



Instituto de Investigación y Formación Agraria y Pesquera
CONSEJERÍA DE AGRICULTURA, PESCA Y DESARROLLO RURAL



TESIS DOCTORAL

Incidencia y epidemiología de nuevos hongos patógenos de fresa en la provincia de Huelva. Desarrollo de herramientas biotecnológicas y aplicación de otras estrategias de control

ANA MARÍA PASTRANA LEÓN

Sevilla, 2014



Instituto de Investigación y Formación Agraria y Pesquera
CONSEJERÍA DE AGRICULTURA, PESCA Y DESARROLLO RURAL



TESIS DOCTORAL

Incidencia y epidemiología de nuevos hongos patógenos de fresa en la provincia de Huelva. Desarrollo de herramientas biotecnológicas y aplicación de otras estrategias de control

Memoria redactada para optar al grado de Doctor por la Universidad de Sevilla

Ana María Pastrana León

Licenciada en Biología

Directora

Dra. M^a Nieves Capote Maínez

Codirectora

Dra. M^a José Basallote Ureba

Tutor de la tesis

Gabriel Gutiérrez Pozo

Sevilla, 2014



Instituto de Investigación y Formación Agraria y Pesquera
CONSEJERÍA DE AGRICULTURA, PESCA Y DESARROLLO RURAL

Dra. M^a Nieves Capote Maínez y Dra. M^a José Basallote Ureba,
investigadoras titulares del Instituto de Formación Agraria y Pesquera de
Andalucía La Torres – Tomejil (Junta de Andalucía).

CERTIFICAN:

que Dña. Ana María Pastrana León ha realizado bajo su dirección en el laboratorio de Biotecnología del Centro Las Torres – Tomejil del Instituto de Formación Agraria y Pesquera de Andalucía, Alcalá del Río (Sevilla), el trabajo que con el título de “Incidencia y epidemiología de nuevos hongos patógenos de fresa en la provincia de Huelva. Desarrollo de herramientas biotecnológicas y aplicación de otras estrategias de control”, presenta para optar al grado de Doctora en Biología por la Universidad de Sevilla.

Para que así conste a los efectos oportunos, firman el presente certificado en Sevilla, a 28 de Octubre de 2014.

M^a Nieves Capote Maínez
Directora

M^a José Basallote Ureba
Codirectora



Dr. Gabriel Gutiérrez Pozo, profesor titular del Departamento de Genética de la Universidad de Sevilla

CERTIFICA:

que Dña. Ana María Pastrana León ha realizado bajo la dirección de la Dra. M^a Nieves Capote Maínez y mi tutoría, en el laboratorio de Biotecnología del Centro Las Torres – Tomejil del Instituto de Formación Agraria y Pesquera de Andalucía, Alcalá del Río (Sevilla), el trabajo que con el título de “Incidencia y epidemiología de nuevos hongos patógenos de fresa en la provincia de Huelva. Desarrollo de herramientas biotecnológicas y aplicación de otras estrategias de control”, presenta para optar al grado de Doctora en Biología por la Universidad de Sevilla.

Para que así conste a los efectos oportunos, firman el presente certificado en Sevilla, a 28 de Octubre de 2014.

Gabriel Gutiérrez Pozo
Tutor

ÍNDICE DE CONTENIDOS

RESUMEN.....	1
INTRODUCCIÓN GENERAL	
El cultivo de la fresa en España.....	6
Hongos de suelo patógenos para el cultivo de la fresa y métodos de control.....	12
<i>Macrophomina phaseolina</i>	14
<i>Fusarium oxysporum</i>	18
<i>Fusarium solani</i>	22
CAPÍTULO I. Caracterización morfológica, patogénica y molecular de <i>Fusarium</i> spp., <i>Macrophomina phaseolina</i> y <i>Phytophthora cactorum</i> del cultivo de la fresa. Tres años de prospecciones en viveros de altura y campos de producción de fruto	
Introducción.....	27
Objetivos.....	31
Materiales y métodos.....	31
Muestreo.....	31
<i>Suelos procedentes de viveros de altura.....</i>	<i>31</i>
<i>Suelos procedentes de campos comerciales de producción de fruto.....</i>	<i>32</i>
<i>Plantas madre prebase.....</i>	<i>32</i>
<i>Plantas certificadas o plantas hija.....</i>	<i>32</i>
<i>Plantas con síntomas de enfermedad o muertas.....</i>	<i>33</i>
Procesamiento de las muestras de suelo.....	33
<i>Aislamiento del patógeno en medio de cultivo semiselectivo.....</i>	<i>33</i>
<i>Extracción ADN de las muestras de suelo.....</i>	<i>34</i>
Procesado del material vegetal.....	35
<i>Aislamiento del patógeno en medio de cultivo.....</i>	<i>35</i>
<i>Preparación de extractos crudos a partir del material vegetal.....</i>	<i>35</i>
Detección y cuantificación mediante PCR en tiempo real.....	36
Caracterización molecular de los aislados mediante secuenciación y análisis filogenético.....	39
<i>Extracción de ADN genómico.....</i>	<i>39</i>
<i>Amplificación, purificación y secuenciación de fragmentos de ADN.....</i>	<i>39</i>
<i>Análisis filogenético.....</i>	<i>40</i>
<i>Diseño de una sonda TaqMan® para la detección y cuantificación de F. oxysporum.....</i>	<i>40</i>
Caracterización patogénica de los aislados mediante test de patogenicidad.....	43
<i>Incremento del inóculo e inoculación.....</i>	<i>43</i>
<i>Evaluación de la enfermedad.....</i>	<i>44</i>
<i>Análisis estadístico.....</i>	<i>44</i>
Caracterización patogénica de los aislados mediante amplificación específica.....	44
Análisis muestras de agua.....	46
Resultados.....	46
Detección y cuantificación de <i>F. oxysporum</i> , <i>M. phaseolina</i> y <i>P. cactorum</i> en.....	46

muestras de suelo.....	
<i>Suelos de viveros de altura de Castilla y León</i>	46
<i>Suelos de campos de producción de la provincia de Huelva</i>	49
Detección y cuantificación de <i>F. oxysporum</i> , <i>M. phaseolina</i> y <i>P. cactorum</i> en	51
material vegetal.....	
<i>Plantas madre prebase</i>	51
<i>Plantas hija certificadas</i>	51
<i>Plantas muertas en los campos de producción de fruto</i>	52
Caracterización molecular de los aislados.....	57
Análisis filogenético de los aislados.....	61
Caracterización patogénica de los aislados mediante test de patogenicidad.....	66
Amplificación específica de <i>ftf1</i> y <i>fofra</i>	73
Discusión	77

CAPÍTULO II. Detección simultánea de tres hongos patógenos de fresa mediante hibridación molecular no radioactiva usando una polisonda

Introducción	86
Objetivo	88
Materiales y métodos	89
Material fúngico.....	89
Material vegetal.....	89
Extracción de ácidos nucleicos totales.....	90
Diseño y elaboración de sondas marcadas con digoxigenina.....	91
<i>Amplificación y digestión de regiones específicas de F. oxysporum f. sp. fragariae,</i>	
<i>M. phaseolina y V. dahliae</i>	91
<i>Ligación</i>	91
<i>Transformación de las células competentes y purificación del plásmido</i>	
<i>recombinante</i>	91
<i>Digestión de los plásmidos recombinantes para comprobar el sentido del</i>	
<i>inserto</i>	92
<i>Digestión y desfosforilación de los plásmidos recombinantes</i>	93
<i>Marcaje de las sondas con digoxigenina</i>	93
Amplificación de las muestras de estudio	94
Hibridación molecular con sondas marcadas con digoxigenina	96
<i>Preparación de las membranas</i>	96
<i>Hibridación molecular no radioactiva</i>	96
<i>Detección múltiple</i>	97
Resultados	98
Amplificación de las muestras de estudio.....	98
Hibridación molecular con sondas marcadas con digoxigenina.....	98
Discusión	99

CAPÍTULO III. Evaluación de especies de *Trichoderma* y *Bacillus* como agentes de control biológico de dos enfermedades de fresa ocasionadas por hongos patógenos de suelo

Introducción	102
Objetivo	105
Materiales y métodos	106
Aislados fúngicos.....	106
Material vegetal.....	106
Productos de control biológico y químico.....	107
Enfrentamientos duales <i>in vitro</i>	107
Experimentos en cámara de cultivo e invernadero.....	108
<i>Tratamientos</i>	109
<i>Preparación del inóculo e inoculación</i>	111
<i>Parámetros observados</i>	112
Experimentos en campo.....	112
<i>Preparación y desinfección del suelo</i>	113
<i>Preparación del inóculo e inoculación del suelo</i>	114
<i>Tratamientos</i>	115
<i>Densidad de inóculo de M. phaseolina y F. solani en el suelo</i>	116
<i>Parámetros observados</i>	116
<i>Aislamiento de los patógenos del material vegetal</i>	117
<i>Análisis estadístico</i>	117
Resultados	117
Enfrentamientos duales <i>in vitro</i>	117
Experimentos en cámara de cultivo e invernadero	118
Experimentos en campo	123
<i>Aislamiento de los patógenos del material vegetal</i>	126
<i>Evolución de las poblaciones de M. phaseolina y de F. solani en el suelo</i>	126
Discusión	127

CAPÍTULO IV. Patogenicidad de aislados de *Fusarium oxysporum* y *Fusarium solani* de fresa en otros cultivos hortícolas de interés económico en Andalucía

Introducción	132
Objetivos	134
Materiales y métodos	135
Material Vegetal.....	135
<i>Fresa</i>	135
<i>Ajo</i>	135
<i>Espárrago</i>	136
<i>Tomate</i>	136
Aislados fúngicos.....	137
Incremento del inóculo.....	137
Inoculación.....	138
Síntomas de la enfermedad.....	140
Análisis estadísticos.....	143
Resultados	143
Desarrollo de los síntomas en los cuatro cultivos.....	143
<i>Fresa</i>	143
<i>Ajo</i>	146
<i>Espárrago</i>	149

<i>Tomate</i>	153
Discusión	155
CONCLUSIONES GENERALES	159
BIBLIOGRAFÍA	161

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 María Pastrana, ha disfrutado de una beca – contrato predoctoral IFAPA según la RESOLUCIÓN de 2 de noviembre de 2010, del Instituto Andaluz de Investigación y Formación Agraria, Pesquera, Alimentaria y de la Producción Ecológica, de concesión de las ayudas cofinanciadas por el Fondo Social Europeo en el marco del Programa de Formación del Personal Técnico e Investigador del IFAPA, correspondiente a la modalidad 3 (Predoctorales) de la convocatoria del año 2010.

RESUMEN

España es el cuarto productor mundial de fruto de fresa. Su cultivo tiene lugar en dos etapas y en dos zonas geográficas diferentes de la península. La producción de plantas de fresa tiene lugar entre abril y mayo en viveros de tierras altas de Castilla y León (viveros de altura), localizados principalmente en las provincias de Segovia, Ávila y Valladolid. El material de partida son plantas madre, procedentes en su mayoría de EE UU (California y Florida) de las que se obtienen por estolonación plantas hija que se cultivan en suelos arenosos al aire libre. Tras la acumulación de horas-frío, se consigue una adecuada multiplicación vegetativa y madurez fisiológica. Estas plantas son recolectadas durante los meses de septiembre y octubre, y enviadas a las zonas de producción de fruto de la provincia de Huelva, donde tiene lugar su desarrollo vegetativo, floración y fructificación, entre los meses de octubre a junio.

