-01221

***cmv1*, A GENE FOR RESISTANCE TO *Cucumber mosaic virus* IN MELON**

Giner A.¹, Bourgeois M.¹, Gyetvai G.¹, Niemöller R.¹, Guiu-Aragónés C.¹, García-Mas J.¹, Martín-Hernández A.M.¹

1) IRTA, Centre de Recerca en Agrigenòmica (CSIC-IRTA-UAB-UB) (CRAG)

Cucumber Mosaic virus (CMV) infections can cause complete harvest loss in more than 1000 species. Resistance to CMV in melon is scarce. One of the two resistant genotypes reported is the exotic accession "Songwhan Charmi", PI161375 (SC) that shows a complex mixture of qualitative and quantitative resistance, depending on the virus strain. It is composed of one gene, *cmv1*, that by itself confers total recessive resistance to strains of subgroup II, like P104.82 but not to strains of subgroup I, like M6, and at least other two genes that must act together and cooperatively with *cmv1* to confer resistance to strains of subgroup I.

We have carried out a map-based cloning of *cmv1* in an F2 population of a cross between the Spanish genotype Piel de Sapo (PS) and SC and reached a final interval of 135Kb, with three annotated candidate genes: a Vacuolar Protein Sorting, involved in membrane trafficking, a Crooked Neck-Like protein involved in splicing, and a Carboxipeptidase. Most of the recessive resistance genes identified to now are eukaryotic translation initiation factors (eIFs). However, the nature of our candidate genes, suggest that a mechanism different than impairing viral translation is involved in this resistance. The three genes have SNPs with amino acid changes between both parental genotypes. A SNP genotyping in 54 accessions from all melon types correlated with the resistant/susceptible phenotype allowed us to discard the Carboxipeptidase. For the remaining two candidate genes, we are conducting protein-protein interaction assays with the viral determinant of virulence (the movement protein) and screening two TILLING populations to identify loss-of-function mutants of the candidate genes.



P-085-01428

INTERACCIÓN ENTRE PROTEÍNAS RELACIONADAS CON LA PATOGÉNESIS Y *Potato virus X* (PVX, Sp2013)

Arcal L.¹, Cueto-Ginzo A.I.¹, Aparicio F.³, Medina V.²

1) Grupo INPLAMICVEC. Departament de Producció Vegetal i Ciència Forestal, Universitat de Lleida (UdL).

2) Centro AGROTECNIO, Universitat de Lleida (UdL).

3) Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas. Consejo Superior de Investigaciones Científicas-Universidad Politécnica de Valencia (CSIC-UPV).

En trabajos previos con *Pepino mosaic virus* (PepMV) se ha comprobado la elicitación de algunas proteínas de la planta, así como su posible interacción. En este trabajo se inicia el estudio del interactoma de *Potato virus X*, PVX (Sp2013), miembro tipo del género potexvirus, en tomate (cv. Boludo). Para ello se ha realizado RT-PCR de extractos totales de ARN de plantas infectadas para proteínas relacionadas con la patogénesis (PRs): PR1, PR2 y HSP70 de tomate, confirmación de tal elicitación mediante WB con antisueros específicos comerciales e inmuno-electromicroscopía electrónica (IEM) o confocal para conocer su posible asociación *in situ*.

Los antisueros comerciales para la PR1 no dieron resultados positivos. Los antisueros comerciales para la PR2 y PR3 sí dieron resultados fiables y se confirmó que los niveles aumentan conforme avanza la infección viral, especialmente para la PR3. El inmunomarcaje con oro coloidal y la IEM confirman resultados previos y establecen un mapa inicial de su distribución.

Para el estudio de la interacción de la CP con la HSP70 se amplificaron ambos genes y, en el segundo caso, para tres isoformas. Se analizó su expresión mediante microscopía confocal y técnicas de Complementación Biomolecular Fluorescente (BiFC) y de doble híbrido en levadura (Y2H). Los resultados obtenidos confirman la no-localización de la CP y la HSP70, y su no interacción, tal y como se comprobó en los estudios con PepMV.

Actualmente se está finalizando otros estudios del interactoma PVX (SP2003)-tomate (cv. Boludo) mediante proteómica que serán discutidos.

* Trabajo financiado por el MICIN (proyecto número de referencia AGL2010-15691, subprograma AGR) y por el programa Udl-IMPULS



P-086-01238

SYMPTOMS INDUCTION BY PLANT VIRUSES: *Pepino mosaic virus* RdRp-Pol DOMAIN IS A NECROSIS-INDUCING ELICITOR ENCODED BY BOTH SYMPTOMATIC AND ASYMPTOMATIC ISOLATES, WHILE TGP3 MODULATES VIRAL ACCUMULATIONNavarro R.¹, Gómez-Aix C.¹, Hasiów-Jaroszewska B.², Sánchez-Pina M.A.¹, Aranda M.A.¹

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

2) Institute of Plant Protection-National Research Institute, Department of Virology and Bacteriology, ul. Władysława Węgorka 20, 60-318 Poznań (Poland). E-mail: beatahasiow@tlen.pl

Pepino mosaic virus (PepMV; genus *Potexvirus*, family *Alphaflexiviridae*) is an emerging pathogen responsible for significant economic losses in tomato crops. PepMV causes on its hosts a diversity of symptoms, ranging from mild mosaics to systemic necrosis. Recently, the genetic determinant of necrosis induction was shown to be amino acid 67 of PepMV TGBp3 (Hasiów-Jaroszewska & Borodynko, 2012, Arch. Virol. 157:337-341). By expressing necrogenic and non-necrogenic versions of PepMV TGBp3 from different genetic backgrounds under different conditions, we have shown that necrosis development correlated with high virus titres, and that glutamic acid at position 67 was necessary but not sufficient for necrosis induction. In necrotized leaf areas, accumulation of reactive oxygen species (H_2O_2 and O_2^-), significant cellular damages, and induction of oxylipins biosynthesis genes occurred both in tomato and *Nicotiana benthamiana*. Transient expression of each PepMV protein was assessed in *N. benthamiana*. Tissues agroinfiltrated with TGBp3 showed symptoms of faint vein necrosis at 3 days post-inoculation, independently of whether the protein belonged to necrogenic or non-necrogenic isolates. Interestingly, the RdRp-Pol domain expression triggered a necrosis phenotype resembling a hypersensitive response. When tissues necrotized after agroinfiltration were analyzed, the histochemical modifications induced by RdRp-Pol expression clearly resembled those of tissues necrotized after viral infection, whereas TGBp3 expression did not. Altogether, these results suggest that PepMV RdRp-Pol domain is a necrosis-inducing elicitor encoded by both symptomatic and asymptomatic isolates, whereas TGBp3 modulates viral accumulation and, by doing so, RdRp-Pol domain expression levels.

Work was supported by grant AGL2012-37390



P-087-01570

CAMBIOS FISIOLÓGICOS PROVOCADOS POR DOS AISLADOS DEL VIRUS DEL MOSAICO DEL PEPINO DULCE (PepMV) EN PLANTAS DE TOMATE QUE EXPRESAN SINTOMATOLOGÍAS DISTINTAS

Hernández-Llopis D.¹, Alfaro-Fernández A.¹, González-Nebauer S.², Font-San-Ambrosio M.I.¹

1) Instituto Agroforestal Mediterráneo/ Universidad Politécnica de Valencia

2) Departamento de Producción Vegetal. ETSIAMN/ Universidad Politécnica de Valencia

El virus del mosaico del pepino dulce (*Pepino mosaic virus*, PepMV), se caracteriza por inducir síntomas muy diversos en las plantas a las que infecta y por el momento, no existe mucha información sobre el efecto de la infección de PepMV sobre la fotosíntesis y su correlación con la expresión de síntomas. Por este motivo, se diseñó un ensayo para determinar cambios fisiológicos provocados por la infección sistémica de dos aislados con sintomatología diferenciada (uno agresivo y otro asintomático) pertenecientes al mismo genotipo (CH2), evaluando a su vez el desarrollo de síntomas inducidos por ambos aislados. Para ello, se midieron, en dos periodos diferenciados del ciclo biológico de la planta: vegetativo y reproductivo, parámetros relacionados con la fotosíntesis y la integridad del aparato fotosintético, el contenido de pigmentos y carbohidratos (azúcares solubles y almidón) en hojas, y el crecimiento de las plantas de tomate mediante la valoración de la biomasa y superficie foliar.

Desde el principio, la sintomatología observada en las plantas estuvo claramente diferenciada dependiendo del aislado inoculado. Mientras las plantas infectadas con el aislado agresivo mostraron mosaicos amarillos en sus folíolos a los pocos días de ser inoculadas, en las plantas infectadas con el aislado asintomático fue con el tiempo cuando comenzaron a percibirse síntomas que afectaban sobre todo al tamaño general de la planta. Además, todas las plantas infectadas con PepMV, independientemente del aislado inoculado, presentaron menor tasa fotosintética y menor conductividad estomática. El contenido en pigmentos fue significativamente menor en las plantas inoculadas con el aislado agresivo, sin embargo, el contenido en azúcares solubles y almidón fue significativamente mayor. Durante el periodo reproductivo, el contenido en carbohidratos medido fue significativamente menor en las plantas infectadas con el aislado asintomático. Estos resultados sugieren una diferencia en el proceso infectivo del virus según el aislado, y que en ambos casos la planta presenta alteraciones fisiológicas.



P-088-01508

MECANISMO Y ELEMENTOS ESTRUCTURALES IMPLICADOS EN LA GENERACIÓN DEL RNA SUBGENÓMICO DEL VIRUS DEL ARABESCO DEL PELARGONIUM**Blanco-Pérez M.¹, Hernández C.¹**

1) Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas, Consejo Superior de Investigaciones Científicas-Universidad Politécnica de Valencia (CSIC-UPV), Departamento de Virología Molecular y Evolutiva de Plantas, Ciudad Politécnica de la Innovación, Avda. de los Naranjos.

Los virus son parásitos obligados de la maquinaria traduccional de las células que infectan. En el caso de eucariotas, dicha maquinaria reconoce preferentemente a los genes situados en posición 5'-proximal en los mRNAs por lo que, para facilitar este reconocimiento, la mayoría de los mRNAs celulares son monocistrónicos. En contraposición, los virus de RNA poseen normalmente genomas policistrónicos y han tenido que desarrollar estrategias diversas para que todos sus genes sean traducidos. Una de estas estrategias consiste en la generación de RNAs subgenómicos (sgRNAs) 3'-coterminales con el correspondiente RNA genómico (gRNA). Dichos sgRNAs son producidos por la RNA polimerasa dependiente de RNA (RdRp) viral y sirven como mRNAs para la expresión de genes situados en posiciones 5'-distales en el gRNA. En el caso de virus de plantas, se han propuesto dos modelos para la generación de sgRNAs: a) iniciación interna en el que la RdRp viral inicia la transcripción del sgRNA internamente a partir del gRNA de polaridad negativa y, b) terminación prematura de la síntesis de cadenas negativas, que dará lugar a un sgRNA de polaridad negativa que, a su vez, servirá como molde para producir un sgRNA de polaridad positiva. Aunque este último mecanismo se consideraba infrecuente en virus de plantas, información reciente sugiere su prevalencia en, al menos, algunas familias virales. El objetivo de este trabajo ha sido intentar determinar el mecanismo por el cual el virus del arabesco del Pelargonium (PLPV), un miembro de un nuevo género dentro de la amplia familia *Tombusviridae*, sintetiza el único sgRNA que se detecta en plantas infectadas. Mediante el diseño y el bioensayo de mutantes, se han obtenido datos que apoyan que la producción del sgRNA del PLPV sigue un modelo de terminación prematura en el que, además, estarían involucrados elementos estructurales formados por secuencias distantes en el RNA viral.



P-089-01524

IDENTIFICACIÓN Y ANÁLISIS DE INTERACCIONES MOLECULARES DEL SUPRESOR DE SILENCIAMIENTO POR RNA DEL VIRUS DEL ARABESCO DEL PELARGONIUM

Pérez-Cañamás M.¹, Hernández C.¹

1) Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas

En plantas, el silenciamiento por RNA actúa como un potente mecanismo de defensa antiviral. Los RNAs virales de doble cadena activan este mecanismo al ser reconocidos por enzimas Dicer que los procesan generando pequeños dúplex de RNA (sRNAs). Una de las cadenas de estos sRNAs se incorpora en complejos multiproteicos que tienen como molécula efectora una endonucleasa tipo Argonauta (AGO) a la que dirigen hacia RNAs complementarios promoviendo su degradación. La mayoría de virus expresan una o varias proteínas, conocidas como VSRs (*viral suppressors of RNA silencing*), que contrarrestan esta respuesta defensiva del huésped al interferir con uno o más componentes de la ruta de silenciamiento, aunque la importancia relativa de las distintas dianas es en general bastante desconocida. El objetivo de este trabajo ha sido la identificación y el análisis posterior del VSR codificado por el virus del arabesco del Pelargonium (PLPV), un miembro de la familia *Tombusviridae*. Los resultados han mostrado que p37, la proteína de cubierta viral, inhibe el silenciamiento por RNA. Un examen de la secuencia de p37 ha revelado la presencia de un motivo de glicina-triptófano (GW) que está conservado en proteínas homólogas y que en el caso de una de ellas, se ha implicado en su actividad supresora. Mediante mutagénesis dirigida, se ha modificado este y otros motivos de la proteína p37 del PLPV lo que ha permitido generar una batería de moléculas capaces e incapaces de actuar como VSR y/o de empaquetar el RNA viral. Esta batería de moléculas ha permitido, por una parte, evaluar la importancia de las funciones de supresión del silenciamiento y de encapsidación de p37 para la infección viral y, por otra, analizar distintas interacciones moleculares de p37 (unión a sRNAs, dimerización, localización subcelular, asociación con proteínas AGO) y establecer posibles correlaciones entre las mismas y la función supresora.



P-090-01234

STRUCTURAL ANALYSIS OF A RNA VIRAL ELEMENT AND ITS TRANSLATION INITIATION FACTOR PARTNER, BOTH CONTROLLING CAP-INDEPENDENT TRANSLATION OF VIRAL RNAsMiras M.¹, Querol-Audi J.², Truniger V.¹, Silva C.², Verdaguer N.², Aranda M.A.¹

1) Centro de Edafología y Biología Aplicada del Segura (CEBAS)- CSIC. Apdo. correos 164, 30100 Espinardo, Murcia.

2) Molecular Biology Institute of Barcelona (IBMB-CSIC), Parc Científic de Barcelona, Baldiri i Reixac 10, 08028-Barcelona.

Cap-independent translation is frequent for viral RNAs, which are often devoid of 5'-cap structure or/and 3'-poly(A) tail typical of eukaryotic mRNAs. Instead, many plant RNA viruses contain in their 3'-UTRs RNA elements able to enhance their cap-independent translation (3'-CITEs). It has been reported that 3'-CITEs directly bind and require eukaryotic translation initiation factors (eIF) for their function. We have shown that cap-independent translation of *Melon necrotic spot virus* (MNSV) RNAs is controlled by a 3'-CITE *in cis* (Truniger et al., 2008. *Plant J.* 56:716-727). Remarkably, MNSV 3'-CITEs are diverse, including at least M α 5TE, M264TE and CXTE (Truniger et al., 2008; Miras et al., 2014. *New Phytol.* 202:233-246). Genetic evidence indicates that the eIF4E subunit of melon eIF4F is necessary for cap-independent translation of MNSV RNAs harboring M α 5TE (Nieto et al., 2006. *Plant J.* 48:452-462); in contrast, M264TE and CXTE are both eIF4E independent, conferring *in cis* translational competence to RNAs in the absence of this factor (Miras et al., 2014). On the one hand, we have performed in this study a structural and functional analysis of M α 5TE. Thus, we defined the minimal size of the 3'-CITE in "*in vivo*" translation assays to a sequence of 45 nucleotides. Its secondary structure in solution was studied by Selective 2'-Hydroxyl Acylation analyzed by Primer Extension (SHAPE) and compared with those of the other two types of 3'-CITEs. On the other hand, we have expressed, crystalized and determined by X-ray crystallography the 3D structure of melon eIF4E. To describe the role of eIF4E in cap-independent translation of MNSV RNAs we are studying the M α 5TE:eIF4F interaction by several methods. Footprinting experiments revealed binding sites on a bulge of M α 5TE. Further structural and functional analyses, including co-crystallization of M α 5TE:eIF4F, are in progress.



P-091-01237

Mechanism of cap-independent translation of RNA viruses: circularization of the viral genome is required

Truniger V.¹, Miras M.¹, Rodríguez-Hernández A.M.², Romero-López C.³, Berzal-Herranz A.³, Aranda M.A.¹

1) Grupo de Patología Vegetal. Centro de Edafología y Biología Aplicada del Segura (CEBAS-CSIC). Apdo. correos 164, 30100 Espinardo, Murcia, Spain

2) Centro de Investigación en Química Aplicada (CIQA). Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT). Blvd. Enrique Reyna Hermosillo 140, 25294, Saltillo, Coahuila, México.

3) Instituto de Parasitología y Biomedicina López-Neyra. Consejo Superior de Investigaciones Científicas (IPBLN-CSIC). Av. Conocimiento s/n. 18016. Armilla (Granada). Spain

Viral mRNAs have evolved numerous mechanisms to recruit the host translational machinery, allowing them to compete with host mRNAs and avoid defense mechanisms that act at the level of translation. Thus, while most plant-encoded mRNAs contain a 5'-cap and a poly(A)-tail that act synergistically to stimulate translation, ~80% of known positive-strand RNA plant viruses lack one or both of these features in their genomic and subgenomic RNAs. In contrast, they contain in their 3'-UTRs modular RNA elements able to enhance their cap-independent translation (3'-CITEs). Thus cap-dependent and cap-independent translation mechanisms may vary: While the formation of closed-loop mRNA structures of host mRNAs during translation is usually achieved by a 5'-cap and 3'-poly(A) dependent protein-protein bridge, for some viruses viral RNA circularization has been shown to be achieved by long-distance interactions between the 5'- and 3'-UTRs. For the carmovirus *Melon necrotic spot virus* (MNSV) we have previously identified a 3'-CITE and shown that its 5'-UTR cooperates synergistically during translation of its RNAs (Truniger et al., 2008. The Plant Journal 56:716-727). Here, we study the mechanism of the MNSV RNA circularization. We analyze secondary structure of both the 5'-UTR and the I-shaped 3'-CITE of MNSV and show genetic evidence for an interaction based on sequence complementarity between both, involving nucleotides of the 3'-CITE and the 5' end of its 5'-UTR. This RNA:RNA interaction is required *in vivo* for efficient cap-independent translation, and it is therefore essential for virus viability.

Work was supported by grants AGL2009-07552/AGR and AGL2012-37390



P-092-01521

T36: UN AISLADO ÚNICO DEL VIRUS DE LA TRISTEZA DE LOS CÍTRICOS (CTV) CAPAZ DE MOVERSE E INVADIR SISTÉMICAMENTE EL HUÉSPED *N. benthamiana*Ruiz-Ruiz S.², Gómez-Muñoz N.¹, Navarro J.¹, Flores R.², Moreno P.¹, Ambrós S.¹

1) Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias

2) Instituto de Biología Molecular y Celular de plantas

La agroinoculación de *N. benthamiana* con clones infecciosos del aislado T36 del virus de la tristeza de los cítricos (CTV) causa infección sistémica y síntomas similares a los de cítricos. Este huésped permite estudiar más fácilmente las interacciones virus-huésped y los determinantes de patogenicidad, pero requiere disponer de clones agroinfecciosos de genotipos diferentes a T36. Algunos aislados de CTV no se replican o se acumulan poco en protoplastos o células de *N. benthamiana*, mientras que clones completos del aislado agresivo T318A se replican en hojas agroinfiltradas pero muestran acumulación limitada de RNA viral que se detiene a 14-21 dpi (días post-infiltración) y no producen infección sistémica. Para intentar la infección sistémica de *N. benthamiana*: 1) se co-infiltraron dichos clones con diversos supresores del silenciamiento, sin conseguir una infección local más eficiente o infección sistémica, 2) se restauraron dos mutaciones encontradas en el gen *p27*, se incorporó en el genoma viral el gen marcador *gfp*, y las nuevas construcciones se clonaron en vectores BAC o pGREEN. Los clones BAC no resultaron infecciosos, mientras que de los 30 clones pGREEN ensayados, algunos expresando en *cis* un supresor de silenciamiento viral, sólo tres produjeron infecciones locales.

Este trabajo ha sido financiado con fondos MINECO, proyecto AGL 2012-32429



P-093-01344

DIFERENCIAS EN LA EFICIENCIA DE SILENCIAMIENTO DE GENES EN *N. benthamiana* Y CÍTRICOS USANDO VECTORES VIRALES BASADOS EN EL GENOMA DEL VIRUS DEL MANCHADO FOLIAR DE LOS CÍTRICOS

Velázquez K.¹, Agüero J.¹, Vives M.C.¹, Pina J.A.¹, Navarro L.¹, Moreno P.¹, Guerri J.¹

1) Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA), Centro de Protección Vegetal y Biotecnología

El silenciamiento postranscripcional inducido por virus (VIGS) es una herramienta biotecnológica muy efectiva para estudiar la función de genes. En este trabajo se ha estudiado la efectividad de diferentes vectores virales basados en el genoma del virus del manchado foliar de los cítricos (*Citrus leaf blotch virus*, CLBV) para inducir VIGS en plantas de *Nicotiana benthamiana* y cítricos, usando diferentes insertos del gen de la fitoeno desaturasa (*pds*). En *N. benthamiana* sólo se indujo fenotipo de silenciamiento de *pds* usando una construcción que contenía 58 nucleótidos de dicho gen dispuestos en tándem invertido formando una estructura en horquilla. Sin embargo, en plantas de cítricos todas las construcciones ensayadas indujeron fenotipo de silenciamiento de *pds*. Estos datos indican que los resultados obtenidos en un huésped no se pueden extrapolar a otro. Diferencias en la generación de ARNs pequeños secundarios parece ser la causa de la respuesta diferencial entre ambos huéspedes. La habilidad de los distintos vectores para inducir el silenciamiento de genes endógenos fue confirmada con el silenciamiento de los genes sulfur y actina. Todas las construcciones ensayadas indujeron el fenotipo de silenciamiento de dichos genes en plantas de cítricos. Los vectores virales desarrollados basados en el genoma de CLBV son muy estables en plantas de cítricos e inducen el fenotipo de silenciamiento en sucesivas brotaciones a lo largo de varios años, por lo que constituyen una herramienta biotecnológica importante para estudiar la función de genes a lo largo de todo el ciclo de desarrollo de la planta mediante genética reversa.



P-094-01512

EL SUPRESOR DE SILENCIAMIENTO GÉNICO p20 DEL VIRUS DE LA TRISTEZA DE LOS CÍTRICOS (CTV) ES UN DETERMINANTE DE PATOGENICIDAD CON LOCALIZACIÓN CITOSÓLICA Y NUCLEARNavarro-López J.¹, Ruiz-Ruiz S.², Gómez-Muñoz N.¹, Flores R.², Ambrós S.¹

1) Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA), Laboratorio de Virología, Ctra Moncada-Náquera Km. 4.5, 46113 Moncada, Valencia

2) Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas (IBMCP-UPV-CSIC), Ciudad Politécnica de la Innovación, UPV, Valencia

Los únicos determinantes patogénicos de CTV descritos se han localizado en la región p23-3'-UTR del RNA genómico. Para identificar otros, es necesario obtener y bioensayar virus híbridos de distintos genotipos, o analizar las interacciones diferenciales entre aislados de CTV y sus huéspedes. CTV es único en poseer tres proteínas supresoras del silenciamiento génico, que actúan intra- (p23 y p20) o intercelularmente (p20 y p25), pudiendo las dos últimas ser también determinantes de patogenicidad. Un estudio de esta clase es abordable en *Nicotiana benthamiana*, un huésped herbáceo experimental en el que hemos demostrado la replicación de los aislados T36 y T318A, que presentan un comportamiento diferencial ya que sólo el primero invade sistémicamente la planta. Para saber si p20 está implicada en dicha interacción, hemos estudiado su capacidad patogénica y localización subcelular. La expresión en *N. benthamiana* de p20 de T36 y T318A a partir de un RNA subgenómico del virus X de la patata (PVX), acentuó los síntomas inducidos por este virus, provocando una intensa necrosis apical que comienza a los 10-12 días pos-inoculación y causa la muerte de las plantas a los 15-16 días pos-inoculación. Estos resultados son similares a los obtenidos previamente con p23. Además, en bioensayos independientes, PVX-p20(T36) causó síntomas más agudos que los de PVX-p20(T318A) y una mayor acumulación del RNA genómico de PVX. Por otra parte, la co-expresión transitoria (por agroinfiltración) de fusiones p20-GFP de ambos aislados en *N. benthamiana* y cítricos, junto a marcadores subcelulares, mostró su localización citosólica y nuclear. A diferencia de p23, p20 no se acumula en el nucleólo y, en cambio, forma agregados nucleares y perinucleares de naturaleza desconocida.



P-095-01477

Implicación de la ruta de metilación del DNA dirigida por RNA en la infección por el virus del cascabeleo del tabaco

Diezma-Navas L.¹, Llave C.¹, Ruiz-Ferrer V.¹

1) Departamento de Biología Medioambiental. Centro de Investigaciones Biológicas-CSIC. Ramiro de Maeztu, 9, 2804-Madrid.
E-mail: vruizferrer@cib.csic.es

La metilación de DNA dirigida por RNA (RNA-directed DNA methylation, RdDM) utiliza pequeñas moléculas de RNA interferentes de 24 nucleótidos (small interfering RNAs, siRNAs) producidas por la maquinaria de RNAi para guiar la metilación *de novo* de citosinas en regiones con secuencia homóloga al siRNA. RdDM participa en la regulación de genes implicados tanto en el desarrollo, como en la fisiología y la defensa de la planta, al silenciar transposones y secuencias repetidas del genoma.

El objetivo de este trabajo es profundizar en el papel que desempeña la ruta RdDM de *Arabidopsis thaliana* en el transcurso de la infección del virus del cascabeleo del tabaco (TRV). Nuestra hipótesis es que la planta utiliza diferentes estrategias epigenéticas para modular la expresión de determinados genes endógenos que participan en la defensa antiviral. Una predicción de esta hipótesis es que plantas deficientes en la ruta RdDM deberían mostrar una mayor susceptibilidad a la infección viral. Para ello, hemos cuantificado la acumulación de TRV en diferentes fondos genéticos donde tanto la biogénesis de siRNAs de 24 nt, como la actividad de las DNA metiltransferasas, está comprometida. Estos resultados se han correlacionado con la acumulación de pequeños RNAs de procedencia viral (vsiRNA), en cada uno de los mutantes. Con estudios de microscopía confocal hemos podido comparar los diferentes patrones de localización de TRV en hoja, flor y silicua, para cada uno de los mutantes. Análisis de librerías de sRNAs y microarrays realizados previamente en el laboratorio nos han permitido seleccionar una serie de genes candidatos que presentan una gran acumulación de siRNAs de 24nt en la región promotora y cuya expresión se ve alterada en presencia de TRV. En la actualidad, estamos estudiando la posible participación de RdDM en la regulación de la expresión de dichos genes endógenos durante la infección de TRV. Estos resultados sugieren por primera vez que RdDM, además de tener papel relevante durante la infección de bacterias, hongos y virus de ADN, también parece participar en el transcurso de la infección de virus de ARN tales como TRV.



P-096-01503

Determination of the cleavage sites of the RNA2-encoded proteins for two members of the genus *Torradovirus* by N-terminal sequencing of the virion capsid proteinsFerriol I.¹, Marques da Silva D.², Turina M.³, Falk B.W.¹

1) Department of Plant Pathology - University of California

2) CAPES Foundation, Ministry of Education of Brazil

3) Istituto per la Protezione Sostenibile delle Piante, Sez. di Torino

Recently, the genus *Torradovirus* was created within the family *Secoviridae* and has several members: *Tomato torrado virus* (ToTV), *Tomato marchitez virus* (ToMarV) (also named as *Tomato apex necrosis virus*, ToANV), *Tomato chocolate spot virus* (ToChSV), *Tomato chocolate virus* (ToChV), *Lettuce necrotic leaf curl virus* (LNLCV) and *Cassava torrado-like virus* (CsTLV). Torradoviruses have bipartite genomes consisting of two single-stranded plus-sense RNAs. The first RNA (RNA 1) is ca. 7 kb and has one open reading frame (ORF), which encodes replication-associated proteins including the protease, helicase and RNA-dependent RNA polymerase (RdRp). The second RNA (RNA 2) is ca. 5 kb and has two ORFs. The ORF1 in the RNA 2 is unique for torradoviruses, but its function is still unclear. The ORF2 has coding regions for a putative movement protein and the three capsid proteins. Other members of the family *Secoviridae* also have a polyprotein strategy, where the polyprotein is cleaved by a 3C-like cysteine proteinase. In addition, the members of the family *Secoviridae* which have a His as the proteinase substrate binding pocket, have a Glutamine (Gln =Q) at the -1 position of the cleavage site. Little is known about the polyprotein strategy and the cleavage site recognition of the proteinase of viruses in the genus *Torradovirus*. In this work, the cleavage sites in the RNA 2 ORF2-encoded protein of two torradoviruses (ToANV and ToChSV) were determined. First, the viral capsid proteins were purified and separated in a SDS-PAGE gel, blotted onto a PVDF membrane and used for N-terminal sequencing. These results showed that the amino acid at the -1 position of the cleavage site is a Gln (Q). Second, amino acid sequence comparison of different isolates of ToMarV confirmed that this Gln (Q) is conserved among different isolates of ToMarV and among members of the genus *Torradovirus*.



P-097-01413

VARIACIÓN EN LA EXPRESIÓN DE LAS PROTEÍNAS DIRIGENTES (DIR) IMPLICADAS EN LA FORMACIÓN DE LIGNINA Y LIGNANOS EN CAÑA DE AZÚCAR EN RESPUESTA A LA INFECCIÓN POR *Sporisorium scitamineum*

Legaz M.E.¹, Sánchez E.¹, De Armas R.², Díaz-Peña E.M.¹, Vicente C.¹

1) Departamento de Biología Vegetal I, Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Complutense de Madrid

2) Departamento de Biología Vegetal. Facultad de Biología. Universidad de La Habana.

Sporisorium scitamineum es el hongo patógeno causante de la enfermedad del carbón en la caña de azúcar. La primera barrera de defensa de la planta ante la enfermedad es la barrera mecánica proporcionada por la lignina, biopolímero que aporta rigidez y resistencia a las paredes celulares.

Estructuralmente, la lignina es un heteropolímero que resulta del acoplamiento de tres cinamil alcoholes o monolignoles: p-cumaril, coniferol y sinapil. Distintas y numerosas son las enzimas implicadas en la biosíntesis de la lignina. La enzima cinamil alcohol deshidrogenasa (CAD) cataliza la reducción del cinamil-aldehído en cinamil alcohol, en el último paso antes de la oxidación polimerizante de los compuestos y de la deposición sobre la pared celular. La familia de proteínas dirigentes (proteínas DIR) contiene un conjunto de proteínas también implicadas en este último paso en la síntesis del biopolímero estructural, ya que son responsables de la estereoselectividad de los productos de oxidación de las enzimas oxidativas. El proceso de formación de lignina se ve favorecido por la familia de proteínas DIR a través de la acumulación mayoritaria de (+)-pinoresinol. En ausencia de proteínas dirigentes, el balance entre los enantiómeros (+) y (-) se modifica, aumentando la proporción de (-)-pinoresinol y los metabolitos secundarios derivados de éste, denominados lignanos.

En plantas de caña de azúcar inoculadas con el patógeno fúngico la expresión de la enzima CAD (levemente) y del conjunto de proteínas DIR (significativamente) se ve reducida en tejido meristemático y foliar en la variedad resistente estudiada (Mayarí cv. 5514) pero no en la susceptible (Barbados cv. 42231). La bajada en la expresión de proteínas dirigentes en la variedad resistente debe estar relacionada con su capacidad defensiva. Así, la disminución en la formación de lignina debe derivar directamente en un aumento en la producción de lignanos, moléculas que finalmente podrían ejercer efecto citotóxico sobre las células en desarrollo del patógeno fúngico.



P-098-00990

EFFECTS OF RISING TEMPERATURE, ATMOSPHERIC CO₂ LEVELS ON INTERACTIONS BETWEEN PLANTS AND RNA VIRUSESDel Toro F.J.¹, Aguilar E.¹, Tenllado F.¹, Chung B.N.², Canto T.¹

1) Departamento de Biología Medioambiental, Centro de Investigaciones Biológicas, CSIC, Ramiro de Maeztu 9, 28040, Madrid, Spain

2) National Institute of Horticultural & Herbal Science. Agricultural Research Center for Climate Change. 281, Ayeon-ro, Jeju, 690-150, Jeju Island, Republic of Korea

To assess effects of climate change on RNA viruses we have studied their accumulation as well as the performance of their suppressors of silencing in *Nicotiana benthamiana*, at standard vs. high temperatures (25 vs. 30 °C), and at current vs. projected end-of-the-century atmospheric CO₂ levels [401 vs. 970 parts per million (ppm); <http://www.ipcc.ch>]. We studied *Cucumber mosaic virus* (CMV) and *Potato virus Y* (PVY) and their respective 2b protein and HCPro suppressors, as well as a *Potato virus X* (PVX) vector, either by itself or expressing 2b protein or HCPro.

High temperature (30 °C) halved the accumulation in infected tissue of PVY and of the three PVX vectors, but not that of CMV, relative to 25 °C. Under high CO₂ levels, both PVY and the three PVX vectors showed a slight decrease in viral titers in infected tissue disks that normalizing total protein content transformed into slight increase, relative to plants kept at current CO₂ levels. A CMV accumulation increase at high vs. current CO₂ levels was apparent in both, leaf disks or after normalizing total protein content.

Neither high temperature nor high CO₂ levels affected negatively 2b protein or HCPro activities at suppressing the silencing of a reporter in agropatch assays (Del Toro et al., 2014. Mol. Plant Pathol. DOI: 10.1111/mpp.12136, and this work) indicating that both suppressors could cope with the reported increase in strength of antiviral silencing at high temperatures. Interestingly, neither suppressor could prevent poor PVX accumulation at high temperature either. Thus, for both PVY and PVX the negative effect of high temperature on their accumulation must be related to processes other than the strength of gene silencing in the host cell or that of its suppression by viral factors, such as perhaps other resistance pathways (proteasome, autophagy), viral replication, and/or intra- or intercellular transport, which had no effect on CMV.

This project was funded by a cooperative grant from the Rural Development Administration (RDA) of the Republic of Korea, at the Spanish Council for Scientific Research (CSIC).



P-099-01491

BEGOMOVIRUS QUASISPECIES ADAPT TO HOSTS BY EXPLORING DIFFERENT SEQUENCE SPACE WITHOUT CHANGING THEIR CONSENSUS SEQUENCESSánchez S.¹, Domínguez G.¹, Tomás D.¹, Navas-Castillo J.¹, Moriones E.¹, Grande A.²

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, Spain.

2) Instituto de Hortofruticultura Subtropical y Mediterránea "La Mayora" (IHSM-UMA-CSIC), Universidad de Málaga, Área de Genética, Campus de Teatinos, 29071 Málaga,

Geminiviruses, which belong to the *Begomovirus* genus, possess single-stranded circular DNA genomes that depend on cellular polymerases for replication in the host nucleus. In plant hosts, geminivirus populations behave as ensembles of mutant and recombinant genomes. This favours the emergence of new geminivirus strains able to produce new diseases or overcome the genetic resistance of cultivars. In warm and temperate areas several whitefly-transmitted geminiviruses cause the tomato yellow leaf curl disease (TYLCD) with important economic consequences. TYLCD is frequently controlled in commercial tomato production using the *Ty-1* resistance gene. Over a 45 day period we studied the evolution of infectious clones from three TYLCD-associated begomoviruses: *Tomato yellow leaf curl Sardinia virus*, *Tomato yellow leaf curl virus* and the recombinant *Tomato yellow leaf curl Axarquia virus*. The evolution of their viral progeny was examined in susceptible tomato (*ty1/ty1*), resistant tomato (*Ty1/ty1*), common bean, and the wild reservoir *Solanum nigrum*. We found that in addition to affecting viral accumulation kinetics, the host influenced the sequence space explored by these begomoviruses. In tomato, viral dynamics was not influenced by the presence of the *Ty-1* gene. Interestingly, positive adaptation of the coat protein gene was only observed in the common bean and *S. nigrum*, which correlates with these plants having viral quasispecies with the highest degree of complexity and heterogeneity. Our results underline the importance of analysing the mutant spectra of begomovirus infections, especially in wild reservoirs, which have the potential to give rise to large numbers of emergent variants in spite of the invariance of their consensus sequences.



P-100-01552

CHARACTERIZATION OF THE ROLE OF THE ER BODIES IN THE PLANT IMMUNE SYSTEMRuñán J.S.¹, Elmore J.M.¹, Bejarano E.R.², Beuzón C.R.², Coaker G.¹

1) University of California, Davis

2) Instituto de Hortofruticultura Subtropical y Mediterránea

The ER bodies are Endoplasmic Reticulum-derived structures that are present in plants belonging to the *Brassicales* order. In *Arabidopsis thaliana*, the ER bodies are ubiquitous in seedlings and roots, but they are absent in most cells in rosette leaves. Nevertheless, both wounding and jasmonic acid treatments induce the formation of ER bodies in leaves. Formation of this structure is fully dependent on the transcription factor NAI1. The main component of the ER bodies are B-glucosidases (BGLUs), enzymes that hydrolyze secondary compounds. In *A. thaliana*, PYK10 (BGLU23) is the most abundant protein in the ER bodies. This protein has high sequence similarity with PEN2, an atypical myrosinase that hydrolyze a certain type of indole glucosinolates. Knockout plants for either the *nai1* or the *pyk10* genes show overgrowth of the fungus *Piriformospora indica*. Taken together, these data suggest a role in the defense response of the ER bodies.

In our laboratory, a large-scale analysis of the changes of protein levels after flg22 treatment showed a decreased quantity of ER body-related proteins. These results were supported by a reduction on the number of ER bodies in cotyledons, 3 hours after flg22 treatment. In contrast, inoculation with virulent *Pseudomonas syringae* DC3000 induces the formation of ER bodies in rosette leaves. T-DNA knockouts in ER body-related proteins exhibit enhanced disease resistance to *P. syringae* DC3000. Using knockout plants on different components of ER bodies, we demonstrate a role for the plant immune system of these proteins. The role of select ER body components in response to herbivores will also be presented.

Resúmenes de pósteres

Epidemiología
(P-101 a P-131)





P-101-01395

GI_{nt}: A NOVEL MOBILE GENETIC ELEMENT WIDELY DISTRIBUTED IN BACTERIA**Bardaji L.¹, Echeverría M.¹, Martínez P.M.², Rodríguez-Palenzuela P.², Murillo J.¹**

1) Dept. Producción Agraria, Universidad Pública de Navarra

2) Centro de Biotecnología y Genómica de Plantas, E.T.S. Ingenieros Agrónomos Universidad Politécnica de Madrid

Genes required by the phytopathogenic gammaproteobacterium *Pseudomonas syringae* for the production of the antimetabolite phytotoxin phaseolotoxin, are clustered in a chromosomal genomic island with demonstrated capacity to transfer horizontally. Comparative and functional genomic analyses allowed us to classify this island as the paradigm of a novel type of mobile genetic element, called GI_{nt}, which shows a tripartite structure: the highly conserved *ginABCD* operon, a variable region of cargo DNA, and a poorly conserved 3' end. GI_{nts} are present in many genera of proteobacteria and other bacteria, but not in Archaea, although different elements appear to be restricted and actively transferred within a single or few related genera. GI_{nt}Ps is a family of closely related elements found mainly in species of pseudomonads. Additionally, most of the cargo DNA in GI_{nt}Ps elements appears to originate from pseudomonads and code for traits that might increase fitness, such as heavy metal resistance, phytotoxin production, or type three and type six secretion system effectors. Nested PCR analyses demonstrated that GI_{nt}Ps excise, generating circular molecules. Sequencing of both the junction of the circular intermediate and the bacterial scar left after excision from diverse types of GI_{nt}Ps indicate that integration and excision of these elements is compatible with the behavior of tyrosine recombinases. An artificial circular GI_{nt}Ps was successfully transferred to several *Pseudomonas* hosts, getting integrated at the predicted *attB* site, generating two direct imperfect repeats. A new and distinctive feature of GI_{nts} is their possession of the four CDSs operon *ginABCD*; genes *ginABC* contain typical patterns of tyrosine recombinases whereas *ginD* codes for a hypothetical protein. Site-directed mutagenesis and complementation assays showed that all four *ginABCD* genes were essential for the excision of a wild-type GI_{nt}Ps. To our knowledge, this is the first mobile genetic element that requires several proteins, including three potential tyrosine recombinases, for its active transfer and mobilization.



P-102-01399

EFFECTO DE LA TEMPERATURA EN EL CRECIMIENTO DE *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni*, CAUSANTE DE LA MANCHA BACTERIANA DE LOS FRUTALES DE HUESO**Morales G.¹, Llorente I.¹, Montesinos E.¹, Moregrega C.¹**

1) INTEA-Universitat de Girona

El cultivo de frutales de hueso y almendro tiene una gran importancia en España, siendo uno de los principales países productores a nivel mundial. La mancha bacteriana de los frutales de hueso y almendro producida por *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni* (*Xap*) es una enfermedad de cuarenta en la UE, de importancia creciente en España dado que amenaza en convertirse en epidemia debido a la rápida distribución de la bacteria, y por tanto producir pérdidas económicas muy importantes. Por el momento no se conoce un método de control de la enfermedad eficaz, y éstos se reducen a tratamientos preventivos con derivados cúpricos y a medidas de cuarentena.

El objetivo de este estudio era contribuir en el conocimiento de la biología y epidemiología de *Xap* modelizando su crecimiento en función de la temperatura. Se obtuvieron las curvas de crecimiento mediante lecturas de densidad óptica (OD) realizadas de forma automatizada utilizando el Bioscreen C a 5, 10, 15, 20, 25, 30 y 35°C. Se estimaron los parámetros de crecimiento ($\log_{10} N_0$, $\mu_{\max}$, lag, $\log_{10} N_{\max}$) de diversas cepas de *Xap* procedentes de distintos huéspedes y zonas geográficas para cada una de las temperaturas evaluadas. Se ajustaron las cinéticas obtenidas al modelo de Gompertz modificado mediante regresión no-lineal. Finalmente se describió la tasa de crecimiento en función de la temperatura mediante ajuste por regresión no-lineal al modelo de Ratkowsky y sus variantes.

Se observó crecimiento de *Xap* en todas las temperaturas evaluadas, de 5 a 35°C, con una tasa de crecimiento máximo a los 31°C. Los tiempos de duplicación que se obtuvieron para las distintas cepas fueron similares y comparables a los descritos por otros autores.

Estos resultados son esenciales para el desarrollo futuro de un modelo de predicción de la infección de *Xap* en los distintos huéspedes, que combine la temperatura y otros parámetros ambientales como la humedad relativa y la humectación foliar. Este modelo de predicción permitirá el asesoramiento del riesgo de infección y de la aparición de síntomas en programas de control y vigilancia de la mancha bacteriana de los frutales de hueso.

Financiado por los proyectos SING 12/13 de la Universitat de Girona, FP7-KBBE 2007-2013 DROPSA de la UE y BR 2013/31 de la Universitat de Girona



P-103-01387

EVALUACIÓN DE PÉRDIDAS DEBIDAS A *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni* EN PLANTACIONES COMERCIALES DE ALMENDRO EN ARAGÓN

Palacio-Bielsa, A.¹, Redondo, C.², Cambra, M.A.³, Berruete, I.M.¹, Collados, R.³, Palazón, M.³, Cubero², J., López, M.M.⁴

¹ Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria de Aragón (CITA). Av. Montañana 930, 50059 Zaragoza. E-mail: apalaciob@aragon.es.

² Laboratorio de Bacteriología. Departamento de Protección Vegetal. Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA). Ctra. de la Coruña km 7,5, 28040 Madrid.

³ Centro de Sanidad y Certificación Vegetal (CSCV). Av. Montañana 930, 50059 Zaragoza.

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

Xanthomonas arboricola pv. *pruni* (*Xap*), patógeno de cuarentena en la Unión Europea (UE), es el agente causal de la mancha bacteriana de los frutales de hueso y del almendro. Aunque se trata de una enfermedad de creciente interés en la UE, y se han descrito mermas sustanciales en estudios realizados en frutales de hueso, apenas existe bibliografía sobre las pérdidas en cosecha ocasionadas por *Xap* en almendro.

Por ello, se ha cuantificado la disminución de la producción de almendra en tres plantaciones comerciales de las variedades Vayro y Guara afectadas por *Xap*, y situadas en distintas localidades de Aragón. Se estudiaron dos variables, pérdida de cosecha y rendimiento total de la plantación. Un total de 30.286 almendras fueron pesadas y clasificadas en función de la presencia o ausencia de síntomas de *Xap*. Para las pérdidas de cosecha (kg/árbol), se contemplaron tanto las almendras que cayeron prematuramente como aquellas que permanecieron adheridas al árbol tras la recolección. De esta manera, las mermas de cosecha en las tres plantaciones evaluadas fueron del 22,4%, 30,6% y 46,7%, respectivamente. Se verificó que la mayoría de las almendras adheridas al árbol tras la recolección mostraban síntomas típicos (83,7%, 81,8% y 98,1%, respectivamente). Asimismo, los porcentajes de almendras caídas prematuramente que mostraban síntomas fueron del 92,4%, 89,5% y 89,7%, respectivamente.

El rendimiento (peso semilla/peso total fruto x 100) de la cosecha disminuyó significativamente debido a las lesiones y exudados de goma en el mesocarpio de las almendras infectadas por *Xap*, al impedir el pelado natural de los frutos, e incluso llegar a producir la deshidratación de las semillas. Los rendimientos de la cosecha en las tres plantaciones con infecciones de *Xap* fueron del 25,6%, 21,8% y 25,7%, respectivamente, estimándose que, en ausencia de infección, hubieran alcanzado, respectivamente, el 31,8%, 28,3% y 36,9%.

*Trabajo financiado por INIA, proyecto RTA2011-00140-C03-03.



P-104-01561

IDENTIFICACIÓN DE VECTORES POTENCIALES DE *Xylella fastidiosa*, EN DISTINTAS ÁREAS VINÍCOLAS

Sabaté J.¹, Laviña L.¹, Batlle A.¹

1) Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentàries (IRTA). Dept. de Protecció Vegetal

Xylella fastidiosa es el agente causal de la enfermedad de Pierce en vid, donde causa necrosis del parénquima internerval, desecación de la planta y finalmente muerte de la misma. *X.fastidiosa* es una bacteria gram negativa de crecimiento limitado al xilema, que se ha identificado en más de 80 especies vegetales, causando enfermedades importantes en algunos cultivos, como cítricos, café, almendro, melocotonero, olivo, adelfas y vid, entre otros. En 2013 se identificó un brote epidémico en olivos viejos, almendros y adelfas, en el sur de Italia, desconociéndose el origen de la cepa identificada en esta región. *X.fastidiosa* se transmite por insectos que se alimentan del xilema, hemípteros del suborden *Auchenorrhyncha*, de las familias *Aphrophoridae*, *Cercopidae*, *Cicadidae* y *Cicadellidae*. La transmisión no requiere periodo de latencia. La explosión de la enfermedad en EEUU se debió a la introducción del vector, *Homalodisca coagulata* syn.vitripennis, con cítricos procedentes del Brasil.