El cultivo de la fresa en España está seriamente amenazado por la emergencia o reemergencia de hongos patógenos de suelo que infectan a este cultivo. En esta tesis doctoral se ha constatado la presencia de tres hongos patógenos de fresa *Fusarium oxysporum*, *Macrophomina phaseolina* y *Phytophthora cactorum* en viveros de altura de Castilla y León y en campos de producción de fruto de la provincia de Huelva. Para ello, y como primera medida preventiva de control, se han desarrollado y aplicado métodos moleculares de diagnóstico, consistentes en i) PCR en tiempo real para su detección y cuantificación de una manera sensible, específica, rápida y fiable y ii) secuenciación de regiones variables del genoma de cada hongo para su identificación y análisis filogenético. Paralelamente, se ha testado la patogenicidad de aislados de *Fusarium* spp. procedentes de muestras de suelo y plantas sintomáticas de campos de producción mediante i) pruebas de patogenicidad y ii) detección por PCR de marcadores de patogenicidad descritos en otras *formae speciales* de *F. oxysporum* (el factor de transcripción *ftf1*) y en aislados patógenos de *F. oxysporum* f. sp. *fragariae* (el fragmento *fofra*). Como resultado, se ha concluido que la incidencia de aislados patógenos de *F. oxysporum* en el cultivo de la fresa es prácticamente nula, pues desde su detección en 2008 por Arroyo y col., (2009) y a pesar de que ha aumentado la

presencia de este hongo en viveros de altura y campos de producción a lo largo de las tres campañas prospectadas, sólo se ha detectado un aislado de *F. oxysporum* capaz de provocar enfermedad en plantas de fresa. Los marcadores de patogenicidad descritos no han permitido distinguir aislados de *F. oxysporum* patógenos de no patógenos. Sin embargo, estos estudios de prospección y caracterización patogénica han permitido la detección de un nuevo patógeno para el cultivo de la fresa: *Fusarium solani*, capaz de provocar enanismo, marchitez y muerte ocasional de las plantas. Los análisis filogenéticos permitieron determinar que la población de *F. solani* del cultivo de la fresa es la que posee mayor diversidad nucleotídica intrapoblacional y la que tiene mayor distancia genética respecto al resto de poblaciones de *Fusarium* estudiadas.

Por otro lado, el patógeno *M. phaseolina* fue detectado en las dos regiones geográficas del cultivo de la fresa, en suelos de viveros de altura, donde se había detectado con anterioridad, y en suelos y plantas sintomáticas de campos de producción. Debido a su ausencia en plantas madre prebase y plantas hija certificadas, se sugiere que el origen de la infección con *M. phaseolina* podría estar en los suelos de campos de producción de fruto y que los productos químicos que se usan para su desinfección al inicio de cada campaña (generalmente 1,3-D+CP) no son suficientemente eficientes para eliminar este patógeno.

P. cactorum, a pesar de ser un patógeno incluido en el “Reglamento técnico de control y certificación de plantas de vivero de frutales”, se ha detectado también en distintos estadios de este cultivo, en suelos sin desinfestar de viveros de altura, en plantas hija certificadas y en suelos y plantas sintomáticas de campos de producción de fruto. Es importante destacar que este patógeno también se ha detectado en el agua de riego de los campos de producción de fruto, y que por tanto éste podría ser un foco importante de inóculo junto con los suelos no eficientemente desinfestados de estos campos, donde este patógeno sobrevive campaña tras campaña. La presencia de *P. cactorum* también se ha relacionado con el cultivar de fresa que se cultiva en una campaña determinada, siendo en nuestro estudio más frecuente en plantas ‘Fortuna’ que en ‘Sabrina’, ‘Splendor’ o ‘Primoris’.

En un intento por desarrollar estrategias preventivas de control basadas en la detección temprana de estos hongos en el cultivo de la fresa, se ha desarrollado en este trabajo de tesis una herramienta molecular consistente en una polisonda para la

detección simultánea de tres hongos patógenos de fresa: *F. oxysporum* f. sp. *fragariae*, *M. phaseolina* y *Verticillium dahliae*. Esta sonda permite la detección específica de estos hongos en material vegetal infectado permitiendo el análisis simultáneo de un gran número de muestras. Este sistema se podría aplicar en programas de certificación de plantas de vivero de fresa como estrategia de prevención, evitando así la introducción de hongos patógenos en campos de cultivo.

En este trabajo se han llevado a cabo estudios de rango de huéspedes para comprobar si aislados patógenos de fresa, pertenecientes a los complejos de especies de *F. oxysporum* y *F. solani*, son capaces de ocasionar enfermedad en otros cultivos o, por el contrario, son específicos de fresa. Estos estudios epidemiológicos son de gran importancia en el diseño de las rotaciones de cultivos. Aunque el cultivo de fruto de fresa en nuestro país se desarrolla actualmente como monocultivo, es importante llevar a cabo este tipo de estudios epidemiológicos como visión de futuro, al tratarse de hongos patógenos con una elevada capacidad de supervivencia en el suelo. Los resultados han demostrado que *F. oxysporum* f. sp. *fragariae* patógeno de fresa (*Fof*) es capaz de infectar a plantas de ajo, espárrago y tomate, aunque la severidad de los síntomas causados en estos cultivos es mucho menor que los causados por aislados de *F. oxysporum* patógenos de cada uno de ellos (*F. oxysporum* f. sp. *cepaie*, *F. oxysporum* f. sp. *asparagi* y *F. oxysporum* f. sp. *radicis-lycopercisi*, respectivamente). Del mismo modo, se determinó que los aislados de *F. oxysporum* patógenos de ajo, espárrago y tomate fueron capaces de infectar plantas de fresa *in vitro* y cultivadas en sustrato, aunque sólo causaron síntomas y éstos fueron poco severos en condiciones *in vitro*.

Por otro lado *F. solani* no es específico del cultivo de la fresa porque puede producir enfermedad en ajo, espárrago y tomate, disminuyendo el vigor de las plantas y afectando por tanto a su producción.

Una vez que los hongos se han establecido en el cultivo, es importante contar con medidas de control eficaces para evitar su propagación y disminuir los daños. Debido a la prohibición por parte de la EU de la comercialización y uso de la gran mayoría de las sustancias activas utilizadas para la desinfección del suelo en el cultivo de la fresa, se han buscado alternativas no químicas eficaces para el control de hongos patógenos de suelo y a la vez respetuosas con el medioambiente y la salud humana. En este trabajo se ha evaluado la eficacia de aislados 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 del cultivo de la fresa provocadas por *M. phaseolina* y *F. solani*. Para ello, se llevaron a cabo enfrentamientos duales *in vitro*, y ensayos en cámara de cultivo o invernadero, y en condiciones de campo.

En los enfrentamientos duales realizados *in vitro*, se observó el efecto antagónico de los dos agentes de biocontrol frente a *M. phaseolina* y *F. solani*. Ambos fueron capaces de inhibir el crecimiento radial *in vitro* de los dos patógenos en más de un 30%. En los experimentos llevados a cabo *in vivo*, tanto en macetas en condiciones controladas como en condiciones de campo, el formulado comercial de *T. asperellum* T18 mostró su eficacia en el control biológico de *M. phaseolina* y *F. solani* cuando se aplicó por inmersión de las raíces y la corona de las plantas en una suspensión del producto, antes de su trasplante.

La efectividad de *Bacillus* spp. como agente de biocontrol de *M. phaseolina* y *F. solani* fue menos consistente que la mostrada por *T. asperellum* T18, variando su eficacia en función de las condiciones experimentales.

Las conclusiones obtenidas en este estudio mostraron que las formulaciones utilizadas en estos experimentos basadas en especies de *Trichoderma* y *Bacillus* son capaces de ofrecer una base para la supresión de enfermedades provocadas por hongos patógenos y podrían ser utilizadas, para mejorar la producción del cultivo de la fresa, como alternativa biológica al uso de compuestos químicos.

Como conclusión general, esta Tesis Doctoral aporta conocimientos sobre la presencia y el posible origen de las enfermedades provocadas por los hongos patógenos *F. oxysporum*, *M. phaseolina* y *P. cactorum* en el cultivo de la fresa. Se han desarrollado medidas preventivas de control basadas en la detección temprana de estos patógenos en material vegetal que podrían ser incluidas en protocolos de certificación de plantas de fresa. Además se propone el uso de agentes de control biológico como medidas de control alternativas al uso de productos químicos, respetuosas con la salud y el medio ambiente. Todas estas medidas están encaminadas a ofrecer una mayor garantía fitosanitaria del material vegetal y a reducir las pérdidas económicas causadas por la infección de estos patógenos en el cultivo de la fresa.

INTRODUCCIÓN GENERAL

INTRODUCCIÓN GENERAL

El cultivo de la fresa en España

La historia de la fresa en Andalucía es tan importante como la del vino o el aceite pero a diferencia de ellos es mucho más moderna, lo que ha hecho que su reconocimiento mundial no haya sido tan importante hasta hace pocos años. Así, cuando los cultivos más importantes para la alimentación del hombre fueron domesticados hace 10.000 años, las primeras especies de fresas lo han sido en los últimos 2.000, lo cuál puede ser debido a la fácil recolección de los frutos de las especies silvestres en su medio natural (Medina-Mínguez, 2008).

Desde su implantación en nuestro país, y debido a su gran importancia económica y social, el cultivo de la fresa (*Fragaria x ananassa* Duch.) ha situado a España como el primer país productor de plantas y fruto de fresa de Europa. Es prácticamente imposible conocer con exactitud los datos actuales de superficie y producción mundial, pero se estima que el cultivo de la fresa ocupa una superficie aproximada de 250.000 hectáreas y tiene una producción en torno a los 4.5 millones de toneladas, de los cuales España aporta al total un 6,4 % (faostat.fao.org/). En España el cultivo de la fresa se concentra en la zona costera de Huelva y se caracteriza por formar parte de una horticultura intensiva muy tecnificada, dinámica, moderna y competitiva, con marcada proyección a la exportación. Las producciones medias anuales se aproximan a las 280.000 t de fruta, de las cuales un 80-85% se destina al mercado en fresco de la Unión Europea, siendo los principales países receptores Alemania y Francia, seguidos de Reino Unido e Italia (www.cap.junta-andalucia.es) (www.fepex.es).

El cultivo de la fresa en España, tal y como se conoce actualmente, se encuentra dividido tanto profesional como geográficamente. De este modo, la producción de plantas se lleva a cabo en los llamados viveros de altura de Castilla y León, mientras

que el cultivo para la obtención de frutos se realiza en los campos de producción de Huelva. Esta diferenciación es una herencia de la tecnología californiana transferida en los años sesenta y una consecuencia de la particular fisiología de la especie *Fragaria x ananassa* Duch., la cual necesita una serie de condiciones agro-climáticas, para multiplicarse vegetativamente de modo adecuado (López-Aranda, 2008).

El Reglamento Técnico de Control y Certificación de Plantas de Viveros de Frutales (Real Decreto 929/95 del 9 de junio de 1995) establece una importante normativa para el control de la producción de plantas de fresa y su proceso de certificación. Así, el material inicial (F0) está constituido por plantas de la variedad, debidamente seleccionadas, obtenidas por cultivo de meristemos *in vitro* (meristemación) o por multiplicación *in vivo* por estolones (estolonación). Las plantas de prebase (F1) serán las hijas conseguidas con ambos tipos de multiplicación a partir del material inicial (F0). Dichas plantas se multiplican en viveros al aire libre para producir plantas de base (F2) popularmente denominadas de ‘etiqueta blanca’. Estos viveros de producción de plantas de base deben desinfestarse con productos autorizados (en el pasado con bromuro de metilo y otros desinfestantes químicos) y estar aislados, como mínimo, 1.000 m de cualquier cultivo de fresa en explotación para fruto. Las plantas de base (F2) serán las plantas madre de la siguiente generación producidas en un vivero comercial, adecuadamente inspeccionado, que será la planta certificada (F3) popularmente denominada de ‘etiqueta azul’. En este caso, los viveros para la producción de planta certificada no deberán haber tenido cultivos de fresa en los tres años anteriores, excepto si fueron desinfectados adecuadamente, y estarán aislados, como mínimo, 100 m de cualquier cultivo de fresa en explotación para fruto. Existe una categoría comercial de plantas de fresa, poco utilizada en el sector fresero de Huelva, con la denominación CAC (Conformitas Agrarias Comunitatis); las plantas CAC provendrán de la multiplicación de plantas de vivero de categoría certificada (F4), o bien de los campos de producción de planta certificada que no hayan cumplido los requisitos exigidos a dicha categoría, siempre que no se sobrepasen las tolerancias establecidas (López-Aranda, 2008).

En Europa se cultivan alrededor de 4.500 ha de vivero de plantas de fresa, ocupando España el primer lugar en producción con algo más de 1.400 ha, seguida por Holanda, Polonia, Francia e Italia (García-Sinovas y col., 2012). El material inicial (F0)

utilizado en nuestro país proviene casi en su totalidad de EEUU, aunque recientemente se están abriendo paso nuevas variedades obtenidas por empresas y organismos españoles. La multiplicación de este material inicial hasta llegar a la planta certificada se lleva a cabo en viveros de altura de Castilla y León (principalmente Segovia, Ávila y Valladolid), donde las plantas adquieren una media de entre 150 y 400 horas-frío por ciclo de cultivo, cantidad suficiente para provocar un incremento de reservas de almidón en corona y raíces, y la parada vegetativa de las plantas antes de su traslado a la etapa de fructificación. En esta región, además de cumplirse a la perfección los requisitos agroclimáticos en cuanto a fotoperiodo y termoperiodo, se produce una separación geográfica con respecto a la zona productora que proporciona el adecuado aislamiento fitosanitario del cultivo de fresa para fruto, al romper el ciclo vital de numerosas plagas y enfermedades (García-Sinovas y col., 2012). Durante esta etapa, la planta precisa de suelos llanos, arenosos y sueltos, con alta capacidad de drenaje que permita el arranque de la planta aunque el comienzo del otoño sea lluvioso (López-Aranda, 2008) (Fig. 1A y B). Este cultivo se realiza al aire libre, en extensivo y se practica la rotación trienal de cultivos con cereal, endivia, zanahoria, girasol o barbecho como ejemplos. La desinfección de estos suelos es una actividad fundamental para que los productores de fresa partan de plantas sanas y libres de patógenos. Actualmente, los productos más utilizados en viveros de altura son 1,3-dicloropropeno combinado con cloropicrina, metam sodio, dazomet y cloropicrina. Tras el arrancado de la planta o recolección, durante los meses de septiembre y octubre, las plantas hija se envían a las zonas de producción de fruto, principalmente a la provincia de Huelva seguida por Marruecos, Grecia, Italia y Portugal (García-Sinovas y col., 2012).

En Huelva, el ciclo anual en el sistema convencional de cultivo en suelo se inicia con el trasplante de las plantas hija procedentes de viveros de altura durante el mes de octubre. La plantación se realiza sobre lomos desinfectados químicamente, protegidos por láminas plásticas opacas, con equipamiento de riego localizado y sistema de fertirrigación (Fig. 1C), bajo cubierta plástica formada por micro o macrotúneles. En los últimos años, el sistema de protección con microtúneles (Fig. 1D) en Huelva ha ido disminuyendo de forma que actualmente apenas se encuentra en un 15% de la superficie. El sistema de protección utilizado mayoritariamente es el macrotúnel (López-Aranda, 2008) (Fig. 1E). Los macrotúneles son túneles de gran dimensión, con capacidad para 6 lomos, que permite realizar las operaciones de cultivo en su interior. El

cultivo sin suelo (Fig. 1F) es otra forma de cultivo que se inició en Huelva hace pocos años; actualmente existen unas 200 ha, de las que se obtiene cerca de un 3% de la producción (López-Aranda, 2009). Existen diversas modalidades dentro del cultivo sin suelo: sistemas abiertos o cerrados, suspendidos o apoyados, con o sin sustrato (hidropónico). Los sustratos usados principalmente son: fibra de coco, lana de roca, perlita y turba. Uno de los problemas actuales del sistema de cultivo sin suelo es la falta de variedades realmente adaptadas a este sistema (Domínguez Morales, 2012). Las fincas de producción de fruto son de reducido tamaño, de suelos arenosos y tan especializadas en el cultivo de la fresa que no se practica la rotación de cultivos, y cuando esto se realiza se lleva a cabo con especies similares de pequeños frutos, como frambuesa y arándano. La recolección de frutos se lleva a cabo entre los meses de diciembre a junio y requiere, según datos de la campaña anterior (2013/2014), una mano de obra compuesta por unos 60.000 trabajadores por campaña en toda la provincia de Huelva (A. Refoyo, comunicación personal).



Figura 1. Sistemas de producción de planta y fruto de fresa en España: A) Fincas de producción de plantas de fresa en viveros de altura de Castilla y León antes de la plantación y B) en plena producción de planta de fresa (foto donada por: Luis Miranda Enamorado, IFAPA-Huelva); C) Lomos con cubierta plástica y sistema de fertirrigación localizado en una finca de producción de fruto de fresa en la provincia de Huelva; D) Cultivo bajo microtúnel; E) Cultivo bajo macrotúnel; F) Cultivo sin suelo.

Fue a primeros de los años 60 cuando se introdujeron en Huelva las primeras variedades de origen californiano. Desde entonces, el cultivo en esta provincia se caracterizó por ser monovarietal (Domínguez-Morales, 2012). Pero en los últimos años, el cambio varietal ha sido toda una novedad, basándose la elección de variedades en la precocidad, productividad y vida post-cosecha. Así, se ha pasado de utilizar una única

variedad predominante, 'Camarosa', a cultivar más de 50 variedades diferentes. Con este cambio, el agricultor intenta solapar el uso de variedades tempranas con otras variedades más tardías, haciendo que la campaña de producción de fruto sea lo más larga posible y permita abastecer a los mercados europeos durante más tiempo. Estos caracteres relacionados con la producción han sido los más demandados por parte de los productores, pero recientemente se está produciendo un cambio social que demanda mayor calidad de fruta, tanto gustativa como de presencia de compuestos beneficiosos para la salud (Pelayo-Zaldivar y col., 2005).

Desde el punto de vista biológico y para evitar la presencia de enfermedades y malas hierbas, es necesaria la desinfección del suelo antes de la plantación. El fumigante de suelos más importante en el cultivo de la fresa hasta hace unos años ha sido el bromuro de metilo (BM), hasta el punto de que durante la década de los 90 casi el 100% del suelo dedicado al cultivo de la fresa en Huelva era fumigado con BM (Calatrava, 2002). Pero debido a su potencial efecto destructivo de la capa de ozono y otros efectos nocivos para el medio ambiente, el Reglamento (CE) 2037/2000, consecuente con el Protocolo de Montreal, prohibió la fabricación y consumo de BM en todo el territorio comunitario. Para los campos de producción de fruto de fresa, la prohibición definitiva se produjo en 2007, mientras que en los viveros de fresa de Castilla y León, la prohibición se hizo efectiva en la campaña 2009. Asimismo, la entrada en vigor de la Directiva 91/414/CEE, ha supuesto la desaparición de alrededor del 70% de las sustancias activas utilizadas en el cultivo de la fresa para el control de las enfermedades y plagas que le afectan, contemplando además la retirada voluntaria de varios desinfectantes de suelo, incluyendo el 1,3-dicloropropeno y la cloropicrina (Reglamento 1381/2011 de la Comisión, de 22 de diciembre de 2011). Éste y otros compuestos químicos prohibidos por la Unión Europea se siguen utilizando como desinfectantes de suelo debido a que el artículo 53 del Reglamento (CE) nº 1107/2009 del Parlamento Europeo y del Consejo, relativo a la comercialización de productos fitosanitarios establece que, en circunstancias especiales, un Estado miembro podría autorizar, por un periodo no superior a 120 días la comercialización de productos fitosanitarios para su utilización controlada y limitada, si tal medida fuera necesaria debido a un peligro que no puede controlarse por otros medios razonables. Debido a la restrictiva política medioambiental que la Unión Europea está marcando para el uso de los desinfectantes de suelo, la situación futura de los mismos es delicada e incierta. Según Domínguez-

Morales (2012), los productos más utilizados actualmente por los productores freseros como desinfectantes químicos del suelo son el 1,3-dicloropropeno, dazomet, cloropicrina y metam sodio. En viveros de altura, además de la prohibición del uso de los desinfectantes, también hay que tener en cuenta las bajas temperaturas del suelo que se registran en la época de desinfección, a menudo por debajo de 5°C, y cómo influyen en los tratamientos empleados. Este hecho, que no afectaba a la actuación del BM debido a su elevada presión de vapor, adquiere relevancia en los desinfectantes químicos empleados actualmente, lo cuáles tienen mayor punto de ebullición y menor presión de vapor que el BM (García-Sinovas, 2012a).

Hongos de suelo patógenos para el cultivo de la fresa y métodos de control

Las enfermedades fúngicas del suelo causan grandes pérdidas económicas en el cultivo de la fresa por sus efectos negativos en la producción, la calidad y los costes del producto en el mercado. Además, la utilización de fungicidas de origen químico utilizados para su control conlleva en muchos casos la producción de residuos contaminantes en la fruta y en el medioambiente. El impacto es aún más grave cuando emergen nuevas enfermedades, sobre todo en cultivos hortícolas intensivos como la es fresa, debido a su dinamismo y métodos de producción (Colla y col., 2012). El control de estas enfermedades es fundamental para el sector fresero ya que se enfrenta a la necesidad de competir con terceros países donde la retirada del bromuro de metilo aún no es definitiva.

Hasta hace unos años, las principales enfermedades causadas por patógenos de suelo en las dos fases del cultivo de la fresa fueron la marchitez producida por *Verticillium dahliae* y la podredumbre de corona causada por *Phytophthora cactorum*. Ambas enfermedades se controlaban eficazmente gracias a la acción del BM; pero desde su retirada, y debido a los cambios en el manejo de la desinfección de los suelos, no se consigue un control adecuado de las mismas. Al mismo tiempo, están emergiendo nuevas enfermedades provocadas por otros hongos de suelo. En 2006, Avilés y col. (2008), detectaron muerte de plantas en campos de producción de fruto de fresa en la provincia de Huelva, e identificaron como agente causal al hongo de suelo

Macrophomina phaseolina. Un año después, en 2007, comienzan a observarse nuevos síntomas de enfermedad, esta vez causados por el hongo de suelo *Fusarium oxysporum* (Arroyo y col., 2009). Durante el periodo 2011-2013 se detectó por primera vez en la zona de Huelva, la presencia de *Fusarium solani* como patógeno causante de enanismo, marchitez, necrosis y muerte en las plantas de fresa (Pastrana y col., 2014). *F. solani* también fue detectado en 2012 en plantas de vivero de fresa con síntomas de podredumbre de cuello (Redondo y col., 2012).

La emergencia de nuevas enfermedades en un cultivo determinado puede ser debida a la interacción de múltiples factores, tanto naturales como influenciados por la actividad humana. En el caso del cultivo de la fresa en España, los factores determinados por la mano del hombre, como el cambio en el uso y modo de aplicación de productos fitosanitarios y la introducción de nuevos cultivares, parecen ser los causantes de la aparición de estas enfermedades.

Las buenas prácticas en el manejo del cultivo son un factor determinante en el control de enfermedades en el cultivo de la fresa, por ejemplo, no manteniendo los lomos un segundo año si se ha detectado la enfermedad o eliminando, antes de la plantación, la totalidad de los restos vegetales procedentes de campañas anteriores para no aumentar la cantidad de inóculo en el suelo (Bascón, 2009). Otra de las principales medidas de control de un patógeno consiste en la prevención de su introducción y establecimiento en una zona de cultivo. Para ello, es imprescindible la detección temprana del patógeno en el material vegetal que se va a plantar o en el suelo de plantación. Además, la cuantificación del patógeno en el sistema planta-suelo es cada vez más importante, ya que sirve como base para el establecimiento de umbrales de daño en el que un agente patógeno provoca enfermedad, y umbrales de acción que determinan cuándo se deben tomar medidas para limitar o evitar pérdidas. Es por tanto necesario contar con sistemas de detección y cuantificación del patógeno que sean rápidas, fiables, sensibles y específicas.