Con la finalidad de determinar los vectores potenciales de *X.fastidiosa* en el caso de que la enfermedad fuera introducida, se han realizado durante más de diez años, seguimientos de los insectos presentes en distintas áreas vitivinícolas del país, determinando la presencia y dinámica poblacional de aquellas especies que según el EFSA (European Food Safety Authority), pueden ser vectores de la enfermedad.

Los resultados obtenidos muestran que especies pertenecientes a cinco de los géneros incluidos en la lista de vectores potenciales en Europa, están presentes en nuestro país, *Aphrophora* sp., *Cercopis sanguinolenta*, *Cercopis* sp., *Cicadella viridis*, *Neophilaneus lineatus*, *N. campestris* y *Philaneus spumarius*. Las especies más abundantes son *Neophilaneus* sp. y *Cercopis* sp., seguidas de *Cicadella* y *Aphrophora*. *Philaneus* sp. es el menos abundante. En Rioja Alavesa, Aragón, la Rioja y Navarra es donde se han capturado un mayor número de individuos pertenecientes a estas especies. En la Rioja alavesa se capturaron cerca de 70 individuos de *N. lineatus* en 2006. En 2007 el número de *Neophilaneus* y *Cercopis* fue elevado en Aragón y La Rioja. En 2012 y 2013 se capturaron *Cicadella viridis*, *Neophilaneus* y *Philaneus* sp. en Cataluña, la Rioja y Navarra. Con los cebadores P1/Tint que amplifican fragmentos del gen 16S rDNA y 23S rDNA de fitoplasmas y bacterias relacionadas, se ha obtenido amplificación en individuos de *Neophilaneus* y *Philaneus*. Se está llevando a cabo la caracterización molecular de estos amplificadores.

Trabajo financiado por el proyecto INIA RTA2011-0067-C04



P-105-01575

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR Y FENOTÍPICA DE AISLADOS BÚLGAROS DE *Agrobacterium* spp. DE VIDGenov N.¹, Llop P.², López M.M.², Bobev S.³, Álvarez B.²

1) Plant Protection Dept., Institute of Viticulture and Enology (IVE). 1, Kala tepe str. 5800 Pleven, Bulgaria.

2) Centro de Protección Vegetal, Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA). Carretera de Moncada a Náquera km 4,5. 46113 Moncada, Valencia, Spain.

3) Phytopathology Dept., Agricultural University. Mendeleev 12 str. 4000 Plovdiv, Bulgaria.

Varias especies de *Agrobacterium* causan tumores en cuello y raíces en muchas plantas cultivadas, entre ellas la vid. En este huésped producen mayores pérdidas en zonas frías como Bulgaria, ya que la aparición de los tumores aéreos se incrementa con las heladas. En los últimos años y debido a la incidencia de la enfermedad en vid en Bulgaria se han realizado prospecciones, obteniéndose más de 400 aislados con morfología típica, de los que se seleccionaron 75 para su caracterización molecular y fenotípica. De ellos, 66 fueron del biovar 3 (*A. vitis*), y los restantes 9 del biovar 1 (*A. tumefaciens*) pero atípicos, ya que mostraron características comunes al biovar 3, como la producción de 3-cetolactosa, la alcalinización a partir del ácido L-tartárico y la acidificación a partir de melecitosa. Todos los aislados fueron tumorigénicos en vid. Se analizaron también características cromosómicas y plasmídicas con cuatro parejas de iniciadores. La detección del gen *pehA* de la hidrolasa péctica permitió distinguir claramente entre *A. vitis* y los *A. tumefaciens* atípicos, pero con iniciadores del gen del sensor de virulencia *virA*, se detectó que el plásmido Ti (inductor de tumores) de las cepas atípicas de biovar 1 era de rango limitado de huéspedes. Con respecto a la utilización de opinas, la mayor parte de los aislados de *A. vitis* y algunos de los *A. tumefaciens* presentaron plásmidos Ti de tipo octopina/cucumopina, y el de tipo nopalina se detectó sólo en una cepa de *A. tumefaciens*.

En general, las cepas de *A. vitis* presentaron perfiles más homogéneos que las de *A. tumefaciens*, tanto molecular como fenotípicamente. Por otra parte, la presencia en vid de cepas de *A. tumefaciens* con algunas características típicas de *A. vitis* sugiere una adaptación de cepas de *A. tumefaciens* a este huésped en algunos viñedos búlgaros.

Este trabajo ha sido financiado por el proyecto R-29 de la Agricultural Academy de Bulgaria.



P-106-01577

PAPEL DE LAS CATALASAS KatA Y KatG EN LA INDUCCIÓN DEL ESTADO VIABLE NO CULTIVABLE EN *Erwinia amylovora*

Delgado R.¹, Figàs A.¹, González-Biosca E.¹

1) Universitat de València

El patógeno responsable del fuego bacteriano, *Erwinia amylovora*, responde a la oligotrofia y a otros estreses ambientales mediante la inducción del estado viable no cultivable (VNC). La pérdida de cultivabilidad asociada a este estado se ha relacionado con la ausencia de actividad catalasa. Puesto que *E. amylovora* posee dos catalasas, KatA y KatG, el objetivo de este trabajo fue determinar su papel durante la inducción del estado VNC mediante el uso de mutantes. Para la inducción del estado VNC se expuso a cada una de las cepas a condiciones de estrés por temperatura (37°C) e iluminación (luz blanca) en microcosmos oligotróficos de agua natural. Como control se usaron microcosmos incubados en oscuridad a 20°C.

La caracterización de los mutantes reveló una mayor sensibilidad a compuestos oxidantes con respecto a la cepa silvestre, siendo la sensibilidad de *katA* > *katG* > cepa silvestre. Los ensayos de inducción del estado VNC confirmaron el papel de las dos catalasas en el mantenimiento de la cultivabilidad de células expuestas a 37°C en condiciones de oligotrofia. No obstante, tan solo el mutante en *katG* mostró sensibilidad a estrés lumínico en microcosmos de agua natural. Todas las cepas se comportaron de forma similar en condiciones no inductoras del estado VNC durante los periodos ensayados. La diferente implicación de ambas catalasas durante las respuestas de *E. amylovora* a los distintos estreses ensayados también podría implicar distintos papeles fisiológicos, que actualmente se están investigando.

* Este trabajo ha sido financiado por los proyectos de investigación AGL2008-05723-C02-02 y UV-INV-AE 112-66196, y ha sido posible gracias a la Beca de Formación de Profesorado Universitario (FPU) otorgada por el Ministerio de Educación a R. D. Santander.



P-107-01578

ADAPTACIONES Y PATOGENICIDAD DE *Erwinia amylovora* A BAJAS TEMPERATURASDelgado R.¹, Montes L.¹, González-Biosca E.¹

1) Universitat de València

Erwinia amylovora es una bacteria fitopatógena mesófila capaz de crecer a 4°C, y temperaturas inferiores a su óptima de crecimiento favorecen su persistencia en el ambiente en estado cultivable. Estos datos sugieren una cierta adaptación a las bajas temperaturas, pero existen pocos estudios al respecto. Con el fin de determinar la respuesta molecular de *E. amylovora* a las bajas temperaturas, se analizaron los patrones de expresión de genes de respuesta al estrés por choque frío (*cspA*, *cspD*, *cspE*) y de adaptación al frío (*dps*, *fliD*, *katG* y *rpoS*) en células expuestas a oligotrofia a 20°C y a 4°C, mediante RT-PCR semicuantitativa. Por otra parte, aunque se ha demostrado la inducción de la expresión de genes de virulencia/patogenicidad a temperaturas inferiores a la óptima, se desconoce la capacidad de *E. amylovora* para producir síntomas en material vegetal susceptible a bajas temperaturas. Por tanto, también se evaluó la patogenicidad de *E. amylovora* en frutos inmaduros a 20°C y 4°C.

Experimentos iniciales revelaron la inducción de la mayoría de genes de estrés por choque frío, tanto a 20°C como a 4°C. De los de adaptación al frío, *dps* se indujo especialmente a 4°C pero no a 20°C, lo que sugiere su contribución a la adaptación de *E. amylovora* a las bajas temperaturas. Además, todos los frutos inoculados mostraron síntomas de fuego bacteriano, tanto a 4°C como a 20°C, lo que indicaría que la ausencia de síntomas de fuego bacteriano durante invierno se debe más a la ausencia de material vegetal susceptible y/o vectores durante este periodo, que a las bajas temperaturas.

Este trabajo ha sido financiado por los proyectos de investigación AGL2008-05723-C02-02 y UV-INV-AE 112-66196, y ha sido posible gracias a la Beca de Formación de Profesorado Universitario (FPU) otorgada por el Ministerio de Educación a R. D. Santander



P-108-01388

IDENTIFICACIÓN DE '*Candidatus Phytoplasma pyri*' CAUSANTE DEL PEACH YELLOW LEAF ROLL (PYLR), EN MELOCOTONEROS DE LLEIDA**Sabate J.¹, Laviña A.¹, Batlle A.¹**

1) Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentàries (IRTA), Dept. de Protecció Vegetal Sostenible. Ctra. Cabrils Km 2, 08348 Cabrils (Barcelona). amparo.laviña@irta.cat

'*Candidatus Phytoplasma prunorum*', causante de los European stone fruit yellows (ESFY), es el fitoplasma más importante que afecta *Prunus* spp. en Europa. Este fitoplasma está estrechamente relacionado con '*Ca. P. pyri*', el cual provoca el decaimiento del peral (PD). Ambos fitoplasmas pertenecen al grupo ribosómico 16Sr-X y se transmiten de forma natural por diferentes especies de *Cacopsylla* spp. En Estados Unidos, '*Ca. P. pyri*' es el responsable del enrollado amarillo de las hojas del melocotonero (Peach yellow leaf roll, PYLR) (1). En España, '*Ca. P. prunorum*' está muy extendido en *Prunus* spp., pero es poco frecuente en *P. persicae*. Mientras que '*Ca. P. pyri*' está presente en la mayoría de parcelas de peral de Lleida (2). Durante el año 2012, se observaron en parcelas de melocotoneros, árboles con síntomas de enrojecimientos, deformación de hojas, caída de frutos y en algunos casos clorosis y muerte de árboles. *C. pruni*, vector de '*Ca. P. prunorum*', no se había ni se ha identificado en ninguno de los muestreos realizados en Lleida hasta el momento, sin embargo *C. pyri* vector del PD en España se encuentra en todas las parcelas de peral de esta provincia y en elevada población, por lo que se pensó que podía tratarse de este fitoplasma tal y como ocurre en EEUU.

Muestras de árboles sintomáticos fueron analizadas mediante PCR con cebadores universales P1/P/7, seguidos por PCR anidada con R16F2n/R16R2 y cebadores específicos fO1/rO1 del grupo 16Sr-X. Los productos de amplificación fueron secuenciados determinándose en todas las muestras el fitoplasma *Ca.P.pyri*.

Esta es la primera referencia del fitoplasma causante del PD en melocotonero en Europa. Actualmente este fitoplasma se está extendiendo a otras zonas de la provincia. Este aumento de la enfermedad podría ser debido al arranque del peral, obligando a *C.pyri* a buscar un nuevo huésped y al aumento poblacional del vector.

References: (1) C. L. Blomquist et al. Plant Dis. 86:759, 2002. (2) M. Garcia-Chapa et al. J. Phytopathol. 151:584, 2003.



P-109-01495

BÚSQUEDA DE PSÍLIDOS VECTORES DE '*Candidatus Liberibacter solanacearum*' EN ESPAÑA

Ribeiro G.¹, Hernández E.², Bertolini E.¹, Siverio F.², Morroquín C.¹, Moreno A.³, Hermoso de Mendoza A.¹, Fereres A.³, Cambra M.¹

1) Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA)

2) Instituto Canario de Investigaciones Agrarias (ICIA)

3) Instituto de Ciencias Agrarias, Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC)

'*Candidatus Liberibacter solanacearum*' está asociada a la enfermedad de "zebra chip" en patata y a desarreglos vegetativos en apio y zanahoria, produciendo importantes pérdidas económicas. Se transmite por semilla de zanahoria y de forma persistente (transovárica) por psílidos. Se realizaron prospecciones, de 2011 a 2014, mediante el método de plantas pegajosas en distintas regiones de España para conocer la fauna de artrópodos que visita los distintos cultivos huéspedes de la bacteria. Los insectos capturados pertenecieron mayoritariamente a las familias Aphididae, Cicadelidae y la super-familia Psylloidea. Los psílidos más frecuentes en las distintas regiones y años fueron *Bactericera trigonica*, *B. tremblayi* y *B. nigricornis*. El máximo de captura de psílidos ocurrió en verano. Todas las especies de psílidos capturadas en apio y zanahoria resultaron positivas frente a '*Ca. Liberibacter solanacearum*' por "squash real-time PCR". La detección de la bacteria en psílidos sugiere que han adquirido la misma y son un posible vector. Con el fin de determinar si *B. trigonica* era capaz de llegar al floema de posibles huéspedes y potencialmente transmitir la bacteria se realizaron estudios mediante gráficos de penetración eléctrica (EPGs). Los resultados indican que *B. trigonica* es capaz de alcanzar el floema de zanahoria y apio y con menor frecuencia también el de patata. Por otro lado, se ha demostrado la transmisión experimental de '*Ca. Liberibacter solanacearum*' por *B. trigonica* de zanahoria a zanahoria, apio, patata y tomate demostrando que esta especie es vectora en las condiciones de ensayo y supone un riesgo de transmisión de la bacteria de zanahoria o apio a solanáceas.

Trabajo financiado por los proyectos INIA (RTA2011-00142) y FP7-ERANET EUPHRESKO (266505/PHYLIB) y por Agrícola Villena Coop. V.



P-110-01585

APROXIMACIÓN A LA DIVERSIDAD DE *Phytophthora* spp. PRESENTES EN EL PARQUE NATURAL DEL MONTSENY ASOCIADAS A *Quercus ilex* L.

Mora-Sala B.¹, Abad-Campos P.¹

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

Durante los últimos años, nuevas especies de *Phytophthora* se han relacionado con el decaimiento de las masas forestales. En ecosistemas naturales, la aplicación de técnicas moleculares de última generación posibilita la detección e identificación de especies patógenas y de cuarentena de *Phytophthora*, superando las limitaciones del clásico aislamiento. Dada la creciente amenaza de la presencia de estos patógenos en ecosistemas con alto valor ambiental, se realizó una prospección en los encinares del Parque Natural del Montseny, situado en Cataluña, considerado Reserva de la Biosfera. El parque contiene diversas especies vegetales que son conocidos hospedantes del género *Phytophthora*. En lo que se refiere a las comunidades vegetales mediterráneas situadas en los pisos bioclimáticos inferiores, la encina (*Quercus ilex* L.) está ampliamente representada junto a otras especies del mismo género. Se muestrearon quince masas de encinares situadas a altitudes entre 293 y 868 metros. En numerosos árboles se observaron síntomas de defoliación, seca de ramas y decaimiento. El ADN extraído de muestras de raíces y de suelo se analizó mediante las técnicas: pirosecuenciación-454 y PCR a tiempo real con sonda específica para *P. cinnamomi*. Los resultados de la pirosecuenciación de ADN de raíces generaron un total de 29.308 secuencias y, según la taxonomía filogenética de *Phytophthora*, el 61.9 y 23% de las secuencias son de especies pertenecientes a los clados 2 y 4, respectivamente.

* Esta investigación ha sido financiada por el Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Agroalimentaria (266505 FP7-ERANET EUPHRESKO II).



P-111-01332

ESPECIFICIDAD PARASITARIA DE *Phytophthora parasitica* EN TOMATE Y PIMIENTODe Cara M.¹, Boix A.¹, Marín J.I.¹, Martín C.D.¹, Ruíz C.¹, Jiménez F.¹, Gómez-Tenorio M.A.¹, Tello J.C.¹

1) Grupo de Investigación AGR-200. Departamento de Agronomía. Universidad de Almería.

La especificidad parasitaria de *Phytophthora nicotianae* var. *parasitica* (*Phytophthora parasitica*) es un tema poco abordado en la bibliografía especializada. Tal vez sea debido al amplio rango de hospedadores descritos para este patógeno. Algunos autores, sin embargo, han señalado cómo *P. parasitica* puede manifestar cierta preferencia para parasitar a uno u otro hospedador. Recientemente se han descrito aislados de *P. parasitica* procedentes de cultivos intensivos de solanáceas que presentan una especificidad casi completa sobre tomate o pimiento. Teniendo en cuenta la práctica de rotación de cultivos como habitual en diversas zonas agrícolas donde se ha citado al patógeno, resulta de interés caracterizar la especificidad parasitaria de aislados originarios de dichas áreas.

En esta comunicación se presenta el resultado de evaluar 81 aislados de *P. parasitica*, procedentes de Murcia y Granada (España) y Chile, obtenidos de muestras de suelo cultivado con tomate, pimiento y otros cultivos, así como procedentes de plantas de tomate y pimiento con síntomas de podredumbre de cuello y raíces. Se inocularon los aislados sobre plantas de pimiento (cv Sonar y cv Piquillo) y sobre tomate (cv Río grande). La evaluación se realizó sobre plantas con 3 hojas verdaderas que habían crecido en vermiculita desinfectada (1 hora a 120°C en autoclave), inoculando por riego al sustrato con una mezcla de propágulos del hongo. El ensayo se mantuvo en cámara de ambiente controlado durante 30 días (23-25 °C, 14 h de luz/oscuridad y 12.000 lux), evaluando el porcentaje de plantas muertas.

Al final del experimento se encontró que todos los aislados de tomate fueron patógenos sobre tomate y únicamente el 1,5% lo fueron sobre pimiento. Ningún aislado de pimiento fue patógeno sobre tomate y únicamente el 28,5% reprodujo patogeneicidad sobre pimiento. Los aislados procedentes de otros cultivos no afectaron ni al tomate ni al pimiento. Estos resultados corroboran otros ya obtenidos anteriormente y muestran una clara tendencia a la especificidad parasitaria de *P. parasitica* respecto a su hospedador de origen.

Palabras clave: Oomicetos, *Solanum lycopersicum* y *Capsicum annum*



P-112-01461

LA PENDIENTE DEL TERRENO Y ALGUNAS PROPIEDADES EDÁFICAS COMO FACTORES MODELADORES DE LA INCIDENCIA Y SEVERIDAD DE LA MARCHITEZ DEL AGUACATE

Ramírez J.G.¹, Castañeda D.A.¹, Morales J.G.¹

1) Universidad Nacional de Colombia sede Medellín, Facultad de Ciencias Agrarias-Departamento de Ciencias Agronómicas. Medellín Colombia.

La marchitez del aguacate es una enfermedad causada por distintos agentes causales, los cuales pueden ser de tipo biótico o abiótico, donde sobresale el Oomiceto *Phytophthora cinnamomi* Rands. El desconocimiento de las variables edáficas asociadas a esta enfermedad ha generado grandes pérdidas, dado que se considera que bajo ciertas condiciones del suelo se puede favorecer el desarrollo de los patógenos implicados y a la vez son una fuente de estrés en el hospedero. El conocimiento de las propiedades edáficas que presentan relación directa con la marchitez podrá servir como base para el manejo de esta enfermedad. El objetivo de este trabajo fue determinar la relación existente entre 32 propiedades edáficas y la incidencia y severidad de la marchitez. Se realizó un análisis descriptivo del comportamiento general de las variables químicas, físicas, microbiológicas y de la enfermedad a nivel de categoría de pendiente. La importancia de las propiedades del suelo en el favorecimiento de la enfermedad se evaluó a través de un modelo de regresión lineal, en donde la variable respuesta fue la raíz cuadrada del área bajo la curva de progreso de la enfermedad y las independientes las propiedades físicas, químicas y microbiológicas estandarizadas. Estos resultados sugieren que el factor que más influencia tiene en el desarrollo de la enfermedad es la pendiente, la cual a su vez modela propiedades altamente relacionadas como el contenido de arcilla, la máxima capacidad de retención de humedad, la conductividad hidráulica, la infiltración, las poblaciones totales de hongos, bacterias y su diversidad microbiana, además de variables químicas como el contenido de azufre, cobre, manganeso y hierro. Este trabajo se convierte en la primera aproximación en Colombia de los factores edáficos que influyen sobre el desarrollo de la marchitez, además de servir de información base para definir aspectos técnicos de la siembra de este frutal.

Este trabajo fue financiado por la Universidad Nacional de Colombia sede Medellín y aportes de los autores y agricultores.



P-113-01616

OPTIMAL CONDITIONS FOR SPORANGIA FORMATION AND GERMINATION OF *Plasmopara viticola*Li H-P¹, Wen Li¹, Du S-H.¹, Zhen Z-X¹, Mercado-Blanco J.², Ran L-X¹

1) College of Forestry, Agricultural University of Hebei, Baoding, 071000, Hebei, China; E-mail: huipingli@sohu.com; longxianran@163.com

2) Departamento de Protección de Cultivos, Instituto Agricultura Sostenible (CSIC), Campus 'Alameda del Obispo' s/n, Apartado 4084, 14080 Córdoba

Downy Mildew is one of the most destructive diseases of grapevines occurring in most grape-growing areas of the world. It is caused by the obligate oomycete *Plasmopara viticola*, resulting in the reduction of production due to cluster destruction and the decrease of the wine quality due to fallen foliage. In order to obtain massive viable sporangia of *P. viticola* for screening biological and chemical control agents, optimal conditions for sporangia formation and germination of *P. viticola* were studied. The effects of light treatment (24h light/24h dark and 12h light/12h dark), temperature range (15°C, 20°C, 25°C) and nutrient availability (2% lactose, 2% sucrose, or 2% glucose) on sporangia formation and germination were assessed.

The percentage of diseased spots compared to total number of spots of the whole leaf inoculated with the same amount of sporangia suspension was calculated under above-mentioned conditions. Results showed that the best conditions for sporangia formation were at 20°C under dark and 100% humidity, and with 2% lactose supplemented in sporangia suspension. To evaluate optimal conditions for sporangia germination, factors such as temperature stimulation (sporangia suspension treated at normal temperature and 4°C before inoculation), nutrient availability (2% lactose or sterile distilled water) and illumination period (24 h light/24 h dark and 12 h light/12 h dark) were tested. The germination rate was determined on water agar. Experiments showed that optimal conditions for *P. viticola* sporangia germination were 2% lactose and stimulation at low temperature for 30 min at dark.

This research was supported by the Special Fund for Agro-Scientific Research in the Public Interest of P.R. China (201203035).



P-114-01366

STUDY OF PHYLOGENETIC RELATIONSHIPS AMONG *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* ISOLATES AND DEVELOPMENT OF A PRACTICAL TOOL FOR SIMPLE POPULATION ANALYSESCañizares M.C.¹, Gómez-Lama C.², García-Pedrajas M.D.¹, Pérez-Artés E.²

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

2) Department of Crop Protection, Instituto de Agricultura Sostenible, IAS-CSIC, Alameda del Obispo s/n. Apdo 4084, 14080 Córdoba

Fusarium wilt, caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* (*Fod*), is the most important carnation disease worldwide. Sequence analyses of partial β -tubuline (β -tub) and translation elongation factor 1 α (EF-1 α) genes, and the full-length ribosomal DNA intergenic spacer (IGS) were conducted to resolve phylogenetic relationships in a collection of *Fod* isolates obtained from the most important growing areas in Spain during the period 1998–2011, along with some representatives from Italy. We found that among the three different gene regions under study, the IGS sequence was the best choice to resolve phylogenetic relationships among *Fod* isolates. Thus, the phylogenetic tree generated with the complete IGS region was the only one showing a perfect clustering of isolates of the same molecular group (virulence grouping) and vegetative compatibility group (VCG). In order to develop a more practical tool, based on a shorter DNA sequence, to quickly analyze population structure of *Fod* isolates, we examined in detail IGS nucleotide alignments and identified a region of approximately 300pb that accumulates enough "informative" changes to resolve intraspecific relationships in *Fod*. Moreover, the "condensed" alignment of this short IGS region showing only the informative positions, revealed the existence of virulence group-discriminating positions. Thus, in this study, in addition to clarifying the phylogenetic relationships among *Fod* isolates of the recently described race-groups by using multi-gene genealogies, we have developed simple tools for the phylogenetic analyses of *Fod* population and the determination of the molecular group (level of aggressiveness) of new *Fod* isolates.

This work was supported by the Spanish Ministry of Science and Innovation (Grant AGL2010-18279), cofinanced with FEDER funds (EU)



P-115-01504

ESTUDIO DEL POSIBLE PAPEL DE LAS TIJERAS DE PODA EN LA INFECCIÓN DE PLANTAS DE VID POR HONGOS DE LA MADERAAgustí-Brisach C.¹, León M.¹, García-Jiménez J.¹, Armengol J.¹

1) Instituto Agroforestal Mediterráneo, Universidad Politécnica de Valencia, Camino de Vera s/n, 46022-Valencia, España.
E-mail: jarmengo@eaf.upv.es

En 2012-2013 se muestrearon en el momento de la poda cuatro viñedos comerciales localizados en las provincias de Albacete y Barcelona. Las tijeras de poda se lavaron con una solución estéril con Tween-20 al 0,2% tras podar grupos de 10 vides, recogiendo un total de 20 muestras por campo, correspondientes a 200 plantas. La detección molecular de hongos de la madera en las muestras líquidas se llevó a cabo mediante nested-PCR utilizando pares de cebadores específicos para *Botryosphaeriaceae* spp., *Cadophora luteo-olivacea*, *Eutypa lata*, *Phaeoacremonium* spp. y *Phaeomoniella chlamydospora*. En los cuatro campos estudiados se detectaron todos estos hongos de madera, con la excepción de *E. lata*, siendo *Ca. luteo-olivacea* y *Phaeoacremonium* spp. los más frecuentes. En algunas de las muestras se detectó la presencia simultánea de 2, 3 ó hasta 4 patógenos distintos, siendo la combinación de *Ca. luteo-olivacea* y *Phaeoacremonium* spp. la más frecuente. En las muestras también se estudió la presencia de *Ca. luteo-olivacea*, *Phaeoacremonium* spp. y *Pa. chlamydospora* por un método de filtrado y aislamiento en medio de cultivo semiselectivo, pero solo se encontró *Ca. luteo-olivacea* en muestras de tres de los cuatro viñedos. Finalmente, varetas del patrón 110 Richter de un año de edad fueron podadas con tijeras infestadas artificialmente con suspensiones de esporas o de fragmentos de micelio de *Ca. luteo-olivacea*, *Diplodia seriata*, *E. lata*, *Pm. aleophilum* y *Pa. chlamydospora*. Cuatro meses después de la poda se realizaron aislamientos de las varetas podadas, reaislándose todos los hongos. Estos resultados confirman que las tijeras de poda pueden ser una posible vía de transmisión de hongos de la madera.

Financiado por el proyecto RTA2010-00009-C03-03 (INIA), cofinanciado con fondos FEDER (EU).



P-116-01372

CRECIMIENTO DE LA PODREDUMBRE PARDAS EN FRUTOS PRODUCIDA POR *Monilinia laxa* Y *M. fructicola* A DIFERENTES TEMPERATURAS

Bernat M.¹, Segarra J.², Lamarca N.¹, Casals C.³, Usall J.¹

- 1) IRTA, Postcollita-XaRTA. Parc Científic i Tecnològic Agroalimentari de Lleida. Parc de Gardeny, edifici Fruitcentre. 25003 Lleida.
- 2) Departament de Producció Vegetal i Ciència Forestal, Universitat de Lleida, Avda. Rovira Roure, 191, 25198, Lleida.
- 3) Departament de Tecnologia d'Aliments, Universitat de Lleida, Postcollita-XaRTA, Centre Agrotecnio, Avda. Rovira Roure, 191, 25198, Lleida.

La podredumbre marrón causada por varias especies de *Monilinia* spp. produce importantes pérdidas económicas tanto en campo como en postcosecha. En el presente trabajo se pretende determinar el progreso de la enfermedad sobre frutos, producida por *M.laxa* y *M.fructicola* en función de la temperatura y del periodo de conservación.

Durante el periodo de conservación se midieron los diámetros de podredumbre producidos por *M. laxa* y *M. fructicola* en nectarinas y melocotones sometidos a diferentes temperaturas constantes: 0, 4, 10, 15, 20, 25,30 y 33°C. La relación entre la temperatura y el desarrollo de la enfermedad a lo largo del tiempo fue modelizada mediante el modelo de crecimiento logístico. Mientras que un modelo no lineal termodinámico fue utilizado para describir la relación entre el área de podredumbre y la temperatura.

Se encontraron diferencias significativas en el crecimiento de la podredumbre parda entre las dos especies de *Monilinia* spp., y no se detectaron diferencias según la variedad de fruta utilizada. La máxima velocidad de crecimiento para ambas especies patógenas fue alrededor de los 25 °C, aunque la velocidad de crecimiento de *M. laxa* fue algo menor que la de *M. fructicola*. Asimismo, el óptimo de crecimiento predicho por el modelo termodinámico fue menor para *M. laxa* que para *M. fructicola*. En ambas especies la velocidad de crecimiento a altas temperaturas (30-33 °C) fue considerablemente menor a la tasa de crecimiento máxima. A 0°C, *M. laxa* tuvo un crecimiento inicial más rápido que *M. fructicola*, aunque a los 72 días de conservación *M. fructicola* alcanzó una mayor área de podredumbre que *M. laxa*.

Este trabajo ha sido financiado por el proyecto AGL2011-30472-C02-02.



P-117-01375

DINÁMICA DE LA INFECCIÓN DE LOS CORTES DE PODA DE LA VID POR HONGOS PATÓGENOS CAUSANTES DE ENFERMEDADES DE LA MADERA EN UN VIÑEDO DEL Penedès**Elena G.¹, Luque J.¹, Reyes J.², Barrios G.²**

1) IRTA

2) Generalitat de Catalunya

Los cortes de poda constituyen la vía habitual de entrada de los hongos causantes de enfermedades de la madera de la vid. El objetivo de este trabajo consistió en determinar la dinámica de la infección patógena que se da de forma natural en un viñedo de Cabernet Sauvignon de la D.O. Penedès (Barcelona). Para ello, se podaron 540 sarmientos de 90 cepas, distribuidos en tres grupos de 30 cepas con 6 sarmientos por cepa. Los sarmientos del primer grupo se dejaron al descubierto, sujetos a infección natural, durante el primer mes posterior a la poda. Los sarmientos restantes se protegieron con una malla de Nytex (con una luz de 5 µm) para evitar infecciones no deseadas. En los dos meses siguientes se procedió alternativamente a proteger o desproteger los sarmientos para que cada grupo estuviera expuesto a las infecciones naturales por periodos exactos de un mes y de forma sucesiva. Al final del ensayo se recolectaron todos los sarmientos y se procedió al aislamiento e identificación de los hongos patógenos de la vid, calculándose además las frecuencias de infección de cada taxón. Como tratamiento control se emplearon 180 sarmientos adicionales, que se podaron y permanecieron protegidos con malla durante todo el ensayo.

Durante el experimento se aislaron distintas especies de las familias Diatrypaceae y Botryosphaeriaceae, además de *Phaeomoniella chlamydospora*. El porcentaje de hongos diatrypáceos se situó por debajo del 5% en los tres meses, mientras que el porcentaje de las especies de Botryosphaeriaceae fluctuó alrededor de ese mismo valor. En ambos casos, no se observó ninguna tendencia clara en las infecciones a lo largo del periodo experimental. En contraste, el porcentaje de aislamiento de *P. chlamydospora* se redujo drásticamente en los dos últimos meses del ensayo.

* Financiado por INIA (Proyecto RTA2010-00009-C03) y fondos FEDER (UE). Georgina Elena recibe financiación de INIA para la realización de su tesis doctoral.



P-118-01576

BIODIVERSIDAD DE HONGOS PATÓGENOS AISLADOS DE GALERÍAS DE *Xylotrechus arvicola* (Olivier) EN MADERA DE VID**García Benavides, P.¹; Martín, P.¹, Ocete, C.A.², Maistrello, L.³, y Ocete, R.²**¹ Centro Regional de Diagnóstico. Junta de Castilla y León. Apdo. 61, 37080 Salamanca. E-mail: pgb@usal.es² Laboratorio de Entomología Aplicada, Universidad de Sevilla, Sevilla 41012.³ Dipartimento di Scienze della Vita, Università di Modena and Regio Emilia, Pad. Besta, Regio Emilia 42122, Italia.

El decaimiento de la vid causado por hongos que atacan la madera amenaza seriamente la viticultura mundial. En España el insecto invasor *Xylotrechus arvicola* (Coleoptera, Cerambycidae) esta en trance de volverse un serio azote en varias zonas vitivinícolas con Denominación de Origen.

Este trabajo ha permitido identificar las especies de hongos que se desarrollan en las galerías excavadas por las larvas de *X. arvicola* en el interior de las cepas con el fin de revelar la posibilidad de una relación entre los hongos xilófagos y el insecto.

Muestras de madera de Tempranillo y *Prunus pisardi* con galerías del insecto *X. arvicola* se recogieron en los viñedos de la D. O. de la Rioja y se analizaron para detectar la presencia de hongos utilizando a la vez técnicas morfológicas y moleculares basadas en la secuenciación de las zonas entre los espaciadores intergénicos (ITS), mediante la secuenciación del ADN que codifica los ARNs ribosómicos (ADNr).

Entre las veinte diferentes especies de hongos identificados, siete pertenecían a hongos asociados al decaimiento de la vid (yesca, eutypa, enfermedad de Petri), seis eran agentes patógenos de plantas, seis saprofitos y uno entomopatógeno (*Beauveria basiana*).

El hecho de que 65% de los hongos detectados en el interior de las galerías excavadas por *X. arvicola* pertenezcan a especies reconocidas de agentes patógenos abre la posibilidad de que este insecto invasor, aparte del deterioro progresivo que causa directamente, podría facilitar la transmisión de estas enfermedades a las plantas lo que amenazaría todavía mas la sanidad de los viñedos con la proliferación de los agentes patógenos.

Este trabajo es un primer paso hacia el reconocimiento de la acción conjunta de los hongos patógenos y el insecto *X. arvicola* sugiriendo el posible papel de este insecto en la transmisión de los hongos.



P-119-01377

IMPORTANCIA DE LOS RESTOS DE PODA COMO FUENTE DE INÓCULO DE *Diplodia seriata*, AGENTE CAUSAL DEL 'BRAZO MUERTO' DE LA VIDElena G.¹, Luque J.¹

1) IRTA

El objetivo de este estudio fue el de evaluar la dinámica de la liberación de conidios de *Diplodia seriata* en restos de poda de la vid infectados de forma natural por el hongo, para determinar así el papel de dichos restos como fuente de inóculo. En Noviembre de 2012 se recogieron sarmientos podados con cuerpos fructíferos de *D. seriata* y se prepararon tres muestras de seis sarmientos cada una. En tres sarmientos de cada muestra se realizó un recuento al azar de 50 picnidios para determinar si contenían o no conidios. En los tres sarmientos restantes se contó el número de picnidios existentes en un fragmento del sarmiento. Los fragmentos se dispusieron separadamente en tubos con agua destilada estéril y en agitación para obtener una suspensión de conidios. Posteriormente se estimó la concentración de conidios de cada suspensión así como el porcentaje de germinación de los conidios en 3 réplicas por sub-muestra. Este proceso se realizó a la recogida de los sarmientos y al cabo de 6, 12 y 18 meses posteriores a la recolección.

A lo largo del ensayo se observó una reducción progresiva del número de picnidios con conidios. Además, el número de conidios por picnidio sufrió una fuerte reducción entre los 6 meses, con unos 200 conidios por picnidio, y los 12 meses, con unos 80, para llegar apenas a 25 a los 18 meses. El porcentaje de germinación también se redujo a lo largo del experimento, del 63% de la evaluación inicial al 44% al final del ensayo, lo que sugiere el envejecimiento de los conidios. Los resultados obtenidos confirman la reducción de la presión de inóculo de *D. seriata* con el tiempo. Sin embargo, al cabo de 18 meses de la recolección todavía existían conidios con capacidad infectiva en los restos de poda.

* Financiado por INIA (Proyecto RTA2010-00009-C03) y fondos FEDER (UE). Georgina Elena recibe financiación de INIA para la realización de su tesis doctoral.



P-120-01430

LAS ASCOSPORAS COMO INÓCULO PRIMARIO PARA LAS EPIDEMIAS DE LA MANCHA OCRE DEL ALMENDRO CAUSADA POR *Polystigma amygdalinum*

Lovera M.¹, Luque F.², Roca L.F.², Arquero O.¹, Trapero A.²

1) Departamento de Fruticultura, IFAPA Centro de Córdoba, Alameda del Obispo s/n, 14071-Córdoba 2) Grupo Patología Agroforestal, Dpto. Agronomía, Universidad de Córdoba. Campus de Rabanales, Edif. C4, 14071-Córdoba

La Mancha ocre de la hoja, causada por el ascomiceto *Polystigma amygdalinum*, constituye actualmente una enfermedad emergente del cultivo del almendro en España. Entre las razones determinantes de su emergencia, se incluyen la elevada susceptibilidad de las nuevas variedades de almendro de floración tardía y el posible escape a los tratamientos fungicidas habituales. En este trabajo se ha investigado la segunda hipótesis mediante un seguimiento del inóculo primario en las hojas caídas al suelo durante el período Septiembre 2013 a Junio de 2014. Hojas de almendro del cultivar susceptible Guara, afectadas de mancha ocre se dispusieron, enterradas o superficialmente, en mallas de nylon bajo la copa de varios almendros en un campo experimental de Córdoba. Asimismo, se dispusieron cerca de las hojas portas impregnados de una sustancia adhesiva para la captura de esporas aéreas. Semanalmente se tomaron muestras de ambos tipos de hojas y de los portas y se determinó y cuantificó el inóculo del patógeno presente en las mismas. Las únicas estructuras del patógeno observadas en los restos de hojas o en las trampas se correspondieron con el estado sexual del patógeno. Los peritecios de *P. amygdalinum* se formaron al final del otoño y la producción de ascosporas fue más elevada y prolongada en las hojas de la superficie del suelo que en las enterradas. El período productivo se extendió entre enero y junio en las hojas superficiales y entre enero y marzo para las enterradas, con el máximo concentrado en febrero-marzo, si bien en las hojas enterradas éste no estuvo bien definido existiendo grandes oscilaciones entre muestreos. El máximo de producción de ascosporas ocurrió tras la floración de los árboles, coincidiendo con el desarrollo de las nuevas hojas y confirmando que los tratamientos habituales, aplicados antes o durante la floración, no son efectivos contra esta enfermedad.

Esta investigación ha sido financiada por el proyecto Transforma de Fruticultura del IFAPA, Junta de Andalucía.



P-121-01500

***Urtica dioica*, HUÉSPED ALTERNATIVO DEL FITOPLASMA CAUSANTE DE LA MADERA NEGRA O BOIS NOIR, EN VIÑEDOS DE LA RIOJA Y NAVARRA**Laviña A.¹, Sabaté J.¹, Batlle A.¹

1) Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentàries (IRTA). Dept de Protecció Vegetal Sostenible

La enfermedad de la madera negra o Bois Noir, causada por el fitoplasma '*Candidatus phytoplasma solani*', fue identificada por primera vez en España en 1994, en áreas vitivinícolas de La Rioja, Navarra, Aragón y Cataluña (1). Desde entonces se han llevado a cabo distintas prospecciones para determinar la incidencia de la enfermedad y la presencia de vectores. La incidencia en las parcelas afectadas oscila entre un 3% y 75%, dependiendo de las áreas. El principal vector del fitoplasma a vid, el ciixido *Hyalesthes obsoletus*, se identificó hasta 2010 en poblaciones muy bajas y siempre vinculadas a *Convolvulus arvensis*. El porcentaje medio de individuos portadores del fitoplasma fue del 55 % (2). Se han determinado dos aislados de stolbur causantes del BN, el aislado *Tuf-a* ligado a la planta huésped *Urtica dioica* y el aislado *Tuf-b* ligado a *Convolvulus arvensis*.

La incidencia de la enfermedad, bastante elevada en algunas parcelas de Navarra y La Rioja y la determinación en las vides de estas parcelas del aislado *Tuf-a* de stolbur, no identificado hasta entonces en los individuos de *Hyalesthes* capturados, hizo plantear una nueva prospección de este vector en plantas de ortiga, no siempre cercanas a los viñedos. Durante 2013 y 2014 se han realizado seguimientos de *H.obsoletus* en los dos huéspedes principales de este insecto, *C.arvensis* y *U.dioica*, en parcelas de La Rioja y de Navarra. Los resultados obtenidos en 2013 indicaron que las poblaciones en *U.dioica* eran más elevadas (7-30 individuos por captura) que las que se venían identificando hasta entonces en *C.arvensis* (0,25-5 individuos por captura) en estas regiones y que el pico de población en *U.dioica* (primera quincena de agosto), era más tardío que el que se obtenía para *C.arvensis* (primera quincena de julio). Los resultados obtenidos indican que los *H.obsoletus* capturados en *U.dioica* son los principales responsables de la transmisión del aislado *Tuf-a* de stolbur y por tanto de la enfermedad a las vides afectadas de La Rioja y Navarra. Referencias: (1) Laviña et al.1995.Plant Disease 70:1075. (2) Sabaté et al. 2014 European Journal of Plant Pathology 39:185–193

Trabajo financiado por el proyecto INIA RTA2011-0067-C04



P-122-01509

ESCALA DIAGRAMÁTICA PARA LA EVALUACIÓN DE DAÑOS EN FRUTOS DE NÍSPERO CAUSADOS POR *Fusicladium eriobotryae*

González-Domínguez E.¹, Martins R.B.², Del Ponte E.M.³, Michereff S.J.⁴, García-Jiménez J.¹, Armengol J.¹

- 1) Instituto Agroforestal Mediterráneo, Universidad Politécnica de Valencia, Camino de Vera s/n, 46022 Valencia. E-mail: jarmengo@eaf.upv.es
- 2) Campus Arapiraca, Universidade Federal de Alagoas, 57309-005 Arapiraca, AL, Brasil
- 3) Departamento de Fitossanidade, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 91540-000 Porto Alegre, RS, Brasil
- 4) Departamento de Agronomia, Universidade Federal Rural de Pernambuco, 52171-900 Recife, PE, Brasil

Fusicladium eriobotryae, agente causal del moteado del níspero, puede atacar brotes jóvenes, hojas y frutos, siendo los daños más graves sobre frutos, ya que deprecian su valor comercial. En éstos, los síntomas comienzan en forma de manchas circulares cloróticas, que al incrementar su tamaño se vuelven de color marrón-oliváceo y aspecto aterciopelado, pudiendo cubrir, en el caso de ataques severos, gran parte de su superficie.

En los últimos años se ha llevado a cabo un amplio programa de investigación para dilucidar los principales aspectos relacionados con la biología y epidemiología de *F. eriobotryae*. En este contexto, se ha desarrollado una escala diagramática (ED) como una herramienta para la evaluación de la severidad de la enfermedad en frutos.

Este diagrama consiste en 8 imágenes en blanco y negro de frutos afectados, con valores de severidad entre el 2% y el 98%. Para su validación, un grupo de 20 personas (10 de ellos con experiencia en la evaluación de síntomas de enfermedades y 10 sin experiencia), evaluaron tres veces el mismo conjunto de 50 imágenes de frutos con distintos grados de infección, la primera sin la ayuda de la ED y las otras dos usando la ED como ayuda. Para comparar las mediciones obtenidas con los valores reales de severidad, se utilizó el coeficiente de correlación de concordancia de Lin (CCC). La ED mejoró significativamente la precisión de las estimaciones sólo para el grupo de los evaluadores sin experiencia (CCC=0,82 sin ED y CCC=0,95 con ED).

Este trabajo ha sido financiado por la Cooperativa Agrícola de Callosa d'En Sarrià (Alicante).



P-123-01365

CHARACTERIZATION OF A NEW PARTITIVIRUS STRAIN IN *Verticillium dahliae* PROVIDES FURTHER EVIDENCE OF THE SPREAD OF THE HIGHLY VIRULENT DEFOLIATING PATHOTYPE THROUGH NEW INTRODUCTIONSCañizares M.C.¹, Pérez-Artés E.², García-Pedrajas N.E.³, García-Pedrajas M.D.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
- 2) Department of Crop Protection, Instituto de Agricultura Sostenible, IAS-CSIC, Alameda del Obispo s/n. Apdo 4084, 14080 Córdoba
- 3) Department of Computing and Numerical Analysis, C2 Building 3rd Floor, Campus Universitario de Rabanales, 14071 Córdoba

The soilborne pathogen *Verticillium dahliae*, causal agent of Verticillium wilt, has a worldwide distribution and a plethora of hosts of agronomic value. The spread of a highly virulent defoliating (D) pathotype has greatly increased the threat posed by *V. dahliae* in olive trees. For disease management, it is important to know if the D pathotype is spreading from contaminated material worldwide, or if D isolates may have originated from native *V. dahliae* populations several times. In this work, we provide evidence to support the hypothesis of long-distance movement of *V. dahliae* isolates. We identified a double-strand RNA mycovirus in an olive D isolate from Turkey. Sequencing and phylogenetic analysis clustered it with members of the family *Partitiviridae*. Interestingly, it was most similar to a partitivirus previously identified in a *V. dahliae* cotton isolate from China (VdPV1), with sequence identities of 94% and 91% at the nucleotide level for RNA1 and RNA2, respectively. It corresponded therefore to a strain of the established species, and we designated it VdPV1-ol (VdPV1 from olive). *V. dahliae* has been described as an asexually-reproducing fungus in which exchange of genetic material is restricted to isolates in the same vegetative compatibility group. Mycoviruses are among the genetic elements that can be readily exchanged between compatible isolates. The identification of the same viral species in these two geographically distant fungal isolates provides evidence of their relationships. We propose that micoviruses can serve as fingerprints to study geographical flows in *V. dahliae*.

This work was supported by the Spanish Ministry of Science and Innovation (Grant AGL2009-13445), and the Junta de Andalucía (Grant FEDER P07-TIC-02682).



P-124-01440

CARACTERIZACIÓN DE PATRONES DE INFECCIÓN DE ESPECIES DEL GÉNERO *Potyvirus* EN ECOSISTEMAS SILVESTRES

Rodríguez-Nevado C.¹, Gavilán R.G.², Pagán I.¹

1) Centro de Biotecnología y Genómica de Plantas (UPM-INIA)

2) Departamento de Biología Vegetal II, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid

Con la intensificación de la agricultura, la proporción de ecosistemas silvestres que lindan con agroecosistemas es cada vez mayor. La zona de contacto entre ambos es permeable, de modo que frecuentemente la emergencia de enfermedades en los agroecosistemas se asocia con la dispersión de patógenos desde ecosistemas silvestres adyacentes. Se ha propuesto que el riesgo de emergencia estaría determinado por el número, composición y distribución espacial de las especies de plantas en dichos ecosistemas silvestres. La reducción del número de especies de plantas aumentaría la densidad de individuos susceptibles al patógeno, incrementando su prevalencia y la probabilidad de transmisión del patógeno, lo que aceleraría su velocidad de evolución. Estos procesos favorecerían la emergencia del patógeno. Sin embargo, apenas existen datos de campo a este respecto, especialmente en el caso de virus de plantas, debido a la falta de información sobre patrones de infección en ecosistemas silvestres. En este estudio, se caracterizaron los patrones de infección de especies del género *Potyvirus* en cinco poblaciones de encinar y cinco de bosque de ribera en la Meseta Central de la Península Ibérica, donde estos ecosistemas generalmente lindan con agroecosistemas. Para ello, se inventariaron y muestrearon las especies de plantas presentes en cada población, y se estimó la prevalencia de especies de potyvirus, su gama de huéspedes, y la estructura genética de sus poblaciones. Los resultados indican que los bosques de ribera y los encinares difieren en riqueza, composición y distribución de especies de plantas. Además, los potyvirus son patógenos importantes en estos ecosistemas, ya que su prevalencia fue del 15-20%, llegando al 80% en algunas especies huéspedes. La gama de huéspedes de cada especie de potyvirus determinó la estructura genética de sus poblaciones. Estos resultados permitirán abordar el papel de la composición de los ecosistemas silvestres en la emergencia de nuevas virosis.