En los últimos años, están emergiendo varios métodos de control como alternativa al uso de productos químicos contra las enfermedades de suelo en el cultivo de la fresa. Entre estas medidas se encuentra la rotación de cultivos, la solarización y/o biosolarización, la aplicación de agentes de control biológico o el uso de variedades más

tolerantes/resistentes. Estas medidas de control se detallan con más profundidad en los siguientes apartados dedicados a cada uno de los patógenos.

Macrophomina phaseolina

Macrophomina phaseolina (Tassi) Goid. es un hongo de suelo que se encuentra distribuido a través de todo el planeta (Reichert y Hellinger, 1947; Mihail, 1992). Se ha referido como causa de graves pérdidas en el cultivo de la fresa en Turquía (Benlioğlu y col., 2004), Israel (Zveibil y Freeman, 2005), Florida (Mertely y col., 2005), Australia (Golzar y col., 2007; Fang y col., 2011b), España (Avilés y col., 2008), California (Koike, 2008), Irán (Sharifi y Mahdavi, 2011), Argentina (Baino y col., 2011) y Chile (Sánchez y col., 2013). Este hongo causante de la podredumbre carbonosa se presenta principalmente bajo dos estados: uno picnídico (*Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goidanich) y otro esclerocial, mucho más frecuente (*Sclerotium bataticola* Taub.). El estado picnidial del hongo se ha observado en diversos tejidos de las plantas huésped; sin embargo, es poco frecuente, y se suele utilizar este nombre sin prestar atención a que, casi siempre, estamos frente al estado esclerocial (Bascón, 2009). Los esclerocios sobreviven en el suelo y en los restos vegetales liberados al final de la campaña y permanecen en el suelo formando una fuente de inóculo primario para el nuevo cultivo (Zveibil y col., 2012). Aunque hay autores que han descrito disminuciones en el número de esclerocios en suelos expuestos a periodos húmedos (Pratt, 2006), existen estudios en los que se ha comprobado que son capaces de resistir en el suelo hasta tres años en cantidad suficiente como para asegurar la infección de los cultivos posteriores (Dhingra y Sinclair, 1975). La germinación de los esclerocios se produce en la superficie de la raíz cuando la temperatura oscila entre los 28 y 35 °C. Los tubos germinativos forman un apresorio capaz de penetrar a través de las paredes de las células epidérmicas mediante presión mecánica y digestión enzimática o a través de aberturas naturales (Bowers y Russin, 1999). Una vez dentro de la planta, las hifas comienzan a crecer intercelularmente a través de la corteza y luego intracelularmente a través del xilema, colonizando los tejidos vasculares. De este modo, *M. phaseolina* se propaga a través de la raíz y la base del tallo produciendo microesclerocios que taponan los vasos (Wyllie, 1988).

Factores medioambientales como el estrés hídrico y las altas temperaturas son ideales para la actuación de *M. phaseolina* (Mihail, 1992). Por ello, la podredumbre carbonosa puede ser un problema en climas mediterráneos como el nuestro, con primaveras cálidas y poco lluviosas. En Australia, los primeros síntomas de podredumbre carbonosa en los campos de cultivo de fresa son predominantes en los meses cálidos del año, finales de primavera / principios de verano, cuando las temperaturas exceden de los 30°C (Fang y col., 2011b). En Huelva se ha observado que estos síntomas de enfermedad aparecen en los meses finales de la campaña, cuando las temperaturas empiezan a exceder los 25°C (Miranda y col., 2012).

La humedad del suelo y el nivel del agua también tienen efectos significativos sobre la supervivencia de los esclerocios de *M. phaseolina* (Papavizas, 1977). Alta humedad del suelo e inundaciones causan una disminución de la viabilidad de los esclerocios en comparación con los suelos secos (Dhingra y Sinclair, 1975; Pratt, 2006).

Los síntomas de enfermedad causados por *M. phaseolina* en el cultivo de la fresa son poco específicos y similares a los de cualquier otro patógeno que afecte al sistema vascular: marchitamiento general, necrosis y muerte de las hojas viejas, parada del crecimiento, colapso de los haces vasculares y muerte de las plantas (Koike, 2008) (Figura 2B). Al dar un corte transversal a la corona de las plantas afectadas se puede observar una necrosis de color marrón oscuro en la zona vascular de la misma (Mertely y col., 2005; Koike, 2008) (Figura 2C).



Figura 2. Características morfológicas y patogénicas de *Macrophomina phaseolina*. A) Cultivo monoesclerocial de *M. phaseolina* crecido en APD; B) Campo de producción de fruto de fresa afectado por Podredumbre carbonosa en Cartaya (Huelva). C) Corte transversal de una corona de planta de fresa afectada por la Podredumbre carbonosa donde se puede apreciar la necrosis de la zona vascular.

A pesar de que es un patógeno cosmopolita capaz de infectar a más de 500 especies botánicas de plantas (Reichert y Hellinger, 1947; Mihail, 1992), dentro del género *Macrophomina* sólo se conoce la especie *M. phaseolina*. Estudios moleculares indican que existe una baja variabilidad genética entre aislados (Su y col., 2001; Jana y col., 2005). En estudios de rango de huésped, no se ha encontrado especialización evidente para aislados procedentes de soja, sorgo o algodón (Su y col., 2001), aunque sí se ha referenciado en judía (Mayék-Pérez y col., 2001). En plantas de fresa, no se demostró evidencia de especificidad huésped cuando se inocularon plantas con aislados de *M. phaseolina* procedentes de siete especies de plantas diferentes (Zveibil y col., 2012).

Algunos autores han asociado la emergencia de *M. phaseolina* en el cultivo de la fresa con la retirada del BM como desinfectante de suelo (Mertely y col., 2005; Zveibil

y Freeman, 2005; Avilés y col., 2008; Koike y col., 2008). Tras esta retirada, las investigaciones llevadas a cabo en este campo tratan de conseguir alternativas de control respetuosas con la salud humana y el medio ambiente. Sin embargo, el uso de medidas alternativas a la fumigación con BM no siempre han sido eficaces (Zveibil y col., 2012). Recientemente, la combinación del aporte de enmiendas con la solarización del suelo (biosolarización) ha demostrado ser prometedora para el control del patógeno en condiciones de campo áridas (Lodha y col., 1997). Ndiaye y col., (2007) mostraron que la viabilidad de los esclerocios de *M. phaseolina* se redujo en los suelos infestados de forma natural, por las temperaturas alcanzadas (50°C) mediante la solarización del suelo.

La supervivencia de este hongo en suelo también se ve afectada por el tipo de inóculo: los esclerocios desnudos son más vulnerables al efecto fungicida de la fumigación y de la solarización que cuando están dentro del tejido vegetal, como en estolones y coronas (Zveibil y col., 2012). En este sentido, se fumigaron suelos de campo en condiciones de laboratorio con distintos productos y se comprobó que todos ellos tenían capacidad para matar microesclerocios de *M. phaseolina*. En contraste, sólo el BM erradicaba los esclerocios en coronas infectadas y enterradas en los suelos tratados (Hutton y col., 2013). Estos resultados destacan la importancia de eliminar los residuos del cultivo de fresa en campos infectados antes de la plantación (Hutton y col., 2013).

Otra alternativa de control propuesta ha sido la rotación de cultivos. Esta técnica es capaz de disminuir la presión selectiva existente en los monocultivos y puede reducir las poblaciones de un patógeno específico en un cultivo particular (Islas, 2012). Fang y col. (2011a) demostraron que si se llevan a cabo rotaciones de tres años o más entre cultivos de fresa sucesivos, el nivel de marchitamiento o muerte de las plantas es menor, incluso en ausencia de fumigación. Sin embargo, es crucial una buena elección del cultivo rotacional, ya que se han observado serias pérdidas por podredumbre carbonosa tras la rotación con sorgo en Australia, pues este cultivo es un huésped importante y una fuente potencial de inóculo de *M. phaseolina* (Hutton y col., 2013).

Dado el carácter saprofita y polífago de este hongo, parece difícil encontrar resistencia varietal frente a esta enfermedad (Bascón, 2009). En cambio, son muchos los autores que han propuesto variedades de fresa con una alta tolerancia a *M. phaseolina*

como 'Seascape', 'Ventana', 'Coral' y 'Camino Real' (Koike 2008b; Koike, 2009b; Avilés y col., 2009; Fang y col., 2012b).

El control biológico de la podredumbre carbonosa se ha erigido también como una alternativa de control respetuosa con el medioambiente. El uso de agentes de biocontrol ofrece además la ventaja de tener un amplio rango de actividad (Thilagavathi, 2007). Además, estudios recientes han demostrado que existen agentes de control biológico como *Trichoderma viride*, *Pseudomonas fluorescens* y *Bacillus subtilis*, capaces de colonizar y reducir la germinación de los esclerocios de *M. phaseolina* y actuar como agentes de control de la podredumbre de raíces (Ahamad and Srivastava, 2000; Srivastava y col., 2001). Sin embargo, la mayoría de estos estudios se han llevado a cabo en condiciones de laboratorio o invernadero y se han basado en la evaluación de la inhibición, la producción de antibióticos y la supresión de la germinación de los esclerocios (Manjunata 2013).

Fusarium oxysporum

Fusarium oxysporum Schlechtend.:Fr. es un hongo asexual ampliamente distribuido alrededor del planeta. Presenta un elevado número de huéspedes, y puede ser dispersado por aire, semillas y material infectado (Garibaldi y col., 2004). Dadas estas características y las grandes pérdidas que puede provocar cuando infecta, es considerado como la especie económicamente más importante del género *Fusarium* (Leslie y Summerell, 2006). Los aislados de *F. oxysporum* son habitantes ubicuos del suelo, tienen la capacidad de existir como saprófitos y de degradar la lignina y los complejos de carbohidratos asociados con restos orgánicos del suelo (Rodríguez y col., 1996; Christakopoulos y col., 1996). Son endófitos, por lo que pueden colonizar las raíces de las plantas y causar enfermedad (Katan, 1971; Gordon y col., 1989), pero también pueden proteger a las plantas o ser la base de supresión de otras enfermedades (Lemanceau y col., 1993; Oyarzun y col., 1994).

Las características morfológicas de *F. oxysporum* incluyen la producción de microconidias en falsas cabezas sobre filíidas cortas formadas a partir de hifas, la producción de clamidosporas (estructuras de resistencia) y la presencia de macroconidias (Leslie y Summerell, 2006) (Figura 3A, B y C).

El hongo coloniza en una primera fase el cortex radical y luego crece dentro de los vasos del xilema y los bloquea, debido en muchos casos a la producción de geles, compuestos por azúcares neutros, en la pared celular de la planta (van der Molen y col., 1986; Shi y col., 1992; Lagopodi et al., 2002; Xiao-min et al., 2011). Esto provoca la enfermedad denominada marchitez producida por *Fusarium* cuyos síntomas son coloración vascular, debilidad, marchitez progresiva, defoliación, enanismo y muerte de la planta (Agrios, 2005; Leslie y Summerell, 2006) (Figura 3D).

F. oxysporum es en realidad un complejo críptico de especies (FOSC) formado por distintos filotipos o linajes (O'Donnell y col., 2009). El complejo de especies de *F. oxysporum* incluye aislados patógenos y no patógenos. Los aislados patógenos suelen infectar a una o a un conjunto de especies de plantas, asignándosele el nombre de *forma specialis* basado en la especificidad de huésped (Armstrong y Armstrong, 1981; Both, 1971). Estas cepas patógenas pueden haber evolucionado en ambientes agrícolas, donde los monocultivos proporcionan una fuerte presión de selección que promueve la aparición de patógenos agresivos. Una vez establecidas, las cepas patógenas se distribuyen fácilmente por el suelo o el material vegetal infectado. Por lo tanto, la aparición de la marchitez producida por *Fusarium* en una nueva área o en un nuevo huésped puede ser el resultado de la selección *de novo* a partir de la población local o de la introducción de una cepa patógena procedente de una infección preexistente (Islas, 2012).