P-125-01475

EL VIRUS DEL AMARILLO DE LAS CUCURBITÁCEAS TRANSMITIDO POR PULGONES INDUCE CAMBIOS EN SU PLANTA HUÉSPED QUE OPTIMIZAN SU DISPERSIÓNCarmo-Sousa M.¹, Moreno A.¹, Garzo E.¹, Plaza M.¹, Fereres A.¹

1) Instituto de Ciencias Agrarias. Consejo Superior de Investigaciones Científicas - CSIC.

Los patógenos vegetales pueden modificar directamente -mediante su presencia en el vector- o indirectamente -mediante alteraciones físico-químicas en la planta resultantes de la infección- el comportamiento y la biología de los insectos vectores y con ello su dispersión. En este trabajo se evaluaron los efectos directo e indirecto del virus persistente *Cucurbit aphid-borne yellow virus* (CABYV, *Polerovirus*) sobre la preferencia, eficacia biológica y comportamiento alimenticio del pulgón *Aphis gossypii*. Para poder conocer si existen efectos directos del virus sobre la eficacia biológica y el comportamiento alimenticio de *A. gossypii* se realizaron ensayos con pulgones virulíferos sobre plantas de pepino (*Cucumis sativus* L.), especie susceptible al virus, y sobre algodón (*Gossypium hirsutum* L.), especie no susceptible a CABYV. Para saber si existe un efecto indirecto mediado por la planta se comparó la respuesta de pulgones no virulíferos en plantas de pepino infectadas con CABYV frente a plantas sanas. No hubo diferencias entre los pulgones CABYV-virulíferos en los ensayos realizados de comportamiento alimenticio y eficacia biológica del vector, sugiriendo que CABYV no ejerce efecto directo sobre *A. gossypii*. Sin embargo, nuestros resultados evidencian un efecto indirecto mediado por la planta CABYV-infectada sobre la actividad alimenticia a nivel de floema: los pulgones invierten menos tiempo en localizar el floema, realizan un mayor número de pruebas floemáticas y permanecen durante periodos más largos alimentándose de forma continuada de floema en plantas infectadas con el virus. Estos resultados sugieren que la infección por CABYV altera el comportamiento alimenticio de su vector optimizando la adquisición viral, la cual para virus persistentes se realiza mediante la ingestión continuada de floema. Dichos resultados evidencian que el virus induce cambios en la planta que modifican el comportamiento del vector para facilitar su dispersión.

Este trabajo ha sido financiado por MICINN-Plan Nacional I+D+I (AGL2010-22196-C02-01). Carmo-Sousa, M., es becaria JAE-Pre del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC).



P-126-01537

LA TRANSMISIÓN DE *Cucumber green mottle mosaic virus* EN DISTINTOS SUSTRATOS Y AGUA DE RIEGO EN CULTIVOS DE PEPINO

Ruiz L.¹, Simón A.¹, Fuentes J.G.¹, Belmonte A.¹, García M.C.¹, Janssen D.¹

1) IFAPA Centro La Mojonera, Camino de San Nicolás 1, 04745 La Mojonera (Almería)

El virus del mosaico verde jaspeado del pepino (*Cucumber green mottle mosaic virus*, CGMMV), pertenece al género *Tobamovirus* y fue detectado por primera vez en España en los años 90, en cultivos de pepino de la provincia de Almería. Desde ese momento, se han producido infecciones que han puesto en peligro el normal desarrollo de este cultivo. La alta capacidad de infección del virus, común en todos los representantes del género, y su transmisión por contacto, han puesto de manifiesto la necesidad de abordar un estudio integral sobre la epidemiología de CGMMV.

Se plantearon dos objetivos principales: a) estudio de la permanencia de CGMMV en distintos sustratos y b) transmisión del virus por agua de riego. Para el desarrollo del primero, durante la campaña de otoño de 2013 (octubre-enero 2014), se cultivaron plantas de pepino cv. Estrada, en 5 sustratos diferentes (perlita, lana de roca, fibra de coco, turba y arena). Las plantas fueron inoculadas manualmente y dejadas hasta final de cultivo. Los sustratos se mantuvieron en sus contenedores originales para volverlos a sembrar la campaña de primavera (marzo-junio 2014) y estudiar la persistencia del virus en suelo.

Para evaluar la transmisión del virus por agua potencialmente infectada de partículas virales; durante las campañas de otoño y primavera se recogió el agua de drenaje y se utilizó como agua de riego en plantas sanas de pepino. La posible presencia de CGMMV transmitido por el agua de riego se analizó mediante ELISA. Los resultados preliminares sugieren que no existe riesgo de contagio de CGMMV por agua de riego en cultivos de pepino, en condiciones de campaña de otoño en Almería. En cuanto a la persistencia en el sustrato, el porcentaje de plantas infectadas en campaña de primavera ha alcanzado el 100% independientemente del tipo de sustrato que fue infectado con anterioridad.

Leticia Ruiz tiene un contrato cofinanciado al 80% por el Programa Operativo FSE de Andalucía 2007-2013. "Andalucía se mueve con Europa"

Este trabajo fue financiado por el proyecto INIA RTA 2012-00003-00-00



P-127-01559

GENETIC VARIABILITY AND EVOLUTION OF *Cucumber vein yellowing virus* IN THE MEDITERRANEAN BASINVelasco L.¹, Salem N.², Willemsen A.³, Lapidot M.⁴, Mansour A.², Rubio L.⁵, Galipienso L.⁵

1) Instituto Andaluz de Investigación y Formación Agraria (IFAPA) (Spain)

2) University of Jordan (Jordan)

3) Instituto de Biología Molecul y Celular de Plantas (IBMCP) (Spain)

4) Institute of Plant Sciences. ARO, Volcani Center (Israel) 5) Instituto Valenciano de Investigaciones (IVIA)(Spain)

Cucumber vein yellowing virus (CVYV) belongs to the genus *Ipomovirus* of the family *Potyviridae*. CVYV causes severe damage and serious economic losses in cucumber and other cucurbit crops in different countries of the Mediterranean basin (the present distribution area). The genetic variability of CVYV was studied to gain insight into the factors involved in the evolution and epidemiology of this virus. Nucleotide sequences of three genomic regions encoding P1, P3 and CP polypeptides of 47 isolates of CVYV from Spain, France, Portugal, Lebanon, Israel, Jordan and Tunisia were determined or retrieved from GenBank. Our analyses showed four putative recombination events in CVYV isolates from Jordan. There were two subpopulations from the genetic point view, with low genetic flow between them: The Eastern Mediterranean subpopulation (Israel, Tunisia, Lebanon and Jordan) and the South-Western European subpopulation (Spain, Portugal and France), having the first much higher nucleotide diversity (0.099) than the European subpopulation (0.013). These results suggest that the Eastern Mediterranean basin is the cradle of CVYV and a unique introduction and rapid spread of CVYV in Europe. This hypothesis was supported by phylogenetic analysis that revealed two well supported main clades: Clade I contained CVYV isolates from Lebanon, Israel, Jordan and Tunisia whereas Clade II was composed of isolates from Lebanon, Israel, Jordan and Europe. The European isolates clustered in a subclade which was closely related to one isolate from Israel and one from Jordan. All European isolates were mild and the damage is easily controlled by using cucumber resistant cultivars whereas the Israeli and Jordanian isolates induced strong symptoms even in plants carrying resistance genes. This genetic proximity between mild and severe isolates suggests that a few amino acid substitutions are sufficient to transform CVYV from mild to severe. These results are a warning of a certain risk of emergence of severe CVYV isolates in Europe by migration or mutation.



P-128-01574

SEGUIMIENTO EN PARCELAS DE ALFALFA DE LA INCIDENCIA DEL VIRUS DEL MOSAICO DE LA ALFALFA, COMPARATIVA ENTRE DOS MANEJOS DEL CULTIVO

Monge P.¹, Luis M.¹, Escriu F.¹

1) Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria de Aragón

El virus del mosaico de la alfalfa (AMV, género *Alfamovirus*, familia *Bromoviridae*) se encuentra distribuido por todo el mundo a través de la alfalfa, su principal huésped natural. AMV se transmite por semilla en alfalfa y además puede transmitirse eficazmente por pulgones de forma no persistente, lo que le confiere una alta capacidad de dispersión. El carácter perenne de la alfalfa, que frecuentemente se cultiva durante periodos de hasta cinco años, favorece esta capacidad de dispersión, convirtiendo a este cultivo en un importante reservorio de inóculo, que constituye un riesgo para otros cultivos susceptibles, entre los que se encuentran tomate, pimiento y otros cultivos hortícolas de interés económico. En trabajos anteriores, nuestro grupo ha analizado la presencia de AMV en alfalfares de distinta edad de dos importantes zonas productoras españolas (Valle del Ebro y Ampurdán), encontrando el virus en todos los alfalfares analizados con incidencias que aumentan con la edad del alfalfar y que frecuentemente alcanzan el 100% a partir del tercer año de cultivo. En este trabajo se ha realizado un seguimiento de la incidencia de AMV desde el primer año de cultivo en seis parcelas de alfalfa cultivadas bajo dos sistemas de control de plagas, uno integrado en el que se dejaron bandas de alfalfa sin cortar para refugio de enemigos naturales, que variaban de posición en cada corte, y otro convencional con utilización de productos fitosanitarios. La evolución de la incidencia de AMV en estas parcelas se comparó mediante modelos de regresión logística, observándose diferencias de incidencia entre ambos manejos ya en los dos primeros años de cultivo (mayor bajo cultivo en bandas). Entre las parcelas bajo cultivo convencional, a partir del tercer año, se observaron además diferencias en la tasa temporal de incremento de la incidencia.

Este trabajo ha sido financiado con fondos del Programa INIA-RTA.



P-129-01617

INCIDENCIA DE CINCO VIRUS DE LA VID EN SEIS REGIONES VINÍCOLAS DE CATALUÑA Y ESTUDIO DE LA DISEMINACIÓN DE GFLVLaviña, A.¹, Mayol, J.¹, Ornat, C.², Batlle, A.¹.¹Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentàries (IRTA), Dept. de Protecció Vegetal Sostenible. Ctra. Cabrls Km 2, 08348 Cabrls, Barcelona, Spain.²Escola Superior d'Agricultura de Barcelona (ESAB, UPC)
amparo.laviña@irta.cat

Se han descrito más de 60 virus en vid, causando muchos de ellos desordenes en la planta que se traducen en pérdidas de vigor, de longevidad, corrimiento de la uva y menor calidad de la cosecha en general. La legislación española establece que el material vegetal de vivero debe estar libre de 5 virus: Grapevine fan leaf virus o entrenudo corto infeccioso (GFLV), Arabis mosaic virus (ArMV), Grapevine leaf roll virus o enrollado 1 y 3 (GLRV1 i 3) y Grapevine fleck virus (GFKV). En el año 2012 se realizó una prospección para determinar la incidencia y distribución de estos cinco virus en distintas D.O. de Cataluña. La prospección se realizó al azar determinando un número de puntos a muestrear proporcional al número de Ha cultivadas en cada D.O.

Los resultados obtenidos mostraron que los virus más extendidos eran GFLV, GFKV y GLRV-3. La técnica de la PCR a tiempo real con sondas TaqMan se mostró más sensible para la detección de casi todos los virus. Mediante RT-PCR se determinó un 56 % de muestras con GFLV, un 30 % con GFKV, un 26 % con GLRV-3 y un 2,6 % con GLRV-1. La D.O donde se determinó una mayor incidencia de todas las virosis fue Priorat-Montsant con casi un 80% de muestras con GFLV, 20% con GLRV-3 y 29% con GFKV, seguida de Penedés y Terra Alta. En Costers del Segre, Empordà y Alella se determinaron unas incidencias ligeramente menores. Fueron habituales las infecciones mixtas, siendo las más frecuentes GFLV + GFKV (18%) y GFLV + GLRV-3 (16,5%). La infección triple de estos tres virus se presentó en un 6,7% de las muestras.

Debido al alto porcentaje de GFLV en algunas parcelas del Priorato y Penedés, se realizó en estas zonas una prospección con el fin de conocer la existencia de nematodos transmisores de este virus.

En las parcelas estudiadas, no se identificó el vector de GFLV, *Xiphinema index*. En estas parcelas se determinaron 12 especies de nematodos fitoparásitos y en dos de ellas individuos de la especie *Xiphinema*. Algunos individuos de estas especies resultaron positivos a GFLV mediante PCR.

Los resultados obtenidos en este trabajo indican una alta incidencia de virosis en casi todas las áreas estudiadas, indicando la necesidad de un mayor control del material vegetal que se produce.



P-130-01329

DINÁMICA DE LA HUMECTACIÓN FOLIAR EN PARCELAS DE CÍTRICOS CON DIFERENTES SISTEMAS DE RIEGO: ANÁLISIS MEDIANTE SERIES TEMPORALES

Bassimba D.D.M.¹, Intrigliolo D.S.², Dalla-Marta A.³, Orlandini S.³, Vicent A.⁴

1) Instituto de Investigação Agronómica (IIA), Chianga, 2104 Huambo, Angola

2) Centro para el Desarrollo de la Agricultura Sostenible, Instituto Valenciano e Investigaciones Agrarias (IVIA), Moncada, 46113 Valencia

3) Dipartimento di Science delle Produzioni Agroalimentari e dell'Ambiente, Università degli Studi di Firenze, 50144 Florencia, Italia

4) Centro de Protección Vegetal y Biotecnología, Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA), Moncada, 46113 Valencia

La duración de la humectación foliar (DHF) es un parámetro micro-meteorológico que determina la severidad la mancha marrón de las mandarinas causada *Alternaria alternata*. El cultivo de los cítricos en las zonas semi-áridas del Mediterráneo precisa de riegos, que pueden aplicarse en grandes volúmenes y baja frecuencia (riego por inundación) o pequeños volúmenes y alta frecuencia (riego localizado). Algunos estudios indican que el riego por inundación podría incrementar la DHF y el riesgo de infección en las parcelas, pero no existe ninguna referencia específica en cítricos. Esta información permitiría determinar el sistema de riego más adecuado para los programas de gestión integrada de la mancha marrón. Se seleccionaron tres parcelas homogéneas de mandarina 'Orogrande' con riego por inundación y otras tres con riego localizado en Carlet, Valencia. Durante 2012 y 2013 se registraron en cada parcela los valores de DHF, contenido de humedad del suelo, humedad relativa, temperatura y pluviometría. La DHF promedio fue de 4-8 horas/días y la DHF máxima de 20-23 horas/día. Debido a la imposibilidad de control experimental sobre el factor 'sistema de riego', se optó por analizar la dinámica de la DHF en las parcelas mediante un modelo de series temporales univariante auto-regresivo de media móvil no estacional ARIMA (1,1,1). El valor del estimador del parámetro auto-regresivo osciló entre 0.106 ± 0.090 y 0.356 ± 0.089 y el de media móvil entre -0.980 ± 0.042 y -0.821 ± 0.057 . El MAE de los modelos fue de 3,17-3,91 horas. No se detectó ninguna asociación entre los riegos por inundación y la DHF, ni en los análisis gráficos de los residuos y ni en los tests de intervenciones. Los aumentos en la DHF se relacionaron de forma significativa únicamente con algunos eventos de lluvia. El posible efecto del riego por inundación sobre la DHF quedaría soslayado por los altos niveles de humedad relativa ($72,7\% \pm 19,6$) habituales en la zona, que favorecen la formación de rocíos prolongados.

INIA RTA2010-00105-00-00-FEDER



P-131-01450

REDES TRÓFICAS EDÁFICAS EN OLIVARES Y VIÑEDOS CONVENCIONALES Y ECOLÓGICOS: IMPLICACIONES EN EL ESTADO FITOPATOLÓGICO DEL SUELOSánchez-Moreno S.¹, López-Pérez J.A.²

1) Unidad de productos Fitosanitarios (DTEVPF), Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria, Crta. Coruña km 7,5 28044 Madrid.

2) Centro Agrario de Marchamalo, INCRECYT, JCCM, Camino de San Martín s/n, 19180 Marchamalo, Guadalajara.

Los productos fitosanitarios han jugado un papel fundamental en la conquista de la seguridad alimentaria. Sin embargo, un uso excesivo de pesticidas puede tener consecuencias muy perniciosas para los agroecosistemas, especialmente para el suelo, que alberga miles de especies de organismos que forman una "diversidad oculta" que ha despertado un gran interés científico en los últimos años. De estos organismos los nematodos son, probablemente, los organismos edáficos que poseen una mejor capacidad indicadora del efecto del manejo agrario en la funcionalidad del agroecosistema.

Con el objetivo de estudiar si el manejo ecológico implica una mejora en la estructura de las redes tróficas edáficas con respecto al manejo convencional, se ha estudiado la comunidad de nematodos edáficos beneficiosos y fitoparásitos en 6 pares de fincas (3 olivares (OLI) y 3 viñedos (VIN)), cada par consistente en dos fincas, una ecológica (ECO) y otra convencional (CONV), en el entrono de Valdepeñas (Ciudad Real).

Los resultados obtenidos hasta el momento indican que las diferencias en la diversidad de la comunidad nematológica entre las formas de manejo no fueron tan acusadas como cabría esperar, y que un manejo ecológico no es garantía de una mejor condición de la red trófica edáfica. A pesar de ello, la forma de manejo tuvo un efecto significativo sobre la abundancia de nematodos fitoparásitos, y se encontraron valores más altos del Índice de Parásitos de Plantas en los viñedos ecológicos que en los convencionales. Además, la red trófica fue más compleja en los sistemas ecológicos que en los convencionales. Las huellas metabólicas estructurales de la comunidad de nematodos, indicadoras de la capacidad del suelo de suprimir especies plaga, indicaron que existe un gradiente en la supresividad edáfica OLI-ECO > OLI-CONV > VIN-ECO > VIN-CONV.

*Este trabajo ha sido financiado por el Plan Nacional de I+D+I, a través del proyecto AGL2012-34199.

Resúmenes de pósteres

*Control de enfermedades de plantas
(P-132 a P-230)*





P-132-01498

EFFECTIVIDAD BIOLÓGICA *in vitro* DE ANTIBIÓTICOS SOBRE BACTERIAS ASOCIADAS AL ANILLAMIENTO DEL PEDÚNCULO DEL AGUACATECervantes E.A.¹, Gutiérrez M.¹, Lara M.B.N.¹, Pedraza M.E.¹

1) Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo

México es considerado el principal productor de aguacate a nivel mundial, sin embargo se ve limitada su producción debido a enfermedades siendo una de ellas el anillamiento del pedúnculo del fruto de aguacate, que ocasiona pérdidas hasta del 45 % en la producción, está ampliamente distribuida en la zona productora de aguacate de Michoacán, México. A ella se asocian diversas causas como deficiencias nutricionales e hídricas, hongos y bacterias, para su control se recomienda una integración de estrategias. En esta investigación se planteo el objetivo de aislar e identificar bacterias asociadas al síntoma de anillamiento del pedúnculo del aguacate y determinar su sensibilidad a antibióticos. Se colectaron frutos de aguacate con síntomas de la enfermedad, se realizaron aislamientos mediante técnicas fitopatológicas, las colonias aisladas se identificaron, se determino su patogenicidad mediante las pruebas de: pudrición de papa, impregnación *in situ* del pedúnculo del aguacate con la cepa bacteriana e infiltración del al solución bacteriana (1.5×10^8) a los frutos. Posteriormente se realizaron antibiogramas de las colonias bacterias con diferentes grupos de antibióticos: oxitetraciclina, estreptomycin + oxitetraciclina, estreptomycin + oxitetraciclina + cobre, gentamicina + oxitetraciclina, kasugamicina y un control absoluto. Se aislaron dos colonias bacterianas, la primera fue un cultivo mixto, identificándose; *Ralstonia pickettii* y *Enterobacter ludwigii* y en la segunda a *Klebsiella oxytoca*. Con excepción de *R. pickettii* estas especies no son reportadas como fitopatógenas. Las dos colonias oxidaron el tejido de la papa. *In situ* se produjo el anillamiento del pedúnculo del fruto de aguacate solo con la infiltración de las bacterias. Cuando se inoculo directamente solo se produjo un ennegrecimiento de este sin desprendimiento del fruto. *E. ludwigii* y *K. oxytoca* presentaron sensibilidad a los a antibióticos probados; *R. pickettii* sólo fue sensible a la mezcla que contenía cobre. Pero ninguna fue sensible a la kasugamicina

*Financiado por Proyecto P/PIFI-2013-16MSU0014T-04 Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo



P-133-01618

EFFECTO DEL BIOENCAPSULAMIENTO DE BACTERIAS EN LA PROMOCIÓN DE LA GERMINACIÓN DE SEMILLAS Y DESARROLLO DE PLÁNTULAS

Diáñez, F.¹, Gea, F.J.², Santos, M.¹, Navarro, M.J.²

1) Dpto. Agronomía. Escuela Politécnica Superior y Ciencias Experimentales. Universidad de Almería. 04120. Spain.

msantos@ual.es

2) Centro de Investigación, Experimentación y Servicios del Champiñón. Quintanar del Rey, Cuenca.

Las PGPR son componentes importantes en los agrosistemas porque contribuyen a la disponibilidad de nutrientes y promueven el crecimiento vegetal. Además, favorecen la tasa de germinación, incrementa el contenido en proteínas y aumentan la tolerancia vegetal a factores que originan estrés (Glick, 2004; Bashan y de-Bashan, 2005). En este trabajo se ha evaluado la capacidad de *Burkholderia glumae* y *Erwinia hormaechei* como promotoras del crecimiento en distintas especies hortícolas.

La inoculación de las cepas se realizó en medio alginato (2,5%), en medio salino, y en medio acuoso. Se llevaron a cabo dos ensayos diferentes: (i) inoculación de *Burkholderia glumae* y *Erwinia hormaechei* en semillas de hortícolas (melón, lechuga, tomate y pepino) en cámaras húmedas; (ii) inoculación de los aislados en semilleros de tomate y pepino. Cada ensayo constó de seis tratamientos, constituyendo éstos el cultivo puro, y diluciones desde 10^{-1} a 10^{-4} , así como un testigo, donde sólo se añadió agua. Cada tratamiento constó de tres repeticiones, y ambos ensayos estaban constituidos por 25 semillas para cada tratamiento.

Se ha demostrado el efecto promotor de la germinación de la cepa de *E. hormaechei*, en semillas de diferentes cultivos hortícolas, en cámara húmeda y en semillero. La longitud de la radícula se incrementó un 50% en semillas de lechuga, en un 94,55% en melón y en un 29,79% en tomate tras la inoculación con los tratamientos 10^{-4} en agua, 10^{-1} en NaCl y 10^{-2} en agua, respectivamente.

Asimismo, se ha producido un efecto promotor del crecimiento tras la inoculación con *B. glumae* en semilleros de pepino y tomate. En pepino, se ha producido un incremento del 20% en el peso seco de la parte aérea y de un 30% de la raíz. En tomate, de un 25% y 29% en el peso seco de la parte aérea y raíz, respectivamente.

Por otra parte, la aplicación de alginato en el proceso de bioencapsulamiento, no mejoró el efecto promotor mostrado por ambas bacterias.



P-134-01352

IDENTIFICACIÓN DE GENES QUE ALTERAN FENOTIPOS RELACIONADOS CON LA COLONIZACIÓN DE LA RIZOSFERA POR *Pseudomonas pseudoalcaligenes* AVO110Crespo-Gómez J.I.¹, Pliego C.³, Pérez-Martínez I.², Ramos C.², Cazorla F.M.¹

1) Instituto de Hortofruticultura Subtropical y Mediterránea "La Mayora" (IHSM-UMA-CSIC), Universidad de Málaga, Departamento de Microbiología

2) Instituto de Hortofruticultura Subtropical y Mediterránea "La Mayora" (IHSM-UMA-CSIC), Universidad de Málaga, Área de Genética

3) IFAPA-Centro de Churriana, Junta de Andalucía

Pseudomonas pseudoalcaligenes AVO110 es un agente de biocontrol frente a la podredumbre radicular blanca causada por *Rosellinia necatrix*, seleccionado por su eficiente capacidad de colonizar de forma competitiva las puntas radiculares de plantas de aguacate, así como por su actividad antagonista *in vitro* frente a este patógeno. Su principal mecanismo de biocontrol se basa tanto en la competición por nicho y nutrientes, como en la colonización competitiva de las hifas de *R. necatrix*, alimentándose de metabolitos fúngicos. Para detectar genes de AVO110 implicados en su multiplicación y supervivencia en presencia de exudados fúngicos, se analizó una colección de mutantes, de entre los cuales, 26 mostraron un crecimiento atenuado (*Growth Attenuated Mutants*, mutantes GAM). Los mutantes GAM-22, GAM-24 y GAM-26, afectados en genes codificadores de una exodeoxirribonucleasa, una histidina kinasa y un regulador transcripcional, respectivamente, mostraron un defecto en la capacidad de colonización de las raíces de plantas de aguacate con respecto a la cepa silvestre. Sin embargo, el mutante GAM-3, afectado en una proteína con dominios GGDEF/EAL/PAS, mostró una mayor capacidad de colonización de la rizosfera. Finalmente, los mutantes GAM-3 y GAM-26 también mostraron un incremento en la formación de biopelícula *in vitro* en comparación con la cepa silvestre.

*Este trabajo ha sido financiado por el MINECO (AGL-2011-30354-C02-01) y por la Junta de Andalucía (P10-AGR.5797), cofinanciados por el Fondo Social Europeo.



P-135-01397

EVALUACIÓN DE COMPUESTOS CÚPRICOS PARA EL CONTROL DE LA TUBERCULOSIS DEL OLIVO

Roca L.F.¹, Trapero A.¹

1) Dpto. Agronomía (Patología Agroforestal), Universidad de Córdoba. Campus de Rabanales, Edificio C-4, 14071, Córdoba.

La Tuberculosis o verrugas del olivo, causada por la bacteria *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*, es una enfermedad histórica del cultivo, distribuida por todas las zonas olivareras del mundo. La intensificación del cultivo, con el consiguiente aumento de heridas durante la recolección, ha sido una de las causas de la re-emergencia de esta enfermedad, que está demandando actualmente medidas de control más eficaces. El control se basa principalmente en el uso de compuestos cúpricos con acción bactericida, si bien, se desconoce la eficacia relativa entre distintos compuestos cúpricos, así como el efecto curativo de los mismos cuando se aplican una vez producida la infección. El objetivo del presente trabajo fue evaluar la eficacia de diversas sales de cobre, representativas de los productos cúpricos registrados para el olivar en España. Para ello, plantones del cultivar Arbequina de 1 año de edad se inocularon con una suspensión bacteriana, ajustada a una concentración de 2×10^8 UFC/ml. Previamente, se realizaron heridas en el tallo principal con ayuda de un escalpelo estéril. Los productos evaluados se aplicaron por pulverización 24 horas antes o 48 horas después de la inoculación. Las plantas se mantuvieron en cámara de ambiente controlado a 24 °C y con fotoperíodo de 12 horas de luz/oscuridad hasta el desarrollo de los síntomas. La evaluación de la enfermedad se llevó a cabo atendiendo a la incidencia de la misma, entendida como porcentaje de heridas con tumores desarrollados. La metodología empleada ha permitido discernir entre el efecto preventivo y curativo de los compuestos evaluados, siendo en la mayoría de los casos eminentemente protector. Este hecho podría explicar la falta de un adecuado control en campo, especialmente cuando los tratamientos se aplican varios días tras la producción de las heridas. Entre los productos cúpricos evaluados, destacaron por su eficacia el sulfato y el hidróxido de cobre.

Esta investigación ha sido financiada por el proyecto de excelencia AGR08-03536 de la Junta de Andalucía.



P-136-01400

CARACTERIZACIÓN DE LA QUIMIOTAXIS DE LA RIZOBACTERIA *Pseudomonas chlororaphis* PCL1606**Polonio A.¹, Escaño C.¹, Codina J.C.¹, De Vicente A.¹, Cazorla F.M.¹**

1) Instituto de Hortofruticultura Subtropical y Mediterránea "La Mayora", Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Departamento de Microbiología, Facultad de Ciencias. Campus de Teatinos s/n. Universidad de Málaga, 29071, Málaga, España. E-mail: polonio@uma.es

La rizobacteria *Pseudomonas chlororaphis* PCL1606 es una bacteria antagonista que produce el antibiótico antifúngico 2-hexil-5-propilresorcinol (HPR). Además, es capaz de colonizar las raíces de aguacate y las hifas del hongo *Rosellinia necatrix*, actividades responsables de su fenotipo antagonista. Para profundizar en el mecanismo de colonización de raíces e hifas, así como en las interacciones multitróficas que se establecen en la rizosfera durante el biocontrol de *Pseudomonas chlororaphis* PCL1606, se caracterizó su quimiotaxis. Para ello se puso a punto una técnica en placa y otra en capilares. Los resultados obtenidos muestran que *Pseudomonas chlororaphis* PCL1606 tiene quimiotaxis positiva hacia varios compuestos descritos comúnmente en la rizosfera a concentraciones no muy elevadas. Algunos de estos compuestos, a concentraciones superiores, llegaron a ser quimiorrepelentes. Por otro lado, la técnica de quimiotaxis en capilares resultó ser más sensible, permitió la cuantificación de la actividad quimiotáctica y reveló quimiotaxis positiva hacia los exudados de *Rosellinia* y aguacate a dos concentraciones diferentes. Estos resultados sugieren que el mecanismo quimiotáctico posee un efecto positivo en la colonización activa de raíces e hifas por parte de *Pseudomonas chlororaphis* PCL1606.

Este trabajo ha sido financiado con el apoyo de una subvención del proyecto del Plan Nacional de I+D+I del Ministerio de Economía y Competitividad (AGL2011-30354-CO2-01).



P-137-01448

CARACTERIZACIÓN GENOTÍPICA DE CEPAS DE *Lactobacillus plantarum* CON POTENCIAL COMO AGENTES DE BIOCONTROL DE BACTERIOSIS DE LAS PLANTAS

Daranas N.¹, Roselló G.¹, Gascón B.¹, Francés J.¹, Badosa E.¹, Bonaterra A.¹, Montesinos E.¹

1) Instituto de Tecnología Agroalimentaria-CIDSAV, Universidad de Girona

Las bacterias del ácido láctico (BAL) se consideran a nivel de actividad y de bioseguridad excelentes candidatas para el desarrollo de nuevos bioplaguicidas. La actividad antimicrobiana de las BAL se debe a una diversidad de mecanismos entre los cuales destacan la producción de ácidos orgánicos, bacteriocinas y otros compuestos de bajo peso molecular. En este trabajo se ha llevado a cabo una caracterización molecular de 45 cepas de *Lactobacillus plantarum* aisladas de plantas y de productos vegetales frescos. Estas cepas mostraron elevada actividad antagonista frente a bacterias fitopatógenas de gran importancia económica.

Se ha estudiado la diversidad genética del conjunto de cepas mediante el análisis por PCR de la presencia de genes biosintéticos de diversas plantaricinas, la secuenciación de varios genes *housekeeping* y RAPDs. En la totalidad de las cepas de *L. plantarum*, excepto en una, se detectó la presencia de los genes responsables de la producción y regulación de las plantaricinas EF y JK. Las secuencias parciales de 6 genes *housekeeping* (*pgm*, *ddl*, *gyrB*, *purK1*, *gdh* y *mutS*) permitió determinar diversos polimorfismos entre la colección de cepas (*Multilocus sequence typing*, *MLST*). Además, esta diversidad genética se confirmó mediante RAP-PCR.

Mediante dichas técnicas se han agrupado las cepas de *L. plantarum* que presentan un patrón genético similar y se han diferenciado de las que muestran características distintas, resultando útiles para seleccionar cepas representativas de cada uno de los grupos y realizar posteriores ensayos de antagonismo y de biocontrol.

Actualmente se están estudiando los niveles de expresión de los genes de plantaricinas EF y JK mediante PCR cuantitativa de los transcritos de mRNA (*Reverse transcription quantitative PCR*, RT-qPCR) de cepas seleccionadas, para estudiar su adaptabilidad a condiciones adversas y durante la colonización de plantas huésped.

Este trabajo ha sido financiado en parte por los proyectos AGL-2009-13255-C02-01 y AGL-2012-39880-C02-01 (Fondos FEDER).



P-138-01554

USO DE *Bacillus subtilis* EN EL CONTROL DE HONGOS DE LA SEMILLA DE CEBOLLAGorrín V.L.¹, Perera S.², Tascón C.², Ríos D.², De la Rosa F.S.¹

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

2) Servicio Técnico de Agricultura y Desarrollo Rural. Cabildo Insular de Tenerife. C/ Alcalde Mandillo Tejera, 8 (4º planta). 38007 S/C de Tenerife.

En Tenerife se cultivan distintas variedades locales de cebolla destinadas al consumo local, que el Centro de Conservación de la Biodiversidad Agrícola de Tenerife (CCBAT) caracteriza y conserva. Las semillas de cebolla pueden ser portadoras de hongos fitopatógenos como *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp. o *Fusarium* sp., entre otros, cuyos riesgos de dispersión es necesario evitar. En este trabajo se estudió el potencial de la bacteria *Bacillus subtilis* para el control del crecimiento *in vitro* de hongos potencialmente fitopatógenos a partir de la semilla. Se trabajó con dos aislados de *B. subtilis* obtenidos de semilla de cebolla que mostraban actividad antagonista en placa y del formulado comercial Serenade® Max (*B. subtilis* cepa QST 713). Se comparó el comportamiento de las semillas tratadas con la bacteria frente a las semillas no tratadas y se estudió la persistencia del tratamiento después de varios meses, simulando los efectos de la conservación refrigerada de las semillas antes de su plantación. Una vez seleccionada la concentración de uso para la bacteria, se trataron distintos lotes de semilla de distintas variedades y agricultores para ver si el tratamiento funcionaba de modo similar frente a diferentes poblaciones fúngicas y con distintas semillas. Por último, se estudiaron los efectos del tratamiento con *B. subtilis* de la semilla en el crecimiento de las plántulas de cebolla en vivero.

Los tratamientos con la cepa B1 o con el formulado Serenade® Max inhibieron el crecimiento de los hongos (*Aspergillus* sp., *Penicillium* sp. y *Fusarium* sp.) detectados en la semilla de los mismos lotes sin tratar. El tratamiento aplicado a las semillas mantiene sus efectos inhibidores después de varios meses de almacenamiento. También se observó la presencia de forma natural de *B. subtilis* en las semillas de las variedades locales de Tenerife.



P-139-01318

ACTIVADORES QUÍMICOS DE RESISTENCIA COMO ALTERNATIVA PARA EL MANEJO DE LA PESTE NEGRA O TIZÓN (*Phytophthora infestans sensu lato*) EN TOMATE DE ÁRBOL (*Solanum betaceum* Cav.)

Patiño L.F.¹, Castaño J.², Ramirez J.G.², Morales J.G.²

1) Politécnico Colombiano Jaime Isaza Cadavid-Facultad de Ciencias Agrarias. E-mail: luisferph@gmail.com

2) Universidad Nacional de Colombia sede Medellín, Facultad de Ciencias Agrarias, Departamento de Ciencias Agronómicas.

El tomate de árbol (*Solanum betaceum*) es una fruta de amplio consumo en países de la región andina de Sur América, además con un alto potencial de exportación. En la última década la enfermedad conocida como peste negra, tizón o gota, ha aumentado muy significativamente, donde su manejo con fungicidas convencionales afectan el medio ambiente y la salud de los agricultores. El agente causal de la enfermedad, ha sido propuesto como *Phytophthora andina* o *P. infestans sensu lato*. En este estudio se evaluaron siete moléculas reportadas como activadores de defensa en plantas, sobre el desarrollo de la Peste negra en tomate de árbol. Bajo condiciones de invernadero, las plantas fueron tratadas tanto en drench al suelo como foliarmente con Fosfito de Potasio (0,75 cm³ l⁻¹), Quitosan (3 mg ml⁻¹), H₂O₂ (1,0 mM), Salicilato de Sodio (0,4 g l⁻¹), Acido 3-aminobutanoico (BABA), (1 g l⁻¹), Metil Jasmonato (0,2 g l⁻¹) y Acibenzolar-S-Metil (ASM, 0,3 ml l⁻¹); plantas tratadas con agua, fueron usadas como testigo. 48 horas después de la aplicación de los activadores, se inoculó el patógeno y seguidamente se midió localmente el diámetro de la lesión y el área bajo la curva del progreso de la enfermedad. Además el posible efecto fitotóxico de diferentes dosis de las moléculas también fue evaluado. Ninguno de los activadores mostró efecto significativo sobre la reducción de la enfermedad cuando fueron aplicados en drench al suelo, ni con la aspersión de Fos K, Quitosan, H₂O₂, y SaNa; mientras que la aspersión de BABA, MeJa y ASM, redujo la enfermedad en 87, 80 y 77% respectivamente, sin causar efectos negativos visibles sobre el crecimiento de las plantas. Se concluye que la aplicación foliar de BABA, MeJa y ASM, son una alternativa promisoría para ser integradas en el manejo del tizón en plantas solanáceas.

Palabras clave: BABA, ASM, Metil Jasmonato, gota en solanáceas, resistencia inducida.



P-140-01460

POBLACIONES MICROBIANAS ASOCIADAS A DIFERENTES ESTRATEGIAS DE MANEJO DE *Phytophthora cinnamomi* Rands EN AGUACATEMorales J.G.¹, Ramírez J.G.¹, Castañeda D.A.¹

1) Universidad Nacional de Colombia sede Medellín, Departamento de Ciencias Agronómicas

Phytophthora cinnamomi Rands en el patógeno mas limitante del cultivo de aguacate en el mundo, no siendo Colombia la excepción. Es por esto que se han desarrollado diferentes estrategias para su manejo integrado, pero aún prevalece el uso de productos químicos, como única medida de manejo, generando impactos negativos en el ambiente y en la salud humana y animal. Uno de los efectos perjudiciales que se ocasiona es la alteración de las poblaciones microbianas en el suelo. Este trabajo tuvo como objetivo conocer las poblaciones microbianas de raíz y suelo, bajo diferentes estrategias de manejo de esta enfermedad. La metodología utilizada para su determinación fue mediante unidades formadoras de colonias (UFC), para hongos, bacterias y actinomicetos, bajo incubación en condiciones de anaerobiosis y aerobiosis, además se midió la actividad microbiana total, en condiciones de laboratorio. Como complemento se cuantificaron grupos funcionales como: *Trichiderma* spp., bacterias formadoras de endosporas (BAFE), celulolíticos, proteolíticos, amilolíticos, solubilizadores de fosfato, fijadores asimbióticos de nitrógeno y promotores del crecimiento como *Pseudomonas* spp., fluorescentes. Los resultados encontrados en esta investigación, sugieren que el uso individual y combinado de mantillo orgánico, material compostado de estiércol bovino, enmienda mineral y cascarilla de arroz y la propuesta de integración; incrementan significativamente la población y actividad microbiana aerobia, en la cual se identificó una mayor población de microorganismos antagonistas como *Trichoderma* spp., celulolíticos, *Pseudomonas* spp. fluorescentes y BAFE. Por su parte la aplicación al suelo de metalaxyl + mancozeb disminuyen las poblaciones de hongos en raíz y rizósfera. Es importante que al seleccionar una determinada práctica de manejo, se tenga en cuenta su efecto sobre las poblaciones nativas de microorganismos, las cuales pueden disminuir o aumentar, con consecuencias directas sobre el manejo de las enfermedades y el equilibrio ambiental.

Este trabajo fue financiado por la Universidad Nacional de Colombia sede Medellín y aportes de los autores y agricultores.



P-141-01582

Quercus ilex* TREES TOLERANT TO WATER STRESS AND TO *Phytophthora cinnamomi

Corcobado T.¹, Pérez E.¹, Krajnc B.¹, Martos A.¹, Pérez A.¹, Cubera E.¹, Núñez L.², Mora B.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, Spain. E-mail: asolla@unex.es
- 2) Servicio de Sanidad Forestal, Consellería de Agricultura, Medio Ambiente y Territorio, Govern Illes Balears, Spain. E-mail: lnunez@dgmambie.caib.es
- 3) Instituto Agroforestal Mediterráneo, Universitat Politècnica de València, Camino de Vera s/n, 46022 Valencia, Spain. E-mail: pabadcam@eaf.upv.es

The health of forests in south-western Europe is conditioned by global change through direct rise in average temperature and variability of climate, with potential to increase the occurrence of severe droughts. In consequence, programs focused on breeding trees for resistance to pathogens should screen to drought stress too. The tolerance of 16 populations of *Quercus ilex* from five Mediterranean countries (France, Italy, Morocco, Portugal and Spain) to water stress and *Phytophthora cinnamomi* was assessed. The experiment included seedlings grown under greenhouse conditions and following a full randomized block design (12 mother trees per population; 20 seedlings per mother tree). During their first vegetative period, half of seedlings were submitted to a severe water stress treatment. During the second vegetative period, all plants were inoculated with *P. cinnamomi*. Plant mortality after the water stress treatment ranged from 0 to 40% and varied significantly between populations. Mortality after inoculations was about 10% higher in water stressed plants in comparison to non-water stressed plants. Survival time of seedlings varied significantly between populations and mother trees, being generally more resistant the populations from arid areas than the populations from semiarid and subhumid areas. Seed mass did not influence the tolerance of seedlings to water stress and *P. cinnamomi*. From about 3.300 *Q. ilex* seedlings tested, the most vigorous 100 plants were selected for further assessments. Breeding for adaptation to new climatic environments will be discussed.

* The study was funded by the Spanish Ministry of Science and Innovation (AGL2011-30438-C02)



P-142-01466

EFFECTO DE PYRACLOSTROBIN EN EL CONTROL DE *Phytophthora infestans* Y LA PRODUCCIÓN DE PAPA VARIEDAD DIACOL CAPIRO**Patino J.A.¹, Cotes J.M.¹, Ramírez J.A.²**

1) Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín

2) BASF Química Colombiana S.A.

En Colombia el cultivo de papa es el más importante de las zonas altas, la causa principal de pérdidas en el cultivo es la gota (*Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary) y la mayor causa del uso de agroquímicos. El pyraclostrobin, de la familia de las estrobilurinas, tiene un modo de acción que se basa en la inhibición de la respiración mitocondrial para proteger de enfermedades fúngicas diferentes cultivos y además ha mostrado ser un producto que mejora la acumulación de asimilados en la planta. Con el fin de evaluar el efecto del pyraclostrobin tanto en su resistencia a gota como en su efecto bioestimulante, se realizaron siembras de 15 tratamientos bajo un arreglo factorial 7x2 (7 aplicaciones en follaje x 2 aplicaciones en semilla) más un tratamiento testigo con manejo convencional, en el corregimiento de Santa Elena del departamento de Antioquia. Se utilizó un diseño de bloques completos al azar (BCA) con cuatro repeticiones para un área total de 2560 m². Para el control de la enfermedad fue muy eficaz mas en la producción de tubérculos, se presentaron diferencias estadísticamente significativas en la aplicación del pyraclostrobin al tubérculo semilla y al follaje. El mejor tratamiento fue la aplicación de pyraclostrobin solamente en el follaje en el momento del aporque y en la floración, lo cual está asociado con período de máxima elongación de los estolones e inicio de tuberización, respectivamente. En general las aplicaciones al tubérculo semilla no incrementan tanto la producción como lo hacen las aplicaciones al follaje. Éstas aplicaciones sólo son efectivas cuando van acompañadas de aplicaciones al follaje en la época del aporque y floración, y cuando se realizan tres aplicaciones del producto al follaje.

Este trabajo fue financiado por La Universidad Nacional de Colombia - Sede Medellín y BASFQuímica Colombiana S.A.



P-143-01333

EVALUACIÓN DE LA RESISTENCIA DE 22 PORTAINJERTOS DE TOMATE A *Phytophthora nicotianae* var. *parasitica* y *P. capsici*.

De Cara M.¹, Martín C.D.¹, Boix A.¹, Marín J.I.¹, Ruíz C.¹, Palmero D.², Tello-Marquina J.C.¹.

1) Grupo de Investigación AGR-200. Departamento de Agronomía. Universidad de Almería. Ctra. Sacramento s/n 04120. Almería. España.

2) Universidad Politécnica de Madrid. E.U.I.T. Agrícola. Ciudad Universitaria s/n, 28040. Madrid. España.

El injerto de variedades de tomate sobre patrones interespecíficos es en la actualidad un método de manejo de enfermedades de origen telúrico ampliamente distribuido en las zonas productoras de tomate protegido.

En esta comunicación se presenta el resultado de evaluar 22 portainjertos comerciales de tomate frente a un aislado de *P. parasitica* y otro de *P. capsici* de patogeneicidad en tomate previamente estudiada. Se realizaron dos inoculaciones espaciadas en el tiempo para cada aislado por separado, en cámara de ambiente controlado (23-25°C, 14 h luz/oscuridad y 12000 lux). Cada inoculación implicó 12 plantas de portainjerto sembradas en vermiculita desinfectada (121°C; 30 min) que fueron inoculadas cuando presentaban la 3ª hoja verdadera bien desarrollada. La inoculación se realizó por riego al sustrato empleando una mezcla de propágulos en suspensión. Transcurrido un mes desde la inoculación se arrancaron las plantas. Durante este tiempo se anotaron las bajas por necrosis de raíces y/o cuello. Los resultados mostraron que de los 22 portainjertos inoculados con *P. parasitica*, sólo 10 se mostraron resistentes. En el caso de *P. capsici* todos los portainjertos se mostraron susceptibles.

Palabras clave: Oomicetos, Resistencia Genética y *Solanum lycopersicum*.



P-144-01334

EVALUACIÓN DE LA RESISTENCIA AL SÍNDROME ROOT ROT DE *Phytophthora capsici* EN ACCESIONES DE PIMIENTO PARA SU POSIBLE EMPLEO COMO PORTA-INJERTOS

Boix A.¹, De Cara M.¹, Marín J.I.¹, Gómez-Tenorio M.A.¹, Ruíz C.A.¹, Martínez-Beltrán C.D.¹, Camacho F.¹, Tello J.C.¹

1) Grupo de Investigación AGR-200. Departamento de Agronomía. Universidad de Almería. Ctra. Sacramento s/n 04120. Almería. España

Los problemas que se plantean en el control de patógenos del suelo, como *Phytophthora capsici*, utilizando distintos procedimientos de desinfección del suelo, han motivado la evaluación de vías alternativas utilizando plantas injertadas sobre porta-injertos resistentes. Esta técnica goza de un éxito importante para el control de otros patógenos del suelo y es una técnica compatible con la producción ecológica. Por ejemplo, en el control del virus del cribado (MNSV) en melón y sandía o en el control de *P. parasitica* en tomate. Siguiendo esas orientaciones existen en el mercado, actualmente, patrones de pimiento que se preconizan con resistencias a patógenos que, a veces, no están suficientemente evaluados. Además del material comercial, se evalúan continuamente nuevas fuentes de germoplasma en las que podrían existir genes de resistencia a este u otros patógenos y que podrían emplearse como patrón de variedades con calidad agronómica, aunque sin resistencia, previa evaluación de las interacciones patrón variedad. Este hecho ha motivado el trabajo que se resume en esta comunicación.

Se evaluaron once accesiones del género *Capsicum* facilitadas por el COMAV, por su resistencia a una cepa de *P. capsici*, previamente evaluada por su patogeneicidad sobre pimiento y otros hospedadores. Los ensayos se hicieron en cámara climatizada y en invernadero. Las plantas crecieron en sustrato de vermiculita (desinfección en autoclave, 1 hora a 120°C). El inóculo se añadió al sustrato como una suspensión de propágulos del hongo.

Los resultados muestran cómo *P. capsici* fue capaz de enfermar a todas las accesiones evaluadas, sin embargo los menores índices de severidad de la enfermedad al inocular las plantas con 8 hojas verdaderas en invernadero, junto al gran volumen radicular que desarrollaron, invitan a evaluar de nuevo este material en condiciones más similares a las de campo para determinar su verdadero potencial como porta-injertos.

Palabras clave: *Capsicum annuum*, Oomicetos.

Agradecimientos: Proyecto Ministerio de Ciencia e Innovación/INIA. RTA2010-00038-C03-02



P-145-01543

POBLACIÓN EDÁFICA ASOCIADA AL DECAIMIENTO DE LAS ENCINAS. CONTROL IN VITROBasallote-Ureba M.J.¹, Aguado A.¹, González J.M.², Capote N.¹, Romero F.¹, Barrau C.¹

1) IFAPA

2) IRNAS-CSIC

El decaimiento del arbolado de la dehesa es un proceso de etiología compleja, en el que están implicados un número variable de factores que causan un deterioro gradual de los árboles hasta su muerte. En prospecciones realizadas en dehesas de Huelva y Sevilla, asociados con síntomas de seca han sido recuperados de suelos y/o raíces 44 aislados. Dichos aislados fueron identificados morfológicamente y a nivel molecular mediante amplificación y secuenciación de la región ITS del ADNr con los cebadores ITS6 e ITS7, específicos de oomicetos. Las secuencias obtenidas se compararon con las del GenBank. Se detectaron 40 filotipos diferentes con un 95% de similitud dentro de cada filotipo, identificándose 5 filotipos como especies previamente definidas de *Pythium*, mientras que 35 filotipos no presentaron suficiente homología con especies ya caracterizadas. Paralelamente, el 52% de los aislados mostraron características morfológicas coincidentes con los clados B (17%), D (9%), F (22%), I (4%) o K (44%) definidos por Lévesque *et al* (2004) como *Pythium* y *Phytophythium*. Además, se identificó un 4% como *Phytophthora cinnamomi* (procedente de vivero). La biofumigación con *Brassica* es un método no químico para el control de patógenos de suelo. Se evaluó *in vitro* el potencial biofumigante de *B. carinata carina*, *B. carinata eleven* y *B. juncea scala* frente a tres aislados de los clados D, F o K. Se determinó el porcentaje de inhibición del crecimiento micelial y el área bajo la curva de crecimiento (ABCC). Los ANOVA realizados mostraron diferencias significativas ($P=0,01$) entre las especies de *Brassica*, las dosis respecto al testigo, los aislados y las interacciones entre los distintos factores. Las especies de *Brassica* evaluadas, a las dosis de 0,5 y 1g de tejido, inhibieron al 100% el crecimiento micelial y redujeron significativamente el ABCC de un aislado del clado D.

Este trabajo ha sido financiado con los proyectos RTA2010-00067-00-00, y Transforma 2010.5 (IFAPA Fondos FEDER).



P-146-01579

CRIBADO DE UNA COLECCIÓN DE ENTRADAS SILVESTRES DEL GÉNERO LACTUCA FRENTE A UNA RAZA DE *Bremia lactucae* DEL CAMPO DE CARTAGENASoler S.¹, Figàs M.R.¹, Hurtado M.², García A.², Prohens J.¹

1) Institut de Conservació i Millora de l'Agrodiversitat Valenciana, Universitat Politècnica de València 2) Meridiem Seeds S.L

El hongo *Bremia lactucae* causa importantes pérdidas en cultivos de lechuga (*Lactuca sativa*). En la introducción de genes de resistencia a este hongo ha sido muy importante la utilización de especies silvestres del género *Lactuca*.

Se presenta un cribado de una colección de entradas de lechuga silvestre frente a un aislado (BLV-1) de *B. lactucae* colectado en el Campo de Cartagena (Murcia), que no corresponde con ninguna de las razas de *B. lactucae* catalogadas por la UPOV. Esta colección consistió en 6 entradas de *L. saligna*, 21 de *L. serriola* y 3 de *L. virosa*. Como control susceptible se emplearon las variedades 'Romana', 'Olaf' y 'Green Towers'. Un número variable de plántulas de cada entrada (3-40) se cultivaron en mini invernaderos en cámara climática con un fotoperiodo de 12 horas, temperatura continua de 16 °C y humedad relativa del 80 %. Se realizó la inoculación cuando las plantas presentaban 2 hojas desarrolladas. Para la inoculación se ajustó la concentración de esporas a 5×10^4 esporas·ml⁻¹. Se evaluó el número de plantas que presentaban esporulación a 7, 10 y 15 días después de inocular.

Los controles susceptibles mostraron un porcentaje de plantas con esporulación de entre un 97.5% ('Olaf') y un 100% ('Romana' y 'Green Towers'). Una entrada de *L. saligna* y cuatro de *L. serriola* se mostraron resistentes, con un 0% de plantas con esporulación. Además, 2 entradas de *L. serriola* y 1 de *L. virosa* mostraron un 5% o menos de plantas con esporulación. Esto nos indica que estas 3 últimas entradas también podrían tener algún interés en el desarrollo de materiales resistentes a la raza utilizada. Es de destacar el elevado porcentaje de plantas con esporulación detectado en 5 de las 6 entradas de *L. saligna* probadas, comparado con los resultados obtenidos por otros autores.



P-147-01355

MULTIRRESISTENCIA A FUNGICIDAS EN OÍDIO DE CUCURBITÁCEAS (*Podosphaera fusca*)**Torés J.A.¹, Bellón-Gómez D.¹, De Vicente A.², Pérez-García A.²**

- 1) Instituto de Hortofruticultura Subtropical y Mediterránea La Mayora. (IHM-UMA-CSIC), Departamento de Protección Vegetal, Estación Experimental La Mayora, Consejo Superior de Investigaciones Científicas. 29750, Algarrobo, Málaga
- 2) Instituto de Hortofruticultura Subtropical y Mediterránea La Mayora (IHSM-UMA-CSIC), Departamento de Microbiología, Facultad de Ciencias, Universidad de Málaga, 29071, Málaga

El oídio causado por *Podosphaera fusca* es un factor limitante en la producción de cucurbitáceas en España y su control depende en gran medida de la aplicación de productos fitosanitarios.

La resistencia a fungicidas depende de dos factores, uno inherente al propio fungicida, de manera que hay mecanismos de acción a los cuales casi todos los organismos desarrollan resistencia en un plazo más o menos largo y un segundo factor correspondiente al propio hongo que puede desarrollar resistencias a numerosas materias activas.

Los oídios se encuentran entre los organismos que desarrollan resistencia a fungicidas con gran facilidad, por lo que las aplicaciones de fitosanitarios deben efectuarse con precaución, para evitar en lo posible la aparición de estas resistencias.

Durante los últimos quince años, nuestro grupo de investigación ha estudiado la resistencia de poblaciones de *P. fusca* en cultivos del centro y sur de España a fungicidas de diferentes mecanismos de acción: DMI (triademol, fenarimol y miclobutanilo), Qol (kresoxim-metil, azoxistrobin y trifloxistrobin), MBC (metil-tiofanato), aza-naftalenos (quinoxifén) e hidroxí (2 amino) pirimidinas (bupirimato). Las concentraciones discriminatorias se establecieron sobre las dosis máximas autorizadas en campo.

El hecho más interesante es la presencia de cepas multirresistentes; en nuestro laboratorio se ha detectado la resistencia a estos nueve fungicidas en 67 cepas. Todas fueron sensibles a quinoxifén y miclobutanilo, no se ha observado resistencia a ellos en España, aunque sí notamos cierta disminución de la sensibilidad. Para los otros cuatro (puesto que consideramos los tres Qol como un único fungicida), treinta y tres cepas eran resistentes al menos a uno de ellos, veintidós a dos, once a tres y una única cepa a cuatro.

Estos datos confirman el riesgo de aparición de cepas multirresistentes en *P. fusca*, por lo que deben extremarse las precauciones a la hora de efectuar tratamientos fitosanitarios

Este trabajo ha sido financiado por fondos de los proyectos del Plan Nacional AGL2001-1837-CO2-02, AGL2004-06056-CO2-02, AGL2007-65340-CO2-02 y AGL2010-21848-CO2-01



P-148-01580

MEJORA DEL CONTROL DE OIDIO (*Podosphaera aphanis*), LA PRODUCCIÓN Y CALIDAD EN EL CULTIVO DE LA FRESA CON E-CODASAL, EN LA PROVINCIA DE HUELVA

Chamorro M.¹, Aguado A.¹, Fernandez de Ayala M.A.¹, Miranda L.¹, Dominguez P.¹, Romero F.¹, De Los Santos-García B.¹.

1) IFAPA Centro Las Torres-Tomejil, Apdo Oficial, 41200 Alcalá del Río, Sevilla.

Podosphaera aphanis es un hongo aéreo patógeno del cultivo de la fresa que ocasiona importantes pérdidas económicas.

La legislación actual en el uso de fitosanitarios va encaminada hacia una completa restricción en el uso de fungicidas convencionales, limitando el uso de sustancias peligrosas para la salud humana y el medio-ambiente. En este sentido, los productos de origen natural tienen una oportunidad de mercado como productos alternativos y representan una alternativa viable para la protección de cultivos.

El objetivo de este trabajo es la búsqueda de alternativas a los fungicidas de síntesis y mas afines a la legislación actual. Por ello se ha realizado un ensayo en condiciones de campo, en la finca experimental "El Cebollar", en Moguer (Huelva) y perteneciente al IFAPA.

El diseño experimental fue en bloques al azar, con cuatro repeticiones, incluyendo un testigo (control) con manejo según los protocolos de Producción Integrada (PI) para el cultivo de la Fresa en Andalucía (Orden 5 diciembre 2007, BOJA nº 4, 5 enero 2008).

En este trabajo se evaluó la eficiencia del producto natural e-Codasal, que es una solución de calcio complejoado y a una dosis recomendada. de 6 litros/ha y de aplicación por riego. La periodicidad de las aplicaciones fue de 10 días, desde finales de noviembre a mediados de abril. Se realizó mediciones de incidencia de la enfermedad de plantas en campo, número de frutos afectados, rendimiento del cultivo y parámetros de calidad de los frutos en postcosecha.

E-Codasal en el ensayo de campo mostró una reducción significativa de la incidencia de la enfermedad en plantas así como el número de frutos afectados y una mejora en rendimiento, respecto al control de producción integrada.

* Este trabajo ha sido financiado con un Contrato entre el Instituto Andaluz de Investigación y Formación Agraria, Pesquera, Alimentaria y de la Producción Ecológica, y la empresa Sustainable Agro Solution S.A. (SAS).



P-149-01164

EVALUACIÓN DE LA EFICACIA DEL AZUFRE Y LOS EXTRACTOS DE AJO Y COLA DE CABALLO EN EL CONTROL DE LA ROYA EN CIRUELO EN CULTIVO ECOLÓGICO

Pérez-Romero L.F.¹, Daza A.¹, Arroyo F.T.¹

1) Instituto de Investigación y Formación Agraria y Pesquera

España es uno de los países de Europa con mayor superficie certificada en Agricultura Ecológica. No obstante, la fruticultura ecológica es aún un sector poco desarrollado, en gran medida por la problemática que presenta el control adecuado de las plagas y las enfermedades. La roya, causada por *Tranzschelia pruni-spinosae* (Pers.), es una enfermedad fúngica muy importante sobre los frutales de hueso (Ogawa *et al.*, 1995). En el caso del ciruelo, afecta sobre todo a las hojas, y un ataque severo puede provocar una defoliación prematura que podría conllevar la pérdida de vigor de los árboles afectados (Ogawa, 1990). En estudios previos se ha estudiado la susceptibilidad varietal de diferentes cultivares de ciruelo japonés (*Prunus salicina* Lindl.) a la enfermedad de la roya (García-Galavís *et al.*, 2009; Castejón *et al.*, 2012). En este trabajo se ha analizado la eficacia de tres productos autorizados en agricultura ecológica, azufre, cola de caballo y extracto de ajo, para el control de la enfermedad de la roya en tres cultivares susceptibles de ciruelo japonés, 'Santa Rosa', 'Showtime' y 'Friar'. Se ha evaluado el progreso de la enfermedad sobre la superficie foliar y la cinética de defoliación de los árboles. Se observó una incidencia severa de roya en los tres cultivares estudiados. Los resultados obtenidos han mostrado una eficacia nula o muy baja de los tres productos para controlar esta enfermedad, no observándose diferencias significativas entre los árboles tratados y los testigos, ni en cuanto a la superficie afectada por el hongo, ni en la cinética de defoliación.

Referencias

- García-Galavís, P.A. *et al.*, (2009). Sci. Hort. 123:210-216
Castejón, M. *et al.*, (2012). Acta Hort. (ISHS) 933:463-467
Ogawa, J.M. (1990). Diseases of stone fruits. Mundi-Prensa.
Ogawa, J.M. *et al.*, (1995). Compendium of Stone Fruit Diseases. APS Press.



P-150-01453

CONTROL DE LA ESTEMFILIOSIS DEL PERAL MEDIANTE CEPAS DE *Bacillus* spp.Ruz L.¹, Morales G.¹, Puig M.¹, Moragrega C.¹, Montesinos E.¹, Llorente I.¹

1) Laboratorio de Patología Vegetal CIDSAV-XaRTA, Institut de Tecnologia Agroalimentària, Universitat de Girona

La estemfiliosis del peral es una enfermedad fúngica, de importancia económica, causada por *Stemphylium vesicarium*, que produce infecciones principalmente en frutos y hojas. El teleomorfo del hongo corresponde a *Pleospora allii* y produce peritecas en restos de material infectado en el suelo. El control de la enfermedad se basa en estrategias que integran medidas sanitarias y agentes de biocontrol 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. En estudios previos se seleccionaron dos cepas de *Bacillus* en base a su actividad contra *S. vesicarium* *in vitro*. Con el objetivo de mejorar la eficacia de control del inóculo se ha evaluado la eficacia de cepas de *Bacillus subtilis/amyloliquefaciens* en ensayos en fincas experimentales de peral. Para ello se evaluaron diferentes métodos de conservación, basados en procesos de liofilización, para así poderlos aplicar tras superarse el umbral de tratamiento según el modelo BSPcast. En los ensayos en finca experimental se evaluaron 3 estrategias de aplicación, que consistieron en aplicar las cepas de *Bacillus*: (1) cuando el índice de riesgo de infección predicho por el modelo BSPcast era $CR \geq 0.4$, (2) si el índice de esporulación predicho por el modelo SPOR era $S \geq 0.3$ o hubiera lluvia, y (3) aplicaciones fijas cada 3-4 semanas. Los resultados globales no mostraron diferencias significativas entre estrategias pero sí entre cepas de *Bacillus*, siendo la cepa B2 la más eficaz ya que disminuyó significativamente la producción de inóculo un 22% respecto al control no tratado.

Mediante cromatografía FPLC se purificaron y fraccionaron extractos libres de células de las cepas cultivadas en medio líquido que se evaluaron *in vitro* y sólo algunas fracciones de la cepa B2 mostraron actividad frente *S. vesicarium*. Las fracciones activas presentaron un patrón similar a las iturinas.

Este trabajo ha sido financiado en parte por el proyecto AGL2009-09829.



P-151-01410

EVALUACIÓN DE LA SUPRESIVIDAD DE CUATRO SUSTRATOS FORMULADOS CON COMPOST A LA PODREDUMBRE CARBONOSA DE RAÍZ Y CORONA DE LA FRESA

Borrero C.¹, Gata A.¹, Bascón J.², Castillo S.¹, Avilés M.¹

1) Dpto. Ciencias Agroforestales, E.T.S.I.A. Universidad de Sevilla

2) Laboratorio de Producción y Sanidad Vegetal de Huelva

La podredumbre carbonosa de raíz y corona de la fresa, inducida por *Macrophomina phaseolina*, es una enfermedad que en los últimos años está aumentando su incidencia en la provincia de Huelva. El propósito de este trabajo es evaluar la posible inducción de supresividad con distintos compost de alperujo a dicha enfermedad al usarlos como componentes de sustrato hortícola. Así, hemos realizado un bioensayo de supresividad para evaluar compost 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). El diseño experimental fue de bloques al azar con 4 bloques y 5 macetas por tratamiento y bloque. Se usó como testigo turba rubia. El ensayo se desarrolló en cámara de cultivo (30°C de día y 28 °C de noche). Cada maceta con una planta de fresa con varias hojas desplegadas se inoculó con 50 ml de una suspensión con 1000 esclerocios/ml. Los síntomas se evaluaron según la escala: 0 = planta sana; 1= planta afectada; 2 = planta muerta, hasta 54 días después de la inoculación. La evolución de los síntomas se expresó como área bajo la curva de progreso de la enfermedad estandarizada. Al final del ensayo se estimó el número de esclerocios / g de sustrato. La severidad registrada mostró que sólo el compost de Cazorla presentó supresividad a la podredumbre carbonosa respecto al sustrato de turba. Además, el número de esclerocios disminuyó también significativamente respecto a la turba.



P-152-01324

VALORACIÓN DE LA RESPUESTA DE VARIEDADES DE FRESA A *Macrophomina phaseolina*, AGENTE CAUSAL DE LA PODREDUMBRE CARBONOSA, EN SUELOS NATURALMENTE INFESTADOSChamorro M.¹, Domínguez P.¹, Medina J.J.¹, Miranda L.¹, Romero F.¹, De los Santos-García B.¹

1) IFAPA

El cultivo de la fresa se ha visto afectado por la retirada del Bromuro de Metilo como principal fumigante de suelo desde el año 2005, lo que ha propiciado la aparición de nuevos patógenos y problemas en su control. Tal es el caso de *Macrophomina phaseolina*, hongo patógeno de suelo que ocasiona la podredumbre carbonosa (charcoal rot). Dadas las restricciones vigentes en la utilización de desinfectantes químicos, el uso de cultivares resistentes se considera una de las alternativas para reducir la incidencia de podredumbre carbonosa en el cultivo de la fresa. El objetivo de este trabajo es determinar la respuesta de variedades de fresa a *M. phaseolina* en suelos naturalmente infestados. Durante las campañas 2011-12 y 2012-13, se ha llevado a cabo ensayos encaminados a determinar la resistencia de alguno de los cultivares de uso común en la provincia de Huelva ('Candonga', 'Camarosa', 'Fortuna' y 'Splendor') a *M. phaseolina*. Los ensayos se llevaron a cabo en una parcela experimental, que nunca había sido desinfestada y que presentaba una población homogénea en suelo del patógeno objeto de estudio. El diseño experimental fue de bloques al azar con 3 repeticiones y 12 plantas por cultivar y repetición. El cultivar 'Splendor' fue el más resistente, mientras que 'Camarosa' y 'Fortuna' resultaron los más susceptibles.



P-153-01540

SUPERVIVENCIA Y VIABILIDAD DE TRES ESPECIES DE *Fusarium* EN UN INVERNADERO DE CLAVEL TRATADO CON CINCO FUMIGANTES DE SUELO

Vela M.D.¹, Melero J.M.⁴, Capote N.², Talavera M.³, Basallote-Ureba M.J.²

1) IFAPA Centro de Chipiona (Cádiz)

2) IFAPA Centro de Las Torres-Tomejil (Sevilla)

3) IFAPA Centro Camino del Purchil (Granada)

4) IAS (CSIC) Córdoba

En un invernadero de Chipiona (Cádiz) destinado al cultivo de clavel e infestado con *Fusarium* spp. se estableció en junio de 2013 un experimento de control en el que se incluyeron 6 tratamientos de suelo: gallinaza (G), pellet de gallinaza (PG), pellet de Brassica (PB), compost de alpeorujó (CA), dimetil-disulfuro (DMDS) y un testigo no tratado (T). Se realizaron muestreos de suelo antes y después de efectuar dichos tratamientos, registrándose temperaturas del suelo, a 20 cm de profundidad, entre 28 y 48,5°C durante el mes del tratamiento. Antes de los tratamientos se aislaron distintas especies de *Fusarium* que se caracterizaron morfológica y molecularmente mediante la secuenciación de un fragmento del gen del factor de elongación-1a (EF-1a). Los aislados se identificaron como *F. oxysporum* (Fo), *F. proliferatum* (Fp) y *F. solani* (Fs). Tras los tratamientos, no se detectaron poblaciones de *Fusarium* spp. en las parcelas enmendadas con PB y DMDS, y se redujeron a niveles casi indetectables en las parcelas correspondientes al resto de las enmiendas. Todos los tratamientos fueron muy efectivos en el control de la enfermedad. Esquejes de clavel 'Master', susceptible a *F. oxysporum* f. sp. *dianthi*, se inocularon por inmersión radical con 20 aislados de *Fusarium* spp. recuperados del suelo, más uno de Fo y otro de Fs aislados de las enmiendas PG y CA, respectivamente. Tras incubarse a 25°C durante 4 meses, se determinaron severidad de síntomas (escala 1-5), longitud de tallos y peso fresco. Se observaron síntomas significativamente más severos (>3) con los aislados de Fo de suelos enmendados con CA, PB, G y T, y con los de Fp de las parcelas correspondientes a PB y DMDS. Las menores alturas y peso de plantas se observaron en las plantas correspondientes a Fo-G, Fp-PB, DMDS-G y PG y Fs-PB y CA.

Este trabajo ha sido financiado por el Convenio INIA-Junta de Andalucía CC09-074 y fondos FEDER (UE).



P-154-01347

CONTROL QUÍMICO Y BIOLÓGICO DE LA PODREDUMBRE DE LA BASE DEL TALLO DEL CALABACÍN CAUSADA POR *Fusarium solani*Pérez A.¹, Porcel E.¹, Gómez-Vázquez J.M.¹

1) IFAPA Centro La Mojonera

Fusarium solani f. sp. *cucurbitae* (Fsc) es un hongo de suelo que causa la podredumbre de la base del tallo de varias cucurbitáceas. Hasta ahora los únicos métodos para su control parecen ser la rotación del cultivo con plantas no susceptibles al patógeno durante 3-4 años, y la solarización con cianamida de calcio y materia orgánica.

El objetivo de este estudio fue la evaluación de varios productos químicos y biológicos para el control de la enfermedad. Para ello se realizaron dos experimentos consecutivos durante la primavera de 2012 en un invernadero multitúnel con cubierta de polietileno en cultivo sin suelo sobre sacos de perlita. Se evaluaron ocho fungicidas: Vimar, Previcur, Octagon, Kemdazim, Terrazole, Tachigaren, Topsin y Moncut; un formulado a base de *Trichoderma harzianum* e inóculo de *Rhizophagus irregularis* procente de la rizosfera de plantas de puerro previamente micorrizadas. La inoculación con el aislado PCL-511 de Fsc se realizó en estado de 2-3 hojas verdaderas. El primer tratamiento con los productos se realizó dos días antes de la inoculación, y el otro, 15 días después del primero. Las dosis aplicadas fueron las recomendadas por los fabricantes.

Los resultados indicaron que tres de los productos evaluados, Kemdazim, Topsin y Octagon fueron altamente eficaces para el control de la enfermedad, permaneciendo todas las plantas, excepto una de las tratadas con Topsin en el primer experimento, sin síntomas después de 40 y 38 días de la inoculación, para el primer y segundo experimento, respectivamente. El resto de productos resultaron ineficaces, ya que se observaron síntomas en el 100% de las plantas inoculadas. Los resultados obtenidos indican la efectividad de Kemdazim, Topsin y Octagon para el control de la enfermedad en las condiciones ensayadas.

Este trabajo ha sido financiado por el proyecto INIA RTA 2010-00044-00-00 cofinanciado con fondos FEDER (UE).

El inóculo micorrícico empleado ha sido cedido por la Dra. Cinta Calvet del IRTA de Cabrils (Barcelona).



P-155-01357

CONTROL BIOLÓGICO DE LA FUSARIOSIS VASCULAR DEL TABACO (*Fusarium oxysporum* f. sp. *batatas*) MEDIANTE EL USO DE AISLADOS NO PATOGENICOSAlves-Santos F.M.¹, Arroyo V.¹, Díez J.J.¹

1) Instituto Gestión Forestal Sostenible (Univ. Valladolid-INIA). Departamento de Producción Vegetal y Recursos Forestales. E.T.S. Ingenierías Agrarias de Palencia - Universidad de Valladolid. fmalvess@pvs.uva.es

Fusarium oxysporum es un hongo del suelo que incluye estirpes no patogénicas y patogénicas de importancia económica. Las estirpes no patogénicas colonizan la raíz sin causar síntomas ni producir daño mientras que las estirpes patogénicas provocan marchitez. Estos patógenos de suelo son difíciles de combatir, tratamientos químicos o físicos han resultado ser muy poco eficaces. Por ello el control biológico toma mayor importancia, por su respeto por el medio ambiente y porque suele ser compatible con otras medidas de control. La eficacia de *Fusarium* como colonizador de las raíces así como su resistencia y permanencia en el suelo convierten las especies no patogénicas en organismos muy adecuados para el control biológico.

El presente trabajo se ha realizado con 15 aislados no patogénicos y 10 aislados patogénicos de *Fusarium oxysporum*. Se han realizado tres pruebas *in vitro*: análisis de la competencia con los aislados patogénicos en medio PDA, inhibición de la germinación esporal de los patógenos mediante el uso del extracto líquido de cultivos de los aislados no patogénicos e inhibición de la germinación de semillas de tabaco por la presencia de los patógenos y no patógenos.

De los aislados probados seleccionamos los tres que presentaron mayor potencial en las pruebas *in vitro*, los aislados seleccionados fueron el AS3, AB63, y AB82. Previamente hemos seleccionado por su crecimiento micelial y su esporulación los aislados no patogénicos AB7 y AB62 respectivamente. Posteriormente mediante ensayos *in vivo* sobre planta de tabaco fue probado el control biológico de los 5 aislados seleccionados frente a siete aislados patogénicos. Los ensayos se basan en la inoculación simultánea de aislados patogénicos y no patogénicos. Para hacer la medición, hacemos un conteo de plantas muertas, afectadas y sanas.

Las diferencias estadísticas observadas indican que alguno de estos aislados podría ser útil en el control biológico de la enfermedad.



P-156-01322

SUSCEPTIBILIDAD DE DIVERSOS CULTIVARES COMERCIALES FRENTE A LA PODREDUMBRE DE LA BASE DEL TALLO DEL CALABACÍN CAUSADA POR *Fusarium solani*Gómez-Vázquez J.M.¹, Pérez A.¹

1) IFAPA Centro La Mojonera (Almería)

La podredumbre de la base del tallo del calabacín, causada por *Fusarium solani* f. sp. *cucurbitae* (Fsc,) produce sobre las plantas enfermas necrosis en la base del tallo, marchitez y finalmente la muerte. Desde su detección en el año 2007, se ha convertido en la principal enfermedad de suelo del cultivo del calabacín en la provincia de Almería.

El objetivo de los experimentos fue evaluar la respuesta de varios cultivares comerciales de calabacín, para su posible utilización como método de control. Para ello se llevaron a cabo dos experimentos en las primaveras de 2009 y 2011, en un invernadero multitúnel con cubierta de polietileno y cultivo sin suelo utilizando sacos de perlita. Con un diseño factorial completamente aleatorio en tres bloques, los factores estudiados fueron: la inoculación o no con el aislado PCl-511 de Fsc y los cultivares comerciales Milenio, Cónsul, Otelo, Platinum, Senator, Capea, Cora, Tosca, Sinatra, Candela, Cronos, Cassiopée, Natura y Vesul.

En el primer experimento todos los cultivares se mostraron muy susceptibles con una mortandad que se situó entre el 94,4 y 100%; excepto para el cultivar Capea que afectó al 77,8% de las plantas, al final del experimento después de 37 días de la inoculación. En el segundo experimento sin embargo, el patógeno causó la muerte de todas las plantas en todos cultivares ensayados, después de los 41 días de la inoculación. Los resultados obtenidos indican una alta susceptibilidad de todos los cultivares en las condiciones ensayadas.

Este trabajo ha sido financiado por el proyecto INIA RTA 2010-00044-00-00, cofinanciado con fondos FEDER (UE).



P-157-01419

EVALUACIÓN DEL EFECTO DE DIFERENTES MATERIAS ACTIVAS FUNGICIDAS SOBRE LA INHIBICIÓN DEL CRECIMIENTO MICELIAR DE *Fusarium proliferatum*

Palmero D.¹, Gálvez L.¹, Bango D.¹, Jurado M.¹, De Cara M.²

1) Universidad Politécnica de Madrid, E.U.I.T. Agrícola, Avda. Puerta de Hierro, 4 (28040) Madrid.

2) IFAPA Centro: La Mojonera. Autovía del Mediterráneo. La Mojonera (4745) Almería.

Las plagas y enfermedades en el cultivo del ajo suponen elevadas pérdidas económicas cada año en nuestro país. En estudios previos, se ha identificado a *Fusarium proliferatum* como el agente causal de la podredumbre de los dientes de ajo durante el almacenamiento. Hasta el momento, no se dispone de datos sobre la eficacia de tratamientos químicos efectivos para el control de esta enfermedad y la lucha contra esta fusariosis no se tiene en cuenta en el calendario de fungicidas aplicados en campo.

Este trabajo presenta el estudio *in vitro* del efecto de diferentes materias fungicidas en la inhibición del crecimiento miceliar del hongo sobre medios de cultivos suplementados. La sensibilidad *in vitro* de siete cepas de *F. proliferatum* se ha evaluado con nueve materias activas (azoxistrobin, boscalida + piraclostrobin, clortalonil, carboxina + tiram, difenoconazol, iprodiona, tebuconazol, procloraz y trifloxistrobin) en cuatro concentraciones crecientes (1, 10, 100 y 1000 ppm). De esta manera, se han analizado el efecto de los fungicidas, la dosis y de los aislados sobre el crecimiento miceliar. El estudio de regresión y el cálculo de los diferentes valores de EC50 muestra como algunos fungicidas tienen eficacia a dosis mucho menores que otros. Las materias activas más eficaces fueron tebuconazol y procloraz (89,91 y 93,87 % de inhibición media respectivamente) en todas las concentraciones ensayadas. En cambio, fungicidas formulados con carboxina deben ser evitados por su baja eficacia (31,27% de inhibición). Debe tenerse en cuenta la respuesta diferencial de los aislados de *F. proliferatum* en el diseño de los calendarios de tratamiento, ya que se observaron diferencias significativas en su susceptibilidad a alguno de los fungicidas probados, información que ha de tenerse muy presente a la hora de diseñar la alternancia de las materias activas fungicidas aplicadas en campo.



P-158-01443

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE UN NUEVO MICOVIRUS EN *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi*Lemus-Minor C.G.¹, Cañizares M.C.², García-Pedrajas M.D.², Pérez-Artes E.¹

1) Instituto de Agricultura Sostenible - Consejo Superior de Investigaciones Científicas (IAS-CSIC)

2) Instituto de Hortifruticultura Subtropical y Mediterránea "La Mayora" - Universidad de Málaga - Consejo Superior de Investigaciones Científicas (IHSM-UMA-CISC)

La búsqueda, identificación y caracterización de micovirus que infectan hongos fitopatógenos constituye una línea de investigación de importancia creciente debido a su posible utilización en estrategias de control biológico. El análisis de extractos de ácidos nucleicos totales de una amplia colección de aislados de *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* (Fod), obtenidos de áreas de cultivo de clavel del sur de España, resultó en la identificación de un elemento extracromosómico de ARN de doble hebra (dsRNA) en uno de los aislados (Fod 116). Para elucidar la secuencia de este elemento se utilizaron tres técnicas distintas: Single Primer Amplification Technique (SPAT), construcción de librerías de cDNA, y amplificaciones dirigidas. El uso combinado de estas técnicas dio como resultado la determinación de la secuencia genómica completa del virus identificado, que consta de 4 segmentos distintos de dsRNA, denominados dsRNA 1, 2, 3 y 4. La secuencia de estos 4 segmentos se analizó utilizando búsquedas BLAST, encontrando similitudes con otros micovirus de la familia *Chrysoviridae*, como *Fusarium graminearum*-China 9 (FgV-ch9) y *Magnaporthe oryzae* chrysovirus 1 (MoCV1). Estos resultados evidencian la presencia en un aislado de Fod de un nuevo micovirus, al que hemos denominado *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* Virus 1 (FodV1). En este trabajo se presenta una descripción detallada de la estructura genómica de FodV1 y se analiza su relación filogenética con otros micovirus.

*Este trabajo ha sido financiado por fondos del Plan Nacional de Investigación otorgados por el Ministerio de Ciencia e Innovación (AGL2010-18279), cofinanciado con fondos FEDER (EU)



P-159-01367

VARIABILIDAD DE LOS EFECTOS SUPRESIVOS FRENTE A VERTICILOSIS DE LA ENMIENDA CON COMPOST DE ALPERUJO SEGÚN SU ORIGEN

Avilés M.¹, Gata A.¹, Pérez S.¹, Borrero C.¹

1) Dpto. Ciencias Agroforestales, E.T.S.I.A. Universidad de Sevilla.

Los métodos de control disponibles frente a la verticilosis del olivo son parcialmente efectivos, lo que obliga a un uso integrado de los mismos. En este sentido, hay evidencias de reducción de las verticilosis por la aplicación de enmiendas con compost de alperujo. No obstante, dada la variabilidad tanto del material 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, de las siguientes almazaras situadas en: Baena (Córdoba), Bobadilla (Málaga), Cazorla (Jaén) y Tabernas (Almería). Todos ellos fueron aplicados 20% (v/v, compost/suelo). Utilizamos un suelo (Villanueva de la Reina, Córdoba) con alta infestación natural de *Verticillium dahliae*. Se realizaron bioensayos en condiciones controladas con un diseño de bloques al azar con 4 bloques y cuatro contenedores por tratamiento y bloque. El patosistema utilizado fue *Verticillium dahliae*/ algodónero. La severidad se evaluó semanalmente desde inicio de síntomas. Al inicio de cada bioensayo se evaluó la actividad microbiana β -glucosidasa, pH y conductividad eléctrica (CE). Al final se cuantificó la densidad de microesclerocios en los suelos. La enmienda con compost de Cazorla presentó una elevada supresividad y el compost de Tabernas una supresividad intermedia, registrando las otras enmiendas severidades no distintas al suelo no enmendado. Además, sólo la enmienda con compost de Cazorla mostró una reducción de la densidad de microesclerocios respecto al suelo no enmendado. La enmienda con supresividad elevada elevó el pH y redujo la CE del suelo. En cambio, la de supresividad intermedia produjo lo contrario, además de mostrar la mayor actividad β -glucosidasa.

Este trabajo ha sido financiado por el proyecto AGL2010-21982-C02-01 del Ministerio de Ciencia e Innovación, cofinanciado por fondos FEDER (UE).



P-160-01619

EVALUACIÓN DE LA APLICACIÓN DE *Trichoderma saturnisporum* SOBRE EL CRECIMIENTO DE PLANTAS SOMETIDAS A ESTRÉS POR SALINIDAD.**Díáñez F.¹, Santos M.¹, Carretero F.¹, Gea F.J.², Navarro M.J.², Marín F.¹**

1) Dpto. Agronomía. Escuela Politécnica Superior y Ciencias Experimentales. Universidad de Almería. 04120. Spain. fdianez@ual.es

2) Centro de Investigación, Experimentación y Servicios del Champiñón. Quintanar del Rey, Cuenca.

El estrés por salinidad es el estrés abiótico de mayor importancia de entre los que afectan al crecimiento y desarrollo de la planta, debido al incremento de la presión osmótica, toxicidad, desequilibrios iónicos y estrés oxidativo. Existen muchos cultivos susceptibles a la salinidad, entre los que se encuentra, el pimiento, dando lugar a disminución de cosechas.

En este trabajo, se evalúa el efecto de la salinidad *in vitro* sobre el crecimiento micelial de dos cepas de *T. saturnisporum*, para continuar con la evaluación sobre planta en campo. Para ello se transplantaron, plántulas de pimiento a contenedores de 1 l en los que se modificó las CE del sustrato, desde 2,77 dS·m⁻¹ (testigo), a 3, 4, 5, 6 y 7 dS·m⁻¹. Todas las condiciones fueron inoculadas con tres dosis de *T. saturnisporum* (10⁵, 10⁶ 10⁷ conidias/ml) y un testigo sin *Trichoderma*.

T. saturnisporum mostró resistencia a ambiente salinos *in vitro*, y aunque se vió reducida su velocidad de crecimiento según se produce un incremento de sal en el medio, mantiene su viabilidad y crecimiento activo a una concentración de 80 g·l⁻¹ de sal.

Los resultados obtenidos para las plantas de pimiento inoculadas con *T. saturnisporum* a las distintas dosis, y a CE elevadas de 6 y 7 dS·m⁻¹, muestran como se produce una mejora en los parámetros morfológicos evaluados; éstos son, número de hojas, peso seco de hojas, tallo, raíz, así como área foliar, a pesar de las altas conductividades. Igualmente, se ha obtenido mejor calidad de planta evaluada según los índices de calidad: Índice de esbeltez, Índice de tallo-raíz, área foliar específica, coeficiente de área foliar, relación foliar-raíz, relación parte aérea-raíz, e índice de calidad, comparado con las plantas sin inocular. Lo más llamativo es el incremento de la hidratación de las plantas de pimiento a valores de CE alto, lo que supone una mayor resistencia de las plantas al estrés salino.



P-161-01545

***Trichoderma harzianum* COMO AGENTE DE CONTROL BIOLÓGICO FRENTE A LA VERTICILOSIS DEL OLIVO**

Barroso J.B.¹, Rincón A.M.², Chaki M.¹, Carreras A.¹, Pérez-Artes E.³, Valderrama R.¹, Ruano-Rosa D.³, Prieto P.⁴, López-García A.A.², Mercado-Blanco J.³

- 1) Departamento de Biología Experimental, Facultad de Ciencias Experimentales, Universidad de Jaén, Campus Universitario "Las Lagunillas" s/n, 23071, Jaén.
- 2) Departamento de Genética, Facultad de Biología, Universidad de Sevilla, Avda. Reina Mercedes s/n, 71012, Sevilla.
- 3) Departamento de Protección de Cultivos del Instituto de Agricultura Sostenible (IAS-C.S.I.C), Campus Alameda del Obispo, Avda. Menéndez Pidal, s/n, 14004, Córdoba.
- 4) Departamento de Mejora Vegetal del Instituto de Agricultura Sostenible (IAS-C.S.I.C), Campus Alameda del Obispo, Avda. Menéndez Pidal, s/n, 14004, Córdoba

La verticilosis del olivo (*Olea europaea* L.) (VO), causada por el hongo *Verticillium dahliae* Kleb., está considerada como una de las enfermedades más devastadoras de este cultivo, particularmente en la cuenca mediterránea. En la actualidad, esta enfermedad sólo puede ser neutralizada de manera efectiva mediante una estrategia de control integrado, incluyendo la lucha biológica. En este sentido, numerosas especies del hongo *Trichoderma* han sido descritas como agentes de control biológico (ACB) de hongos fitopatógenos. El objeto de este estudio ha consistido en la evaluación del potencial de la cepa *T. harzianum* CECT 2413 como ACB efectivo frente a la VO. La cepa CECT 2413 demostró ser capaz de crecer *in vitro* sobre aislados representativos de los patotipos defoliante (D) y no defoliante (ND) de *V. dahliae* que infectan al olivo. Además, la observación mediante microscopía láser confocal (CLSM) del enfrentamiento directo de ambos hongos marcados con *eyfp* (*V. dahliae*) y *gfp* (*T. harzianum*) reveló que el micoparasitismo es uno de los mecanismos implicados en este antagonismo. Cuando se aplicó mediante irrigación una suspensión de conidias de la cepa CECT 2413 a plantones de olivo de 3 meses de edad (cv. Picual) antes de la infección con un aislado D de *V. dahliae*, se observó una reducción significativa de los síntomas de la enfermedad frente a los observados en plantas no tratadas con *Trichoderma*. Finalmente, mediante observación de la interacción *gfp-Trichoderma*-raíz por CLSM, se constató que la cepa CECT 2413 es capaz de colonizar y permanecer en la rizosfera de los olivos durante un periodo prolongado de tiempo. En resumen, *T. harzianum* CECT 2413 ha demostrado ser un colonizador eficiente de raíces de olivo y un ACB efectivo frente al patotipo D de *V. dahliae*.

Financiado con fondos FEDER y Junta de Andalucía (P10-AGR-6038, grupo BIO286)



P-162-01368

LA SUPRESIVIDAD ESPECÍFICA Y GENERAL ASOCIADAS A LA REDUCCIÓN DE LA VERTICILOSIS EN UN COMPOST DE ALPERUJO FORMULADO COMO SUSTRATO

Avilés M.¹, Gata A.¹, Castillo S.¹, Borrero C.¹

1) Dpto. Ciencias Agroforestales, E.T.S.I.A. Universidad de Sevilla.

Hemos informado de la identificación de un compost de alperujo supresivo a la verticilosis en su formulación como sustrato viverístico. Con el objetivo de dilucidar la naturaleza de la supresividad mostrada hemos llevado a cabo bioensayos en condiciones controladas. Así, hemos incluido los siguientes tratamientos del sustrato supresivo (1:2 v/v, compost de alperujo/turba): natural; natural fertilizado (con 0.52 g/L de nitrato amónico); autoclavado (dos días consecutivos durante 1 hora a 120 °C y 1,2 atm); calentado (durante 6 días a 60°C), además de un sustrato 100% turba. El diseño experimental fue 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 final del bioensayo se cuantificó la densidad de microesclerocios en los sustratos. Se observó una notable pérdida de supresividad con ambos tratamientos térmicos, si bien más intensa con el calentamiento que con el autoclavado. No obstante, estos sustratos mantuvieron parte de la supresividad en comparación con la turba, aunque también registraron concentraciones finales de microesclerocios no distintas de la encontrada en el sustrato de turba (característica típica de la supresividad general). Por otro lado, el aporte extra de nitrógeno no afectó a la supresividad, pero sí dio lugar a mayor concentración de microesclerocios finales. En definitiva, podemos asignar la participación mayoritaria de supresividad específica como también, en menor proporción, de la supresividad general. Además, la disponibilidad del nitrógeno parece no estar claramente involucrada. El comportamiento diferencial de ambos tratamientos térmicos parece indicar la no participación en la supresividad específica de determinados taxones mesofílicos termotolerantes.

Este trabajo ha sido financiado por el proyecto AGL2010-21982-C02-01 del Ministerio de Ciencia e Innovación, cofinanciado por fondos FEDER (UE).



P-163-01620

EVALUACIÓN DE ACTIVIDAD BIOLÓGICA EN TÉ DE COMPOST ENRIQUECIDOS CON *Trichoderma saturnisporum*.

Santos, M.¹, Diáñez, F.¹, López, E.¹, Marín, F.¹, Navarro, M.J.², Gea, F.J.²

¹Dpto. Agronomía. Escuela Politécnica Superior y Ciencias Experimentales. Universidad de Almería. 04120. Spain. msantos@ual.es

²Centro de Investigación, Experimentación y Servicios del Champiñón. Quintanar del Rey, Cuenca.

Los téis o extractos de compost suponen un producto derivado del compost, de excelentes propiedades para el control de enfermedades y nutrición de las plantas.

La adición de microorganismos, ya sea para aportar antagonistas o como complemento a la biodiversidad microbiana autóctona, puede potenciar el desarrollo de la supresión de enfermedades.

En este trabajo se ha evaluado la influencia de distintos factores en la producción de sideróforos, actividad proteasa y celulasa de diferentes téis de compost enriquecidos o no con *Trichoderma saturnisporum*. Estos factores son: la influencia de aireación (aireados y no aireados), la proporción de compost-agua, ensayándose 1/3, 1/4 y 1/8, y por último, el tiempo de incubación, 1, 3, 7 y 15 días. Los téis de compost se obtuvieron a partir de cuatro tipos diferentes: compost de sustrato agotado de champiñón, compost y vermicompost de restos hortícolas y compost de orujo de vid. Para cada una de las condiciones, se ensayaron, extractos filtrados, esterilizados y microfiltrados, procediendo a cada una de las determinaciones de actividad biológica.

De todos los tipos de tratamientos solo los filtrados, para todas las condiciones ensayadas mostraron actividad biológica. Los téis de compost enriquecidos con *T. saturnisporum* presentaron mayor actividad proteasas y producción de sideróforos que los téis de compost no enriquecidos, por lo que puede ser considerado como producto de alto potencial para el control de agentes fitopatógenos. Entre todos los téis de compost, el de restos hortícolas mostró mayor actividad para todas las condiciones ensayadas. Para el resto de los extractos, los no aireados, mostraron una mayor producción de sideróforos. La adición de *T. saturnisporum* a los extractos produjo la inhibición de la producción de celulasa.



P-164-01621

COMPATIBILIDAD DE *T. saturnisporum* CON FUNGICIDAS DE USO FRECUENTE EN CULTIVOS HORTÍCOLAS.

Diáñez F.¹, Santos M.¹, Carrillo A.J.¹, Gea F.J.², Castillo A.¹, Navarro M.J.²

1) Dpto. Agronomía. Escuela Politécnica Superior y Ciencias Experimentales. Universidad de Almería. 04120. Spain. fdianez@ual.es

2) Centro de Investigación, Experimentación y Servicios del Champiñón. Quintanar del Rey, Cuenca.

El conocimiento de la compatibilidad de los microorganismos utilizados para el control biológico con los fungicidas de uso más frecuente en los cultivos hortícolas permite racionalizar las decisiones en cuanto a la aplicación de este tipo de productos, que habitualmente no se tiene en cuenta su manejo. En este trabajo, se evalúa la compatibilidad del uso de *Trichoderma saturnisporum*, con los fungicidas Propamocarb (60,5 %), Etridiazol (48%), Metil tiofanato (70%), Tetraconazol (12,5%), Kresoxim metil (50%), Dimetomorf (7,5%) + Mancozeb (66,7%), Folpet (40%) + Metalaxil (10%), Cimoxanilo (50%), Iprodiona (50%), Pirimetanil (40%), Dietofencarb (25%), Benalaxil (6%) + Cimoxanilo (3,2 %) + Mancozeb (40%), Pencicuron (25%), Azoxistrobin (25%), Flutriafol (12,5%), Clorotalonil (50%) Triadimenol (25%), Fosetil-Al (80%), Ciptrodinil (37,5%)+ Fludioxonil (25%), Miclobutanil (24%), Mancozeb (80%), Fenhexamida (50%), Hidróxido cúprico (35%) y Cimoxanilo (45%). Para cada producto, se tomaron como referencia las dosis mínima (dosis 2) y máxima (dosis 3) recomendadas en el MAGRAMA, además de la mitad de la dosis mínima (dosis 1) y 1,5 veces la dosis máxima (dosis 4). La evaluación se realizó *in vitro* determinando el porcentaje de inhibición micelial obtenido así como el carácter fungistático para aquellos que no crecían en presencia de fungicida. De todos los fungicidas ensayados solo flutriafol (12,5%), Clortalonil (50%), Metil tiofanato (70%), Ciprodinil (37,5%)+ Fludioxonil (25%) e hidróxido cúprico para la dosis 4 fueron tóxicas y, por tanto, incompatibles con el agente de control biológico. Si consideramos de forma conjunta, el modo de aplicación para todos los fungicidas ensayados, y la dosis final que se podría alcanzar en el suelo, podemos concluir que no existe incompatibilidad en el empleo integrado de *T. saturnisporum* con los fungicidas evaluados.