F. oxysporum f. sp. *fragariae* es el patógeno que provoca la marchitez producida por *Fusarium* en plantas de fresa. Fue descrito por primera vez en Australia (Winks y Williams, 1965), pero ha sido también detectado en Argentina (Mena y col. 1975; Bairo y col. 2010), Korea (Cho y Moon, 1984; Nam y col., 2011), Japón (Matsuo, 1972), Chile (González y col., 2005), California (Koike y col., 2009), China (Zhao y col., 2009) y Carolina del Sur (Williamson y col., 2012_B). En España, *F. oxysporum* fue detectado por primera vez como causante de marchitez y muerte en plantas de fresa en campos de producción de la provincia de Huelva (Arroyo y col., 2009).

En el cultivo de la fresa, los síntomas de marchitez producida por *Fusarium* se encuentran favorecidos por temperaturas moderadamente altas (>22°C). En las plantas inoculadas con *F. oxysporum*, un incremento de temperatura de 17 a 27°C hace que la severidad de la enfermedad incremente significativamente (Fang y col., 2011b). El crecimiento lineal máximo ocurre a una temperatura de 25°C y un potencial osmótico

de -1.0 MPa (Nelson y col., 1990). Además de a la retirada del BM (Islas, 2012), el desarrollo del marchitamiento debido a *F. oxysporum* también se ha asociado a escasez de agua en el suelo, presencia de plagas y nematodos y estrés fisiológico de la planta, por ejemplo en los momentos de máxima producción.

Estudios filogenéticos sugieren que existen aislados de una misma *forma specialis* que se han originado de forma independiente durante la evolución (O'Donnell y col., 1998). Debido a la carencia de ciclo sexual conocido, los mecanismos a través de los cuáles estos linajes patogénicos han emergido en otro fondo genético diferente no son bien conocidos. Recientemente, el análisis del genoma completo de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* (*Fol*), patógeno de tomate, ha revelado la presencia de regiones genómicas específicas de linaje (LS), incluyendo cuatro cromosomas enteros que están ausentes en otras especies de *Fusarium* (Ma y col., 2010). La transferencia de dos cromosomas LS desde *Fol* a un aislado no patogénico hace que este aislado pueda causar enfermedad en plantas de tomate. Esto sugiere que la transferencia horizontal de pequeños cromosomas podría ser la responsable de la existencia de nuevos linajes patogénicos en *F. oxysporum* (Ma y col., 2010).

La enfermedad causada por *F. oxysporum* es muy difícil de controlar debido a la larga supervivencia de las clamidosporas en el suelo, su amplio rango de huésped y la ineficacia de los actuales fungicidas. Por ello, actualmente no existen tratamientos efectivos para el control de *F. oxysporum* y la mayoría de los esfuerzos se dirigen hacia la prevención de la enfermedad. En muchos cultivos existen genes capaces de proveer una resistencia eficaz, pero la mejora vegetal para la resistencia a este patógeno es complicada y, aunque se desarrollen otras variedades, nuevas razas pueden llegar a superar la resistencia del huésped (Jiménez-Gasco y col., 2004). A pesar de ello, muchos autores han propuesto variedades con mayor tolerancia a *F. oxysporum* f. sp. *fragariae* como 'San Andreas', 'Ventana', 'Festival', 'Aromas' y 'Camino Real' (Koike y col., 2011; Fang y col., 2012b).

La rotación de cultivos se aplica en el cultivo de la fresa en California con cultivos de cobertura u otros productos comercializables, como judías, brócoli, coles de Bruselas, lechuga o coliflor. En general, los beneficios de la rotación de cultivos son variables, pero algunos estudios han demostrado reducciones de la densidad del inóculo en el suelo (Islas, 2012). Sin embargo, a veces esta práctica no es económicamente

factible debido al coste de la tierra y el agua y/o el menor valor del cultivo de rotación (37_Islas, 2012).

Alternativamente, la presencia de este hongo en el suelo puede ser controlada por la manipulación del microambiente del suelo de tal manera que se disminuya el crecimiento, la esporulación y la agresividad, o mediante la reducción de sus propágulos (Nelson y col., 1981). En general, los ambientes ácidos son capaces de favorecer la supervivencia de las especies de *Fusarium*. En este sentido, existen estudios en donde la adición de cal al suelo retrasó la aparición de fusariosis en sandía y disminuyó la incidencia de la enfermedad (6_Islas, 2012).

El control biológico también es una buena alternativa en la lucha contra las enfermedades causadas por *Fusarium*. Se han desarrollado un gran número de productos capaces de actuar contra *Fusarium oxysporum*, entre los cuáles se encuentran formulados de *Bacillus* spp. (Nam y col., 2008) y de *Trichoderma* spp. (Moon y col., 1995_De Nam, 2008), capaces de reducir los síntomas de marchitez de *Fusarium* en el cultivo de la fresa. También se han referido entre los agentes de biocontrol cepas no patógenas de *F. oxysporum* u otros microorganismos antagonistas (Fravel y col., 2003). Todos ellos, al derivar de la naturaleza tienen menor impacto ambiental que los fungicidas tradicionales, aunque para la mayoría la eficacia en condiciones de campo es aún desconocida.

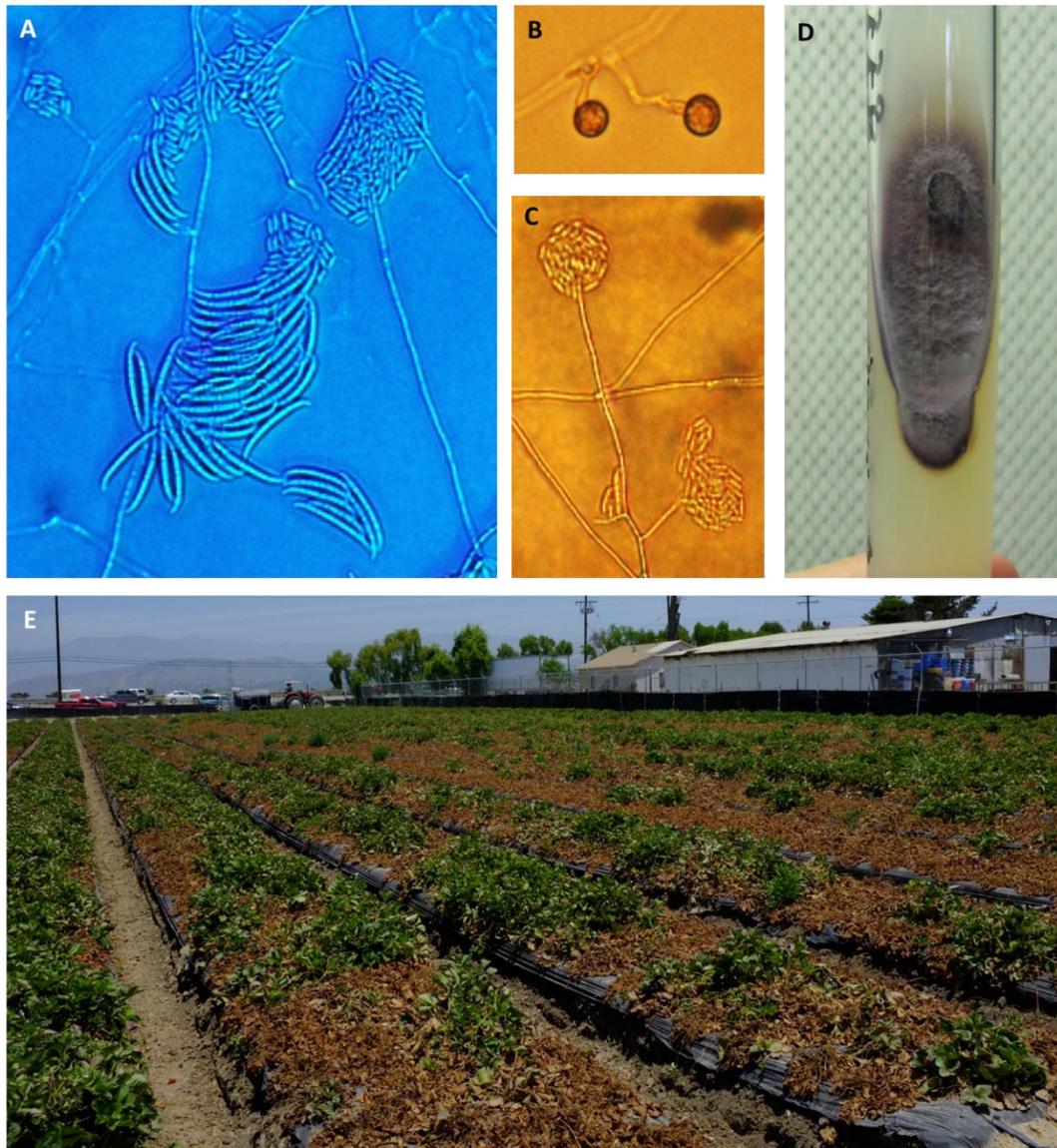


Figura 3. Características morfológicas y patogénicas de *F. oxysporum*. A) macroconidia y microconidia; B) clamidosporas; C) microconidias en falsas cabezas; D) Cultivo monospórico de *F. oxysporum* f. sp. *fragariae* crecido en APD. E) Campo de producción de fruto de fresa afectado por marchitez producida por *Fusarium* en California (EEUU) (foto donada por Margaret Lloyd, UC Davis, California, EEUU).

Fusarium solani

Fusarium solani (Mart.) Appel & Wollenw. es un hongo de suelo que ha sido descrito como patógeno en una amplia variedad de vegetales, así como en humanos y animales (Aoki y col., 2014). Al igual que *F. oxysporum*, *F. solani* también está constituido por un complejo de 45 especies filogenéticamente distintas (O'Donnell, 2000) y se han descrito distintas *formae speciales* basándose en su rango de huésped (Booth, 1971; Gerlach, 1981; Nirenberg, 1995). Tanto su plasticidad genética como su

diversidad metabólica son las responsables de su alta capacidad para adaptarse a una amplia variedad de escenarios medioambientales, siendo capaces de degradar hidrocarburos, compuestos orgánicos de flúor, lignina, cianuros de metales e incluso plaguicidas en el suelo (Rafin y col., 2000; Saparrat y col., 2000; Mitra y col., 2001; Romero y col., 2002).

F. solani puede distinguirse de otras especies de *Fusarium* gracias a sus características morfológicas, presencia de clamidosporas, longitud de las monofiálidas, y tamaño y forma de las macroconidias y microconidias (Leslie y Summerell, 2006) (Figura 4A, B, C y D).

Los mecanismos de patogenicidad de *F. solani* son muy similares a los de *F. oxysporum*, ambos son capaces de penetrar las plantas a través de las raíces, pero suelen presentar diferencias en cuanto a los mecanismos de colonización; de este modo, *F. solani* penetra en la planta y se concentra principalmente en la zona del cuello, mientras que *F. oxysporum* penetra en las raíces y se mueve a través del sistema vascular para colonizar la planta. Factores importantes que ayudan a determinar si un aislado de *F. solani* es un patógeno efectivo y el grado de enfermedad que es capaz de causar son la actividad de la enzima cutinasa y el modo de fijación y penetración de las hifas a través de la superficie del huésped (Leslie y Summerell, 2006). En plantas de fresa, *F. solani* afecta al crecimiento y es capaz de provocar síntomas de enanismo, marchitez, necrosis y muerte de las plantas (Pastrana y col., 2014).

En España, *F. solani* se ha descrito como patógeno de judía (Tello y col, 1985), guisante (Tello y col. 1988), espárrago (Corpas-Hervías y col., 2006), ajo (Basallote y col, 2011) y la *forma specialis cucurbitae* sobre calabaza, calabacín y sandías injertadas (García-Jiménez y col., 1997; Armengol y col., 2000; Gómez-Vázquez y col., 2008). Además, recientemente se ha citado como patógeno en plantas de fresa, tanto en campos de producción (Pastrana y col., 2014), como en viveros de altura (Redondo y col., 2012). En Italia y Méjico también se ha descrito como patógeno de fresa, pero siempre causando la enfermedad junto con otros patógenos (Manici y col., 2005; Ceja Torres y col., 2008).