P-165-01369

LOS ÁCIDOS ORGÁNICOS INVOLUCRADOS EN LA SUPRESIVIDAD INDUCIDA FRENTE A VERTICILLOSIS POR LA ENMIENDA DEL SUELO CON COMPOST DE ALPERUJO

Avilés M.¹, Gata A.¹, Castillo S.¹, Borrero C.¹

1) Dpto. Ciencias Agroforestales, E.T.S.I.A. Universidad de Sevilla.

Hemos detectado la capacidad de las enmiendas con algunos compost de alperujo de inducir supresividad a la verticilosis. En bioensayos frente a la verticilosis del algodón en dos suelos distintos (Utrera, Sevilla y Almodóvar del Río, Córdoba) con infestación natural de *Verticillium dahliae* y donde la enmienda con compost de alperujo se aplicó a 0, 10 y 20% (v/v) se registró supresividad dependiente de la dosis de enmienda. Al inicio de estos ensayos se caracterizó el perfil del metabolismo del carbono de las correspondientes comunidades microbianas y se obtuvo el espectro de infrarrojo con transformada de Fourier de los distintos tratamientos. Mediante análisis de regresión múltiple hemos detectado una importante contribución del consumo microbiano de ácidos carboxílicos en la explicación de la severidad registrada y la concentración final de microesclerocios. En coincidencia con la concentración de estas fuentes carbonadas en los suelos enmendados, determinadas mediante los espectros de infrarrojo. Todo ello parece apuntar la participación de los ácidos orgánicos en esta supresividad inducida por enmienda.

Este trabajo ha sido financiado por el proyecto AGL2010-21982-C02-01 del Ministerio de Ciencia e Innovación, cofinanciado por fondos FEDER (UE).



P-166-01389

SELECCIÓN DE UN MÉTODO DE INOCULACIÓN EFECTIVO PARA ENSAYOS DE CONTROL BIOLÓGICO DE LA VERTICILOSIS EN OLIVO

Varo A.¹, Roca L.F.¹, Trapero A.¹

1) Grupo Patología Agroforestal, Dpto. Agronomía, Universidad de Córdoba. Campus de Rabanales, Edificio C-4, 14071, Córdoba.

La principal limitación para el estudio de aspectos epidemiológicos y de control de la Verticilosis del olivo, causada por *Verticillium dahliae*, es la falta de un método eficaz de inoculación de olivo que reproduzca las condiciones naturales de infección.

En este trabajo se ha desarrollado una metodología de inoculación de plantas de olivo para la selección de productos biológicos por su eficacia contra la enfermedad. Se han evaluado cuatro métodos de inoculación: infestación del suelo con microesclerocios, infestación con el medio arena-harina maíz-agua (AMA) colonizado por el hongo, inmersión de raíces en una suspensión de conidios, e inmersión de raíces en un batido del medio patata-dextrosa-agar (PDA) colonizado por el hongo. De los dos primeros métodos se ensayaron, además, varias dosis de inóculo. Se utilizaron plantones del cultivar susceptible 'Picual' y dos aislados de *V. dahliae* del patotipo defoliante que diferían en su capacidad para producir microesclerocios. Para comprobar la eficacia de los métodos, se realizó un bioensayo con dos mezclas de bacterias y hongos procedentes de extractos de compost.

El método de infestación del suelo con AMA fue seleccionado en base a la respuesta severa y homogénea de las plantas, la cual permitió establecer diferencias entre los tratamientos biológicos. La dosis de AMA seleccionada fue 10%, aunque se detectó un incremento significativo ($P=0.0036$) de la severidad de la enfermedad, con el incremento de inóculo entre 5 y 50%. De los dos tratamientos biológicos, uno redujo significativamente la gravedad de las infecciones con el método AMA, mientras que no hubo diferencias entre el testigo y los tratamientos con los otros métodos de inoculación. Por ello, el método AMA se está utilizando de forma rutinaria para la selección de productos biológicos por su eficacia contra la Verticilosis del olivo en condiciones controladas.

Esta investigación ha sido cofinanciada por el proyecto "Control Biológico de la Verticilosis del olivo" (UG 400545) de la Interprofesional del Aceite de Oliva Español y el proyecto de excelencia AGR08-3635 de la Junta de Andalucía.



P-167-01409

ESTUDIO DE LA FUNGITOXICIDAD A *Verticillium dahliae* Y FITOTOXICIDAD EN SUSTRATOS FORMULADOS CON COMPOST DE ALPERUJO**Borrero C.¹, Gata A.¹, Castillo S.¹, Avilés M.¹**

1) Dpto. Ciencias Agroforestales, E.T.S.I.A. Universidad de Sevilla

En otros trabajos hemos constatado la supresividad a la verticilosis de ciertos compost de alperujo. Los objetivos de este trabajo son evaluar la fungitoxicidad a *Verticillium dahliae* y la fitotoxicidad en una colección de cuatro compost comerciales de alperujo de distinto origen y en dos estados de madurez (frescos y maduros) y, relacionar estas propiedades con su supresividad. Los compost fueron formulados como sustratos hortícolas en mezcla con turba (1:2 v/v, compost de alperujo/turba). Como testigo se empleó turba 100%. Todas las determinaciones tuvieron tres repeticiones. Para los ensayos de fungitoxicidad se elaboraron medios de cultivo con los sustratos molidos en los que se sembró una pastilla de 0.5 cm de diámetro de un aislado de *V. dahliae* y se midió su crecimiento radial. Para conocer la fitotoxicidad cada sustrato se distribuyó en placas Petri con 10 semillas de lechuga y se determinó el índice de germinación. Todos los compost presentaron más fungitoxicidad que la turba, siendo los compost frescos de Tabernas y Bobadilla y los maduros de Baena y Bobadilla los más fungitóxicos. Los compost frescos de Tabernas y Baena y los maduros de Cazorla y Tabernas presentaron menor índice de germinación que la turba. La leve fungitoxicidad del compost de Cazorla pudiera colaborar en su supresividad, en el resto de compost la fungitoxicidad no se corresponde con su supresividad. Podemos concluir que algunos compost de alperujo comerciales presentan cierto efecto fitotóxico y que no vemos una correspondencia entre la fungitoxicidad registrada y su 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.



P-168-01444

CONTROL DE LA VERTICILOSIS DEL OLIVO MEDIANTE LA DESINFESTACIÓN DEL SUSTRATO DE PLANTACIÓN CON UNA FORMULACIÓN DE EXTRACTOS DE *Allium* spp.

Trapero J.L.¹, Remesal E.¹, García-López J.D.², Núñez C.², Rubio A.², Guillamón E.², Baños A.², Navas-Cortés J.A.¹

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

2) DMC Research Center. Dep. de Microbiología. Camino de Jayena s/n, 18620 Alhendín, Granada

La producción de plantones de olivo libres de patógenos implica tanto el uso de material vegetal como de sustratos de plantación libre de éstos. En este trabajo se ha evaluado la actividad contra *Verticillium dahliae*, agente de la Verticilosis del olivo de un nuevo producto basado en extractos de *Allium* spp. [AGROCU® (AC®)] desarrollado por la empresa española DOMCA.

Se han realizado experimentos in vitro dosis-respuesta de AC frente a 8 aislados de *V. dahliae* de los patotipos Defoliante (D) y No defoliante (ND). Existió una reducción del crecimiento micelial de todos los aislados y dosis de AC (100 a 500 ppm) con una inhibición micelial completa a 300-400 ppm. La actividad de AC en la supresión de *V. dahliae*-D se evaluó en dos experimentos en cámara de crecimiento en que el sustrato de plantación se trató con las dosis recomendadas (500 y 1.000 ppm) y se incubó 4 días en bolsas herméticas. Tras este período el inóculo de *V. dahliae*-D se redujo el 94 y 99,4% en sustrato tratado con 500 y 1.000 ppm de AC, respectivamente. La capacidad de AC en la supresión de Verticilosis se evaluó en por el trasplante de plantones de olivo cv. Picual al sustrato infestado por *V. dahliae*-D y tratado con AC. Posteriormente existieron dos tratamientos, las plantas no fueron tratadas con AC o bien tras una semana se realizó un riego con 100 ml de AC a la misma dosis a la que se trató ese mismo sustrato. Tras 3 meses de crecimiento, las plantas de 'Picual' que crecieron en suelo infestado por *V. dahliae*-D no tratadas con AC alcanzaron una incidencia de Verticilosis del 100% y una severidad de 3,3 (escala 0-4). Sin embargo, las plantas que crecieron en sustrato tratado con 500 y 1.000 ppm de AC alcanzaron una incidencia del 60 y 20%, una severidad de síntomas de 1,9 y 0,6, e intensidad de colonización vascular del tallo del 60 y 43%, respectivamente. El tratamiento adicional con AC suprimió completamente el desarrollo de Verticilosis. La densidad de inóculo de *V. dahliae*-D tras 3 meses del experimento se redujo respecto al sustrato no tratado en 89,0 y 97,4% en los diferentes tratamientos. Los resultados demuestran la capacidad de AC para la reducción de inóculo de *V. dahliae* en sustrato de plantación así como de suprimir el posterior desarrollo de Verticilosis en olivo.

Financiación: Contratos DOMCA S.A.UNIP - IAS CSIC



P-169-01446

EL CRECIMIENTO DE PLÁNTULAS COMO PARÁMETRO PARA LA SELECCIÓN DE GENOTIPOS DE OLIVO RESISTENTES A *Verticillium dahliae* EN UN PROGRAMA DE MEJORA

Valverde P.¹, Trapero C.¹, López-Escudero F.J.¹

1) Departamento de Agronomía, Universidad de Córdoba, Campus Universitario de Rabanales, Edificio Celestino Mutis (C4), 14071 Córdoba

La obtención de nuevas variedades de olivo resistentes a la Verticilosis es actualmente el principal objetivo en la mejora de dicha especie y permitiría avanzar en el control de la enfermedad. Para la selección precoz de genotipos resistentes son necesarios métodos de evaluación rápidos y eficaces. Por ello, en este trabajo se estudia el uso del crecimiento vegetativo como un parámetro para la selección de genotipos resistentes a la Verticilosis.

En Octubre de 2013 se recolectaron y sembraron semillas de olivo procedentes de polinización libre de 91 variedades (un árbol por variedad) del Banco de Germoplasma Mundial de Olivo de Córdoba. Entre 10 y 20 plántulas de cada variedad madre se inocularon mediante inmersión radicular en una suspensión de conidias de un aislado defoliante de *Verticillium dahliae* y se incubaron en invernadero. Otras 4 plántulas de cada variedad madre se emplearon como control. En total se inocularon 1200 plántulas y otras 340 se incluyeron como control. Los síntomas en las plántulas se evaluaron semanalmente desde la 4ª semana tras la inoculación. Además, se midió la altura de las plántulas cada dos semanas a partir de la inoculación.

Todas las plántulas control comenzaron a crecer a las 4 semanas de la inoculación, mientras que las pocas plántulas inoculadas que mostraron crecimiento lo hicieron varias semanas más tarde. La ausencia de crecimiento estuvo en la mayoría de los casos asociada al desarrollo de síntomas, salvo en algunas plántulas que permanecieron asintomáticas y sin crecer. Estos resultados sugieren que el crecimiento vegetativo podría emplearse como parámetro adicional al de la ausencia de síntomas para la selección de genotipos resistentes. Finalmente, se han detectado algunas variedades que transmiten un nivel elevado de resistencia a su descendencia y se han preseleccionado como resistentes 200 genotipos según los parámetros mencionados (crecimiento y ausencia de síntomas).

Financiación: AGL 2011-30137 (Ministerio de Ciencia e Innovación-EU FEDER) y P10-AGR6573 (Junta de Andalucía).



P-170-01472

EVALUACION DE LA RESISTENCIA AL CHANCRO RESINOSO EN *Pinus pinaster* PARA SU INCORPORACION EN PROGRAMAS DE MEJORA GENETICAElvira-Recuenco M.¹, Iturritxa E.², Raposo R.¹

1) Patología Forestal, Dpto. Selvicultura, CIFOR-INIA, Ctra. La Coruña Km. 7.5, 28040 Madrid. E-mail: Elvira@inia.es

2) NEIKER Granja Modelo-Arkaute, Apdo.46, 01080 Vitoria-Gasteiz

La enfermedad del chancro resinoso del pino causada por *Fusarium circinatum* Nirenberg & O'Donnell fue registrada por primera vez en Europa en 2005 en viveros de Asturias. Posteriormente ha sido detectada en el norte de España en masas forestales de *Pinus radiata* y recientemente en *P. pinaster*. Uno de los síntomas que produce son los chancros en la madera que deprecian su valor e incluso producen la muerte del árbol. La amenaza que puede suponer *F. circinatum* en las poblaciones autóctonas de *P. pinaster* depende en gran medida de la resistencia al patógeno que exista en estas poblaciones. Hemos testado la resistencia a *F. circinatum* en 10 poblaciones con variación clinal de *P. pinaster* y con estructura familiar para determinar la variabilidad de la resistencia inter e intra poblacional, poder estimar la respuesta a la selección mediante estimaciones de la heredabilidad del carácter y la posibilidad de la mejora de la especie como medida de control de la enfermedad.

El fenotipado de la resistencia se hizo en plántulas de *P. pinaster* de 3 años en condiciones controladas durante dos años consecutivos con inoculaciones artificiales en el tallo. Se testaron 5 familias por población, 2-5 medios hermanos por familia analizando longitud de lesión, marchitamiento y mortalidad como medida de la resistencia. Se encontró una alta variabilidad genética a nivel de población, familia e individuo, siendo significativa la varianza aditiva. La población más resistente procedía del Norte de España y la más susceptible de Marruecos, siendo ésta la que presentaba una menor variación entre sus familias. Valores de heredabilidad en sentido estricto fueron de 0.43-0.58 dependiendo de la variable medida. Estos resultados sugieren el fuerte componente genético de la resistencia y una respuesta a la selección del carácter que haría posible su inclusión en programas de mejora de la especie.



P-171-01473

USO DE PROTECTORES DE LA MADERA PARA PREVENIR LA DISPERSION DE *Fusarium circinatum* EN EL TRANSPORTE DE MADERA

Serrano Y.¹, Elvira-Recuenca M.¹, Conde M.², Llinares F.³, Troya M.T.², Raposo R.¹

1) Patología Forestal, Dpto. Selvicultura, CIFOR-INIA, Ctra. La Coruña Km. 7.5, 28040 Madrid. E-mail: Elvira@inia.es. (Y. Serrano, afiliación durante este trabajo)

2) Dpto. Productos Forestales, CIFOR-INIA, Ctra. La Coruña Km. 7.5, 28040 Madrid.

3) Dpto. de Biología, Facultad de Farmacia, Universidad San Pablo, Urbanización Montepríncipe, Boadilla del Monte, Madrid

Fusarium circinatum es el agente causal del chancro resinoso del pino, enfermedad de cuarentena en la Unión Europea para la que existen regulaciones específicas que tienen como objetivo evitar la introducción y dispersión del patógeno en nuevas áreas. Entre éstas se incluye la restricción al libre comercio de la madera cortada procedente de zonas infectadas. En este estudio se evaluó el valor añadido que los protectores de madera, utilizados de forma rutinaria contra hongos del azulado en serrerías y de pudrición en la industria maderera, pueden tener en la reducción o eliminación de *F. circinatum* de la madera procedente de una zona infectada. Se determinó primero la eficacia de las materias activas más frecuentes en los formulados comerciales, mediante la determinación de la concentración que inhibe el 50% del crecimiento miceliar en medio de cultivo (DE_{50}); segundo, se midió la concentración de producto comercial que inhibe el 50% de la germinación de las conidias; y por último, se determinó la eficacia de estos productos en probetas de madera de *Pinus radiata* previamente inoculadas con el hongo y tratadas con los respectivos productos a las dosis recomendadas por el fabricante. Los resultados mostraron que propiconazol, tebuconazol e IPBC fueron los ingredientes activos efectivos en la inhibición del crecimiento miceliar, mientras que el producto que presentó mayor eficacia en la madera fue el formulado compuesto por tebuconazol, propiconazol y dichlofuonida, que se usa habitualmente contra los hongos de la pudrición. Ninguno de los protectores para hongos del azulado fue efectivo. La eficacia de este tipo de biocidas frente a este organismo de cuarentena abre una aplicación adicional a los protectores de la madera que se vienen utilizando de forma rutinaria para los organismos xilófagos.



P-172-01431

ACTIVIDAD FUNGICIDA DE EXTRACTOS DE ESPÁRRAGO FRENTE A AISLADOS DE *Fusarium oxysporum* PATÓGENOS DE DIFERENTES CULTIVOSMolinero-Ruiz L.¹, Rosado-Álvarez C.², Rodríguez-Arcos R.³, Basallote-Ureba M.J.²

1) Instituto de Agricultura Sostenible, CSIC

2) IFAPA Centro Las Torres-Tomejil

3) Instituto de la Grasa, CSIC

El clavel, el espárrago y la fresa son cultivos importantes en Andalucía, donde son frecuentes las enfermedades ocasionadas por patógenos de suelo. Entre ellos, las especies de *Fusarium* constituyen el grupo de hongos que se asocia con mayor frecuencia a las infecciones de los órganos subterráneos. Por otro lado, los flavonoides son compuestos fenólicos vegetales que poseen un amplio rango de actividades biológicas, incluida la actividad antifúngica. En este trabajo hemos evaluado el efecto *in vitro* de un extracto parcialmente purificado y enriquecido en flavonoides obtenido de subproductos de espárrago "Morado de Huétor", frente a tres aislados de *F. oxysporum* patógenos de clavel, espárrago y fresa. Se llevaron a cabo tres experimentos independientes en los que se utilizó la técnica del medio enmendado para evaluar el efecto del extracto enriquecido en flavonoides (EEF) sobre el crecimiento y la esporulación de *F. oxysporum* f. sp. *asparagi*, *F. oxysporum* f. sp. *dianthi* y *F. oxysporum* patógeno de fresa. En los tres casos se observó una inhibición significativa del crecimiento micelial, así como bajos valores del área bajo la curva de progreso del crecimiento y de la esporulación de los hongos. Además, también se comprobó la inocuidad del EEF para plantas de espárrago mediante dos experimentos *in vitro*, en los que la germinación de las semillas y el crecimiento posterior de las plántulas en el medio enmendado con EEF fueron muy similares a los obtenidos en el medio testigo no enmendado. Nuestros resultados constituyen la primera referencia sobre las propiedades antifúngicas de compuestos bioactivos extraídos de residuos del cultivo del espárrago, principalmente de los flavonoides, y muestran que estos extractos pueden constituir una alternativa interesante para la protección de cultivos hortícolas.

Trabajo financiado por el Convenio P07-AGR-02364 (CICE, Junta de Andalucía) y por una beca en prácticas concedida por IFAPA (Junta de Andalucía) a C. Rosado-Álvarez.



P-173-01484

USO DE LA BIODIVERSIDAD INTRAESPECIFICA VARIETAL PARA LA RECUPERACIÓN DE AMBIENTES DEGRADADOS POR MONOCULTIVO EN MUSÁCEAS, COMO MEDIDA DE CONTROL DE ENFERMEDADES.

Vera D.F.², Suárez C.¹

1) Universidad Técnica Estatal de Quevedo

2) Universidad Autónoma de Barcelona

3) Bioversity Internacional

Actualmente el combate químico es la mejor y más usada alternativa para hacerle frente a las plagas y enfermedades. Esta opción, trae consigo el deterioro del medio ambiente, problemas a la salud humana, la resistencia de enfermedades a los pesticidas, además de debilitar la competitividad del cultivo por los altos costos que estos productos representan. En el caso del pequeño productor la estrategia de control debe buscar alternativas sostenibles. El objetivo de esta investigación fue determinar si la diversidad intraespecífica puede ser la respuesta adecuada para la recuperación de ambientes degradados por monocultivos intensivos y extensivos, reduciendo la vulnerabilidad al ataque de enfermedades. El ensayo se lo estableció en tres localidades **1)** Quevedo, Lo Ríos; **2)** El Carmen, Manabí; **3)** La Maná, Cotopaxi, en cada localidad se instalaron dos parcelas contiguas, cada una con su respectivo tratamiento. Los resultados evidenciaron un mayor número de hojas libres de la enfermedad para el plátano asociado (T1) en contraste al plátano establecido en monocultivo (T2) que presenta un mayor número de hojas afectadas por Sigatoka negra. En base a los resultados obtenidos se puede mencionar que el sistema de plátano asociado con otras musáceas de diferentes niveles de resistencia, ofrece la ventaja de reducir los niveles de severidad de la Sigatoka negra y por ende un mayor número de hojas funcionales a floración y cosecha, lo cual se traduce en racimos de mayor peso y tamaño. La menor severidad de Sigatoka negra dentro del sistema intra-específico, posiblemente se deba a la sustitución de lo que serían plantas susceptibles en un monocultivo homogéneo por una proporción de plantas resistentes (monocultivo heterogéneo), lo cual reduce la cantidad del patio susceptible dentro del sistema, y además, el movimiento de inóculo desde una planta susceptible a otra se ve obstaculizado por la presencia de plantas resistentes.

Palabras claves: plagas, enfermedades, diversidad intraespecífica, variedades, resistencia

* Proyecto financiado por Bioversity Internacional en convenio con la Universidad Técnica Estatal de Quevedo – Ecuador.



P-174-01510

IDENTIFICACIÓN DE LA RESISTENCIA A DIFENOCONAZOL Y METIL TIOFANATO EN POBLACIONES DE *Fusicladium eriobotryae* AGENTE CAUSAL DEL MOTEADO DEL NÍSPEROGonzález-Domínguez E.¹, Guillem-Amat A.¹, Calatayud M.¹, León M.¹, Armengol J.¹, Berbegal M.¹

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

En España, los daños causados por el hongo *Fusicladium eriobotryae* en frutos de níspero pueden suponer importantes pérdidas de producción en las principales zonas de cultivo. En ellas, se lleva a cabo una estrategia de lucha basada en el tratamiento con fungicidas sistémicos de las familias DMI y MBC. A pesar del uso continuado de materias activas con riesgo medio o alto de generar resistencias, no existen estudios sobre la presencia en campo de aislados resistentes a difenoconazol y metiltiofanato.

Para evaluar la resistencia, se recolectaron 249 aislados de *F. eriobotryae* en 46 parcelas comerciales de níspero de las principales provincias productoras (Alicante, Almería, Castellón, Granada y Valencia), determinándose la inhibición del crecimiento miceliar en medio de cultivo toxificado con difenoconazol (0,1 µg/ml) o metil tiofanato (0,5 µg/ml). Veinticuatro aislados de *F. eriobotryae* se mostraron resistentes a difenoconazol, detectándose en todas las provincias muestreadas excepto Almería. La resistencia a metil tiofanato se encontró en 26 aislados, todos ellos procedentes de la provincia de Alicante. En esta provincia, el 15% de los aislados se mostraron resistentes a este fungicida, encontrándose también aislados con resistencia múltiple.

Además, se caracterizó molecularmente la resistencia a metil tiofanato en *F. eriobotryae* mediante el estudio de las mutaciones asociadas en el gen de la β -tubulina. Para ello se secuenció la región de este gen con los cebadores BtubF14 y BtubR en una selección de 33 aislados (10 resistentes y 23 sensibles). En los aislados resistentes, se observó una mutación no sinónima en uno de los codones 198, 200 ó 240. Los resultados obtenidos en este trabajo se utilizarán para el desarrollo de un protocolo de detección de aislados resistentes de *F. eriobotryae*.

Este trabajo ha sido financiado por la Cooperativa Agrícola de Callosa d'En Sarrià (Alicante)



P-175-01548

POTENCIAL USO DE LOS ACTIVADORES DE DEFENSA DE LAS PLANTAS EN EL CONTROL DE PATÓGENOS DEL SUELO.**Rodríguez R.¹, Justribo X.¹**

1) Sustainable Agro Solutions S.A

Las plantas tienen la capacidad de defenderse de los patógenos mediante varios mecanismos de defensa físicos y químicos. Tras la infección, las plantas responden mediante la activación de la resistencia basal en un intento de prevenir la enfermedad. Este proceso está regulado por varias moléculas de señalización y reguladores transcripcionales, incluyendo alteraciones estructurales, la acumulación de especies reactivas del oxígeno, la síntesis de metabolitos secundarios y la producción de una amplia variedad de moléculas de defensa, tales como compuestos antimicrobianos. El marchitamiento por *Fusarium* es considerado uno de los patógenos más importantes del suelo, entre ellos, *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (FORL), es una de las principales enfermedades del suelo que afecta al cultivo de tomate *Lycopersicon esculentum*. Diversas estrategias para controlar FORL se han introducido en los últimos años como, la desinfección del suelo, las prácticas culturales, los tratamientos fungicidas y grafting con patrones resistentes. Sin embargo aún se presentan importantes pérdidas debido en gran parte a la variabilidad de la eficacia de estas estrategias y a menudo de corta duración. Los importantes daños que causa FORL en el cultivo de tomate ha sido motivo de estudio en las diferentes disciplinas de investigación agrícola durante el último siglo con la finalidad de buscar estrategias de control eficaces y sostenibles. Hoy en día está bien documentado que la aplicación exógena de compuestos con capacidad de activar los mecanismos de defensa de las plantas incrementan la resistencia en las plantas previo al ataque patógeno, tanto local como sistémica. Varias son las respuestas de defensa que se activan y que juegan un papel importante en la planta contra la colonización de patógenos, en este estudio se investigó si la aplicación exógena de productos naturales como, extractos de algas, polisacáridos y fosfitos activan los mecanismos de defensa del tomate contra FORL.



P-176-01309

RESISTENCIA A LA VERTICILOSIS EN PROGENIES DE CRUZAMIENTOS DE OLIVORodríguez-Jurado D.¹, Arias-Calderón R.¹, Bejarano-Alcázar J.¹, De la Rosa R.¹, Belaj A.¹, León L.¹

1) IFAPA Centro "Alameda del Obispo", Córdoba

La búsqueda de resistencia a la Verticilosis es una línea prioritaria en el programa de mejora de olivo del Centro IFAPA "Alameda del Obispo" de Córdoba. Los cruzamientos entre variedades en los que al menos un genitor posee resistencia podrían proporcionar nuevas variedades de interés y ampliar la información sobre la herencia de este carácter. El objetivo fue evaluar el nivel de resistencia a la Verticilosis de genotipos procedentes de cruzamientos entre variedades diferentes de olivo algunas de las cuales están caracterizadas como más resistentes.

Se seleccionaron por sus buenas características agronómicas 38 genotipos descendientes de tres cruzamientos entre variedades de olivo: 'Frantoio' x 'Arbosana' (13), 'Changlot Real' x 'Dolce Agogia' (16) y 'Koroneiki' x 'Empeltre' (9). Estos se propagaron por estaquillado semileñoso para obtener plantas que se inocularon con un aislado defoliante de *Verticillium dahliae* y crecieron en condiciones controladas. Se incluyeron plantas de los genitores en estudio y las variedades 'Picual' (susceptible) y 'Frantoio' (resistente), referentes de enfermedad.

Las variedades parentales, excluida 'Arbosana' (susceptible), y el 19-39% de las descendencias evaluadas dependiendo del cruzamiento presentaron un nivel de resistencia significativamente igual a 'Frantoio' y diferente de 'Picual' según distintos parámetros de enfermedad. Parte de las progenies mostraron valores de varios parámetros más bajos que los respectivos genitores y 'Frantoio': 23, 12 y 11% para 'Frantoio' x 'Arbosana', 'Changlot Real' x 'Dolce Agogia' y 'Koroneiki' x 'Empeltre', respectivamente. 'Frantoio' x 'Arbosana' generó mayor proporción de genotipos resistentes a pesar de incluir un parental susceptible. El comportamiento agronómico y nivel de resistencia de estos genotipos se confirmará en trabajos futuros en condiciones de campo.

Financiado por los proyectos RTA2010-00036 del INIA y PEI.PEI2011.1 del IFAPA parcialmente financiados por recursos del FEDER. R. Arias-Calderón agradece a FPI-INIA su formación.



P-177-01525

ENSAYOS (CAMPO E IN VITRO) DE CONTROL DEL CHANCRO DE RAMAS DEL ALMENDRO CAUSADO POR *Phomopsis amygdali* (Delacr.) J.J Tusset & M.T. Portilla EN MALLORCAOrell M.A.¹, Sastre-Conde I.², Nieto A.², Juan A.¹, Olmo D.²

1) Consejería de Agricultura, Medio Ambiente y Territorio de Islas Baleares. C/ del Foners., nº 10. 07006. Palma de Mallorca (Islas Baleares) E-mail: dolmo@semilla-sau.es

2) SEMILLA, C/ Esperanto, nº 8 07198. Palma de Mallorca (Islas Baleares).

El chancro de ramas causado por *Phomopsis amygdali* es una de las patologías más importantes del almendro en Mallorca, donde la lucha química resulta cada vez menos efectiva, especialmente en variedades sensibles.

Este estudio se centra en dos ensayos (campo y laboratorio) para analizar la sensibilidad a la enfermedad de diferentes variedades y la respuesta en éstas al tratamiento con distintos fungicidas.

En una finca de almendros de unos 20 años se analizó la respuesta a fungicidas con dos estrategias de aplicaciones sobre las variedades Ferragnes, Glorieta y Masbovera, en 3 bloques (control, 3 y 5 tratamientos de fungicidas), con dos filas de cada variedad en cada bloque. Los fungicidas utilizados fueron Captan, Mancozeb, Ciproconazol aplicados en diferentes momentos del ciclo de cultivo desde enero hasta julio. Se evaluó la presencia de chancros en 100 brotes/variedad/bloque tomados de enero a julio. La sensibilidad resultó ser Ferragnes > Glorieta > Masbovera. En función de la variedad el tiempo para surgir efecto de los fungicidas es de 20 a 45 días. Como prevención se recomienda Oxicloruro de cobre y Captan los momentos de máximo apogeo del hongo. La estrategia con tres tratamientos parece suficiente para las variedades menos sensibles, mientras que la de 5 no parece frenar el ataque del hongo en la más sensible.

Por otro lado, se realizó un ensayo en laboratorio para valorar la respuesta *in vitro* del crecimiento miceliar del hongo frente a 6 fungicidas. El resultado expresado como toxicidad para el hongo fue: Metil tiofanato > Ciproconazol > Captan > Mancozeb > Tiram.



P-178-01427

INFLUENCIA DE LA APLICACIÓN DE ENMIENDAS BASADAS EN CUBIERTAS VEGETALES DE CRUCÍFERAS SOBRE LA VERTICILOSIS DEL OLIVO EN CONDICIONES DE CAMPO**Jurado J.¹, De Haro A.², Hidalgo J.J.¹, Hidalgo J.C.¹, Vega V.¹, Bejarano-Alcázar J.¹**

1) IFAPA Centro "Alameda del Obispo" 2) Instituto de Agricultura Sostenible (CSIC)

El control de la Verticilosis del olivo (VO), causada por *Verticillium dahliae*, es particularmente difícil de conseguir debido a la amplia dispersión en Andalucía de aislados del patógeno altamente virulentos (patotipo defoliante) y a la prolongada supervivencia de los esclerocios del hongo en el suelo. El objetivo del presente trabajo fue evaluar en condiciones de campo el efecto de la aplicación de enmiendas de las especies crucíferas *Brassica carinata* (línea IAS-C1) y *Sinapis alba* subsp. *mairei* sobre la densidad de inóculo (DI) de *V. dahliae* en el suelo y el desarrollo de la VO.

El estudio se realizó en una plantación del cv. Arbequina de olivo infestada naturalmente por *V. dahliae*. Se establecieron parcelas experimentales en las que durante dos campañas consecutivas *B. carinata* y *S. alba* fueron implantadas como cubiertas vegetales y aplicadas como enmiendas al suelo o se mantuvieron libres de vegetación (controles). La virulencia de una colección de aislados monoconídicos de *V. dahliae* obtenidos de olivos sintomáticos fue caracterizada en un experimento de inoculación artificial en condiciones controladas del cv. Acala SJ-2 de algodónero. Periódicamente se evaluaron la DI de *V. dahliae* en el suelo y la incidencia y severidad de los síntomas de VO observados.

Todos los aislados de *V. dahliae* caracterizados fueron clasificados como pertenecientes al patotipo defoliante altamente virulento. La DI del hongo en las parcelas enmendadas con *B. carinata* o con *S. alba* permaneció en niveles similares o significativamente inferiores a los estimados al inicio del experimento. Por el contrario, en las parcelas sin enmienda el inóculo de *V. dahliae* incrementó significativamente hasta alcanzar valores finales más de 6 veces superiores a los iniciales. Los valores de las variables de enfermedad estimadas fueron inferiores en las parcelas enmendadas con *S. alba* que en aquellas no enmendadas o enmendadas con *B. carinata*.

Investigaciones financiadas por los proyectos PP.PEI.PEI2011.1 y PP.TRA.TRA2010.10 del IFAPA, ambos parcialmente financiados con fondos FEDER. J. Jurado Bello es beneficiario de una ayuda del Subprograma FPI-INIA.



P-179-01418

EVALUACIÓN DE LA RESISTENCIA DE GENOTIPOS DEL BANCO DE GERMOPLASMA MUNDIAL DE OLIVO (BGMO) DE CÓRDOBA A LA VERTICILOSIS DEL OLIVO

García-Ruiz G.M.¹, Trapero C.², López-Escudero F.J.²

1) IFAPA, Centro 'Alameda del Obispo', 14080 Córdoba.

2) Departamento de Agronomía, Universidad de Córdoba, Campus Universitario de Rabanales, Edificio Celestino Mutis (C4), 14071 Córdoba

El uso de genotipos resistentes se considera una herramienta clave para el control integrado de la Verticilosis del olivo. Por ello, en 1994 se inició el Programa de evaluación por resistencia a *Verticillium dahliae* de genotipos del BGMO de Córdoba (Junta de Andalucía, UCO e IFAPA), en el Departamento de Agronomía de la Universidad de Córdoba. Durante el periodo 2011-2013 se realizaron tres experimentos en invernadero para evaluar la resistencia a *V. dahliae* de 80 cultivares de olivo. 'Picual' (susceptible) y 'Frantoio' (resistente) se incluyeron como cultivares control. En 2011, se evaluaron 37 cultivares españoles y extranjeros por inmersión radicular en una suspensión de conidias (10^7 conidias/ml). En 2012 y 2013 se evaluaron 27 y 16 cultivares españoles, respectivamente, mediante inmersión radicular en una masa batida compuesta por medio de cultivo y micelio y conidias del hongo (10^8 conidias/ml). Las plantas se incubaron en invernadero durante tres meses siguiendo un diseño de bloques al azar, evaluando semanalmente la severidad de síntomas (escala 0-4). La severidad media final (SMF), el área bajo la curva de enfermedad (ABCPEP), la mortalidad (M) y la recuperación de la enfermedad tras la infección se usaron para asignar un nivel de resistencia/susceptibilidad a cada genotipo. 'Picual' mostró un ABCPEP medio en los tres experimentos del 43.8% (2011), 50.0% (2012) y 83.0% (2013), mientras que los valores de 'Frantoio' fueron 9.5% (2011), 10.9% (2012) y 18.7% (2013). De los cultivares evaluados, 20 resultaron extremadamente susceptibles, 11 susceptibles, 23 moderadamente susceptibles y 26 resistentes. Entre ellos, destaca el cultivar principal 'Verdial de Badajoz', que resultó resistente en los experimentos de 2011 y 2012. Los genotipos resistentes serán evaluados en campo y aquellos que superen estas evaluaciones serán incluidos en el Programa de Mejora de Olivo para resistencia a la Verticilosis de la Universidad de Córdoba.

Financiación: FEDER-INIA (RTA 2010-00013-C02-01, RFP 2009-00008-C02-01 y RFP 2012-00005); y AGL 2011-30137 (Ministerio de Ciencia e Innovación-EU FEDER).



P-180-01358

LO QUE LA RAÍZ ESCONDE: CARACTERIZACIÓN DE NUEVOS AGENTES DE BIOCONTROL BACTERIANOS FRENTE A LA VERTICILLOSIS DEL OLIVORuano-Rosa D.¹, Valverde A.¹, Gómez-Lama C.¹, Mercado-Blanco J.¹

1) Departamento de Protección de Cultivos, Instituto Agricultura Sostenible (CSIC), Campus 'Alameda del Obispo' s/n, Apartado 4084, 14080 Córdoba; E-mail: ruanodavid@gmail.com

La verticilosis del olivo (VO), causada por *Verticillium dahliae* Kleb., es una enfermedad vascular que da lugar a importantes pérdidas económicas. Entre los métodos de control propuestos destacan, por su bajo riesgo medioambiental, aquellos basados en el uso de agentes de control biológico (ACB). El control biológico es una medida que puede ser aplicada, bien de forma individual, bien complementaria a otras en una estrategia de manejo integrado de las enfermedades. Dado que la eficacia de un ACB depende en gran medida de su capacidad para colonizar y persistir en el nicho donde debe desplegar su actividad beneficiosa (por ejemplo, la raíz y/o la rizosfera de la planta), y que puede existir especificidad (o co-adaptación) ACB-huésped, dirigir la búsqueda de potenciales ACB hacia el microhábitat diana parece una estrategia acertada. Este trabajo tiene como principal objetivo generar una colección de bacterias cultivables colonizadoras naturales de raíces de olivo que, solas o en combinación, puedan servir como base de futuras bioformulaciones efectivas frente a la VO y/o promotoras del crecimiento de la planta. Se realizaron aislamientos de bacterias desde raíces de plantones de olivo procedentes de una muestra representativa de viveros de la provincia de Córdoba. Se dispone así de una "bacterioteca" compuesta por más de 300 aislados bacterianos residentes de forma natural en la raíz de olivo. Esta colección se evaluó en cuanto a su capacidad para antagonizar *in vitro* al patotipo defoliante de *V. dahliae*. Un total de 121 aislados mostraron capacidad inhibidora del patógeno. Asimismo se ha efectuado una caracterización fenotípica de una selección de aislados encaminada a la identificación de caracteres bacterianos tradicionalmente asociados al biocontrol y/o promoción del crecimiento (fosfatasas, proteasas, sideróforos, celulasas, quitinasas, etc.). Un objetivo adicional es evaluar el rango antagonista de la colección frente a otros patógenos.

Financiado por los proyectos P12-AGR667 de la Junta de Andalucía y RECUPERA 2020 del MINECO/CSIC, ambos con cofinanciación FEDER de la UE.



P-181-01356

EFICACIA IN VITRO DE PRODUCTOS QUÍMICOS COMERCIALIZADOS PARA PREVENIR Y ERRADICAR LOS ESCLEROCIOS DE *Verticillium dahliae* EN EL AGUAGómez F.J.¹, Santos A.¹, Rodríguez D.¹

1) IFAPA, Centro "Alameda del Obispo". Apdo. 3092, 14080 Córdoba.

Determinados productos químicos comercializados disminuyen diferencialmente las infestaciones del agua por conidias de *Verticillium dahliae*. EL potencial de estos productos para reducir los niveles de esclerocios del patógeno presentes también en las aguas de riego de distintos cultivos se desconoce. Se evaluó la eficacia *in vitro* de tres productos comercializados a base de peróxido de hidrógeno (px1, px2, desinfectante y alguicida, respectivamente) o hipoclorito sódico (hp) para prevenir y erradicar las infestaciones del agua por esclerocios de seis grupos de virulencia del patógeno sobre olivo.

La eficacia supresiva se determinó incubando en condiciones controladas agua infestada con esclerocios de cada aislado del hongo y tratada con cinco concentraciones de un producto (tres autorizadas para aplicar al agua con otros fines). En otros experimentos, la eficacia preventiva se evaluó infestando periódicamente con esclerocios el agua incubada previamente tratada con las concentraciones de mayor eficacia supresiva. La viabilidad del inóculo se comparó con la de los controles (test de Dunnett) en cuatro tiempos durante 30 días. Se estimaron las CL_{90} y CL_{99} (Probit).

La eficacia de los productos varió escasamente con la virulencia de los aislados. Las tres concentraciones más altas (una autorizada) del desinfectante con px1 y la concentración más alta del alguicida con px2 mostraron una eficacia supresiva del 65,8-100% según la concentración tras 5-15 días del tratamiento químico del agua. La eficacia preventiva a las concentraciones y tiempos indicados fue al menos del 98,9% para el desinfectante y varió de 0-100% con el experimento para el alguicida. El producto a base de hp fue prácticamente inefectivo.

Financiado por el proyecto RTA2011-00019-00-00 del INIA, parcialmente financiado con recursos del FEDER. F. J. Gómez Gálvez agradece a FPI-INIA su formación.



P-182-01312

COMPARACIÓN DE LA FUNCIONALIDAD, ESTRUCTURA Y DIVERSIDAD BACTERIANA DE LA RIZOSFERA DE OLIVO EN ÁRBOLES AFECTADOS POR VERTICILOSIS Y ASINTOMÁTICOS NO INFECTADOSGramaje D.¹, Montes-Borrego M¹, Navas-Cortés J.A.¹, Landa B.B.¹

1) Instituto de Agricultura Sostenible, CSIC

El objetivo de este estudio ha sido comparar la estructura y diversidad bacteriana de la rizosfera de olivar en árboles con síntomas de Verticilosis y en árboles asintomáticos no infectados, para identificar bacterias que potencialmente supriman la actividad de supervivencia y patogénica de *Verticillium dahliae*. Para ello, raíces y ramas jóvenes de olivos de 4 árboles con síntomas de Verticilosis y 4 árboles asintomáticos en cada una de tres fincas en Mengibar-Jaén fueron muestreadas en otoño (2012) y primavera (2013). En ambos periodos se aisló *V. dahliae* en el 80% de árboles con síntomas de Verticilosis, confirmándose su pertenencia al patotipo D, no aislándose de árboles asintomáticos. Para cada suelo, se caracterizaron sus propiedades fisicoquímicas, y se determinó la densidad de población de bacterias cultivables y la diversidad funcional de la rizosfera de cada árbol (ECOPLATE®). Adicionalmente, se caracterizó la estructura y diversidad de las comunidades bacterianas totales mediante análisis de polimorfismos de los fragmentos terminales de restricción (T-RFLP) y de pirosecuenciación de fragmentos amplificados del ARNr 16S. Las secuencias de pirosecuenciación obtenidas se agruparon en OTUs, y cada OTU fue alineado con la base de datos de Greengenes utilizando UCLUST para su identificación taxonómica, y a partir de las frecuencias normalizadas de OTUs se calcularon índices de diversidad α y β , y curvas de rarefacción. En el análisis de pirosecuenciación se obtuvieron un total de 100.769 secuencias de calidad con una media de 4.200 por árbol, y un total de 8.044 OTUs (especies). Los diferentes análisis multivariantes llevados a cabo (NMDS, PCA, CDA y cluster), indicaron que existe una tendencia de las muestras rizosféricas de cada árbol a agruparse de acuerdo a la finca de procedencia, así como al desarrollo o no de Verticilosis dentro de ésta. Los índices de diversidad α y β indicaron que la rizosfera de olivo sustenta una diversidad bacteriana muy elevada y en general altamente estable con una clara prevalencia de Alphaproteobacteria (Rhizobacteria) seguido de Actinobacteria (Actinomycetales). Sin embargo, el análisis discriminante y canónico nos permitió clasificar en el 100% de los casos los árboles con Verticilosis y no infectados en base a las frecuencias diferenciales de 16 OTUs, con 4 de ellos pertenecientes a 4 clases bacterianas presentando diferencias significativas.

Financiado por Proyecto AGL2012-37521, fondos CICE-Junta de Andalucía (ayudas Grupo PAIDI AGR-136, P. Excelencia P10-AGR-5908) y cofinanciado por fondos FEDER (EU).



P-183-01391

EVALUACIÓN DE ENMIENDAS ORGÁNICAS, MICROORGANISMOS Y PRODUCTOS NATURALES PARA EL CONTROL BIOLÓGICO DE LA VERTICILOSIS DEL OLIVO

Varo A.¹, Raya M.C.¹, Roca L.F.¹, Trapero A.¹

1) Dpto. Agronomía, Patología Agroforestal, Universidad de Córdoba. Campus de Rabanales, Edificio C-4, 14071, Córdoba.

La Verticilosis del olivo, causada por el hongo *Verticillium dahliae*, se ha convertido en la amenaza más importante de este cultivo en la cuenca mediterránea. El control químico de esta enfermedad no es efectivo, por lo que el control integrado y dentro de esta estrategia, el control biológico, aparece como un componente esencial para luchar contra la enfermedad en campo. Esta investigación trata de suplir la carencia existente de una selección masiva de potenciales agentes de control biológico para la Verticilosis del olivo, teniendo en cuenta el aumento de la incidencia y severidad de la enfermedad en los últimos años.

La selección masiva de candidatos se está realizando en cuatro etapas: 1) **in vitro**, por su efecto sobre el crecimiento micelial o la germinación de esporas del patógeno, 2) **en suelo**, por su efecto sobre la reducción de microesclerocios del patógeno en un suelo naturalmente infestado, 3) **en planta**, por su efecto sobre la infección de plántones de olivo en condiciones controladas, y 4) **en campo**, por su efecto sobre la enfermedad en condiciones de infección natural.

Hasta el momento se han evaluado más de 200 productos potenciales, entre ellos 42 extractos vegetales acuosos, 14 aceites esenciales, 39 microorganismos (hongos y bacterias), 39 productos biológicos comerciales y 42 enmiendas orgánicas. En este trabajo se presentan los resultados de las tres primeras etapas de evaluación, en las que se han seleccionado 20 candidatos potencialmente eficaces. Doce de ellos se están evaluando en olivos del cultivar susceptible 'Picual' plantados en una parcela que presenta una elevada infestación natural (20 UFC/g) por *V. dahliae*. La evaluación de campo se va a completar en otras dos parcelas con menores niveles de infestación y utilizando, además, el cultivar moderadamente susceptible 'Arbequina'.