Se ha demostrado que los genes responsables de la patogenicidad de *F. solani* de guisante se encuentran en cromosomas prescindibles. La presencia de estos cromosomas confiere al hongo ventajas para adaptarse al medio y poder conquistar otros nichos,

incluyendo las plantas. Se especula que estos cromosomas prescindibles son adquiridos a través de un mecanismo de transferencia horizontal entre individuos de una misma especie (Temporini y vanEtten, 2004) o de especies distintas (Deslerone y col., 2004). Por otro lado, Funnell y van Etten (2002) comprobaron que los genes responsables de la patogenicidad de *F. solani* en tomate y zanahoria se encuentran presentes en otras regiones del genoma diferentes a los cromosomas prescindibles.

Actualmente se desconoce la incidencia de la enfermedad causada por *F. solani* en el cultivo de la fresa en viveros y campos de producción de fruto. Pero, al igual que ocurre cuando infecta a otros huéspedes, su incidencia dependerá principalmente de la densidad de clamidosporas en el suelo. Debido a su reciente aparición, no se conoce aún si existe variabilidad genética o diferentes grados de agresividad entre los aislados de *F. solani* que infectan a la fresa y las estrategias de control ante esta enfermedad aún no han sido estudiadas. Las estrategias usadas contra *F. solani* en otros cultivos suelen estar dirigidos a disminuir la densidad de inóculo en el suelo mediante el uso de fumigantes, la eliminación superficial por desinfección del material vegetal, el uso de variedades moderadamente tolerantes (Burton y col., 2012; Ahmad y col., 2012), la rotación de cultivos (Rupe y col., 1997; Oddino y col., 2008) y el control biológico (Rojo y col., 2007; Fernandes y col., 2013).

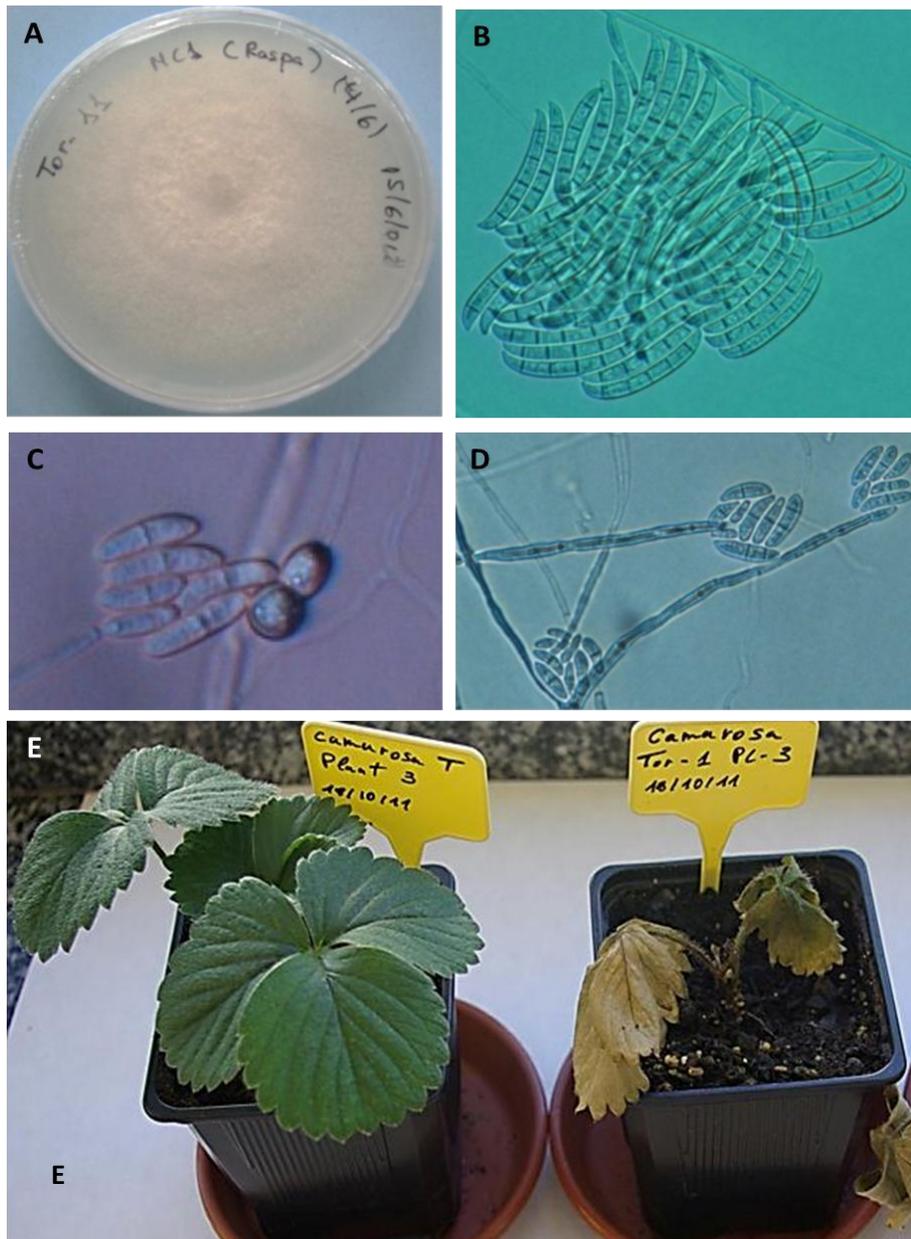


Figura 4. Características morfológicas y patogénicas de *Fusarium solani*. A) Cultivo monospórico de *F. solani* en PDA; B) Macroconidia; C) Clamidosporas terminales en pares y microconidia; (D) Monofiálidas con microconidias en falsas cabezas. E) A la izquierda planta de fresa ‘Camarosa’ sin inocular y a la derecha planta inoculada con *F. solani* con síntomas de necrosis.

**CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA,
PATOGENICA Y MOLECULAR DE *Fusarium* spp.,
Macrophomina phaseolina y *Phytophthora cactorum*
DEL CULTIVO DE LA FRESA. TRES AÑOS DE
PROSPECCIONES EN VIVEROS DE ALTURA Y
CAMPOS DE PRODUCCIÓN DE FRUTO**

CAPÍTULO I.

CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA, PATOGENICA Y MOLECULAR DE *Fusarium* spp., *Macrophomina phaseolina* y *Phytophthora cactorum* DEL CULTIVO DE LA FRESA. TRES AÑOS DE PROSPECCIONES EN VIVEROS DE ALTURA Y CAMPOS DE PRODUCCIÓN DE FRUTO

INTRODUCCIÓN

El cultivo de la fresa en España se realiza en dos etapas y en dos regiones geográficas diferentes. La producción de plantas de fresa tiene lugar en viveros de producción de plantas de fresa (viveros de altura) localizados en las provincias de Ávila, Segovia y Valladolid. La plantación comienza entre los meses de abril y mayo, y las plantas permanecen en el campo hasta el momento de su cosecha y posterior traslado a Huelva en el mes de octubre. Este último proceso es vital, pues en un corto periodo de tiempo la planta es cosechada en Castilla y León y plantada en fincas de producción de fruto de la provincia de Huelva donde tiene lugar su desarrollo vegetativo, floración y fructificación entre los meses de octubre a junio. A partir de unas 50 plantas de fresa de vivero se producen por estolonación alrededor de 400 plantas para su cultivo en Huelva.

En la campaña 2009/10, la incidencia de muerte de plantas en campos de producción de fruto de fresa en la provincia de Huelva aumentó de forma preocupante en los meses de abril y mayo. A partir de plantas muertas de distinta procedencia, se aislaron los hongos patógenos de suelo *F. oxysporum* (Arroyo y col., 2009), *M. phaseolina* (Avilés y col., 2008) y en menor medida *P. cactorum*, fundamentalmente en parcelas que no habían sido desinfestadas (De los Santos, 2010). Sin embargo no se conoce la incidencia actual de cada uno de estos patógenos en viveros de producción de planta y en campos de producción de fruto, para determinar el origen de las infecciones y así poder implementar medidas para su control. En este sentido, la detección e identificación temprana de los patógenos es una de las principales medidas preventivas

de control que permite impedir la introducción de los mismos en campos de cultivo donde aún no se han establecido.

La detección e identificación de hongos fitopatógenos se ha basado tradicionalmente en la observación de los síntomas en campo, el aislamiento del agente causal en medio de cultivo a partir de los tejidos afectados, y la caracterización morfológica de las colonias originadas, siendo este es un proceso largo y costoso. Los síntomas en campo de plantas de fresa infectadas por *F. oxysporum*, *M. phaseolina* y *P. cactorum* son muy similares y difícilmente distinguibles a simple vista. En general, consisten en la flacidez y marchitez de la planta, usualmente de las hojas periféricas, la cual puede terminar en muchos casos en muerte; y, en manchas, de pardas a oscuras en tejidos de raíz y corona, que acaban frecuentemente en necrosis. Los aislados de *M. phaseolina* son fácilmente identificables morfológicamente, tras su crecimiento en un medio de cultivo común como el APD, por el desarrollo de un micelio de color negro y la presencia de microesclerocios globosos, también de color negro, de 50 a 300 μm de diámetro. En cambio, la identificación de los hongos u oomicetos aislados a partir de tejidos afectados es normalmente una tarea complicada si no se poseen conocimientos taxonómicos amplios.

Los métodos moleculares de identificación son rápidos y fiables, y complementan a los métodos morfológicos de detección aportando más sensibilidad, especificidad y posibilidad de cuantificación. La detección mediante métodos moleculares de especies de *Fusarium*, *Macrophomina* y *Phytophthora* se ha basado tradicionalmente en la amplificación por PCR y secuenciación del gen del factor de elongación de la traducción-1 alfa (*EF-1 α*) (O'Donell y col., 1998) y de la región intergénica (ITS) del ADN ribosomal del genoma del hongo (Okubara y col., 2005). Estas mismas regiones también se han utilizado para llevar a cabo análisis filogenéticos de las poblaciones de hongos. En concreto, el gen *EF-1 α* es una de las regiones más informativas del genoma de *Fusarium*, es decir, la que proporciona una mayor variabilidad entre las distintas especies.

Actualmente, la PCR en tiempo real es considerada la mejor técnica para la detección de patógenos de plantas. Esta técnica permite visualizar la reacción durante el proceso de amplificación gracias al uso de una señal fluorescente que incrementa proporcionalmente según el número de amplicones generado. Además, mediante el uso

de una recta patrón, es capaz de cuantificar la cantidad de ADN del hongo presente en la muestra.

Babu y col (2011) desarrollaron un método de PCR en tiempo real para detectar y cuantificar *M. phaseolina* en muestras de suelo y material vegetal. Para ello, llevaron a cabo un análisis de RAPDs de aislados de *M. phaseolina* en el que identificaron y secuenciaron un fragmento específico de este patógeno (SCAR) a partir del cual diseñaron dos parejas de cebadores para ensayos de detección con SYBR® Green y sonda TaqMan®, respectivamente.

Tewoldemedhin y col. (2011) y Li y col. (2011) desarrollaron protocolos de PCR en tiempo real usando SYBR® Green para la detección específica de aislados del género *Phytophthora* y de *P. cactorum*. La detección por SYBR® Green se basa en la emisión de luz de un fluoróforo que se une a estructuras de doble cadena de ADN de forma inespecífica, por lo que se puede intercalar entre los dímeros de cebadores que se forman en la reacción de PCR o en cualquier fragmento que se amplifique de manera no específica. La cuantificación es, por tanto, menos precisa que cuando se usan sondas TaqMan®. Posteriormente, Li y col., (2013) desarrollaron un protocolo para la detección y cuantificación de *P. cactorum* y *P. nicotianae* en plantas y muestras de suelo de viveros de fresa de Japón mediante duplex PCR en tiempo real. Para ello, diseñaron cebadores y sondas TaqMan® en el gen *Ypt 1* (gen de la proteína relacionada con ras) y la región ITS, respectivamente.