Esta investigación ha sido cofinanciada por el proyecto "Control Biológico de la Verticilosis del olivo" (UG 400545) de la Interprofesional del Aceite de Oliva Español y el proyecto de excelencia AGR08-3635 de la Junta de Andalucía



P-184-01325

INFLUENCIA DEL RANGO DE HUMEDAD EN EL SUELO Y LA FRECUENCIA DE RIEGO SOBRE LA VERTICILOSIS DEL OLIVOSantos A.¹, Hidalgo J.J.¹, Hidalgo J.C.¹, Vega V.¹, Rodríguez-Jurado D.¹

1) IFAPA Centro "Alameda del Obispo"

El manejo integrado de la Verticilosis del olivo (VO) debe contemplar pautas de riego del cultivo que ayuden a minimizar la enfermedad y/o los niveles de inóculo del patógeno en el suelo. Por ello, se determinaron los efectos a largo plazo del rango de humedad en el suelo (alto y bajo: RA y RB) y la frecuencia de riego (diaria, semanal y combinada; FD, FS y FC) superficial por goteo sobre la VO y la densidad de inóculo total (DI) de *Verticillium dahliae* en el suelo. El estudio se llevó a cabo sobre un cultivar de olivo susceptible que creció en macetas sobre suelo no infestado o infestado por un aislado defoliante del patógeno (24 macetas por tratamiento). Durante dos temporadas de riego se realizó un seguimiento periódico de la severidad de síntomas de Verticilosis, la DI de *V. dahliae* en el suelo y la infección y crecimiento de los plantones. La enfermedad final acumulada fue significativamente menor o más baja a FD que a las otras frecuencias de riego independientemente del rango de humedad en el suelo, el cual no afectó significativamente a la enfermedad. La frecuencia de riego influyó además en el desarrollo de enfermedad no acumulada principalmente en los periodos primavera-verano y su efecto tendió a variar entre años para este periodo estacional. El área estandarizada del porcentaje de la DI respecto al periodo estacional anterior fue significativamente menor a FD que a otras frecuencias de riego para RB y no difirió con la frecuencia para RA independientemente del periodo estacional, tendiendo a ser menor para RA que RB. La infestación del suelo por el patógeno modificó el efecto de los factores estudiados sobre el crecimiento de los plantones.

Financiado por los proyectos RTA2011-00019-00-00 del INIA y PR.TRA.TRA2013.5 del IFAPA parcialmente financiados por el FEDER.



P-185-01518

RESISTENCIA DE PORTAINJERTOS DE ACEBUCHES CONTRA LA VERTICILLOSIS DEL OLIVO CAUSADA POR EL PATOTIPO DEFOLIANTE DE *Verticillium dahliae*Jiménez D.¹, Trapero J.L.², Castillo P.², Navas-Cortés J.A.², Jiménez-Díaz R.M.^{1,2}

1) Universidad de Córdoba

2) Instituto de Agricultura Sostenible

El uso de portainjertos resistentes al patotipo defoliante (D) de *Verticillium dahliae* sería de gran interés para el control integrado de la Verticilosis del olivo y la producción de cultivares de olivo susceptibles de interés comercial en áreas donde prevalece dicho patotipo. En investigaciones previas identificamos dos clones de acebuches (Ac-13, Ac-18) con fenotipo resistente a *V. dahliae* D con potencial de ser utilizados como portainjertos de olivos susceptibles. En este trabajo se ha confirmado y caracterizado la reacción resistente de dichos clones a *V. dahliae* D, y se ha identificado un nuevo clon resistente (Ac-4), en una serie de bioensayos utilizando protocolos de inoculación y condiciones de incubación óptimas para el desarrollo de la Verticilosis en olivo susceptible. La reacción de los clones se evaluó por la severidad e incidencia de síntomas foliares, el aislamiento del patógeno a lo largo del tallo, y la cuantificación del DNA del hongo en el tejido caulinar mediante un protocolo de qPCR con un límite de detección de 18 fg de *V. dahliae* DNA en tejidos infectados asintomáticos. Los clones AC13 and AC18 mostraron una reacción altamente resistente en inoculaciones por inmersión radical con *V. dahliae* 138I. La concentración de *V. dahliae* DNA por 100 ng de DNA de tallo fue 10,9 y 86,7 pg en plantas de 'AC13' y 'AC18', respectivamente, comparado con 42,9 pg y 16,6 ng en olivos 'Frantoio' y 'Picual', respectivamente. Bioensayos adicionales en condiciones óptimas para la infección por el patógeno demostraron que: i) la naturaleza de la reacción resistente de dichos clones no es modificada por la infección conjunta de su sistema radical por *Glomus intraradices* o *Meloidogyne javanica*, y ii) el injerto de olivo 'Arbequina' o 'Picual' sobre portainjertos de 'Ac-13' o 'Ac-18' protege satisfactoriamente a dichos cultivares de la enfermedad en condiciones que determinan la muerte de plantones autoenraizados de ellos.

*Trabajo financiado por los proyectos P10-AGR 6082, Consejería de Economía, Innovación y Ciencia, Junta de Andalucía y fondos FEDER; e IDI-20120047, CEDETI, Ministerio de Economía y Competitividad, y la Organización Interprofesional del Aceite de Oliva Español-CITOLIVA,



P-186-01432

SUSCEPTIBILIDAD DE CULTIVARES DE ALMENDRO A LAS PRINCIPALES ENFERMEDADES EN ANDALUCÍALovera M.¹, Arquero O.¹, Ollero A.², Roca L.F.², Trapero A.²

1) Fruticultura Mediterránea, IFAPA Centro Alameda del Obispo, Avda. Manédez Pidal s/n, 14071-Córdoba.

2) Grupo Patología Agroforestal, Dpto. Agronomía, Universidad de Córdoba. Campus de Rabanales, Edif. C4, 14071-Córdoba.

Durante el periodo 2004-2012 se ha evaluado la incidencia y severidad de las principales enfermedades del almendro en 14 campos experimentales, pertenecientes a la red de ensayos del proyecto Transforma de Fruticultura del IFAPA, localizados en las provincias de Almería, Córdoba, Granada, Huelva y Málaga. Los diferentes campos experimentales, plantados entre 2000 y 2010, incluyen variaciones en las condiciones de cultivo, tanto en riego como en secano, condiciones ambientales, tipo de suelo y manejo del cultivo. En el conjunto de los campos, se han evaluado 22 cultivares (cvs) de floración tardía y 16 cvs de floración temprana, representativos de los cultivares que se están utilizando en las nuevas plantaciones de almendro en Andalucía. Entre las enfermedades evaluadas destacan cuatro micosis foliares: Moniliosis (*Monilia laxa*), Mancha ocre (*Polystigma amygdalinum*), Cribado (*Stigmata carpophila*) y Lepra (*Taphrina deformans*). La enfermedad más prevalente fue la Mancha ocre, si bien la gravedad de sus ataques varió marcadamente entre años y campos. La Moniliosis presentó los ataques más graves, pero sólo cuando coincidió la lluvia durante la floración y no se realizaron tratamientos fungicidas. La repuesta de los cvs a las enfermedades varió notablemente entre campos y años, existiendo diferencias significativas entre cvs para todas las enfermedades. Los cvs de floración temprana fueron más afectados por la Moniliosis que los de floración tardía, aunque la mayoría de ellos fueron menos susceptibles que el cv de referencia Marcona. Este cultivar, en cambio, resultó poco susceptible a la Mancha ocre. Entre los cvs de floración tardía, el cv de referencia Guara resultó muy susceptible a las cuatro enfermedades evaluadas, existiendo notables diferencias de susceptibilidad entre cultivares. Estos resultados resaltan la necesidad de considerar la susceptibilidad a enfermedades en el desarrollo y en la elección de variedades para las nuevas plantaciones, así como para la gestión integrada del cultivo.

Esta investigación ha sido financiada por el proyecto Transforma de Fruticultura del IFAPA, Junta de Andalucía.



P-187-01396

DETECCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE ELEMENTOS DE dsRNA EN AISLADOS DE *Rosellinia necatrix*Arjona-Girona M.I.¹, Ariza-Fernández T.¹, Velasco L.², López-Herrera C.J.¹

1) Instituto de Agricultura Sostenible. CSIC 2) IFAPA. Centro de Churriana

El objetivo de este trabajo ha sido la detección en campo de aislados hipovirulentos de *Rosellinia necatrix* que presenten elementos de dsRNA. Durante 2012, se realizó un muestreo de árboles sintomáticos, afectados por podredumbre blanca, en distintas plantaciones comerciales de aguacate de la costa sur (Málaga-Granada). Se seleccionaron 17 árboles que estando infectados por *R. necatrix* vegetaban normalmente (árboles escape). Se enterraron en suelo alrededor del tronco de cada árbol un total de 16 brotes sanos de aguacate. A finales de 2012 se realizaron 10 extracciones secuenciales, recuperándose entre 20 y 25 brotes en cada una y obteniéndose un total de 79 aislados sospechosos de ser *R. necatrix*, que infectaban o parasitaban saprofiticamente los brotes extraídos. Tras observaciones de sus características morfológicas *in vitro* y posterior secuenciación e identificación (mediante técnica de PCR) se han identificado 13 como *R. necatrix*. Los test de patogenicidad en plantas de *Lupinus luteus* de tres semanas de edad han puesto de manifiesto la patogenicidad de 12 de ellos. Se ha detectado la presencia de dsRNA en estos aislados de *R. necatrix* mediante técnica puesta a punto por nuestro equipo empleando como controles aislados de *R. necatrix* suministrados por otros laboratorios (Japón) que contienen dsRNA. Hay que mencionar que uno de los aislados que resultó no patogénico tampoco presentó elementos de dsRNA. Estos resultados denotan que aunque se ha descrito que algunos de estos elementos suelen estar asociados a factores de hipovirulencia, su presencia no la implica necesariamente tal como han citado otros autores para otros huéspedes como manzano y peral y para otros hongos como *Rhizoctonia* y *Cryphonectria parasitica* en castaño; y quizás haya otros factores, además de dsRNA, implicados en la hipovirulencia de aislados de *R. necatrix*. Actualmente estamos confirmando la patogenicidad de los aislados en plantas de aguacate de seis meses de edad y caracterizando molecularmente el dsRNA detectado.

Este trabajo ha sido financiado por fondos CICE-Junta de Andalucía, ayudas Grupo PAIDI AGR-235 e Incentivos al Plan Nacional I+D+I del Ministerio de Ciencia e Innovación (AGL 2011-030354-CO2-02), cofinanciado con fondos FEDER (EU).



P-188-01339

ACTIVIDAD GLUCANASA Y QUITINASA DE *Trichoderma* spp. EN PRESENCIA DE *Rosellinia necatrix*Ariza-Fernández T.¹, Arjona-Girona M.I.¹, Pozo M.J.², López C.J.¹

1) Instituto de Agricultura Sostenible, CSIC

2) Estación Experimental del Zaidín, CSIC

Rosellinia necatrix es un hongo fitopatógeno que provoca una enfermedad importante en ciertos cultivos, entre ellos la Podredumbre blanca (PB) de las raíces del aguacate. Los hongos pertenecientes al género *Trichoderma* secretan enzimas que le permiten penetrar la pared celular de los hongos fitopatógenos. Así, el objetivo de este trabajo fue evaluar en distintos aislados de *Trichoderma*, potenciales agentes de biocontrol de la PB, la dinámica de inducción de dos enzimas glucanasa y quitinasa en presencia o ausencia de *R. necatrix*. Para ello, se crecieron en medio PDB (en agitación y oscuridad) 10 aislados de *Trichoderma* spp. (CH101, CH252, CH273, CH296, CH303, CH304, CH314, CH316, CH282b y CH312c) durante 5 días. Posteriormente, se filtraron y los micelios fúngicos se añadieron a medio mínimo de Vogel suplementado con micelio de *R. necatrix* al 0.06%. Tras 48h se filtró nuevamente y el filtrado se conservó a -20°C para el posterior análisis de la actividad glucanasa y quitinasa. Los aislados de *Trichoderma* CH-252, CH-273 y CH-304 presentaron actividad glucanasa constitutivamente, y los aislados CH101, CH314, CH316, CH282b y CH312c, de forma inducida en presencia del patógeno. La actividad quitinasa constitutiva se observó en los aislados CH-273, CH-303, CH 304, CH-314, CH-282b y CH-312c, y solo en el aislado CH-303, se inducía más dicha actividad en presencia del patógeno. Esto confirma que los aislados varían en su capacidad de sintetizar y secretar estas enzimas hidrolíticas de manera constitutiva o inducibles por la presencia del patógeno. Se propone pues el uso de los aislados CH 282b y CH 312c, que muestran niveles constitutivos altos de actividad quitinasa e inducibles de actividad glucanasa para el control biológico de la PB.

* Este trabajo ha sido financiado por fondos CICE-Junta de Andalucía, ayudas Grupo PAIDI AGR-235 e Incentivos al Plan Nacional I+D+I del Ministerio de Ciencia e Innovación (AGL 2011-030354-CO2-02), cofinanciado con fondos FEDER (EU).



P-189-01337

EFFECTO IN VIVO DE METABOLITOS DE *Trichoderma* sp. SOBRE PLANTAS DE *Lupinus luteus* INOCULADAS CON *Rosellinia necatrix*Arjona-Girona M.I.¹, López-Herrera C.J.¹

1) Departamento de Protección de Cultivos, Instituto de Agricultura Sostenible, CSIC. C/Alameda del Obispo s7n, Apartado 4084, Córdoba. E-mail: isabelarjona@ias.csic.es

El objetivo del presente trabajo fue estudiar el efecto de metabolitos de *Trichoderma* sp. sobre el incremento de biomasa (IB) y sobre la podredumbre blanca (PB) causada por *Rosellinia necatrix* en plantas de *Lupinus luteus* utilizada como planta modelo muy susceptible a este patógeno.

Se utilizaron dos aislados de *Trichoderma atroviride* y *T. cerinum*, previamente seleccionados como potenciales agentes de biocontrol de la PB del aguacate y que producen los metabolitos 6PP y, Harzianolide y Cerinolactona, respectivamente. Los metabolitos (a concentraciones 0, 1, 10 y 100 mg l⁻¹) se aplicaron a las plantas, mediante inmersión de un total de 360 semillas germinadas y de 360 plántulas de *Lupinus*, en las diluciones de cada metabolito. Posteriormente, las semillas y plántulas inoculadas se dispusieron en sustrato Laura incubándose 21 días e inoculándose adicionalmente con semillas de trigo colonizadas por un aislado virulento (Rn 400) de *R. necatrix*. El efecto de los metabolitos sobre la PB se evaluó por lecturas semanales de la sintomatología de las plantas según escala de severidad (1: planta sana a 4: planta muerta). El efecto de los metabolitos sobre el IB se realizó sobre un grupo de 20 plántulas por tratamiento, sumergidas en la solución de metabolitos pero no inoculadas con el patógeno.

La aplicación de los metabolitos 6PP y Harzianolide a 1 mg l⁻¹ (mínima dosis efectiva), indujeron un retraso en el avance de la enfermedad en plantas de *lupinus*. Por el contrario, Cerinolactona sólo fue efectiva a concentración de 10 mg l⁻¹. Los tres metabolitos utilizados produjeron un incremento de biomasa a 10 mg/L y un efecto negativo a la dosis de 100 mg/L.

Este estudio revela el papel que estos metabolitos producidos por cepas de *Trichoderma* pueden jugar en el IB y en el control biológico de la PB del aguacate causada por *R. necatrix*

* Este trabajo ha sido financiado por fondos CICE-Junta de Andalucía, ayudas Grupo PAIDI AGR-235 e Incentivos al Plan Nacional I+D+I del Ministerio de Ciencia e Innovación (AGL 2011-030354-CO2-02), cofinanciado con fondos FEDER (EU).



P-190-01353

INTERACCIONES MULTITRÓFICA EN LA RIZOSFERA DE AGUACATE DE LA CEPA DE BIOCONTROL *Pseudomonas chlororaphis* PCL1606 CON EL HONGO FITOPATÓGENO *Rosellinia necatrix* CH53Calderón C.E.¹, Crespo-Gómez J.I.¹, Vida C.¹, De Vicente A.¹, Cazorla F.M.¹

1) Instituto de Hortofruticultura Subtropical y Mediterránea "La Mayora" (IHSM-UMA-CSIC), Departamento de Microbiología, Facultad de Ciencias, Universidad de Málaga

La podredumbre blanca radicular del aguacate está causada por el hongo fitopatógeno *Rosellinia necatrix*. Dicha enfermedad puede ser biológicamente controlada por la rizobacteria antagonista *Pseudomonas chlororaphis* PCL1606, mediante la producción del compuesto antifúngico 2-hexil, 5-propil resorcinol (HPR). Para profundizar sobre el efecto de la producción de HPR en la interacción sobre *R. necatrix* en la rizosfera de aguacate, se han llevado a cabo análisis microscópicos. Se empleó microscopía de escáner láser confocal usando una cepa virulenta de *R. necatrix*, la cepa silvestre *P. chlororaphis* PCL1606 y una colección de mutantes dirigidos en los genes *dar*, implicados en la producción de HPR. Todos estos microorganismos fueron transformados con diferentes proteínas autofluorescentes como marcadores y facilitar su visualización. Este estudio reveló que la producción de HPR influye directamente en la capacidad de *P. chlororaphis* PCL1606 para colonizar y persistir en la raíz de aguacate. Además, esta cepa de biocontrol interacciona directamente con las hifas de *R. necatrix*, lo que puede representar un nuevo mecanismo de biocontrol adicional. La producción de HPR afecta negativamente al crecimiento de la hifa del hongo *R. necatrix*, provocando ensanchamientos, vacuolización o cambios en la dirección de crecimiento fúngico. Estos efectos afectarían presumiblemente a las habilidades de colonización e infección de este hongo.

Este trabajo está financiado por el Proyecto del Plan Nacional de I + D + I AGL2011-30354-CO2-01 (MINECO, España), cofinanciado por la Unión Europea (FEDER). C.E. ha estado financiada por una beca FPI, Ministerio de Ciencias e Innovación, España.



P-191-01354

CAPACIDAD SUPRESIVA CONTRA *Rosellinia necatrix* DE SUELOS AGRÍCOLAS ENMENDADOS CON CÁSCARA DE ALMENDRAVida C.¹, Bonilla N.¹, Cazorla F.M.¹, De Vicente A.¹

1) Instituto de Hortofruticultura Subtropical y Mediterránea (IHSM-UMA-CSIC)

El aguacate es uno de los principales cultivos subtropicales del sur de España y la podredumbre blanca de la raíz, causada por el hongo fitopatógeno *Rosellinia necatrix*, uno de sus problemas más graves. Desde hace tiempo, se ha utilizado la aplicación de enmiendas orgánicas como estrategia para mejorar la supresividad de los suelos agrícolas frente a determinadas enfermedades de plantas. En este trabajo, tratamos de evaluar la capacidad supresiva de los suelos enmendados con cáscara de almendra compostada y la posible implicación de la microbiota del suelo en este aspecto, puesto que, estudios previos han demostrado que la aplicación de enmienda orgánica provoca un cambio en las comunidades microbianas del suelo a nivel poblacional y funcional. Para ello, llevamos a cabo ensayos "in vitro", usando dos modelos de plantas susceptibles diferentes, *Persea americana* (aguacate) y *Triticum aestivum* (trigo). Los resultados indican una clara relación entre las comunidades microbianas del suelo y la supresividad, ya que la adición de cáscara de almendra compostada al suelo agrícola causa un aumento de la supresividad contra *R. necatrix*. Este efecto está directamente asociado a componentes microbianos, puesto que la capacidad supresiva se reduce al someter al suelo a un tratamiento térmico, y se recupera parcialmente al complementar el suelo tratado con suelo de campo. Algunas cepas bacterianas se correlacionaron con la supresividad mediante diferentes técnicas moleculares.

*Este trabajo está siendo financiado por el Plan Nacional de I+D+I del Ministerio de Economía (MINECO, España) (AGL2011-30354-C02-01) y cofinanciado por los fondos FEDER (EU). C. Vida está siendo financiada con una ayuda del programa FPI del MINECO.



P-192-01553

EL CALCIO COMO HERRAMIENTA PARA EL CONTROL DE LA ANTRACNOSIS DEL OLIVO CAUSADA POR *Colletotrichum* spp.

Xavier C.J.¹, Moral J.², Pérez M.¹, Agalliu G.¹, Alcántara E³, Trapero A.¹

1) Grupo Patología Agroforestal, Dpto. Agronomía, Universidad de Córdoba. Campus de Rabanales, Edif. C4, 14071-Córdoba.

2) Dpto. Mejora Vegetal, Instituto de Agricultura Sostenible-CSIC, 14080 Córdoba.

3) Grupo Fisiología Vegetal, Dpto. Agronomía, Universidad de Córdoba. Campus de Rabanales, Edif. C4, 14071-Córdoba.

La resistencia de la aceituna a la Antracnosis, causada por *Colletotrichum* spp., está influida notablemente por el cultivar, el estado de maduración, la presencia de heridas y la concentración de fenoles en el fruto. En otros patosistemas similares, como en *Colletotrichum*/manzano, el calcio también influye en la resistencia del fruto. En el presente trabajo se estudia *in vivo*, *in planta* y en condiciones de campo la influencia del calcio en la Antracnosis del olivo.

En laboratorio, se evaluó la capacidad de inhibir el desarrollo micelial y la germinación de los conidios del patógeno de cuatro compuestos de calcio: carbonato, silicato, propionato y cloruro. Los compuestos evaluados afectaron escasamente al desarrollo micelial y a la germinación de los conidios, aunque afectaron a la formación de los apresorios causando la inhibición del 80%.

Utilizando plantones y olivos del cv. Arbequina se estudió la influencia de aplicaciones periódicas de cloruro de calcio en la severidad de síntomas. En general, las aplicaciones realizadas no incrementaron la concentración de calcio en la aceituna. Aunque, en las aceitunas tratadas con cloruro de calcio y directamente inoculadas, mostraron una disminución significativa de la severidad de síntomas respecto a las aceitunas control.

Debido a la dificultad de incrementar la concentración de calcio en las aceitunas, se utilizó un agente quelatante (EDDHA) para disminuir la concentración de calcio en los frutos. Las aceitunas tratadas con EDDHA fueron significativamente más susceptibles al patógeno que las aceitunas control. Finalmente, se estudió la relación entre la concentración de calcio y la susceptibilidad a la enfermedad utilizando aceitunas procedentes de 27 olivares con distintas características de suelo. En este caso, aunque no se observó un patrón claro, se ha detectado un nivel crítico de calcio (0.8 ppm) en la aceituna, a partir del cual la probabilidad de sufrir un ataque severo se incrementa.

Esta investigación ha sido cofinanciada por el proyecto de excelencia AGR08-3635 de la Junta de Andalucía y los proyectos AGL2004-7495 y AGL2008-1683 del Ministerio de Economía y Competitividad.



P-193-01464

EFFECTO DE LA APLICACIÓN DE SILICIO SOLUBLE SOBRE LA SIGATOKA NEGRA (*Mycosphaerella fijiensis*) EN PLANTAS DE BANANO (*Musa* AAA) EN CONDICIONES CAMPO, ZONA DE URABÁ, ANTIOQUIA, COLOMBIA.

Londoño D.A.¹, Castañeda D.A.¹, Patiño L.F.⁴, Mira J.J., Morales J.G.¹

1) Universidad Nacional de Colombia sede Medellín. Departamento de ciencias Agronomicas

2) Cales Rio Claro Naranjo S.C.A

3) Asociación de bananeros de Colombia AUGURA

4) Politecnico Colombiano Jaime Isaza Cadavid

En numerosos estudios se ha demostrado que la fertilización con silicio (Si) tiene un efecto benéfico en las plantas al aumentar su resistencia a enfermedades y plagas. Con el objetivo de evaluar el efecto de la fertilización con Silicio sobre el desarrollo de la Sigatoka negra (ocasionada por el hongo *Mycosphaerella fijiensis*), enfermedad más limitante en la producción de banano a nivel mundial, se desarrolló este estudio en la finca bananera Campo Experimental Ramiro Jaramillo Sossa, ubicado en el municipio de Carepa, Antioquia, zona de Urabá, Colombia. Se utilizaron dos fuentes de silicio comerciales (Silimag 30-30®, y Termofosfato Rio Claro®) en 3 niveles cada una (500, 1000 y 1500 kg ha⁻¹). Las unidades experimentales fueron brotes de la unidad productiva (puyones) a las cuales se aplicaron los tratamientos en una única dosis, incorporando el producto con ayuda de la herramienta Hércules. Semanalmente se evaluó el desarrollo de los síntomas por medio de la metodología de preaviso biológico y se obtuvo la suma bruta (SB) y el estado de evolución (EE) de la enfermedad, hasta la floración de la planta. El estudio se realizó en dos ciclos de cosecha. Los resultados mostraron diferencias significativas entre los tratamientos para las variables SB ($p=2.39e-14$) y EE ($p=1.64e-08$). Mediante comparación de medias, se obtuvo que los tratamientos evaluados difirieron significativamente del testigo sin aplicación, lo que indica que la evolución de la enfermedad se vio retrasada por la aplicación de las fuentes evaluadas. Por ende, la fertilización con silicio puede ser considerada como una herramienta para el manejo integrado frente a *Mycosphaerella fijiensis* en condiciones de campo.

Este trabajo fue financiado por la Universidad Nacional de Colombia sede Medellín, Cales Rio Claro Naranjo S.C.A, Asociación de bananeros de Colombia AUGURA y el Gobierno Nacional de Colombia a través del programa Consejo Nacional de Beneficios Tributarios, en Ciencia, Tecnología e innovación, Convocatoria 548, proyecto código 561454832649.



P-194-01351

RESISTANCE TO MULTIPLE FUNGICIDES IN *Botrytis cinerea* ISOLATES FROM COMMERCIAL STRAWBERRY FIELDS IN THE EASTERN USA

Fernández-Ortuño D.¹, Grabke A.², Bryson P.K.², Li X.P.², De Vicente A.¹, Schnabel G.²

1) Instituto de Hortofruticultura Subtropical y Mediterránea La Mayora, Universidad de Málaga, Consejo Superior de Investigaciones Científicas. Departamento de Microbiología. Facultad de Ciencias. Campus de Teatinos. 29071 Málaga. España

2) School of Agricultural, Forest & Environmental Sciences. Clemson University. Clemson. SC 29634, USA

Chemical control of gray mold of strawberry caused by *Botrytis cinerea* Pers. is essential to prevent pre- and postharvest fruit decay; however, resistance to multiple chemical classes of fungicides including APs (cyprodinil), DCs (iprodione), MBCs (thiophanate-methyl), PPs (fludioxonil), QoIs (pyraclostrobin), SBLs (fenhexamid), or SDHIs (boscalid) is a well-known and well-described phenomenon in *B. cinerea* from strawberry fields in Florida, Germany, North Carolina, and South Carolina. As part of a resistance-monitoring program conducted during 2012 and 2013, a total of 1,890 *B. cinerea* isolates were collected from 10 states in the eastern USA. The isolates were analyzed for fungicide resistance using a mycelial growth assay. The overall resistance frequencies in 2012 for thiophanate-methyl, pyraclostrobin, boscalid, cyprodinil, fenhexamid, iprodione, and fludioxonil were 76, 42, 29, 27, 25, 3, and 1%, respectively. Frequencies in 2013 were 85, 59, 5, 17, 26, 2, and 1%, respectively. Isolates were resistant to either one (23%), two (18%), three (19%), four (14%), five (3%) or six (0.1%) chemical classes of fungicides in 2012. In 2013 this distribution was 24%, 29%, 26%, 8%, 2%, 0.3%, respectively, and also 0.3% (6 isolates) were resistant to all classes of fungicides. Resistance to thiophanate-methyl, iprodione, boscalid, pyraclostrobin and fenhexamid was based on target gene mutations in β -tubulin, *bos1*, *sdhB*, *cytB*, and *erg27*, respectively. Isolates were MDR1 or MDR1h dependent on sensitivity to fludioxonil and variations in transcription factor *mrr1*. Expression of ABC transporter *atrB* was highest in MDR1h isolates. The discovery of *B. cinerea* isolates resistant to all registered site-specific fungicides for gray mold control represents an unprecedented milestone of resistance development in *B. cinerea* that signals a failure of current anti-resistance management strategies.

* This work has been supported by the CSREES/USDA, under project number SC-1000642 and the Marie Curie COFUND programme U-Mobility, co-financed by the University of Malaga, the European Commission FP7 under GA No. 246550, and Ministerio de Economía y Competitividad (COFUND2013-40259).



P-195-01622

SUPPRESSION OF GRAPE POWDERY MILDEW BY *Streptomyces* AND *Pseudomonas* spp.Ran L-X¹, Du X-L¹, Du S-H¹, Li H-P¹, Zhen Z-X¹, Mercado-Blanco J.²¹ College of Forestry, Agricultural University of Hebei, Baoding, 071000, Hebei, China; E-mail: longxianran@163.com² Departamento de Protección de Cultivos, Instituto Agricultura Sostenible (CSIC), Campus 'Alameda del Obispo' s/n, Apartado 4084, 14080 Córdoba

Grape powdery mildew, caused by *Uncinula necator*, is one of the most damaging diseases of *Vitis* spp. in the drought areas of China. The main measure used to manage this disease is the application of diverse chemical fungicides about 8 times in growing seasons. In order to develop environmentally friendly biocontrol agents (BCAs), twenty two strains from *Streptomyces* spp. and *Pseudomonas* spp. were screened for their potential to suppress grape powdery mildew. Conidiospore germination inhibition tests were performed on water agar media mixed with the BCAs. *Streptomyces aureofaciens* CN122, *Streptomyces rimosus* CN123, the genetically-modified derivatives of *Pseudomonas putida* WCS358r WCS358::phl and WCS358::phz, constitutively producing 2,4-diacetylphloroglucinol (DAPG) and phenazine carboxylic acid (PCA), respectively, and *Pseudomonas fluorescens* strains WCS417r, L1d6, L2d6 and L3d6, were found to significantly inhibit germination of *U. necator* conidiospores. Based on these results, two types of bioassays were performed. The first was a preventive bioassay in which detached leaves were dipped in a suspension of each beneficial strain for 20 min, surface dried, and followed by the inoculation of the pathogen spore suspension. The second was a curative bioassay in which detached leaves were first inoculated with the spore suspension of the pathogen and then dipped in suspensions of the BCAs. Results from the preventive bioassay showed that all strains tested produced a strong inhibition of spore germination. Thus, effective suppression of grape powdery mildew was observed, and DAPG and PCA produced by the genetically-modified strains could be involved in the control of the disease. On the other hand, none of the bacterial strains tested showed significant control of the disease when applied after pathogen inoculation (curative bioassay). This suggests that effective control may only be expected when the biocontrol strains are applied in a preventative way.

This research was supported financially by the Special Fund for Agro-Scientific Research in the Public Interest of P.R. China (201203035).



P-196-01382

MECANISMOS DE BIOCONTROL DE *Penicillium frequentans* FRENTE A *Monilinia* spp.Hernández L.¹, Melgarejo P.¹, De Cal A.¹, Guijarro B.¹

1) Departamento de Protección Vegetal, Instituto Nacional de Investigación Agraria y Alimentaria (INIA), Carretera de La Coruña Km 7,5, 28040, Madrid

Penicillium frequentans Westling cepa 909 (Pf909) es un componente de la micobiota de flores y brotes de melocotonero en España, cuyas conidias reducen el momificado de los frutales de hueso causado por *Monilinia laxa* (Mlx). La reciente aparición en España de una nueva especie del patógeno, *M. fructicola* (Mfc), nos lleva a replantear el nuevo patosistema en el que actúa Pf909, que dependerá de la agresividad del nuevo patógeno y la susceptibilidad de la planta. Para alcanzar consistencia en el control de ambos patógenos con la aplicación del biofungicida, será necesario entender la interacción entre el antagonista, patógenos y planta hospedadora.

Este trabajo tiene como objetivo el estudio de los posibles mecanismos de acción de Pf909 en la supresión de la podredumbre parda causada por Mlx y Mfc y la contribución relativa de cada uno de estos mecanismos en el proceso general de biocontrol.

La interacción o competencia directa se evaluó mediante ensayos *in vitro* de germinación conjunta Pf909/Mlx y Pf909/Mfc en medio nutritivo czapeck y posterior crecimiento de las colonias en medio sólido PDA. Para el análisis de competencia por nutrientes se evaluó la eficacia del antagonista para agotar los recursos nutritivos en detrimento del patógeno mediante crecimiento conjunto Pf909/Mlx y Pf909/Mfc en diferentes concentraciones de extractos de frutos liofilizados: (fruto verde, en maduración y maduro) a 20, 10 y 1% (p/v). Se obtuvieron las curvas de crecimiento/concentración de sustrato patógeno/antagonista en los diferentes estados de maduración de la fruta y los ratios de crecimiento y eficacia de aprovechamiento de nutrientes antagonista vs patógeno.

La habilidad de Pf909 de inducir resistencia en el huésped se evaluó sobre cerezas desinfectas tratadas con Pf909 e inoculadas posteriormente con el patógeno después de eliminar a Pf909 de la superficie del fruto.

En este estudio se ratifica la eficacia del ACB Pf909 en el control de Mlx y su eficacia también frente a Mfc. Se determinó también la eficacia relativa antagonista/ patógeno mediante ensayos dosis/ respuesta en fruta, en los que se determinó la concentración de antagonista capaz de inactivar diferentes concentraciones de patógenos. Los estudios realizados muestran que en el modo de acción de Pf909 parece competencia por nutrientes aunque no es descartable que existan otros fenómenos involucrados.

Investigación financiada por 612713 BIOCOTES fondos FP7



P-197-01374

EFICACIA DE NUEVOS AISLADOS DE *Epicocum nigrum*, *Penicillium frequentans* Y *Penicillium oxalicum* FRENTE A ENFERMEDADESLarena I.¹, Herranz Y.¹, Morales M.T.¹, Castillo R.¹, Melgarejo P.¹, De Cal A.¹

1) INIA-Dpto. Protección Vegetal. Carretera de La Coruña km7. Madrid

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. Para mejorar su eficacia se han obtenido 120 nuevos aislados de *E. nigrum*, 55 de *P. oxalicum* y 9 de *P. frequentans*, desde la filosfera de especies caducifolias y suelo y se han seleccionado por su eficacia frente a las enfermedades.

Para ello se estimó la eficacia de cada uno de los aislados de *P. oxalicum* en ensayos in vivo en cámaras de cultivo sobre plántulas de tomate (cv. San Pedro) sensibles a *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (FOL) en matraces erlenmeyer de 250 ml que contendrán 125 ml de una solución Hoagland nº2 estéril. La solución se inoculó con microconidias de FOL a una concentración final de 1×10^4 conidias/ml. Cinco matraces por cada aislado y cuatro plantas por matraz se mantuvieron durante 3 semanas en cámara de cultivo. A lo largo del ensayo se evaluó el consumo de solución nutritiva, la incidencia y gravedad de la enfermedad inducida por FOL y el nº de hojas de cada planta. Para estimar la eficacia de los aislados de *P. frequentans* y *E. nigrum* se realizaron ensayos en cámaras de cultivo sobre cerezas desinfectadas superficialmente e inoculadas con una suspensión de conidias de *Monilinia fructicola* (10^3 conidia ml⁻¹) y pulverizados con una suspensión de cada uno de los aislados (10^6 conidia ml⁻¹). Se pulverizaron tres frutos por aislado. Los frutos se incubaron durante 7 días a 25°C y 99-100% HR. Al finalizar el ensayo se estimó el porcentaje de podredumbre en cada uno de los frutos infectados. Todos los ensayos se repiten dos veces. Se discute la eficacia de los nuevos aislados y su repercusión como nuevas materias activas de los productos biológicos.

El trabajo ha sido financiado por el proyecto RM2010-00013.



P-198-01363

INDUCCIÓN DE LA RESPUESTA DEFENSIVA POR EL AGENTE DE CONTROL BIOLÓGICO *Penicillium chrysogenum* EN EL HUÉSPEDCarreras M.¹, Herranz Y.¹, De Cal A.¹, Melgarejo P.¹, Larena I.¹

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

La inducción de los mecanismos naturales de defensa de las plantas para proporcionar resistencia contra patógenos es una aproximación actualmente desarrollada en la protección vegetal. Las conidias de *Penicillium chrysogenum* (PO212, anteriormente *P. oxalicum*) son elicitores de las respuestas defensivas en *Arabidopsis thaliana* a concentraciones de 1×10^6 conidias/ml. Por ello nos planteamos identificar las señales o "elicitores" de PO212 que inducen las respuestas de defensa en plantas de tomate frente a *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (FOL), centrándonos en la búsqueda de proteínas con actividad enzimática como celulasas, xilanasas y pectinasas.

Se llevó a cabo un ensayo de crecimiento y esporulación de PO212 sobre APD suplementado con diferentes sustratos enzimáticos: pectina, xilano, carboximetilcelulosa y ácido poli-galacturónico, con el fin de determinar si PO212 era capaz de utilizar dichos sustratos. Simultáneamente se realizaron ensayos de eficacia frente a FOL con enzimas sintéticas en una cámara de cultivo con condiciones controladas de humedad y temperatura sobre plantas de tomate. También se comprobó si extractos de crecimiento de PO212 en medio líquido y libres de conidias (ECPO) a distintos tiempos de incubación y las conidias de PO212 (CCLPO) así obtenidas reducían la fusariosis vascular del tomate en el mismo grado que las conidias secas de PO212 desde medio sólido (CSPO). Se evaluó la toxicidad del ECPO sobre la germinación y del crecimiento micelial de FOL. Por otra lado y con intención de comprobar si la actividad inductora de PO212 es una/s proteína/s con actividad enzimática se realizaron ensayos de eficacia en plantas de tomate, donde ECPO, CCLPO y CSPO una vez sometidos a un proceso de desnaturalización con calor (30 minutos, 120°C, 1atm) se aplicaron a plántulas de tomate en semillero.

PO212 mostró un crecimiento y esporulación significativamente mayor sobre xilano y ácido poli-galacturónico que sobre el control con APD sin sustrato. El ECPO demostró no tener efectos tóxicos ni sobre las plantas de tomate ni sobre el patógeno. Los resultados sobre la eficacia de los ECPO, CCLPO naturales y autoclavados así como de CSPO vivas y muertas frente a FOL en plantas de tomate se relacionan con los resultados de eficacia de las enzimas seleccionadas (xilanasas y poligalacturonasas) como posibles inductoras de la resistencia en plantas de tomate frente a FOL.

Este trabajo ha sido financiado por el proyecto RTA2010-00093 del INIA.



P-199-01361

ESTUDIOS DE LA INTERACCIÓN ENTRE *Penicillium chrysogenum* Y *Fusarium oxysporum* f. *sp. lycopersici* EN PLANTAS DE TOMATE MEDIANTE MICROSCOPIA CONFOCALVacas D.¹, Villarino M.¹, De Cal A.¹, Melgarejo P.¹, Larena I.¹1) SGIT-INIA, Departamento de Protección Vegetal, Carretera de La Coruña 7, 28040 Madrid. ilarena@inia.es

Los agentes de microbianos control biológico (ACB) representan una alternativa prometedora frente a la continua aplicación de productos químicos sintéticos en el control de las enfermedades vegetales. Con el fin de optimizar los métodos de selección y aplicación de los ACBs es imprescindible incrementar el conocimiento de la interacción ACB-planta-patógeno. La combinación de etiquetado con proteínas fluorescentes y los avances en la microscopía para monitorización *in situ* proporcionan un gran número de posibilidades para estudiar los complejos mecanismos de interacción entre hongos antagonistas, patógenos y plantas. Por ello el objetivo de este trabajo fue emplear mutantes del ACB *Penicillium chrysogenum* (PO212), etiquetados con GFP, para estudiar *in situ* la interacción del mismo con el patógeno *Fusarium oxysporum* f. *sp. lycopersici* (FOL), etiquetado con DsRed, en co-cultivos y directamente sobre las raíces de plantas de tomate.

Previamente se ha desarrollado en nuestro laboratorio un método de transformación y de selección de cepas recombinantes de PO212 que nos ha permitido obtener una cepa de PO212 etiquetada con GFP (PO212-GFP). La cepa de FOL etiquetada con DsRed (FOL-DsRed) fue proporcionada por el INRA (Francia).

Inicialmente se han llevado a cabo estudios de interacción mediante microscopía confocal entre PO212-GFP y FOL-DsRed en co-cultivo en medio sólido agar patata dextrosa y en medio líquido cuyo resultados corroboran que el modo de acción de PO212 no es micoparasitismo ni toxicidad hacia el patógeno, aunque con estos ensayos no es posible descartar la competencia por espacio o nutrientes.

En el siguiente paso se visualizó la interacción entre PO212-GFP y FOL-DsRed en plántulas de tomate en medio líquido. Las plántulas de tomate eran tratadas con una suspensión de conidias de PO212-GFP a dos concentraciones diferentes (10^5 y 10^6 conidias/ml). A los 7 días del tratamiento fueron inoculadas con 3 concentraciones diferentes del patógeno (10^4 , 10^5 y 10^6 microconidias/ml). Se tomaron muestras de las raíces a los 3, 4, 7, 10 y 14 días desde el tratamiento (ddt) con PO212-GFP para su visualización mediante microscopía confocal. Los resultados mostraron la colonización externa de las raíces de tomate por PO212-GFP a partir del 3 ddt. Se discute la interacción entre el ACB y el patógeno en las raíces de plantas de tomate.

*Este trabajo ha sido financiado por el proyecto RTA2010-00093 del INIA



P-200-01376

ESTUDIO DE LA APTITUD ECOLÓGICA DEL AGENTE DE BIOCONTROL *Penicillium frequentans* CEPA 909Guijarro B.¹, Larena I.¹, Melgarejo P.¹, De Cal A.¹

1) Departamento de Protección Vegetal, subunidad Hongos Fitopatógenos. Instituto Nacional de Investigación Agraria y Alimentaria (INIA), Carretera de La Coruña Km 7,5, 28040, Madrid

Una de las principales limitaciones del control biológico de enfermedades vegetales reside en las condiciones ambientales a las que puede estar sometido el agente de biocotrol (ACB) a lo largo del cultivo. Esto influye a su vez sobre su eficacia, incidiendo sobre su capacidad para colonizar y sobrevivir en el medio en el que se aplica. Un mayor conocimiento de la capacidad de supervivencia y adaptación del ACB a situaciones desfavorables constituye uno de los puntos críticos en el desarrollo de sus aplicaciones prácticas.

Por ello con el objetivo de conocer mejor las aptitudes ecológicas de *Penicillium frequentans* (Pf909), eficaz ACB frente a la podredumbre parda de fruta de hueso, se plantearon cuatro ensayos de crecimiento en placa con agar patata dextrosa bajo distintas condiciones variables de pH (2-8), actividad hídrica (a_w 0.67-0.99), intensidad lumínica (0-2) y periodos diarios luz/oscuridad (h) (0/24, 12/12, 14/10, 16/8, 12/0). Se obtuvieron las curvas de crecimiento (mm/día) y esporulación (conidias/mm²) a lo largo de un periodo de incubación de 10 días en cada una de las condiciones descritas.

El potencial osmótico fue el factor que más influyó en el crecimiento y esporulación de Pf909: con actividades hídricas inferiores a 0.97 se redujo significativamente la velocidad de crecimiento, y la esporulación con respecto al control (a_w 0.99). Pf909 presentó gran tolerancia a pH extremos, manteniendo un crecimiento similar entre pH4 y pH7. El crecimiento de las colonias fue significativamente inferior a pH inferiores a 3, reduciendo el crecimiento a sólo 6 días de incubación. Los periodos de luz diaria por debajo de 14h mostraron un incremento de la esporulación respecto al resto, mientras la intensidad lumínica no tuvo efecto significativo en la esporulación ni el crecimiento.

Estos resultados ayudarán a desarrollar formulaciones que permitan mejorar la eficacia de Pf909 bajo condiciones de estrés e incrementar su permanencia en las aplicaciones en campo.

Investigación financiada por 612713 BIOCOTES fondos FP7



P-201-01426

SUPERVIVENCIA DEL AGENTE DE CONTROL BIOLÓGICO *Candida sake* CPA-1 BAJO LA INFLUENCIA DE FACTORES ABIÓTICOS LIMITANTES PRESENTES EN EL VIÑEDO

Calvo-Garrido C.¹, Viñas I.¹, Fermaud M.², Usall J.³, Solsona C.³, Ramos M.C.⁴, Teixidó N.³

1) Universitat de Lleida, XaRTA-Postcollita, Agrotecnio, 25198, Lleida.

2) UMR 1065 Santé & AgroEcologie du Vignoble (SAVE) - ISVV - Centre INRA de Bordeaux Villenave d'Ornon, France

3) IRTA, XaRTA-Postcollita, 25003, Lleida. E-mail: neus.teixido@irta.cat

4) Departamento de Medio Ambiente y Ciencias del suelo, Universitat de Lleida, Agrotecnio, 25198, Lleida

La efectividad del control biológico de enfermedades con microorganismos antagonistas depende en gran medida de su persistencia y la supervivencia sobre el cultivo. *Candida sake* CPA-1 es un agente de control biológico (ACB) que, en estudios previos, ha demostrado ser eficaz en el control de la podredumbre gris (*B. cinerea*) cuando ha sido aplicado en viña. El presente trabajo tiene como objetivo evaluar el efecto de diferentes factores abióticos como Temperatura, Humedad Relativa, radiación solar y lluvia en las poblaciones de *C. sake* aplicadas sobre uvas y describir la dinámica de sus reducciones.

En diferentes ensayos, *C. sake* (5×10^7 UFC mL⁻¹) fue aplicada con el aditivo Fungicover® (FC) sobre la superficie de uvas, para después exponer las poblaciones a diferentes regímenes de T y HR (40-45 °C y 30-100 % HR) en cámaras climáticas, condiciones exteriores de verano con alta irradiación solar, así como al efecto de la lluvia con la ayuda de un simulador.

Las poblaciones de *C. sake* se redujeron entre 1 y 3,5 log en 72 horas de exposición a alta T y baja HR en condiciones exteriores de verano. En estas condiciones, el aditivo FC mostró mejorar la supervivencia del ACB. En condiciones limitantes constantes en cámaras climáticas, las reducciones tras 72 horas fueron de 3-4 log (40-45 °C y 30 % HR), mientras que la combinación de T y HR altas (40-45 °C y 100 % HR) resultó muy perjudicial para el microorganismo. La aplicación de lluvia simulada redujo 0.7-1 log las poblaciones sobre uvas. En todos los casos las mayores reducciones se observaron en las primeras 6-24 horas de exposición y un periodo de establecimiento (24-48 horas a 20-25 °C y 80-100 % HR) incrementó significativamente la supervivencia del ACB. Los resultados permiten realizar recomendaciones generales para su aplicación en campo.

* Este trabajo ha sido financiado por la Universitat de Lleida (Proyecto de Investigación de Producción Ecológica y la beca predoctoral de C. Calvo-Garrido)



P-202-01514

VANILLYLNONANOATE INDUCES SYSTEMIC RESISTANCE IN PEPPER AND *Arabidopsis thaliana* AGAINST *Botrytis cinerea***García T.¹, van Kan J.², Veloso J.¹, Díaz-Varela J.¹**

1) Grupo de Investigación de Fisiología das plantas, Departamento de Bioloxía Animal, Bioloxía Vexetal e Ecoloxía, Facultade de Ciencias, Universidade da Coruña, Campus de A Coruña, 15071 A Coruña, Spain

2) Wageningen University Plant Sciences, Laboratory of Phytopathology, Droevendaalsesteeg 1, P.O. Box 8025, 6700 EE, Wageningen, The Netherlands.