Para la detección de *F. oxysporum*, en muestras de suelo y tejidos vegetales de distinta procedencia, Jiménez-Fernández y col. (2010) desarrollaron un protocolo de detección mediante PCR en tiempo real basado en la química SYBR® Green, mejorando un protocolo previamente diseñado por Mishra y col. (2003). Los cebadores utilizados FOF1 (5'-ACATACCACTTGTTGCCTCG-3') y FOR1 (5'-CGCCAATCAATTTGAGGAACG-3') amplifican un fragmento de la región ITS del ADN ribosomal. En este trabajo de tesis se ha desarrollado un protocolo de PCR en tiempo real basado en el uso de un par de cebadores y una sonda TaqMan® diseñadas en el gen EF-1 α , capaz de detectar y cuantificar *F.oxysporum* en muestras de suelo y plantas sintomáticas y asintomáticas de fresa. En el caso de muestras vegetales, la detección se realiza a partir de extractos crudos de plantas, por lo que el protocolo no precisa de extracción de ADN. Esto permite el análisis de un elevado número de

muestras de una forma rápida y menos costosa. En el protocolo se ha incluido además un control interno positivo para eliminar la detección de falsos negativos debido a la posible presencia de inhibidores de la ADN polimerasa en el suelo o en los extractos crudos de las plantas.

Sin embargo, ninguno de los dos protocolos anteriores es capaz de diferenciar aislados de *F. oxysporum* patógenos de los no patógenos. La identificación de aislados patógenos de *F. oxysporum* se lleva a cabo mediante pruebas de patogenicidad, las cuales son laboriosas, de larga duración, y en las que sólo se permite el análisis de un limitado número de aislados por ensayo. Por ello, se han desarrollado técnicas moleculares, basadas en la detección de factores de patogenicidad y marcadores moleculares, que permitan su discriminación sin la necesidad de inocular el patógeno en la planta.

Los factores de patogenicidad son muy diversos y constituyen un amplio abanico de genes cuya presencia o activación permiten al hongo abandonar su estado saprófito para convertirse en patógeno (Gómez-Lama, 2012). Existen genes que codifican factores de transcripción que modulan la expresión de otros genes mediante regulación transcripcional. En este sentido, Martín-Rodríguez y col. (2005) y Ramos y col. (2005) describieron un nuevo gen que codifica para el factor de transcripción denominado *Fusarium transcription factor 1 (ftf1)* que está presente en cepas patógenas de *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli* pero ausente en cepas no patógenas. Este gen se expresa en *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli* durante la colonización de la judía (de Vega-Bartol y col., 2011) y su expresión está relacionada con el grado de agresividad de la cepa patógena. La relación de *ftf1* con la patogenicidad ha sido también observada en *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* y f. sp. *cubense* (de Vega-Bartol y col., 2009; Ghag y col., 2014). Pero no existen referencias acerca de la relación entre dicho gen y la patogenicidad de los aislados de *F. oxysporum* procedentes del cultivo de la fresa.

Por otro lado, se han desarrollado marcadores moleculares para identificar las *formae speciales*, razas o patotipos de *F. oxysporum*. Mediante la amplificación aleatoria de ADN polimórfico (RAPD) se detectó un fragmento de ADN correspondiente a un elemento transponible, específico de aislados de *F. oxysporum* patógenos de fresa (Suga y col., 2013). La secuencia de este fragmento sirvió para el diseño de cebadores específicos para la detección de *F. oxysporum* f. sp. *fragariae*

(Suga y col., 2013). Este método de detección específica se validó usando cepas patogénicas y no patogénicas de *F. oxysporum* procedentes de plantas de fresa cultivadas en Japón.

OBJETIVOS

Los objetivos de este trabajo han sido estudiar la incidencia de *F. oxysporum*, *M. phaseolina* y *P. cactorum* en suelos y material vegetal de viveros de producción de plantas de fresa de Castilla y León y de campos de producción de fruto de la provincia de Huelva; desarrollar o aplicar métodos moleculares fiables, sensibles y específicos para detectar la presencia de estos patógenos en suelo y en material vegetal, incluso antes de que se hayan desarrollado síntomas de enfermedad; caracterizar molecularmente los aislados de *F. oxysporum*, *M. phaseolina* y *P. cactorum* que infectan a fresa mediante secuenciación y análisis filogenético; y caracterizar patogénicamente los aislados de *Fusarium* spp. procedentes de suelo y de plantas de fresa con o sin síntomas de enfermedad.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestreo

Suelos procedentes de viveros de altura

Las muestras de suelo se tomaron durante tres años consecutivos (2011, 2012 y 2013) en tres viveros comerciales de plantas de fresas localizados en las principales provincias productoras de planta de fresa de España: Segovia, Ávila y Valladolid. En cada parcela de 500 ha, se tomaron aleatoriamente doce muestras de 20 cm de profundidad, con una barrena de 35 mm de diámetro, de suelos desinfestados con diferentes productos químicos antes de la plantación de fresas y de suelos no desinfestados donde se había cultivado fresa en la campaña anterior.

Suelos procedentes de campos comerciales de producción de fruto

Las prospecciones se llevaron a cabo durante tres campañas consecutivas (2011/12, 2012/13 y 2013/14) en dos campos comerciales de producción de fruto de fresa localizados en dos zonas geográficas de la provincia de Huelva: Comarca Litoral (Palos de la Frontera) y Comarca Costa (Cartaya). En cada campo se muestrearon dos y tres macrotúneles respectivamente, cada uno de ellos con seis lomos. En cada lomo, se tomaron aleatoriamente cinco muestras de suelo a la profundidad mencionada anteriormente, en suelos desinfestados antes de la plantación (suelo pre-plantación) y al finalizar la campaña (suelo post-plantación). Además, se tomaron muestras en aquellos puntos donde se recogieron plantas con síntomas o muertas a lo largo de cada campaña.

Plantas madre prebase

Se muestrearon plantas prebase, en tres viveros de altura pertenecientes a las provincias de Segovia, Ávila y Valladolid, durante tres años consecutivos (2011, 2012 y 2013). El primer año se analizaron un total de 314 plantas de diez variedades distintas (Amiga, Benicia, Candonga, Camarosa, Sabrina, Favette, Fortuna, Primoris, San Andreas y Viva), el segundo año se analizaron 180 plantas de nueve variedades (Benicia, Candonga, Camarosa, Sabrina, Festival, Fortuna, Primoris, San Andreas y Viva) y el tercero, un total de 207 plantas de las variedades Candonga, Fortuna, Merced y Sabrina.

Plantas certificadas o plantas hija

Durante tres años consecutivos (2011, 2012 y 2013) se analizaron plantas certificadas o plantas hija, antes de su trasplante a campos de producción, procedentes de 23 viveros de altura localizados en Ávila, Segovia, Valladolid, Holanda y Polonia. En la campaña 2011 se muestrearon 480 plantas hijas de once variedades distintas (Amiga, Antilla, Benicia, Camarosa, Candonga, Festival, Fortuna, Primoris, Sabrina, San Andreas y Splendor), en 2012 se analizaron 200 plantas de seis variedades (Camarosa, Candonga, Fortuna, San Andreas, Sabrina y Splendor), y en 2013 se analizaron 340 plantas de siete variedades (Camarosa, Fortuna, Honor, Merced, Primoris, Sabrina y Splendor).

Plantas con síntomas de enfermedad o muertas

Una vez al mes durante tres campañas consecutivas (2011/12, 2012/13 y 2013/14) se tomaron muestras de plantas con síntomas o plantas muertas en los mismos macrotúneles donde se realizaron las prospecciones de suelo de los campos de producción de fruto de la provincia de Huelva. Las plantas se llevaron al laboratorio para su análisis.

Procesamiento de las muestras de suelo

Las muestras de suelo se secaron a temperatura ambiente, se pulverizaron con ayuda de un mortero, se homogeneizaron y se tamizaron con un tamiz de 1 mm de luz de malla. Las 12 muestras de suelo de cada parcela de vivero se unieron y se tomaron tres submuestras para analizar. Para el análisis de los suelos de campos de producción de fruto de Huelva, las cinco muestras de cada lomo se unieron en una y se hicieron tres réplicas por lomo o, alternativamente se unieron todas las muestras de un macrotúnel en una sola muestra compleja y se analizaron tres réplicas por macrotúnel. La cuantificación del inóculo (UFC) de *F. oxysporum* y *M. phaseolina* en el suelo se realizó utilizando el método tradicional de dilución en placa y siembra posterior en medio semiselectivo y por otra parte, mediante PCR en tiempo real con cebadores y sondas específicas para cada hongo.

Aislamiento del patógeno en medio de cultivo semiselectivo

Los aislamientos en medio semiselectivo se llevaron a cabo durante la primera campaña (2011-2012). El procedimiento utilizado varió según el patógeno.

Fusarium spp

Se añadieron 3 ó 5 g de suelo tamizado a un frasco de 250 mL de capacidad, conteniendo 150 mL de AA al 0.1% (DIFCO™). Los frascos se agitaron durante 1 min en un agitador magnético, posteriormente se tomó 1 mL y se extendió en una placa de Agar Jugo V8, disponiendo un total de cinco placas/muestra de suelo. El mismo

procedimiento se repitió para las diluciones (10^{-1} y 10^{-2}) de cada una de las muestras. Las placas se incubaron a 24°C durante dos días en oscuridad y 3 días más con fotoperiodo de 12 h.

M. phaseolina

En un vaso de precipitado de 1 L de capacidad, conteniendo 250 mL de una solución al 0.4% de hipoclorito de sodio, se añadieron 10 g de suelo homogeneizado. El suelo y la solución se mezclaron con una batidora convencional en dos pasos de mezcla durante 30 s y reposo durante tres minutos, repetidos hasta un total de tres veces. La mezcla final se pasó a través de un tamiz de 45 μ m y los residuos que permanecieron en el tamiz se lavaron bajo el grifo durante un minuto. Posteriormente, el contenido residual del tamiz se transfirió, usando ADE, a un vaso de precipitado de 100 mL (dilución 1:10) en agitación. Se sembraron en césped alícuotas de 1 mL de la solución en agitación en cinco placas con medio PDA-DOPCNB preparado con uno o dos días de antelación. Las placas se incubaron en oscuridad a 28°C durante 7 días y se cuantificó el número de UFC de *M. phaseolina*.

Extracción ADN de las muestras de suelo

El ADN genómico total del suelo se obtuvo a partir tres réplicas de 500 mg de suelo por muestra mediante el uso de PowerSoil® DNA Isolation Kit de MoBio según instrucciones del fabricante. La concentración de ADN se determinó en un espectrofotómetro ND-100 NanoDrop (NanoDrop Products, Wilmington, DE). El ADN obtenido se utilizó para la amplificación y cuantificación de *F. oxysporum*, *M. phaseolina* y *P. cactorum* mediante PCR en tiempo real. Los resultados se expresaron como la media de las tres réplicas incluyendo los resultados de muestras negativas. Debido a la heterogénea distribución de los patógenos en el suelo no se muestran las desviaciones estándar.

Procesado del material vegetal

Las plantas (plantas madre prebase, plantas hija o plantas sintomáticas de campos de cultivo) se lavaron bajo el grifo para eliminar restos de tierra, se cortó la parte aérea de las plantas, y las raíces a una distancia de unos 7 cm de la corona, se desinfectaron durante dos minutos sumergiéndolas en una solución de hipoclorito de sodio al 1% y se enjuagaron en agua destilada (AD). Posteriormente, cada planta se dividió en dos partes, una de ellas se utilizó para aislamientos y la otra para la detección de *F. oxysporum*, *M. phaseolina* y *P. cactorum* mediante PCR en tiempo real.