Botrytis cinerea Pers.:Fr. is one of the most destructive pathogens. It is able to infect more than 200 plants including dicotyledonous plants and is considered a necrotroph model pathogen. The aim of this study is to test whether vanillylnonanoate, a synthetic analogue of capsiate, is able to induce systemic resistance in pepper and *A. thaliana* against *B. cinerea* and test which defensive mechanisms are involved in the process. The compound was applied to cotyledons of pepper and to basal leaves of *A. thaliana*. In both cases, systemic leaves were inoculated with *B. cinerea* 24 hours after treatment. The disease severity was scored for 3 days in *A. thaliana* and 4 days in pepper. Disease severity was reduced after vanillylnonanoate treatment in both plants. Gene expression was also measured in systemic leaves of vanillylnonanoate-treated plants. The selected genes were: *CaSC1* (involved in capsidiol synthesis), *CaBPR1* and *CaBGLU* (PR proteins) and *CaACO* (involved in ethylene biosynthesis) in pepper and genes *PR1* (PR protein and gene marker for SA signalling), *VSP2* and *PDF1.2* (gene markers for JA/ET signalling) and *PAD3* (involved in camalexin synthesis) in *A. thaliana*. Changes in gene expression were detected in both hosts upon vanillylnonanoate treatment. In addition, several *Arabidopsis* mutants (*NahG*, *jin4*, *ein3*, *npr1-1* and *pad3*) were tested for vanillylnonanoate induced resistance in order to find out the defense pathways involved.

This project was financed by Xunta de Galicia (Project 10MRU103009PR)



P-203-01454

ENCAPSULATION OF FUNGICIDE TO ENHANCE ITS PENETRATION THROUGH THE CELL WALL OF THE FUNGI

Salgado M.¹, Rodríguez-Rojo S.¹, Alves-Santos F.M.², Cocero M.J.¹

1) Universidad de Valladolid - High Pressure Processes Group, Dpto. Ingeniería Química y Tecnología del Medio Ambiente

2) Universidad de Valladolid - Sustainable Forest Management Research Institute, Dpto. Producción Vegetal y Recursos Forestales

Botrytis cinerea is a pathogenic fungus that affects several fruits and plants. In order to reduce the use of toxic substances against fungus, new formulation methods are being developed. In this work, β glucans are used as encapsulating material for conventional fungicides. Taking into account that the cell wall of *Botrytis cinerea* contains β glucans in its structure, this novel formulation may provide an improvement on the absorption of the fungicide in the fungus, which results in higher effectiveness and less quantity of product required to control the infection.

Resveratrol is one of the natural compounds found in numerous plant species. It is synthesized as a response to infection by pathogens. Some studies have reported its action against *Botrytis cinerea*. In this work, it is the product chosen as active compound because, together with β glucans, it would suppose the use of a completely natural product. For comparison with the action of resveratrol, it is also used tebuconazole, which is one of the compounds commonly employed in plant protection.

For the production of particles, first an oil-in-water emulsion is formed, with the active compound dissolved in ethyl acetate as organic phase, whereas the aqueous phase contains the different matrixes used: β glucans, soybean lecithin (for comparison) or a mixture of both of them. Then, the organic solvent is removed by vacuum evaporation, and finally the suspension is dried by conventional spray-drying.

Once the particles are obtained, the encapsulation efficiency of the active compound in the different matrixes is evaluated by HPLC analysis. The morphology of the particles is analyzed by scanning electron microscopy (SEM). Also the antifungal activity of the particles against *Botrytis cinerea* is studied through in-vitro culture on solid agar in Petri dishes, and compared to that of pure resveratrol and tebuconazole powder and commercial emulsion of tebuconazole.



P-204-01305

OPTIMIZACIÓN DE ROTACIONES PARA EL CONTROL INTEGRADO DE *Globodera* spp.Cabaleiro C.¹, Pesqueira A.M.¹, Antón J.A.¹, Barrio J.C.², García L.²

1) Universidade de Santiago de Compostela

2) Centro Tecnolóxico da Carne - INGACAL Xunta de Galicia

La directiva 27/33/CE obliga a detectar la aparición de nematodos del quiste, determinar su distribución, evitar su propagación y tenerlos bajo control. *Globodera rostochiensis* está presente en Galicia desde los años 70 y se ha controlado con nematicidas y variedades resistentes; la repetición de dichas variedades ha facilitado la proliferación de *G. pallida*. Como alternativa al uso de nematicidas se ha propuesto la biofumigación y para acelerar la reducción de viabilidad de los quistes, el uso de plantas trampa, pero las variedades resistentes siguen siendo la opción preferida. En 2012 se estableció en A Limia (Ourense) un ensayo con variedades resistentes al nematodo, biofumigación con *Brassica napus* y *B. rapa*, dos variedades de *Solanum sisymbriifolium* como trampa y el nematicida oxamilo. En 2013 se amplió el número de variedades resistentes y nematicidas orgánicos. El efecto de la biofumigación fue equivalente a un nematicida a dosis baja: el rendimiento no se resiente significativamente y disminuyen otros daños al tubérculo (sarna común, agusanado) pero *Globodera* se multiplica. *S. sisymbriifolium* consiguió una reducción muy significativa de la viabilidad de los quistes (70%) pero se establece mal y el coste es alto. El nematicida de síntesis consigue mantener las producciones de patata pero a corto/medio plazo es insostenible al no impedir la multiplicación de *Globodera*. Alguna variedad supuestamente resistente multiplicó los quistes y el rendimiento se vio afectado pero otras tuvieron alto rendimiento, redujeron la infestación del suelo y suponen una alternativa prometedora, pero que solo debe utilizarse dentro de rotaciones racionales que incluirían cultivo de crucíferas para ser enterradas como biofumigantes para limitar los daños al inicio del cultivo; el coste de utilizar solanáceas trampa solo se justificaría para rebajar drásticamente la viabilidad de los quistes en suelos muy infestados, como alternativa a 3-4 años sin cultivar patata.

Este trabajo fue financiado parcialmente por el Proyecto PGIDT/PGIDIT – 2010/CG870 FEADER, Xunta de Galicia y Agroxinzo S.L.



P-205-01346

COMPARATIVA DE LA EFICACIA DE DIFERENTES MÉTODOS DE DESINFECCIÓN DEL SUELO EN LA REDUCCIÓN DE LAS POBLACIONES DE NEMATODOS FITOPARÁSITOS EN EL CULTIVO DE FRESA

Talavera M.¹, Flor-Peregrín E.¹, Miranda L.², Domínguez P.², Medina-Mínguez J.J.²

1) IFAPA Centro Camino de Purchil

2) IFAPA Centro Huelva

Durante los últimos doce años, los proyectos de alternativas al bromuro de metilo han llevado a cabo diversos ensayos en campo, con el objetivo de encontrar alternativas eficaces a la desinfección del suelo en diversos cultivos. En este trabajo se presenta una comparativa de la eficacia de diversos tratamientos en la reducción de las poblaciones de nematodos fitoparásitos (*Meloidogyne hapla* y *Pratylenchus penetrans*) en el cultivo de fresa. La lista de tratamientos químicos ensayados incluye: 1,3 dicloropropeno, cloropicrina, dazomet, dimetildisulfito, furfural, metam-sodio e ioduro de metilo, a diferentes dosis y con diferentes combinaciones entre ellos. Los tratamientos biológico-físicos se basaron en combinaciones de solarización y biofumigación con enmiendas de gallinaza y la adición de otros agentes biológicos como *Trichoderma* sp. y fitoestimulantes como aminoácidos. Las densidades de nematodos en suelo se estimaron antes y después de los tratamientos y al final del ciclo de cultivo. Las eficacias en la reducción de las poblaciones de nematodos tras los tratamientos oscilaron entre un 40% y un 97,5%. Los tratamientos con productos químicos fumigantes mostraron mayores eficacias. El uso de plásticos VIF incrementó la eficacia de los tratamientos frente al uso de polietileno normal en la reducción de las densidades de nemátodos en suelo. Los tratamientos de biosolarización consiguieron reducir las densidades de nematodos a niveles similares a la desinfección con nematicidas del tipo dazomet, metam-sodio o dimetildisulfito.

Este trabajo ha sido financiado por los contratos INIA: AT06-006-C7-1, AT06-006-C7-3, INIA-IFAPA CC09-074, IFAPA: PP.TRA. TRA201300.6 y Fondos FEDER de la UE.



P-206-01452

USO DE SUBPRODUCTOS AGROALIMENTARIOS PARA EL MANEJO DE NEMATODOS EN CULTIVOS HORTÍCOLASLópez-Pérez J.A.¹, Sánchez-Moreno S.²

1) Centro Agrario Marchamalo, INCRECYT, JCCM, Camino de San Martín s/n, 19180 Marchamalo, Guadalajara.

2) Unidad de productos Fitosanitarios (DTEVPF), Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria, Crta. Coruña km 7,5 28044 Madrid.

La necesidad de encontrar alternativas a los métodos convencionales de control de patógenos ha llevado a la búsqueda de nuevas técnicas de control menos agresivas ambientalmente, como la biodesinfección de suelos, que, además de ser una forma eficaz de control de patógenos edáficos, valoriza nuevas fuentes de materia orgánica.

Con el objetivo de estudiar los efectos de la biofumigación sobre los nematodos patógenos edáficos, se ha empleado vinaza de vino y estiércol de forma combinada para el manejo de nematodos formadores de nódulos del género *Meloidogyne* en un cultivo protegido bajo plástico. El cultivo consistió en una rotación de acelga-tomate, con la aplicación del biofumigante en verano. Los tratamientos incluyeron vinaza de vino a 4 l/m² (V) en combinación o no con estiércol aplicado a 5 kg/m² (E). Los resultados obtenidos mostraron una mejora de la fertilidad del suelo, una reducción en los índices de nodulación de la raíz en ambos cultivos, y efectos significativos de ambos tratamientos sobre la nematofauna beneficiosa en los tratamientos con biofumigante. Se observó, además, una mejora significativa en las parcelas con vinaza y estiércol en relación con las parcelas testigo. Nuestros resultados indican que la utilización de subproductos de la industria vitivinícola puede ser una herramienta útil en el manejo de suelos y su nematofauna asociada en cultivos hortícolas.

*Este trabajo ha sido financiado por el Plan Nacional de I+D+I, a través del proyecto AGL2012-34199.



P-207-01468

MANEJO INTEGRADO DE *Meloidogyne* EN CULTIVOS DE TOMATE COMBINANDO DESINFECCIÓN DEL SUELO EN LÍNEA E INJERTORos C.¹, Hernández M.A.¹, Lacasa C.M.¹, Martínez V.¹, Guerrero M.M.¹, Lacasa A.¹

1) Biotecnología y Protección de Cultivos, IMIDA, C/ Mayor s/n 30150 La Alberca Murcia.

En más del 70% de los invernaderos de tomate de la Región de Murcia se cultivan plantas injertadas en patrones con resistencia a *Meloidogyne*. El monocultivo de variedades o patrones portadoras de resistencia ha supuesto que en la mayor parte de los suelos se hayan seleccionado poblaciones que han remontado la resistencia, produciéndose pérdidas de cosecha. La desinfección del suelo con 1,3-dicloropropeno o su mezcla con cloropicrina es habitual en los invernaderos, presentándose deficiencias en el control de los nematodos en suelos con alta densidad poblacional cuando el ciclo de cultivo es largo (9-10 meses), incluso cultivando variedades resistentes.

Durante 4 años se han realizado ensayos combinando la desinfección del suelo con dos dosis de 1,3-dicloropropeno aplicado en "línea" y el injerto en patrones resistentes, en invernaderos con altas densidades poblacionales (ADP) de *Meloidogyne* y con bajas poblaciones (BDP). La desinfección se realizó en julio y el cultivo se desarrolló entre agosto-septiembre y mayo-junio.

En los dos supuestos la desinfección con 1,3-D disminuyó significativamente la población de *Meloidogyne*, pero el efecto se disipó con el transcurso del cultivo. En el testigo de los invernaderos ADP el índice de agallas en las raíces fue superior a 5 (escala 0-10) a partir del segundo a sexto mes después de la plantación, mientras que en el suelo desinfectado con la menor dosis de 1,3-D (100 L/ha) no se alcanzó ese índice hasta el octavo mes y hasta el final del cultivo en el suelo desinfectado con 200 L/ha. En el testigo no desinfectado se produjo una pérdida de cosecha superior al 30%. En los invernaderos BDP no se encontraron diferencias entre los tratamientos de desinfección y el testigo en la producción comercial, pero si en los daños en las raíces al final del cultivo, siendo menores en el suelo desinfectado con la dosis mayor de 1,3-dicloropropeno.



P-208-01467

ESTRATEGIAS PARA EL MANEJO DE LA RESISTENCIA GENÉTICA A *Meloidogyne incognita* EN INVERNADEROS DE PIMIENTO

Ros C.¹, Guerrero M.M.¹, Martínez-Mora C.¹, Sánchez-Solana F.¹, Lacasa C.M.¹, Martínez V.¹, Sánchez E.², Lacasa A.¹

1) Dpto de Biotecnología y Protección de Cultivos IMIDA, C/ Mayor s/n 30150 La Alberca Murcia.

2) Dpto de Hortofruticultura IMIDA, C/ Mayor s/n 30150 La Alberca Murcia

Meloidogyne incognita es uno de los principales problemas del cultivo de pimiento en invernadero en el sureste. Las limitaciones para el uso de fumigantes del suelo, generales o específicos hacen que se oriente el control del nematodo hacia el uso resistencias específicas introducidas en porta-injertos y en variedades. Se ha constatado la selección de poblaciones virulentas al gen *Me3* (=Me7) cuando se reitera el cultivo de porta-injertos portadores de este gen en el mismo suelo, por lo que se plantea el establecimiento de estrategias del uso de de tales resistencias.

Para los ensayos se utilizaron los porta-injertos Terrano (Syngenta Seeds) portador del gen *Me1*; Atlante (Ramiro Arnedo S.A.) e IMIDA-2 (obtención del IMIDA) portadores del gen *Me3* (=Me7) y las variedades susceptibles Gacela (Syngenta Seeds) o Traviata (Rijk Zwaan) puestos en cuatro invernaderos infestados naturalmente por *M. incognita*. En el momento de iniciar los ensayos, dos invernaderos tenían poblaciones virulentas al gen *Me3*, uno en proceso de disminución de la población por el manejo del uso de los genes *Me3* y *Me1* y el otro en proceso de selección de la virulencia; los otros dos tenían poblaciones avirulentas al mismo *Me3*.

Los porta-injertos portadores del gen *Me3* se infestaron igual que la variedad susceptible en el invernadero donde se está seleccionando la virulencia mientras que en el otro invernadero donde desde hace 4 años se está manejando las resistencias, estos porta-injertos mostraron un bajo nivel de infestación. En estos dos invernaderos (con poblaciones de nematodos virulentas al gen *Me3*) no se infestó el porta-injerto Terrano portador del *Me1*.

En los dos invernaderos con poblaciones avirulentas al gen *Me3*, los patrones portadores de este gen no mostraron ninguna agalla en uno de ellos mientras que en el otro mostraron una infestación fue inferior a la variedad susceptible. El porta-injerto Terrano tampoco se infestó.

Este trabajo ha sido financiado con los proyectos INIA RTA2005-0209 e INIA RTA2009-0058, cofinanciado con fondos FEDER (EU)



P-209-01623

ESTUDIO DE LA INTERACCIÓN TRITRÓFICA: TOMATE, *Meloidogyne javanica* Y *Pochonia chlamydosporia***Escudero B, López-Llorca J.V.**

(Instituto Multidisciplinar para el estudio del Medio "Ramón Margalef", Dpto, de Ciencias del Mar y Biología Aplicada.
nuria.escudero@ua.es)

En este trabajo se ha estudiado mediante técnicas agronómicas, de biología celular/molecular y metabolómica la interacción de raíces de tomate, con el nematodo fitopatógeno *M. javanica* y el hongo nematófago *P. chlamydosporia*.

Las plántulas de tomate (*Solanum lycopersicum*) se inocularon con *P. chlamydosporia* y con *M. javanica* 10 días más tarde. Se midieron parámetros de crecimiento de las plantas así como la colonización total y endofítica por *P. chlamydosporia* mediante cultivo, microscopía láser confocal y PCR cuantitativa. Al final del ciclo de *M. javanica* también se evaluó la colonización de las masas de huevos por *P. chlamydosporia*. Asimismo se ha estudiado la composición de los exudados radiculares mediante técnicas metabolómicas (fluorescencia, RMN y HPLC-MS).

Mediante microscopía láser confocal se observó una colonización en las células epidérmicas y del córtex radicular por *P. chlamydosporia*. Mediante qPCR se observó una disminución en la colonización por *P. chlamydosporia* con el tiempo. Sin embargo la colonización por *P. chlamydosporia* promovió el crecimiento de raíces y parte aérea respecto a las plantas no inoculadas. Las raíces de tomate colonizadas endofíticamente por *P. chlamydosporia* e inoculadas con juveniles de *M. javanica* desarrollaron agallas y masas de huevos que fueron colonizados por el hongo. El estudio metabolómico mostró que las diferencias en la composición de los exudados se debe fundamentalmente a la presencia de *M. javanica* en la raíz.

Nuestros resultados sugieren que la colonización endofítica de raíces de tomate por *P. chlamydosporia* promueve el crecimiento de plantas de tomate y coloniza masas de huevos de *M. javanica* al final de su ciclo. El estudio metabolómico tiene un papel importante para identificar los compuestos de los que depende el intercambio de señales planta-patógeno-agente de biocontrol. Estos estudios permitirán mejorar el efecto supresor del daño por nematodos en cultivos por hongos nematófagos.



P-210-01479

ACTIVIDAD NEMATICIDA DEL ACEITE ESENCIAL DE TRES QUIMIOTIPOS DE *Tagetes minuta***Massuh Y.^{1,4}, González-Coloma A.², Arraiza M.P.³, Ojeda M.S.¹, Zygodlo J.A.⁴, Andrés M.F.²**

1) Fac. Ciencias Agropecuarias, UNC. Córdoba, Argentina. Email: ymassuh@yahoo.com.ar

2) ICA-CSIC. c/ Serrano 115 dpdo. 28760. Madrid, España. Email: mafay@ccma.csic.es

3) ETSI Montes, UPM – Madrid, España.

4) IMBIV, Universidad Nacional de Córdoba/CONICET – Córdoba, Argentina.

Los aceites esenciales (AEs) presentan cada vez mayor interés por su potencial como alternativa a plaguicidas sintéticos. El género *Tagetes* (*Asteraceae*) es reconocido como fuente de AEs, de importancia por su actividad biológica. *Tagetes minuta* L. es una planta aromática anual cuyo AE está compuesto principalmente por los monoterpenos Z- y E-ocimenona, dihidrotagetona, E- y Z-tagetona, limoneno y ocimeno. Como resultado de un proceso de domesticación, selección y mejora mediante cultivo experimental (Córdoba, Argentina) se han identificado tres quimiotipos diferenciados en la proporción de compuestos principales. El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto nematocida de los AEs de los quimiotipos de *T. minuta* y de las fracciones aisladas en el nematodo formador de nódulos *Meloidogyne javanica*. Los AEs se obtuvieron por destilación de hojas y flores en equipo Clevenger, las fracciones fueron separadas por fluidos supercríticos y el análisis químico se realizó por GC/MS. Los bioensayos *in vitro* mostraron una fuerte actividad nematocida del AE de los tres quimiotipos ensayados. Aunque todos ellos inducen una alta mortalidad en juveniles infectivos (J2) de *M. javanica*, destaca especialmente el AE del quimiotipo rico en ocimenona (Q3) que presenta una menor LC_{90} (0,234 μ /ml) en J2 e induce una fuerte inhibición de la eclosión de huevos y de la capacidad infectiva de juveniles en plántulas de tomate. Consecuentemente, la fracción más activa fue la mayoritaria en ocimenona (F4) tanto por sus efectos en J2 (LC_{90} : 0,062 μ /ml) como en la eclosión de huevos (100 % de supresión). Los resultados obtenidos en este estudio evidencian la importancia de la caracterización de quimiotipos de *T. minuta* para la obtención optimizada de AE y de compuestos activos con gran potencial en el control de *M. javanica*.



P-211-01493

COMPORTAMIENTO DE LÍNEAS DE *Cucumis metuliferus*, *Citrullus lanatus* var. *citroides* y *C. colocynthis* FRENTE A *Meloidogyne* spp. COMO POTENCIALES PORTAINJERTOS DE MELÓN, PEPINO Y SANDÍA

Munera M.¹, Giné A.¹, Pocurull M.¹, Picó B.², Gisbert C.², Sorribas F.J.¹

1) Departamento de Ingeniería Agroalimentaria y Biotecnología (DEAB), Universitat Politècnica de Catalunya (UPC)

2) Instituto de Conservación y Mejora de la Agrodiversidad Valenciana (COMAV), Universitat Politècnica de València (UPV)

La resistencia vegetal para el control de *Meloidogyne* es efectiva y económicamente rentable, pero su uso continuado puede seleccionar poblaciones virulentas, como se ha citado en tomate y pimiento. En cucurbitáceas existe germoplasma resistente que podría utilizarse como patrón en rotación con solanáceas para mejorar el control del nematodo y la durabilidad de los genes implicados. Se llevaron a cabo una serie de ensayos para identificar resistencia a *M. incognita* y *M. javanica* en dos líneas de *Cucumis metuliferus*, potencial portainjerto de melón y pepino, tres de *Citrullus lanatus* var. *citroides* y una de *C. colocynthis*, potenciales portainjertos de sandía. Las plantas fueron trasplantadas en contenedores de 200 cm³ con arena esterilizada e infestada con 200 juveniles (J2) de *M. incognita* o *M. javanica*, y se mantuvieron en cámara climática a 25 °C y 16:8 h (luz:oscuridad) hasta que el nematodo completó una generación. Se determinó el número de masas de huevos y número de huevos por planta, y se calculó el índice de reproducción (IR) según la expresión (número de huevos en la línea / número de huevos en pepino cv. Dasher II o sandía cv. Sugar Baby) x 100, para categorizar la resistencia según la clasificación de Hadisoeganda y Sasser. El número de masas de huevos y de huevos por planta en ambas líneas de *C. metuliferus* fue inferior que en el pepino Dasher II, independientemente de la especie de nematodo, y se comportaron como altamente resistentes (IR entre 1 y 4). Dos líneas de *C. lanatus* var. *citroides* se comportaron como altamente resistentes (IR entre 3 y 7) y una como moderadamente resistente a (IR 9 frente *M. incognita*, IR 21 frente *M. javanica*). La línea de *C. colocynthis* se comportó como ligeramente resistente (IR = 34). Las líneas resistentes al nematodo serán evaluadas en condiciones de campo.



P-212-01335

EVALUACIÓN DE LA RESISTENCIA A *Meloidogyne incognita* EN ACCESIONES DE PIMIENTO PARA SU POSIBLE EMPLEO COMO PORTA-INJERTOS

Boix A.¹, Marín J.I.¹, De Cara M.¹, Gómez-Tenorio M.A.¹, Ruíz C.A.¹, Jiménez F.¹, Lupión B.¹, Camacho F.¹, Tello J.C.¹

1) Grupo de Investigación AGR-200. Departamento de Producción Vegetal. Universidad de Almería. Ctra. Sacramento s/n 04120. Almería

De las seis especies del género *Meloidogyne* que se muestran patógenas para pimiento, *Meloidogyne incognita* es la especie que mayor importancia presenta en los pimentonales españoles. La eliminación del bromuro de metilo (BrMe), las primeras tentativas de cultivo ecológico y las rotaciones con otros cultivos susceptibles a estos nematodos como calabacín o melón han provocado un aumento de las poblaciones que pueden llegar a ser limitantes del siguiente cultivo de pimiento. Frente a esta situación, el empleo de variedades resistentes quiso posicionarse como alternativa a su control, identificándose con los años varios genes de resistencia. Sin embargo existe, al igual que en otros casos, dificultad para incorporar resistencias a *Meloidogyne* en cultivares comerciales, por lo que se contempla al injerto como alternativa para el control de estos los patógenos del suelo.

Se evaluaron 11 accesiones del género *Capsicum* facilitadas por el COMAV por su resistencia a *M. incognita* raza 2. Los ensayos se hicieron en cámara climatizada y en invernadero, en dos estados fenológicos distintos. Las plantas crecieron en vermiculita. El inóculo se añadió al sustrato como una suspensión de huevos y juveniles J1 y J2.

Los resultados muestran cómo en cámara con 3 hojas verdaderas se comportó como resistente la accesión Serrano-2, mientras que en invernadero, al evaluarlas con 8 hojas verdaderas, lo hicieron Serrano-2 y A-20, comportándose igual que el testigo resistente Serrano-1. El resto de accesiones mostraron más o menos nodulación, con valores generalmente menores en el ensayo de invernadero.

Los resultados son prometedores, aunque una evaluación más completa parece necesaria, especialmente valorando si estos patrones modificarían su comportamiento frente a otras poblaciones de *M. incognita* reiterando el cultivo, buscando la durabilidad del gen o genes de resistencia. Además, deberían evaluarse los patrones injertados, dado que el injerto podría modificar la resistencia.

Palabras clave: *Capsicum annuum*, nematodos, patrón.

Agradecimientos: Proyecto Ministerio de Ciencia e Innovación/INIA. RTA 2010-00038-C03-02



P-213-01481

LA BIOSOLARIZACIÓN CON SUBPRODUCTOS AGROINDUSTRIALES REDUCE LA INCIDENCIA DE *Phytophthora* Y *Meloidogyne* EN CULTIVOS DE PIMIENTO EN INVERNADEROS DEL SURESTE

Lacasa A.¹, Hernández M.A.¹, Lacasa C.M.¹, Ros C.¹, Martínez V.¹, Martínez M.C.¹, Fernández P.², Guerrero M.M.¹

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

2) Servicio de Formación y Transferencia Tecnológica OCA "Vega Alta". Cieza. Consejería de Agricultura y Agua. Región de Murcia

Phytophthora spp. y *Meloidogyne incognita* son los principales patógenos del pimiento en los invernaderos del Campo de Cartagena (Murcia). Hasta ahora el control se ha basado en la desinfección del suelo con fumigantes químicos. La biosolarización se ha planteado como una alternativa a la desinfección química, habida cuenta de las limitaciones que en la actualidad se ponen al uso de los fumigantes químicos.

Durante dos campañas consecutivas se ha evaluado el efecto de la biosolarización (solarización con enmiendas orgánicas) con torta de colza (TC) y la mezcla de bagazo de cerveza (BC) y estiércol fresco de ovino sobre la supervivencia de oosporas de *Phytophthora capsici* y sobre la incidencia de *M. incognita* y de *P. nicotianae* en el cultivo, iniciando la desinfección en agosto y en octubre, en dos invernaderos (A y B) de pimiento del Campo de Cartagena. El diseño experimental fue de bloques al azar con tres repeticiones, teniendo como referencia un testigo no tratado en los dos invernaderos y suelo desinfectado con 1,3-dicloropropeno+ cloropicrina o con dazomet en el B. La biosolarización se realizó humedeciendo el suelo después de haber incorporado la enmienda y manteniendo el plástico de sellado durante 6 semanas.

La supervivencia de las oosporas de *P. capsici* enterradas antes de iniciar el tratamiento a 15 y 30 cm fue menor en los tratamientos iniciados en agosto que en los iniciados en octubre, no encontrándose diferencias entre las enmiendas a ninguna de las profundidades, ni entre estas y los desinfectantes químicos, pero sí entre las enmiendas y el testigo. En el invernadero A, la biosolarización en agosto proporcionó menor incidencia de *Meloidogyne* que en octubre, la cual fue menor a la del testigo. En el invernadero B la biosolarización proporcionó, los dos años, similar nivel de incidencia de *Meloidogyne* y de *P. nicotianae* que los desinfectantes químicos.

* El trabajo ha sido financiado por el proyecto INIA RTA2011-00005-C03, participado con fondos FEDER



P-214-01208

FUENTES DE RESISTENCIA A *Tomato leaf curl New Delhi virus* (ToLCNDV) EN CUCURBITÁCEAS**López, C.¹, Ferriol, M.², Picó, B.¹**

1) Instituto de Conservación y Mejora de la Agrodiversidad Valenciana - Universitat Politècnica de Valencia (COMAV-UPV).
Camino de Vera s/n 46022-Valencia. E-mail: clopez@upvnet.upv.es

2) Instituto Agroforestal Mediterráneo - Universitat Politècnica de Valencia (IAM-UPV). Camino de Vera s/n 46022-Valencia.

En 2013 se detectó una nueva virosis en el sudeste español que está causando estragos en los cultivos de cucurbitáceas. Se trata de una cepa del begomovirus *Tomato leaf curl New Delhi virus* (ToLCNDV).

Como en todas las enfermedades de etiología viral, la mejor estrategia para controlar la enfermedad consiste en el desarrollo de variedades resistentes. Con ese fin, se ha puesto a punto un protocolo de transmisión mecánica del virus y se ha cribado una colección de entradas de melón (*Cucumis melo*) y otra de calabacín y especies relacionadas (*Cucurbita* spp.). En todos los casos, la presencia del virus se ha confirmado mediante PCR.

Los primeros resultados indican que la gran variabilidad de la especie *C. melo* también se manifiesta en la existencia de una respuesta diferencial al virus. La mayoría de los genotipos ensayados, incluidas variedades comerciales de tipo Piel de sapo y Cantalupo, presentan síntomas severos de la enfermedad. Sin embargo, varias accesiones de melones exóticos procedentes de la India muestran distintos niveles de resistencia. Algunas de estas entradas son totalmente asintomáticas, mientras que otras presentan una aparición tardía de los síntomas, observándose sólo un ligero fruncido de la hoja. En algunos casos se observa una recuperación de las plantas, con síntomas iniciales que desaparecen en los brotes nuevos.

Las entradas de calabacín con mayor importancia comercial, *C. pepo* subsp *pepo* morfotipos Zucchini, Pumpkin, Vegetable Marrow y Cocozelle y *C. pepo* subsp *ovifera* morfotipos Scallop, Acorn y Crookneck, han resultado ser altamente susceptibles al virus, así como la especie silvestre *C. pepo* subsp *fraterna*. El elevado nivel de susceptibilidad encontrado en esta especie confirma la gravedad de la enfermedad para el cultivo del calabacín.

Además, estamos cribando colecciones de *Cucurbita maxima* y *C. moschata*. Los mejores resultados se están obteniendo en *C. moschata*, que presenta compatibilidad parcial con *C. pepo*, por lo que es posible transferir las resistencias encontradas a variedades comerciales.



P-215-01233

PepProtect®: UNA SOLUCIÓN QUE INTEGRA UN PRODUCTO Y UN SERVICIO PARA LA PROTECCIÓN CRUZADA DE CULTIVOS DE TOMATE FRENTE AL VIRUS DEL MOSAICO DEL PEPINO DULCE (PepMV)

Agüero J.¹, Sempere R.N.², Gómez P.², García-Nuñez J.², Casado A.¹, Méndez-López A.¹, Hernando Y.², Aranda M.A.²

1) Abiopep S.L. Centro Europeo de Empresas de Innovación de Murcia (CEIM). Campus Universitario de Espinardo, nº7, módulo 4. 30100 Murcia (Spain). URL: www.abiopep.com. E-mail: jaguero@abiopep.com

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

El virus del mosaico del pepino dulce (*Pepino mosaic virus*, PepMV) está causando graves epidemias en cultivos de tomate en todo el mundo. En España, la mayor incidencia de la enfermedad causada por PepMV se da en las provincias de Murcia, Almería y en el Archipiélago Canario, en donde puede afectar al 100% de las plantas de un 60-70% de las parcelas de cultivo comercial de tomate, causando gravísimas pérdidas económicas. Esta es una situación de emergencia fitosanitaria que requiere medidas urgentes y eficaces para salvaguardar la producción de tomate para consumo en fresco en España. Abiopep, en colaboración con el grupo de Patología Vegetal del CEBAS-CSIC (Murcia), ha desarrollado PepProtect®, una solución que integra un producto y un servicio para la protección cruzada de cultivos de tomate frente a PepMV. PepProtect® se basa en cuatro aspectos clave: (i) Atenuación, conferida por cepas virales autóctonas, que circulaban en epidemias tempranas en España. (ii) Protección frente a aislados más agresivos. Nuestros resultados indican que PepProtect® confiere inmunidad frente a una amplia gama de aislados de PepMV, incluyendo aislados europeos y chilenos, necrogénicos y no necrogénicos. (iii) Procedimiento de inoculación. El procedimiento puesto a punto da lugar a pre-inmunizaciones del 100% de las plantas tratadas. (iv) Seguimiento. Abiopep no sólo lleva a cabo la inmunización mediante la aplicación del producto, sino que realiza un exhaustivo seguimiento de las plantaciones tras el tratamiento.



P-216-00801

EL TRATAMIENTO EXÓGENO CON ÁCIDO SALICÍLICO RETRASA LA INFECCIÓN Y CONTRARRESTA LAS ALTERACIONES INDUCIDAS POR *Maize dwarf mosaic virus* (MDMV) EN MAÍZ

Cueto-Ginzo A.I.¹, Serrano L.², Sin E.¹, Rodríguez R.¹, Macías E.¹, Román C.¹, Medina V.^{1,2}, Achón M.A.^{1,2}

1) Grupo INPLAMICVEC. Departament de Producció Vegetal i Ciència Forestal, Universitat de Lleida (UdL)

2) AGROTECNIO Center, Universitat de Lleida (UdL)

La resistencia sistémica adquirida (SAR) inducida por el ácido salicílico (AS) es un hecho probado aunque su uso en el control de virus fitopatógenos sigue en revisión. En este trabajo, se ha evaluado el efecto del tratamiento foliar con AS a dos dosis diferentes (5mM y 25mM) sobre maíz infectado con *Maize dwarf mosaic virus* (MDMV), aislado AM110558, para conocer su efecto en la fisiología de la planta y la infección viral. Para ello, se han examinado parámetros de desarrollo de las plantas de maíz, junto con RT-PCR de genes de proteínas relacionadas con la patogénesis (PRs) y proteómica diferencial, a cuatro tiempos post-tratamiento. En general, ambas dosis de AS retrasan la infección y la aparición de síntomas inducidos por MDMV sin observarse fitotoxicidad. En plantas tratadas aumenta la altura y el volumen radicular cuanto mayor es la dosis aplicada, mientras que la infección viral los reduce, aunque incrementa la proliferación de raíces finas. El tratamiento con AS no cambia significativamente la tasa fotosintética, sin embargo la infección aumenta el intercambio de oxígeno de la planta. Las variaciones en el proteoma indican que tanto AS como MDMV inducen estrés, pero el efecto sobre proteínas relacionadas con la ROS, o la elicitación de PRs, descritos para otras especies, no son tan evidentes en maíz, únicamente la HSP70 varía significativamente debido a la infección por MDMV. La principal variación se produce en los niveles del complejo RuBisCo reducidos por el virus y aumentados por AS. AS también contrarresta la infección viral incrementando proteínas de unión y reduciendo la capacidad antioxidante de la planta. Los resultados de RT-PCR para genes de las PRs es muy variable, la PR6 se mantiene elevada para todos los tratamientos y tiempos, incluidos los controles negativos, y los genes de las proteasas no se expresan. Otros resultados son discutidos.

* Trabajo financiado por el MICIN (proyecto número de referencia AGL2010-15691, subprograma AGR) y por el programa Udl-IMPULS



P-217-01624

CONTROL DE *Lecanicillium fungicola* CON FUNGICIDAS AUTORIZADOS EN ESPAÑA.**Diáñez F.¹, Ruíz C.¹, Gea F.J.², Navarro M.J.², Santos M.¹**

1) Dpto. Agronomía. Escuela Politécnica Superior y Ciencias Experimentales. Universidad de Almería. 04120. Spain. fdianez@ual.es

2) Centro de Investigación, Experimentación y Servicios del Champiñón. Quintanar del Rey, Cuenca.

En el año 2013, se introdujo el cultivo comercial de champiñón en el término municipal de Fiñana (Almería, España). Tras su puesta en marcha, ya en la primera florada de este cultivo se pudo observar la aparición de las llamadas moles o bolas, claro síntoma producido por *Lecanicillium fungicola*. En este trabajo, se evalúa la efectividad de los fungicidas Procloraz-Mn y clortalonil sobre el desarrollo micelial de los aislados obtenidos de *L. fungicola*. Tras el aislamiento del hongo de carpóforos afectados por la enfermedad, se sometieron a diferentes dosis partiendo de las recomendadas por el registro de productos fitosanitarios del MAGRAMA. Así, se ensayó la susceptibilidad o resistencia a Procloraz-Mn, a las dosis de 0,3, 0,5, 0,75 y 1 g/L y clortalonil, a 1, 1,5, 2, y 2,5 mL/L. Los resultados mostraron que el Procloraz-Mn presentó una actividad fungistática en los 10 primeros días del ensayo, permitiendo su crecimiento lento en días posteriores. En caso del clortalonil, se evidenció una clara resistencia de los aislados a este fungicida, por lo que se confirmó la ineficacia del mismo para el control de la enfermedad. Estos resultados evidencian la nula efectividad de los dos únicos fungicidas permitidos en España para el control de la enfermedad, por lo que se debe de incidir en la búsqueda de métodos alternativos para su control.



P-218-01555

EVALUATION OF RESISTANCE AND TOLERANCE, WITH LONGITUDINAL MODELS, OF A NEW *Capsicum baccatum* ACCESSION TO Tomato spotted wilt virusSoler S.¹, Debreczeni D.², Vidal E.², Aramburu J.³, López C.¹, Galipienso L.², Rubio L.²

1) Centro de Conservación y Mejora de la Agrodiversidad Valenciana, Universidad Politécnica de Valencia (COMAV-UPV), Valencia, Spain

2) Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA), Moncada, Valencia, Spain

3) IRTA, 08348 Cabrils, Barcelona

Tomato spotted wilt virus (TSWV) causes severe damage to crops of pepper (*Capsicum annuum*). The only effective method for disease control is breeding cultivars with the gene *Tsw*, which confers a complete resistance against a wide spectrum of TSWV isolates. But often, *Tsw*-resistance-breaking (TRB) isolates arise after a few years of using these resistant cultivars. In this work, we obtained an accession (PIM26-1) from *Capsicum baccatum* and evaluated the level of resistance and tolerance to TSWV in comparison to a susceptible pepper cultivar (Negral) and an accession with the resistance gene *Tsw* (PI-152225). We performed an assay by inoculating two isolates: wild type (WT) and TRB to Negral, PI-152225 and PIM26-1 (30 plants per each combination accession/isolate). Plants were evaluated at 7, 14, 21, and 28 days post-inoculation (dpi) for infectivity (percentage of virus-infected plants) and TSWV titer (number of viral molecules) by ELISA and quantitative RT-PCR, respectively, and for symptoms (mild and severe) by visual observation. Statistical analyses were performed by using longitudinal models with the Kaplan-Meier procedure for infectivity and symptoms, and absolute fitness (W) for TSWV accumulation. Our results showed that PIM 26-1 presented higher resistance and tolerance levels (lower TSWV infection and multiplication rates and symptoms) than Negral. As expected, PI-152225 showed complete resistance to the WT isolate and susceptibility to the TRB isolate, which was similar to the resistance level shown by PIM26-1 against both WT and TRB isolates. PIM26-1 showed a good performance (high tolerance level) to WT (only 20% of plants with mild symptoms at 28 dpi) and TRB (~70% with mild symptoms at 28 dpi). PIM26-1 represents an alternative to develop new pepper cultivars tolerant to TSWV.

This research was supported by grants RTA2008-00010-C03 and RTA2013-00047-C02 financed by INIA.



P-219-01564

SANEAMIENTO DE LA VARIEDAD DE VID "BOTÓ DE GALL" INFECTADA CON 'Grapevine fleck virus'Peiro R.¹, San Pedro T.¹, Gammoudi N.¹, Olmos A.², Gisbert C.¹

1) Universitat Politècnica de València

2) Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias

En vid (*Vitis vinifera* L.), la transmisión de virosis por multiplicación vegetativa es un problema frecuente. Según el RD 208/2003, modificado por la Orden APA/2474/2006, el material vegetal certificado de vid debe estar exento del virus del mosaico del arabis (ArMV), virus del entrenudo corto infeccioso (GFLV), virus del enrollado 1 (GLRaV-1), virus del enrollado 3 (GLRaV-3) y virus del jaspeado (GfKv). La variedad minoritaria "Botó de Gall" se cultiva en Penàguila, provincia de Alicante, y el objetivo de este trabajo fue la recuperación y mantenimiento de esta variedad minoritaria. Con este fin, se realizó el análisis por RT-PCR a tiempo real, para la detección de estos cinco virus, de diversas cepas de vid, y se seleccionó aquella planta que únicamente estaba infectada por un virus, GfKv. El saneamiento de esta planta se realizó mediante embriogénesis somática a partir de semillas, mediante un protocolo que se desarrolló en el laboratorio de *Cultivo in vitro* del COMAV. Las semillas cortadas longitudinalmente se sembraron en medio de inducción que contenía sales y vitaminas Nitsch y Nitsch (2.17 gL^{-1}), sacarosa (40 gL^{-1}), polivinilpirrolidona (100 mgL^{-1}), planta agar (7.5 gL^{-1}) y 6- bencinladenina (1 mgL^{-1}) (compuestos habituales del medio de inducción) además del regulador del crecimiento 2,4- ácido diclorofenoxiacético en una concentración de 2 mgL^{-1} . A los dos meses se transfirieron a un medio sin reguladores de crecimiento y tras cinco meses de cultivo se obtuvieron las primeras plántulas. Posteriormente se confirmó el estado sanitario mediante RT-PCR en tiempo real, tanto en callos como en plántulas. Todas las muestras analizadas resultaron estar libres del virus GfKv.

Trabajo financiado por el proyecto INIA RTA2011-00067-C04-01 y RTA2011-00067-C04-04 y cofinanciado con fondos FEDER.



P-220-01571

El mercado de los cultivares de calabacín resistentes a virusGarcía-García M.C.¹, Ruiz L.¹, Simón A.¹, Martínez de la Peña A.², Janssen D.¹

1) IFAPA La Mojonera, Camino San Nicolás 1. 04745 La Mojonera, Almería.

2) ASEHOR. Antonio Vico, 23. 04003 Almería

e-mail: mariac.garcia.g@juntadeandalucia.es

Los virus son factores limitantes en la horticultura. En calabacín se han descrito más de 60 virus a nivel mundial; de éstos, 8 en el sudeste de España, algunos de ellos transmitidos por pulgón: CMV, WMV2 y ZYMV; en los años 80 causaron tanto daño que obligaron a instalar mallas antiartrópodos en las ventanas de los invernaderos para evitar la entrada del vector. SqMV causó ciertos problemas al final de la década de los 1980, y es altamente transmisible por semilla y por contacto. CABYV, también transmitido por pulgón, fue descrito en 2003. Otros virus en calabacín son transmitidos por la mosca blanca *Bemisia tabaci*, como son CYSDV, CVYV, y recientemente, ToLCNDV. El amplio historial de virosis que afectan a calabacín hace que las empresas productoras de semillas hayan obtenido material vegetal con diferentes resistencias a virus. Así mismo, los diferentes estándares de calidad en producción integrada recomiendan el uso de cultivares resistentes. El objetivo del presente estudio es analizar la oferta de mercado de cultivares de calabacín con y sin resistencia a virus y contrastarla con la demanda de plántulas de calabacín en Andalucía oriental para la campaña 2012/13.

El mercado oferta 150 cv. de calabacín (Portagrano, 2012). El 36% de los cv. ofertados presenta resistencia intermedia a ciertos virus; todos son virus transmitidos por pulgón, o sea, 3 potyvirus (PRSV, WMV-2, ZYMV) y 1 cucumovirus (CMV). En los semilleros de Andalucía se germinó un tercio de los cv. ofertados, siendo el 75% de las plántulas de calabacín correspondientes a sólo 4 cv, con resistencia solo a WMV-2 (2/4) y a ZYMV (2/4). (ASEHOR, 2014). Queda por ver si la aparición de nuevos patógenos como CABYV y recientemente el ToLCNDV podría reactivar la investigación para satisfacer la necesidad de nuevos cultivares que incluyen resistencias a estos virus.

PALABRAS CLAVE: cultivares, calabacín, oferta, demanda, resistencia, virus



P-221-01140

THE PRODUCTION OF RECOMBINANT CATIONIC α -HELICAL ANTIMICROBIAL PEPTIDES IN PLANT CELLS INDUCES THE FORMATION OF PROTEIN BODIES DERIVED FROM THE ENDOPLASMIC RETICULUM

Ruiz C.¹, Company N.¹, Nadal A.¹, La Paz J.L.², Martínez S.², Montesinos E.¹, Pla M.¹

1) Institute for Food and Agricultural Technology (INTEA)

2) Center for Research in Agricultural Genomics (CRAG) 3) Fraunhofer Institute for Molecular Biology and Applied Ecology (IME)

Synthetic linear antimicrobial peptides with cationic α -helical structures, such as BP100, are valuable as novel therapeutics and preservatives. However, they tend to be toxic when expressed at high levels as recombinant peptides in plants, and they can be difficult to detect and isolate from complex plant tissues because they are strongly cationic and display low extinction coefficient and extremely limited immunogenicity. We therefore expressed BP100 with a Cterminal tag which preserved its antimicrobial activity and demonstrated significant accumulation in plant cells. We used a fluorescent tag to trace BP100 following transiently expression in *Nicotiana benthamiana* leaves and showed that it accumulated in large vesicles derived from the endoplasmic reticulum (ER) along with typical ER luminal proteins. Interestingly, the formation of these vesicles was induced by BP100. Similar vesicles formed in stably transformed *Arabidopsis thaliana* seedlings, but the recombinant peptide was toxic to the host during latter developmental stages. This was avoided by selecting active BP100 derivatives based on their low haemolytic activity even though the selected peptides remained toxic to plant cells when applied exogenously at high doses. Using this strategy, we generated transgenic rice lines producing active BP100 derivatives with a yield of up to 0.5% total soluble protein.



P-222-00771

ALTERNATIVAS PARA EL CONTROL DE ENFERMEDADES FOLIARES EN CULTIVOS PROTEGIDOS DE PIMIENTO Y TOMATEGaleano M.¹, Moreno J.¹, Belda J.E.¹

1) KOPPERT ESPAÑA, S.L. C/ Cobre, 22-24. Parcela P. 14 Nave 3 . Polígono Ind. Ciudad Transporte Poniente. 04745 La Mojonera. Almería

Se han llevado a cabo dos ensayos en el invernadero de investigación de KOPPERT ESPAÑA, sito en Vúcar (Almería), para la evaluación del efecto de diferentes productos (residuo cero) sobre enfermedades aéreas en cultivos hortícolas protegidos.

Ambos ensayos se realizaron sobre cultivo hidropónico con sustrato de fibra de coco y bajo estrategia IPM (manejo integrado de plagas). Un ensayo sobre pimiento (cv. Melchor) tuvo lugar en un sector de 748 m² y otro de tomate (cv. Ramyle) se realizó en otro sector de 656 m². En ambos cultivos se evaluaron semanal o bisemanalmente, y tras la primera infestación, las enfermedades aéreas aparecidas de forma natural, según directrices EPPO.

Cada ensayo constaba de 5 tratamientos (1) Químico convencional, 2) Enzicur + Addit, 3) Nopath, 4) Linapro + Addit, y 5) Control no tratado), con 4 repeticiones por tratamiento para pimiento y 3 en el caso de tomate. Las aplicaciones se llevaron a cabo mediante una mochila de espalda (Maruyama) para garantizar pulverizaciones correctas de 2.000 litros/ha.

Las enfermedades que aparecieron y se evaluaron fueron: Botrytis en hoja y tallo (*Botrytis cinerea*), oídio (*Leveillula taurica*) y cladosporiosis (*Fulvia fulvia*).

En el cultivo de pimiento, el oídio pudo ser controlado con los tratamientos Linapro y Enzicur, mostrando unos valores promedios más bajos al final de las evaluaciones, y sin diferencias significativas con el químico convencional.

Por otra parte, en el tomate, Enzicur, Linapro y Nopath mostraron un buen efecto sobre Botrytis en hojas, siendo NoPath el tratamiento más efectivo.

El oídio en tomate fue controlado mediante los tres productos analizados, Linapro, NoPath y Enzicur, mostrando valores significativamente más bajos que el control y el químico convencional.

No se observó efecto alguno sobre Fulvia en tomate por parte de ningún producto evaluado.



P-223-01435

SUSCEPTIBILIDAD RELATIVA DE CULTIVARES DE OLIVO A LA ANTRACNOSIS CAUSADA POR *Colletotrichum* spp.

Xavier C.J.¹, Moral J.², Viruega J.R.¹, Caballero J.³, Del Río C.³, Trapero A¹

1) Grupo Patología Agroforestal, Dpto. Agronomía, Universidad de Córdoba. Campus de Rabanales, Edif. C4, 14071-Córdoba.

2) Dpto. Mejora Vegetal, Instituto de Agricultura Sostenible-CSIC, 14080 Córdoba. 3) Dpto. Olivicultura, IFAPA Centro Alameda del Obispo, Avda. Menéndez Pidal s/n, 14071-Córdoba.

La Antracnosis o Aceituna jabonosa, causada por *Colletotrichum* spp., es una grave enfermedad del olivo cuyas epidemias son muy dependientes de la susceptibilidad de la variedad y de las condiciones ambientales durante el otoño. En los últimos 15 años se han registrado cuatro graves epidemias en Andalucía que han permitido completar la evaluación del Banco de Germoplasma Mundial de Olivo (BGMO), incluyendo la parcela principal situada en el IFAPA de Córdoba y dos campos complementarios localizados en Cabra (Córdoba) y en Mengíbar (Jaén). En total se han evaluado 384 cultivares procedentes de 22 países, destacando España (222 cvs.), Siria (31), Italia (22), Turquía (18) y Grecia (17).

Las evaluaciones se han realizado utilizando una escala 0-10, especialmente desarrollada para estimar la incidencia de frutos afectados en la copa de los olivos, confirmando mediante inoculaciones artificiales en algunos casos. Debido a la relación directa que existe entre madurez de la aceituna y susceptibilidad a la Antracnosis, todas las evaluaciones se han realizado en el momento del envero de los frutos, lo que ha obligado a realizar evaluaciones ajustadas al estado de madurez de los árboles.

Los análisis estadísticos han permitido agrupar los 384 cultivares en 5 categorías de susceptibilidad: altamente susceptible (25.5%), susceptible (31.5%), intermedia (19.8%), resistente (14.3%) y altamente resistente (8.9%). Los cultivares representativos de dichas categorías son Ocal, Lechín de Sevilla, Arbequina, Picual y Frantoio, respectivamente. Con algunas excepciones, como los cultivares Picual y Arbequina, la gran mayoría de los principales cultivares españoles, como Cornicabra, Hojiblanca, Manzanilla de Sevilla, Morisca, Picudo, Farga y Verdial de Huévar, se incluye en las categorías de susceptible o muy susceptible. El contenido de fenoles en los frutos, que depende del estado de madurez de los mismos, es la característica mejor relacionada con la resistencia de los cultivares.

Esta investigación ha sido cofinanciada por el proyecto de excelencia AGR08-3635 de la Junta de Andalucía y los proyectos AGL2000-1725, AGL2004-7495 y AGL2008-1683 del Ministerio de Economía y Competitividad.



P-224-01350

ANÁLISIS DE LOS METABOLITOS SECUNDARIOS PRODUCIDOS POR LOS AGENTES DE CONTROL BIOLÓGICO *Bacillus amyloliquefaciens* CECT 8237 Y CECT 8238**Magno M.C.¹, Martínez P.M.², De Vicente A.¹, Rodríguez-Palenzuela P.², Romero D.F.¹, Pérez-García A.¹**

- 1) Instituto de Hortofruticultura Subtropical y Mediterránea "La Mayora", Universidad de Málaga, Consejo Superior de Investigaciones Científicas (IHSM-UMA-CSIC). Departamento de Microbiología, Facultad de Ciencias, Universidad de Málaga, 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).

Las cepas de *Bacillus amyloliquefaciens* CECT 8237 (UMAF6639) y CECT 8238 (UMAF6614) han sido ampliamente estudiadas en trabajos previos de nuestro grupo por su reseñable capacidad de biocontrol. Desde un principio ha destacado su actividad antagonista frente a *Podosphaera fusca* y ciertas bacterias patógenas de cucurbitáceas, siendo la antibiosis mediada por lipopéptidos tales como iturinas y fengicinas, uno de los principales mecanismos de acción.

La secuenciación de los genomas de ambas cepas nos ha permitido localizar un amplio grupo de genes implicados en la síntesis de otros antibióticos ya descritos con anterioridad en otras cepas del género *Bacillus*. Sin embargo, las cepas CECT 8237 y CECT 8238 siguen mostrando mayor capacidad de biocontrol que otros agentes de biocontrol, lo que nos lleva a pensar en la producción de otras moléculas activas. Por ello, hemos desarrollado herramientas bioinformáticas que han facilitado la identificación de regiones poco conservadas con respecto al género *Bacillus*, así como regiones presentes solo en las cepas de estudio. También se pudo determinar si la adquisición de estas regiones genómicas por parte de estas bacterias se debía a procesos de transferencia horizontal, debido a las variaciones en el patrón de tripletes de aminoácidos y/o en el contenido en GC de dichas zonas.

Actualmente, se está realizando la caracterización de algunas de las regiones identificadas en la cepa CECT 8237, cuyos genes parecen estar implicados en la síntesis de nuevos antibióticos no descritos hasta la fecha. Todos estos resultados refuerzan la hipótesis de que la producción de antibióticos es el mecanismo de acción determinante en la actividad de biocontrol de estas bacterias.

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), ambos cofinanciados con fondos FEDER (UE).



P-225-01360

TRANSFORMACION DEL AGENTE DE BIOCONTROL PO212, CON PLASMIDOS AUTORREPLICATIVOS E INTEGRATIVOS QUE EXPRESAN PROTEÍNAS FLUORESCENTES

Villarino M.¹, Espeso E.A.², Herranz Y.¹, Vacas D.¹, Melgarejo P.¹, Larena I.¹

1) SGIT-INIA, Departamento de Protección Vegetal, Carretera de La Coruña Km 7, 28040 Madrid. ilarena@inia.es

2) CIB-CSIC, Departamento de Biología Celular y Molecular, Ramiro de Maeztu 9, 28040 Madrid. eespeso@cib.csic.es

El aislado 212 de *Penicillium chrysogenum* (PO212) (anteriormente *P. oxalicum*), original de la micoflora del suelo en España, ha demostrado ser un eficaz agente de control biológico (ACB) frente a un amplio espectro de enfermedades de plantas hortícolas.

Con el objetivo de avanzar en el conocimiento de la interacción entre el ACB y el huésped, se planteó la transformación de PO212 con plásmidos autorreplicativos e integrativos que expresan proteínas fluorescentes, DsRed y GFP, respectivamente, para estudiar así su interacción con las raíces de tomate.

Mediante el uso del ácido 5'-fluoro-otico (5-FOA), se generaron mutantes auxótrofos en la ruta de biosíntesis de pirimidinas, obteniendo mutaciones en el gen homólogo *pyrG*, que codifica para orotidina 5'-monofosfato descarboxilasa.

El uso de protocolos de transformación ya establecidos en *Aspergillus* y otras especies de *Penicillium* permitió la obtención de transformantes con plásmidos autorreplicativos (p1393, pRG3-AMA1-NotI y p1394, pRG3-gpdA-DsRed) e integrativos (p1439, GFP-*pyrG*^{A. fumigatus} y p1394, gpdA-GFP-*pyrG*^{A. fumigatus}).

Posteriormente se comprobó mediante microscopia de epifluorescencia y confocal los clones obtenidos y se eligió un candidato de cada transformación. La transformación no afectó a la ecofisiología del mismo ni a su capacidad de biocontrol cuando se comparó con la cepa silvestre.

Estas herramientas moleculares nos permiten avanzar en el estudio del comportamiento de PO212 en su ambiente natural y por tanto optimizar el biocontrol del ACB mediante la mejora de la colonización de las plantas por parte del mismo.

* Este trabajo ha sido financiado por el proyecto RTA 2010-00093 (INIA).



P-226-01364

PRODUCCIÓN DE PÉPTIDOS CECMEL11 RECOMBINANTES. ANÁLISIS Y ACTIVIDAD CONTRA BACTERIAS Y HONGOS FITOPATÓGENOSMontesinos L.¹, Bundo M.², Badosa E.¹, Coca M.², San Segundo B.², Montesinos E.¹

1) Laboratorio de Patología Vegetal CIDSAV-XaRTA, Universitat de Girona

2) Centre de Recerca Agrigenómica (CRAG)

Los péptidos antimicrobianos (PAMs) ofrecen un gran potencial para el control de enfermedades de las plantas causadas por hongos y bacterias, y poseen un perfil aceptable de toxicidad, impacto medioambiental y biodegradabilidad.

A partir del diseño, síntesis y evaluación de 52 derivados del péptido BP100 de la quimioteca CECMEL11 adaptados a su expresión en plantas, se procedió al desarrollo de una plataforma sostenible para su producción heteróloga en semillas de arroz como biofactoría. Se seleccionó el péptido BP178_KDEL como modelo ya que presentó un potente efecto bactericida contra bacterias fitopatógenas y baja actividad hemolítica y fitotóxica. Se obtuvieron plantas transgénicas de arroz que expresaban las secuencias génicas correspondientes a los péptidos antimicrobianos (PAMs) bajo el control de dos promotores específicos de semilla de arroz, (α -26 kDa globulina y 18 kDa oleosina). Se confirmó la acumulación de los PAMs en semilla pero no en otros tejidos de la planta, confiriendo a las plántulas durante la germinación un incremento muy significativo de su resistencia a infecciones causadas por *Dickeya* sp. y *Fusarium verticillioides*.

La purificación de los PAMs mediante solubilización/precipitación selectivas combinadas con cromatografía de Intercambio Catiónico Suave y Fase reversa permitió obtener productos a partir de las semillas de arroz aptos para su estudio. El análisis mediante Western y espectrometría de masas confirmó que se trataba de los productos esperados, aunque con posibles modificaciones. Los niveles de acumulación de los PAMs en las semillas, fueron variables y dependieron de la estrategia. Uno de los péptidos obtenidos mediante fusión a oleosina, S-Cec A, presentó una potente actividad antimicrobiana y bactericida frente *Dickeya* sp.

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



P-227-01379

SUSCEPTIBILIDAD DE HONGOS DE LA FAMILIA *Botryosphaeriaceae* AL TRATAMIENTO POR TERMOTERAPIA CON AGUA CALIENTE

Luque J.¹, Elena G.¹, Di Bella V.², Armengol J.³

1) IRTA

2) Universidad de Palermo

3) Instituto Agroforestal Mediterráneo - Univ. Politécnica de Valencia

El uso de la termoterapia con agua caliente (TAC) se ha mostrado potencialmente eficaz para controlar las enfermedades de Petri y del 'Pie Negro' en el material de propagación durante el proceso de producción de planta de vid. Sin embargo, hasta ahora no se había estudiado el efecto de TAC sobre las especies de *Botryosphaeriaceae* (hongos asociados a la enfermedad del 'Brazo Muerto'). Para ello se diseñaron dos experimentos independientes en los que se evaluó la susceptibilidad a TAC de diferentes aislados de ocho especies de esta familia. En el primer ensayo, fragmentos de micelio contenidos en tubos Eppendorf con agua destilada estéril se sometieron a distintas combinaciones de temperatura (50 a 54°C, en intervalos de 1°C) y tiempo de exposición (15, 30 y 45 minutos) en un baño de agua caliente. En el segundo ensayo, los hongos se inocularon en madera del portainjerto Richter 110 previamente tratada con TAC, se incubaron a 25°C durante tres semanas y se sometieron posteriormente a TAC en el rango de 50 a 53°C durante 30 minutos. En ambos ensayos se evaluó la supervivencia de los hongos y en el primer ensayo, además, el crecimiento miceliar relativo de los aislados.

En el ensayo *in vitro* se observaron diferencias significativas en supervivencia y crecimiento para todos los factores estudiados (especie, temperatura y tiempo) y sus interacciones. *Diplodia seriata*, *Dothiorella viticola*, *Neofusicoccum luteum* y *N. parvum* fueron las especies más sensibles a la temperatura mientras que *Lasiodiplodia* sp. y *N. vitifusiforme* fueron las más tolerantes. En el ensayo *in planta*, todas las especies redujeron drásticamente su supervivencia después de 30 minutos a 51°C. A 50°C, *Lasiodiplodia* sp. fue la especie más tolerante, y *N. luteum* la más sensible. Estos resultados demuestran que el control de estos patógenos mediante TAC es factible.

* Financiado por INIA (Proyecto RTA2010-00009-C03) y fondos FEDER (UE). Georgina Elena recibe financiación de INIA para la realización de su tesis doctoral.



P-228-01404

FRUIT.NET: EL PROGRAMA DE SANIDAD VEGETAL DE CATALUÑAUsall J.¹, Casals C.², Gòdia J.³, Sió J.³, Giné J.³

- 1) IRTA, Postcollita-XaRTA. Parc Científic i Tecnològic Agroalimentari de Lleida. Parc de Gardeny, edifici Fruitcentre. 25003 Lleida.
- 2) Departamento de Tecnología de Alimentos, Universidad de Lleida, Postcollita-XaRTA, Centre Agrotecnio, Avda. Rovira Roure, 191, 25198, Lleida
- 3) DAAM, 612-614 Gran Via de les Corts Catalanes, 08007 Barcelona

Catalunya es una zona importante de producción de fruta fresca y, actualmente, las estrategias de control de las diferentes plagas y enfermedades que afectan a los cultivos se basan principalmente en la aplicación de productos químicos de síntesis, pero su uso cada vez más, está limitado por las regulaciones de la UE, implicando una mayor dificultad para la protección vegetal de los frutales.

En este contexto, el "Departament d'Agricultura, Ramaderia, Pesca, Alimentació i Medi Natural" (DAAM), el "Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentàries" (IRTA) conjuntamente con las universidades y el sector productor representado por AFRUCAT, iniciaron en el 2010 el programa Fruit.Net con el principal objetivo de optimizar la aplicación de los productos fitosanitarios y minimizar la presencia de residuos en la fruta en el control de plagas y enfermedades que afectan a los cultivos de manzana, pera, melocotón y cítricos.

El Programa diseña cada año un plan de investigación y una estrategia completa de control para cada cultivo y se valida a nivel comercial, esta incluye el conocimiento de los técnicos y investigadores que participan en el programa, así como los resultados obtenidos del plan de investigación. La información generada se divulga a través del plan de transferencia del programa Fruit.Net que incluye jornadas, publicaciones y una oficina virtual dentro de la web del DAAM (www.ruralcat.net).

Los resultados obtenidos de la validación comercial de la estrategia Fruit.Net en todas las campañas han sido satisfactorios, con niveles de control de las plagas y enfermedades similares a la estrategia de producción convencional. No obstante, con la aplicación de la estrategia Fruit.Net se ha reducido el nombre de tratamientos, siendo en la campaña 2013, la reducción superior al 25%, 30%, 25% y 15% para los cultivos de la manzana, melocotón, pera y cítricos, respectivamente.



P-229-01471

BIOCOMES: NUEVOS PRODUCTOS BIOLÓGICOS PARA UNA AGRICULTURA Y SILVICULTURA MÁS SOSTENIBLE. "NEW BIOLOGICAL CONTROL PRODUCTS FOR SUSTAINABLE FARMING AND FORESTRY"Teixidó N.¹, De Cal A.², Usall J.¹, Guijarro B.², Larena I.², Torres R.¹, Abadías M.¹, Köhl J.³

1) IRTA, XaRTA-Postcollita, 25003, Lleida. E-mail: neus.teixido@irta.cat

2) INIA, Departamento de Protección Vegetal, 28040, Madrid

3) DLO (Wageningen UR), 6708, Wageningen, The Netherlands

El creciente interés que desde hace más de treinta años ha suscitado el Control Biológico de enfermedades ha quedado reflejado en un gran número de publicaciones científicas, libros y simposios. Sin embargo, su aplicación comercial a nivel europeo está limitada a unas pocas materias activas que contienen microorganismos, sobre todo si se compara con los productos químicos.

El proyecto europeo BIOCOTES pretende desarrollar 11 nuevos productos biológicos para el control de plagas y enfermedades clave en importantes cultivos agrícolas y forestales, como alternativa a los productos químicos de síntesis, para poder tener una estrategia de control más sostenible y respetuosa con el medio ambiente y la salud humana. BIOCOTES aglutina 13 empresas y 14 centros de investigación de 14 países diferentes, trabajando de forma conjunta para desarrollar herramientas y dar soluciones nuevas para el manejo integrado de plagas y enfermedades en Europa.

Las principales enfermedades y huéspedes objeto de estudio son: el oídio en cereales, la podredumbre marrón causada por *Monilinia* spp. en fruta de hueso, enfermedades fúngicas de la raíz en vivero, *Fusarium* spp. en cereales y *Verticillium* en *Brasica*.

Los agentes de biocontrol desarrollados son parasitoides, nemátodos entomopatógenicos, virus, bacterias y hongos.

La participación de un buen número de empresas significa que ha llegado el momento en el que empresas productoras estarán involucradas en el desarrollo de los productos, asegurando la viabilidad práctica y económica de los mismos. Además todo el proceso estará guiado por una empresa consultora especializada en el registro de pesticidas y en el impacto de los productos en el medio ambiente.

* Este trabajo es financiado por el VII Programa Marco de la Unión Europea. Proyecto FP7-612713. www.biocotes.eu



P-230-01310

ESTRATEGIAS PARA MEJORAR LA APTITUD ECOLOGICA DE BIOPLAGUICIDAS MICROBIANOS PARA EL CONTROL DE ENFERMEDADES DE LAS PLANTASMora I.¹, Cabrefiga J.¹, Francés J.¹, Montesinos E.¹, Bonaterra A.¹

1) Instituto de Tecnología Agroalimentaria-XaRTA-CIDSAV, Universidad de Girona

Una de las principales limitaciones en el uso del control biológico de enfermedades de las plantas a nivel comercial es la falta de consistencia en la eficacia en condiciones de campo. En parte, esta baja consistencia está asociada a las dificultades del agente de biocontrol para sobrevivir y colonizar el huésped, con frecuencia en condiciones de baja disponibilidad de agua y nutrientes. El uso de metodologías que mejoren la adaptabilidad del agente de biocontrol permite obtener productos formulados más eficientes y con resultados consistentes. Modificaciones del proceso de fermentación, como el estrés osmótico (osmoadaptación), o el enriquecimiento nutricional o la adición de lioprotectores antes de la deshidratación, han mostrado ser de gran utilidad en la mejora de la aptitud ecológica de diversos agentes de biocontrol. Así, el uso de osmoadaptación durante la fermentación de *Bacillus amyloliquefaciens* EPS1, *Lactobacillus plantarum* TC92, *Pantoea agglomerans* EPS125 y *Pseudomonas fluorescens* EPS62e, mejora significativamente su supervivencia epífita en el huésped en condiciones de baja humedad relativa. La osmoadaptación mejora la eficacia de control de la podredumbre azul causada por *Penicillium expansum* en manzanas y peras en post-cosecha tratadas con EPS125, y de EPS62e contra el fuego bacteriano causado por *Erwinia amylovora* en peral y manzano. La combinación de osmoadaptación y enriquecimiento nutricional también produce aumentos significativos de los niveles poblacionales de EPS62e en flores en condiciones de campo y mejora significativamente la eficacia de control del fuego bacteriano de las rosáceas. Además la adición de lioprotectores durante el proceso de deshidratación en combinación con osmoadaptación mejora la vida útil (almacenaje) de un producto formulado en polvo a base de EPS62e, incrementando su eficacia en el control de *E. amylovora* en condiciones de baja humedad relativa. Estos resultados indican que la mejora fisiológica del agente de biocontrol en producción es esencial para la obtención de bioplaguicidas microbianos eficaces y fiables.

Trabajo financiado parcialmente por los proyectos AGL2006-13564-C02-01/AGR y AGL2009-13255-C02-01

Índice alfabético de autores





Abad-Campos P.	39, 182, 231, 263	Antón J.A.	326
Abadias M.	351	Aparicio F.	54, 170, 205
Achón M.A.	73, 107, 170, 338	Aragón I.M.	46
Acosta W.	37	Aramburu J.	340
Agalliu G.	314	Aranda M.A.	56, 91, 206, 210, 211, 337
Aguado A.	106, 139, 194, 267, 270	Arango R.E.	21
Agüero J.	213, 337	Arcal L.	73, 107, 170, 205
Aguila B.	26	Archidona A.J.	40
Aguilar E.	55, 218	Argotti E.	62
Aguilar M.I.	139	Arias Calderón R.	298
Aguilera-Cogley V.	141	Ariza-Fernández T.	192, 309, 310
Aguirre S.	136	Arjona-Girona M.I.	192, 309, 310, 311
Agusti-Brisach C.	236	Armengol J.	82, 141, 150, 156, 157, 236, 243, 296, 349
Akdi K.	106	Armero C.	117
Alcalá M.J.	169	Armijos V.D.	65
Alcántara E.	314	Arnold D.L.	179
Alfaro-Fernández A.	126, 127, 168, 171, 207	Arquero O.	86, 241, 308
Allende L.	55	Arraiza M.P.	332
Almendral D.	55	Arroyo F.T.	271
Alonso A.	66	Arroyo V.	277
Alonso-Blanco C.	90	Ávila T.C.	136
Álvarez B.	226	Avilés M.	273, 281, 284, 287, 289
Álvarez R.	194	Ayllón M.A.	71, 165
Alves-Santos F.M.	277, 325	Babini A.R.	163, 164
Ambrós S.	212, 214	Badosa E.	101, 103, 259, 348
Andrés M.F.	74, 94, 202, 332	Ballester A.R.	67, 97, 199
Añorga M.	176	Bango D.	279
Antolínez C.A.	113		



Baños A.	290	Blanco G.	71
Barbé S.	48, 114	Blanco-Pérez M.	208
Barcala M.	25	Blok V.	201
Bardaji E.	101	Bobev S.	226
Bardaji L.	110, 176, 222	Boix A.	146, 147, 232, 264, 266, 334
Barrau C.	267	Bombarely A.	190
Barrio J.C.	326	Bonaterra A.	103, 259, 352
Barrios G.	238	Bonilla N.	312
Barriuso J.J.	135	Borrero C.	273, 281, 284, 287, 289
Barroso J.B.	190, 283	Bostoc R.M.	12, 73
Basallote-Ureba M.J.	138, 139, 267, 275, 294	Botella L.	137
Bascón J.	273	Bourgeois M.	204
Bassimba D.D.M.	251	Boyer K.	112
Battle A.	225, 229, 242, 250	Bryson P.K.	316
Bejarano-Alcázar J.	298, 300	Bundo M.	348
Bejarano E.R.	24, 178, 220	Burillo J.	74
Belaj A.	298	Cabaleiro C.	115, 326
Belda J.E.	183, 344	Caballero J.	345
Bellón-Gómez D.	269	Caballo E.	31
Belmonte A.	247	Cabrefiga J.	101, 352
Benito S.	122	Cabrera J.	94, 25
Berbegal M.	39, 141, 296	Calatayud M.	296
Bernat M.	237	Calderón C.E.	312
Berruete I.M.	111, 224	Calleja M.C.	138
Bertolini E.	114, 125, 230	Calvo-Garrido C.	323
Berzal-Herranz A.	211	Camacho F.	266, 334
Beuzón C.R.	24, 47, 61, 179, 220, 178	Camañes G.	177
Bezós D.	38	Cambra M.	114, 123, 125, 230



Cambra M.A.	111, 224	Chamorro M.	270, 274
Cañizares M.C.	71, 235, 244, 280	Choi Y.H.	202
Cantalapiedra C.	40	Chung B.N.	55, 218
Canto T.	55, 218	Cifuentes D.	133
Capote N.	1106, 138, 139, 267, 275	Coaker G.	220
Carmona L.	67, 97	Coca M.	348
Carmo-Sousa M.	246	Cocero M.J.	325
Caro J.	180	Cock P.J.A.	48, 201
Carreras A.	283	Codina J.C.	258
Carreras M.	320	Colinas C.	70, 142
Carretero F.	282	Collados R.	111, 224
Carrillo A.J.	286	Company N.	343
Casado A.	337	Conde M.	293
Casado-del Castillo V.	63	Conesa A.	48
Casals C.	237, 350	Corcobado T.	182, 263
Castañeda D.A.	85, 100, 233, 262, 315	Cordovilla M.P.	149
Castañeda-Ojeda M.P.	175	Corry D.	179
Castaño C.	18, 70, 142	Costa T.M.M.	37
Castaño J.	261	Cotes J.M.	264
Castillo A.	286	Craven K.D.	65
Castillo P.	40, 30, 81, 165, 201, 307	Crespo-Gómez J.I.	256, 312
Castillo R.	186, 197, 319	Cretazzo E.	169
Castillo S.	273, 284, 287, 289	Crisosto C.H.	12
Catalá S.	39	Crous P.	150
Cazorla F.M.	256, 258, 312	Cubera E.	182, 263
Cebrián M.C.	126	Cubero J.	44, 29, 111, 123, 172, 174, 224
Cervantes E.A.	254	Cueto-Ginzo A.I.	73, 107, 170, 205, 338
Chaki M.	283		



Dagdas Y.F.	9	Díaz-Varela J.	104, 195, 196, 324
Dall'Ara M.	163, 164	Díaz-Pendón J.A.	52, 162, 166
Dalla-Marta A.	251	Diez J.J.	38, 132, 137, 153, 154, 277
Daranas N.	103, 259	Diezma-Navas L.	215
Darós J.A.	57	Díez-Navajas A.M.	41
Davino S.	53	Domínguez G.	219
Daza A.	271	Dominguez P.	270, 274, 327
De Armas R.	217	Donaire L.	32, 71
De Cal A.	116, 145, 152, 158, 186, 197, 318, 319, 320, 321, 322, 351	Dreo T.	172
De Cara M.	147, 232, 265, 266, 279, 334	Droby S.	67, 198
De Haro A.	300	Drott M.T.	19
De la Fuente B.	97, 128, 130, 131, 260, 298	Du S-H.	234, 317
De Los Santos-García B.	194, 270, 274	Du X-L.	317
De Vicente A.	23, 33, 180, 258, 269, 312, 316, 346	Durantez V.	37
Debreczeni D.	340	Echeverría M.	110, 222
Deckers T.	11	Elena G.	193, 238, 240, 349
Del Ponte E.M.	243	Elmore J.M.	220
Del Río C.	345	Elvira-Recuenco M.	292, 293
Del Toro F.J.	55, 218	Emiliozzi M.	94
Delgado R.	226, 228	Escaño C.	258
Di Bella V.	349	Escobar C.	25, 94
Diáñez F.	255, 282, 285, 286, 339	Escriu F.	249
Díaz F.E.	25	Escudero B.	331
Díaz J.	80	Espeso E.A.	151, 347
Díaz-Hernández C.E.	74	Falcioni T.	73
Díaz-Mínguez J.M.	62, 63	Falk B. W.	15, 216
Díaz-Peña E.M.	184, 185, 217	Feliu L.	101
		Fenoll C.	25



Fereres A.	113, 230, 246
Fermaud M.	323
Fernández de Ayala M.A.	194, 270
Fernández E.	194
Fernández G.	24
Fernández M.M.	38
Fernández P.	335
Fernandez-Calvino L.	32
Fernandez-Crespo E.	177
Fernández-Ortuño D.	316
Fernández-Sanz A.M.	120
Ferragud E.	29, 123, 174
Ferrándiz J.C.	126, 127
Ferrio J.P.	73
Ferriol I.	216
Ferriol M.	336
Fiallo-Olivé E.	162
Figàs A.	226
Figàs M.R.	268
Fiore N.	36
Flores R.	53, 212, 214
Flor-Peregrín E.	203, 327
Flors V.	80
Font-San-Ambrosio M.I.	126, 127, 168, 171, 207
Fortes I.M.	162
Fraile A.	90, 165
Francés J.	103, 259, 352
Franco-Zorrilla J.M.	32
Fuentes J.G.	247
Gabaldón T.	67
Gago-Fuentes R.	196
Gaju N.	75
Galante E.	155
Galeano M.	183, 344
Galindo S.	93
Galipienso L.	248, 340
Gallego E.	187, 188, 189
Gallegos M.T.	46
Gálvez L.	122, 134, 155, 279
Gammoudi N.	341
Garcés A.	135
García A.	268
García A.M.	165
García C.	167
García F.	48
García J.	106
García L.	326
García M.	134
García M.C.	161, 247
García P.	177
García T.	196, 324
García-Arenal F.	14, 90, 96
García-Baquero J.	139
García-Benavides P.	239
García-Benítez C.	116, 145, 197
García-Carneros A.B.	149



García-Díaz M.	122, 155	Gómez-Aix C.	91, 206
García-García F.	48	Gómez-Gallego M.	70
García-García M.C.	91, 342	Gómez-Gálvez F.J.	303
García-Jiménez J.	82, 236, 243	Gómez-Guillamón M.L.	166
García-Lamas T.	104	Gómez-Lama C.	45, 95, 235, 302
García-López J.D.	266	Gómez-Muñoz N.	212, 214
García-Mas J.	204	Gómez-Tenorio M.A.	146, 147, 232, 266, 334
García-Nuñez J.	337	Gómez-Vázquez J.M.	139, 276, 278
García-Pedrajas M.D.	64, 71, 191, 235, 244, 280	González J.M.	267
García-Pedrajas N.E.	244	González-Biosca E.	226
García-Ruiz G.M.	301	González-Candelas L.	67, 97, 199
Garita-Cambroner J.	44, 111, 123	González-Coloma A.	74, 202
Garzo E.	246	González-Fernández A.J.	120, 121
Gascón B.	259	González de Chaves M.Q.	128
Gata A.	273, 281, 284, 287, 289	González-Domínguez E.	83, 243, 296
Gavilán R.G.	245	González-Nebauer S.	207
Gaviria A.E.	181	Gorrín V.L.	260
Gea F.J.	255, 282, 285, 286, 339	Gorris M.T.	123, 124
Genov N.	226	Grabke A.	316
Gentit P.	114	Gradziel T.M.	12
Ghini R.	200	Gramaje D.	150, 156, 304
Gil-Serna J.	122, 155	Grande A.	219
Giné A.	75, 87, 333	Grausgruber-Groeger S.	172
Giné J.	350	Grygiel P.	112
Giner A.	204	Guerrero M.M.	329, 330, 335
Gisbert C.	333, 341	Guerri J.	160, 213
Gòdia J.	350	Guigón C.	105
Gómez P.	337	Guijarro B.	152, 318, 322, 351



Guillamón E.	290	Hurtado M.	268
Guillem-Amat A.	296	Ibáñez-Torrent I.	127
Guillén H.	136	Ibarra, A.	133
Guiu-Aragónés C.	52, 204	Iglesias C.	155
Gupta Y.K.	9	Intrigliolo D.S.	251
Gutiérrez J.	196	Iturrutxa E.	292
Gutiérrez M.	76, 136, 254	Izquierdo-García A.C.	54
Gyetvai G.	204	Janssen D.	161, 167, 169, 247, 342
Ha W.D.	15	Jiménez D.	148, 307
Hamada I.B.	32	Jiménez F.	232, 334
Hantula J.	137	Jiménez M.M.	19
Haque M.	132	Jiménez-Díaz R.M.	19, 307, 148
Hasiów-Jaroszewska B.	206	Jiménez-Ruiz J.	190
Hedley P.E.	48, 201	Jones J.T.	201
Heinlein M.	52	Juan A.	299
Hermoso de Mendoza A.	230	Julio J.	154
Hernández C.	208, 209	Julio L.F.	74, 202
Hernández E.	230	Jung T.	8
Hernández J.	182	Jurado J.	300
Hernández L.	318	Jurado M.	279
Hernández M.A.	329, 335	Justrito X.	297
Hernández-Llopis D.	126, 127, 168, 207	Kaloshian I.	10
Hernando Y.	337	Kamita S.G.	15
Herranz Y.	151, 158, 319, 320, 347	Kershaw M.J.	9
Herrera-Mármol M.	149	Khan A.M.	15
Hidalgo J.C.	300, 306	Khelil A.	187
Hidalgo J.J.	300, 306	Kikuchi T.	30
Hodgetts J.	172	Klosterman S.J.	64



Köhl J.	351	Li H-P.	234, 317
Kopina M.	172	Li X.P.	316
Krajnc B.	263	Littlejohn G.	9
Kuo Y.	15	Liu T-H	12
La Paz J.L.	343	Llave C.	32, 215
Lacasa A.	329, 330, 335	Llinares F.	293
Lacasa C.M.	329, 330, 335	Llop P.	48, 226
Lamarca N.	237	Llorens E.	177
Landa B.B.	20, 61, 129, 304	Llorente I.	77, 223, 272
Lanzoni C.	164	Loiseau M.	114
Lapeña L.	177	Londoño D.A.	315
Lapidot M.	248	López del Rincón C.	336, 340
Lara M.B.N.	76, 136, 254	López E.	285
Larena I.	151, 152, 158, 319, 320, 321, 322, 347, 351	López M.M.	48, 26, 111, 112, 114, 123, 124, 125, 177, 224, 226
Larenas J.	186	López-Escudero F.J.	84, 86, 291, 301
Laviña A.	229, 242, 250	López-García A.A.	283
Laviña L.	225	López-Gómez M.	87, 203
Lázaro E.	117	López-Herrera C.J.	192, 309, 310, 311
Lee M-H	12	López-Llorca J.V.	28, 331
Legaz M.E.	184, 185, 217	López-Márquez D.	178
Lemus-Minor C.G.	72, 280	López-Moya J.J.	92, 166
León L.	298	López-Pérez J.A.	252, 328
León M.	150, 236, 296	López-Solanilla E.	49, 33, 175
Jerma M.L.	157	López-Soriano P.	112
Leveau J.	12	Lorite J.I.	86
Levin E.	67	Lovera M.	241, 308
Leyva-Pérez M.O.	190	Lozano R.	24



Lucía A.	47	Martínez C.	114
Luis M.	249	Martínez-Beltrán C.D.	147, 266
Lupi3n B.	146,334	Martínez de la Peña A.	342
Luque F.	190,241	Martínez-García F.	57, 145
Luque J.	193, 193, 240, 349	Martínez M.C.	335
Luzuriaga W.P.	73	Martínez P.M.	49, 222, 346
Mac Leod R.E.O.	200	Martínez S.	343
Macho A. P.	24, 47, 179	Martínez V.	329, 330, 335
Macías E.	338	Martínez J.A.	133
Maes M.	172	Martínez-Alonso M.	75
Magno M.C.	346	Martínez-Álvarez P.	38, 137
Maistrello L.	239	Martínez-Cruz J.	23
Makowski D.	27	Martínez-García P.J.	12
Mansfield J.W.	179	Martínez-García P.M.	45, 33
Mansour A.	248	Martínez-Mora C.	330
Marcet-Houben M.	67	Martínez-Treceño A.	186
Marco-Noales E.	26, 112, 124	Martín-García J.	132, 153
Marcos-García M.A.	155	Martín-Hernández A.M. ..	52, 204
Marín F.	282, 285	Martín-Robles M.J.	125
Marín J.I.	146, 147, 232, 264, 266, 334	Martins R.B.	243
Marín M.	36	Martos A.	263
Marques da Silva D.	216	Massuh Y.	332
Martín C.	47	Mayol J.	250
Martín C.D.	232, 264	Medina J.J.	274
Martín I.	134	Medina V.	73, 107, 170, 205, 338
Martín M.	135	Medina-Mínguez J.J.	327
Martín P.	239	Meler P.	107
Martín R.	194	Melero J.M.	275



Melgarejo P.	116, 145, 151, 152, 158, 186, 197, 318, 319, 320, 321, 322, 347
Méndez-López A.	337
Méndez-López E.	56
Mercado-Blanco J.	45, 95, 190, 234, 283, 302, 317
Michereff S.J.	243
Milgroom M.G.	19, 96
Mingot A.	92, 166
Mira J.J.	315
Miranda J.	195
Miranda L.	270, 274, 327
Miras M.	210, 211
Mirotti A.	163
Mitidieri M.	123
Mitsuteru A.	30
Molinero-Ruiz L.	149, 294
Monge P.	249
Montes L.	226
Montes M.	20
Montes N.	90, 96
Montes-Borrego M.	61, 129, 223, 304
Montesinos E.	77, 101, 103, 259, 272, 343, 348, 352
Montesinos L.	101, 103, 348
Mora B.	182, 263
Mora I.	103, 352
Mora J.	156
Moragrega C.	77, 223, 272
Moral J.	60, 82, 84, 143, 314, 345
Morales G.	223, 272
Morales J.G.	21, 85, 100, 181, 233, 261, 262, 315
Morales M.T.	158, 186, 197, 319
Mora-Sala B.	231
Moreda W.	143
Moreno A.	113, 230, 246
Moreno J.	148, 183, 344
Moreno P.	53, 160, 212, 213
Moreno S.	146
Moriones E.	80, 162, 219
Morris J.A.	48
Morroquín C.	230
Mosquera G.	102
Mueller L.	190
Mulet J.M.	54
Munera M.	333
Muñoz L.N.	105
Muñoz M.J.	117
Muñoz R.M.	157
Muñoz-Gómez C.	49
Murillo J.	110, 176, 222
Nadal A.	101, 343
Nandety R.	15
Navarro I.	124
Navarro J.	212
Navarro M.J.	255, 282, 285, 286, 339



Navarro R.	56, 206	Ortiz-Barredo A.	41
Navarro-López J.	53, 160, 213, 214	Ostos E.	84
Navas M.J.	49	Pacheco R.	55
Navas-Castillo J.	159, 162, 219	Padilla C.V.	169
Navas-Cortés J.A.	20, 40, 61, 87, 290, 304, 307	Pagán I.	96, 245
Niemöller R.	204	Palacio-Bielsa A.	44, 111, 112, 123, 224
Nieto A.	299	Palazón M.	111, 224
Niño-Sánchez J.	63	Pallás V.	36, 54, 93, 170, 171
Norelli J.	198	Palmero D.	122, 134, 147, 155, 264, 279
Nouri S.	15	Palomares J.E.	30, 201
Núñez C.	290	Palomo J.L.	125
Núñez L.	263	Palou L.	144
Ocete P.	239	Parfitt D.E.	12
Ocete R.	239	Parra, M.A.	133
Ojeda M.S.	332	Pascual F.	161
Olalde G.G.	136	Pastrana A.M.	106, 138, 140
Oliach D.	18	Patiño J.A.	264
Oliva J.	18	Patiño L.F.	181, 261, 315
Olivares C.	19, 148	Pautasso M.	27
Oliveros D.F.	102	Pedraza M.E.	254
Ollero A.	308	Peiro A.	54
Olmo D.	156, 299	Peiro R.	341
Olmos A.	341	Peña E.	52
Orell M.A.	299	Peña L.	53
Orgaz F.	86	Peñalver J.	124
Orlandini S.	251	Penyalver R.	26
Ornat C.	75, 87, 250	Perera S.	260
		Pérez A.	139, 263, 276, 278



Pérez D.	46	Polonio A.	258
Pérez E.	37, 263	Porcel E.	276
Pérez M.	86	Porras R.	84
Pérez M.	314	Pozo M.J.	80, 310
Pérez S.	281	Prats E.	60
Pérez-Artés E.	244	Prieto A.B.	23
Pérez-Artés E.	235	Prieto P.	283
Pérez-Artes E.	280	Prieto-Recio C.	153
Pérez-Artes E.	283	Pritchard L.	48
Pérez-Artés E.	71	Prohens J.	268
Pérez-Benito E.	62, 66	Pruvost O.	112
Pérez-Cañamás M.	209	Puig M.	77
Pérez-García A.	23, 180, 269, 346	Puig M.	272
Pérez-Martínez I.	256	Querol-Audi J.	210
Pérez-Romero L.F.	271	Rafoss T.	27
Pérez-Sierra A.M.	39	Ramírez J.A.	264
Pesqueira A.M.	115, 326	Ramírez J.G.	85, 100, 261, 233, 262
Picó B.	333, 336	Ramos C.	46, 31, 33, 175, 256
Pina J.A.	160, 213	Ramos M.C.	323
Pitman T.	15	Ran L-X.	234, 317
Pla M.	101, 343	Raposo R.	292, 293
Plana O.	70	Ratti C.	163, 164
Planas M.	101	Raya M.C.	305
Plaza M.	246	Rech G.E.	22
Pliego C.	256	Redondo C.	29, 224
Pocurull M.	333	Remesal E.	290
Poggi Pollini C.	163, 164	Requena J.	148
Poliakoff F.	172	Reyes J.	238



Reyes P.	194	Ros C.	329, 330, 335
Ribeiro G.	230	Rosa C.	15
Riedel M.	172	Rosado-Álvarez C.	294
Rincón A.M.	283	Rosas-Díaz T.	24
Río-Álvarez I.	49, 33	Roselló G.	103, 259
Ríos D.	260	Roselló J.	117
Roca L.F.	82, 143, 241, 257, 288, 305, 308	Roselló M.	111
Rodríguez A.	130, 131	Rossi V.	82
Rodríguez C.	130, 131	Ruano-Rosa D.	45, 283, 302
Rodríguez E.	21, 178	Rubiales D.	60
Rodríguez H.A.	21	Rubies Autonell C.	163, 164
Rodríguez P.	146	Rubio A.	290
Rodríguez R.	73, 107, 297, 338	Rubio L.	117, 248, 340
Rodríguez-García C.	71	Rueda E.A.	102
Rodríguez-Hernández A.M.	211	Ruñán J.S.	47, 179, 220
Rodríguez-Herva J.J.	33	Ruiz C.	339
Rodríguez-Jurado D.	298, 303, 306	Ruiz C.A.	146, 147, 232, 266, 334
Rodríguez-Moreno L.	56	Ruiz J.	47
Rodríguez-Nevado C.	245	Ruiz L.	161, 167, 247, 342
Rodríguez-Palenzuela P.	45, 49, 33, 222, 346	Ruiz-Ferrer V.	215
Rodríguez-Rojo S.	325	Ruiz-Ramírez C.	343
Román C.	107, 338	Ruiz-Ramón F.	56
Romeralo C.	154	Ruiz-Ruiz S.	53, 212, 214
Romero D.F.	23, 180, 346	Ruz L.	77, 272
Romero F.	194, 267, 270, 274	Ryder L.R.	9
Romero-López C.	211	Sabate J.	225, 229, 242
Romero-Rodríguez J.	82, 143	Sabuquillo P.	174
		Sahouli S.	187, 188, 189



Sakulkoo W.	9	Sanz J.M.	22, 65
Salem N.	248	Sarmiento-Villamil J.L.	64, 191
Salgado D.	106	Sastre-Conde I.	299
Salgado M.	325	Scalschi L.	177
San Pedro T.	341	Schiliro E.	45, 95, 190
San Segundo B.	348	Schnabel G.	316
Sánchez A.	138	Segarra J.	237
Sánchez D.	21	Sela N.	67
Sánchez E.	184, 185, 217, 330	Selma-Lázaro C.	67, 97
Sánchez J.	187, 188, 189	Sempere R.N.	337
Sánchez M.C.	106, 139	Sena M.	44, 29
Sánchez-Campos S.	162, 219	Sénchez S.	135
Sánchez-Diana N.	36	Serra J.	117
Sánchez-Guzmán M.J.	80	Serrano L.	73, 107, 338
Sánchez-Moreno S.	252, 328	Serrano N.	86
Sanchez-Navarro J.A.	36, 54, 93, 168, 171	Serrano Y.	139, 293
Sánchez-Pina M.A.	91, 206	Sharif A.	15
Sánchez-Solana F.	330	Shoji J.	65
Sánchez-Torres P.	199	Silva C.	210
Sancho D.	57	Silva C.E.O.	200
Sanjuán S.	126, 127	Simón A.	161, 167, 247, 342
Santa Bárbara A.E.	143	Sin E.	107, 338
Santamaría O.	154	Sió J.	350
Santamaría R.	66	Siverio F.	230
Santander D.	66	Solano R.	24
Santos A.	303, 306	Soler S.	268, 340
Santos M.	255, 282, 285, 286, 339	Solis Z.K.	135
Santos M.S.	200	Solla A.	182, 263



Solsona C.	323	Trapero J.L.	148, 290, 307
Soria C.	186	Trapiello E.	121
Sorribas F.J.	75, 87, 333	Troya M.T.	293
Spàno R.	53	Truniger V.	210, 211
Stancanelli G.	27	Tsai I.J.	30
Suárez C.	295	Turina M.	216
Sukno S.A.	22, 65	Usall J.	97, 197, 198, 237, 323, 350, 351
Sundin G.W.	26	Vacas D.	321, 347
Taberner V.	144	Vainio E.J.	137
Takeuchi Y.	30	Valderrama R.	283
Talavera M.	87, 203, 275, 327	Valli A.	92
Talavera-Reyes M.M.	76	Valverde P.	291
Talbot N.J.	9	Valverde-Corredor A.	95, 302
Tanaka F.	114	Van de Vossenber B.	172
Tascón C.	260	Van den Bosch F.	13
Teixidó N.	97, 198, 199, 323, 351	Van Dillewijn P.	31
Tello J.C.	146, 147, 232, 264, 266, 334	Van Kan J.	324
Tello V.	63	Vargas M.	76, 136
Tenllado F.	55, 218	Varo A.	288, 305
Teresani G.	114, 125	Vega V.	300, 306
Thon M.R.	22, 65	Vela M.D.	87, 275
Tomás D.	219	Velasco L.	167, 169, 248, 309
Torés J.A.	269	Velasco V.	146
Torres R.	198, 199, 351	Velázquez K.	160, 213
Torres T.	97	Veloso J.	104, 195, 196, 324
Trapero A.	84, 82, 143, 241, 257, 288, 308, 305, 314, 345	Vera D.F.	295
Trapero C.	301, 291	Verdaguer N.	210



Verdejo-Lucas S.	87, 203	Zeng Q.	26
Vernière C.	112	Zhen Z-X.	234, 317
Verpoorte R.	202	Zucchini G.	163
Vicedo B.	177	Zumaquero A.	47, 178
Vicedo J.	134	Zygadlo J.A.	332
Vicent A.	27, 141, 251		
Vicente C.	184, 185, 217		
Vida C.	312, 313		
Vidal E.	340		
Vilanova L.	198, 199		
Vilaplana L.	92, 166		
Villaescusa F.J.	126		
Villanueva F.	159		
Villarino M.	151, 321, 347		
Viñas I.	97, 198, 199, 323		
Viruega J.R.	345		
Vives M.C.	160, 213		
Voglmayr H.	129		
Wen L.	234		
Willemsen A.	248		
Wisniewski M.	67, 198		
Wittich R.M.	31		
Witzell J.	154		
Xavier C.J.	314, 345		
Yaghmour M.	12		
Yan X.	9		
Yurkewich J.I.	142		
Zamora-Ballesteros C.	132		

Organizan