Aislamiento del patógeno en medio de cultivo

Se tomaron muestras de raíces nuevas y viejas, corona y peciolo de cada una de las plantas, se desinfectaron con hipoclorito de sodio al 1% durante 1 min, se enjuagaron en agua destilada estéril y se dejaron secar en campana de flujo laminar. El tejido vegetal se recortó mediante bisturí estéril en pequeñas piezas que se colocaron en placas de APD (suplementado con sulfato de estreptomicina (0.5g/l)) y se incubaron a 25°C durante 2 días en oscuridad y 5 días más en fotoperiodo de 12 h (OSRAM L 18 W/21-840 Hellweiss Lumilux Cool White, 75 μ E m⁻² s⁻¹). Posteriormente, se anotó la presencia de *Fusarium spp*, *Oomicetes* y *M. phaseolina* crecidos a partir de cada una de las plantas analizadas. Se hicieron réplicas de los hongos de interés y se obtuvieron cultivos monoconídicos de las especies de *Fusarium*, monoesclerociales de *M. phaseolina* y monozoospóricos de las especies de *Phytophthora* y se conservaron en glicerol 80% a -80°C para su posterior análisis.

Preparación de extractos crudos a partir del material vegetal

La mitad de cada planta destinada al análisis mediante PCR tiempo real se pesó y se introdujo en una bolsa de extracción (BIOREBA®) en presencia de 1/10 (p/v) de tampón PBS (0.14 M NaCl, 2.7 mM KCl, 8.1 mM Na₂HPO₄ • 2 H₂O, 1.76 mM KH₂PO₄, pH 7.2-7.4) suplementado con 2% Polyvinylpyrrolidona (PVP-40) y 0.2% sodium diethyl dithiocarbamate (DIECA). El tejido vegetal se homogeneizó mediante un rodillo manual hasta obtener un extracto crudo. Las bolsas BIOREBA® poseen en su

interior una malla fina que permite retener los restos de material vegetal y separarlos del extracto crudo que se usará como muestra en la PCR. Del extracto obtenido se tomó 1 mL, se incubó a 95°C durante 10 minutos y se conservó a -20°C. Para el análisis por PCR en tiempo real se usaron como muestra 5 µL de una dilución 1:20 (v:v) en ADE.

Detección y cuantificación mediante PCR en tiempo real

Las reacciones de PCR en tiempo real para la detección y cuantificación de *F. oxysporum*, *M. phaseolina* y *P. cactorum* se llevaron a cabo en placas de 96 pocillos en un termociclador Chromo 4.0 (Bio-Rad), utilizando el kit SensiMix™ Probe (Bioline). Los cócteles de reacción para cada patógeno contenían tampón SensiMix™ (Bioline) 1x, 900 nM de cada uno de los primers, 100 nM / 150 nM de sonda TaqMan (*F. oxysporum* / *M. phaseolina* y *P. cactorum*, respectivamente), 1 mg/mL BSA y 5 µl de extracto diluido de planta o ADN genómico de suelo. Los cebadores y las sondas utilizadas se describen en la Tabla I.1. El ciclado de las reacciones de PCR consistió en un ciclo a 95°C durante 10 min seguido de 45 ciclos de 15 s a 95°C, 30 s a 61°C y 30 s a 72°C para *F. oxysporum*, y 15 s a 95°C y 60 s a 61°C para *M. phaseolina* y *P. cactorum*.

Para descartar falsos negativos, se introdujo un control positivo interno en las muestras analizadas consistente en 0.05 ng de ADN del bacteriófago lambda, el cual se amplificó en reacciones paralelas de PCR utilizando el tampón SensiMix™ SYBR® Green No-Rox (Bioline) 1x, 50 nM de cada cebador (Tabla I.1), 1 mg/mL BSA y 5 µL de extracto diluido de planta o ADN genómico de suelo. Las condiciones de amplificación fueron las mismas que las descritas anteriormente.

Para la cuantificación de los patógenos en las muestras de suelo y en los extractos crudos de las plantas se construyeron dos curvas estándar. La primera de ellas se realizó a partir de diluciones seriadas de ADN genómico de los aislados de *M. phaseolina* MAC16, *F. oxysporum* G2-4 y *P. cactorum* PC305 diluido en extracto de planta de fresa sana, o en ADN extraído a partir de 500 mg de suelo estéril para la cuantificación en planta o en suelo, respectivamente. La segunda curva de calibración se realizó para cuantificar el número de UFC/g suelo de *F. oxysporum* y *M. phaseolina*. Para ello, se infestaron 500 mg de suelo estéril con diluciones seriadas de una suspensión de conidias de concentración conocida de *F. oxysporum*, o de

microesclerocios de *M. phaseolina*, respectivamente (tres réplicas de cada dilución) y seguidamente se extrajo el ADN de cada una de las réplicas. Paralelamente se tomaron tres réplicas de 1 mL de cada una de las diluciones y se sembraron en placas de APD. Las placas de *F. oxysporum* se incubaron durante 5 días a 25 °C en fotoperíodo de 12 h., y las de *M. phaseolina* se incubaron durante 5 días a 28°C en oscuridad. Transcurrido este tiempo, se anotó el número de colonias crecidas por placa. El valor de los ng de ADN, y de las UFC de cada muestra se obtuvo extrapolando los valores de C_T obtenidos en la amplificación usando el software de análisis MJ Opticon Monitor versión 3.1. En el caso de las muestras de suelo, se analizaron tres réplicas técnicas a las que se calculó el promedio y el error estándar.

Tabla I.1. Secuencias de cebadores y sondas TaqMan usadas en este estudio para la detección y cuantificación de *Fusarium oxysporum*, *Macrophomina phaseolina*, *Phytophthora cactorum* en suelos y en plantas de fresa mediante PCR en tiempo real. Se incluye el control interno positivo basado en el bacteriófago lambda (λ).

Organismo	Nombre	Secuencia (5'-3')	Tamaño	Química	Gen diana	Referencia
<i>Fusarium oxysporum</i>	Foxy-F	GACCTGGYGGGGTATTTCTCA	239 pb	TaqMan®	Factor de elongación 1 α (<i>EF-1α</i>)	Capítulo 4 de esta tesis
	Foxy-R	ACCGCACTGGTAGATCAAGTG				
	Foxy-P	FAM-AAGTCAACATACTGACATCGT-MGB				
<i>Macrophomina phaseolina</i>	MpTqK-F	GCCTTACAAGGGTCTCGTCAT	150 pb	TaqMan®	SCAR	Babu y col., 2011
	MpTqK-R	CCCTTGGCGATGCCGATA				
	MpTq-P	6-FAM-CAGGCCACAGGATCTT-MGB				
<i>Phytophthora cactorum</i>	Ypt-cac-F3	CATGGCATTATCGTGGTGTA	122 pb	TaqMan®	Proteína ras (<i>Ypt1</i>)	Li y col., 2013
	Ypt-cac-R3	GCTCTTTTCCGTCGGC				
	P-cac4	VIC-CGGACCAGGAGTCGTTCAACAAC-MGB				
Bacteriófago Lambda	λ -F	CTGCGGCCTTTTACACATGA	71 bp	SYBR® Green		Capítulo 4 de esta tesis
	λ -R	AAACGGCAGGAGGTTGTTAGC				

Caracterización molecular de los aislados mediante secuenciación y análisis filogenético

Se realizó la caracterización molecular de los aislados procedentes de plantas sintomáticas o muertas, caracterizados morfológicamente como *Fusarium* spp., *M. phaseolina* y *Oomycetes*.

Extracción de ADN genómico

La extracción de ADN se realizó utilizando el ISOLATE II Plant DNA Kit (Bioline) según las instrucciones del fabricante con algunas modificaciones: el micelio en crecimiento activo de cada uno de los hongos se raspó con un bisturí estéril y se introdujo en tubos de 0,5 mL (no más de 100 mg por tubo). El material fúngico se trituró mediante un pistilo acoplado a un taladro en presencia del tampón de extracción y se prosiguió el protocolo del fabricante. La concentración de ADN se determinó en un espectrofotómetro ND-100 NanoDrop (NanoDrop Products, Wilmington, DE). El ADN obtenido se utilizó para amplificación por PCR y secuenciación.

Amplificación, purificación y secuenciación de fragmentos de ADN

Los aislados de *Fusarium* spp. y de *M. phaseolina* se caracterizaron mediante la amplificación seguida de secuenciación de un fragmento del gen del factor de elongación de la transcripción 1α (*EF-1 α*) con los cebadores EF1 y EF2 (O'Donnell y col., 1998) y EF446f y EF1035r (Inderbitzin y col., 2005), respectivamente (Tabla I.2). Para la caracterización de los *Oomycetes* se amplificó y secuenció la región ITS1 del ADN ribosomal usando los cebadores ITS6 e ITS7 (Cooke y col., 2000) (Tabla I.2). Los productos de PCR se visualizaron en un transiluminador mediante electroforesis en gel de agarosa al 1,5% en TAE 0,5x (Sambrook y col., 1989 tesis CGL) gracias a la tinción con RedSafe™ (Intron Biotechnology), usando como marcador de peso molecular la escalera de 100 pb (Intron Biotechnology). Los productos de PCR se purificaron a partir de la mezcla de reacción o desde la banda recortada en el gel de agarosa mediante el uso del kit FavorPrep™ Gel/PCR Purification (Favorgen). Los fragmentos se secuenciaron

en ambos sentidos por la empresa Stabvida (Portugal) y los resultados se compararon con las secuencias existentes en las bases de datos del GeneBank y *Fusarium-ID* mediante el programa BLAST.

Tabla I.2. Cebadores utilizados en este estudio para la identificación de *Fusarium* spp., *M. phaseolina* y *Oomycetes* mediante amplificación por PCR y secuenciación.

Cebadores	Secuencia (5'-3')	Región	Referencia
EF1	ATGGGTAAGGARGACAAGAC	<i>EF-1α</i>	O'Donnell y col., 1998
EF2	GGARGTACCAGTSATCATGTT		
EF446f	TCACTTGATCTACAAGTGCGGTGG	<i>EF-1α</i>	Inderbitzin y col., 2005
EF1035r	GGTGATACCACGCTCACGCTC		
ITS6	GAAGGTGAAGTCGTAACAAGG	ITS1	Cooke y col., 2000
ITS7	AGCGTTCATCGATGTGC		

Análisis filogenético

Se analizó la secuencia parcial del gen *EF-1 α* de 92 aislados de *Fusarium* spp. y de 22 aislados de *M. phaseolina*, y la región ITS1 de 13 *Oomycetes* procedentes de plantas y suelos de campos de producción de fresa. Las secuencias parciales se alinearon usando el programa Mega 5.1 (Tamura y col., 2011) y se editaron manualmente. Se llevó a cabo el análisis filogenético de las mismas mediante la construcción de un árbol de Máxima Probabilidad (Maximum Likelihood, ML) utilizando el modelo Kimura-2 parámetros (K2) con una distribución gamma (G=5). En el análisis de *Fusarium* se utilizó como raíz del árbol un aislado de *Fusarium staphyleae* (Nº acceso del GenBank DQ247563) y se calculó la diversidad nucleotídica (π) dentro de cada población (especie) mayor de diez individuos.

Diseño de una sonda TaqMan® para la detección y cuantificación de F. oxysporum mediante PCR en tiempo real

Las secuencias amplificadas de la región parcial de *EF1- α* obtenidas en este estudio se alinearon mediante el programa MEGA 6 (Tamura y col., 2013) junto con dos secuencias de esta misma región de cada una de las especies de *Fusarium* reportadas en el GeneBank en 2011: *Nectria rigidiuscula*, *F. denticulatum*, *F. dimerum*,

Giberella fijkuroi, *F. globosum*, *F. guttiforme*, *F. hostae*, *G. konza*, *F. lactis*, *F. mangiferae*, *F. merismoides*, *F. miscanthi*, *F. napiforme*, *F. nelsonii*, *F. nisikadoi*, *F. nurragi*, *F. nygamai*, *F. phyllophilum*, *F. polyphialidicum*, *F. pseudoacantophylum*, *F. pseudocircinatum*, *F. graminearum*, *F. pseudograminearum*, *F. pseudonygamai*, *F. ramigenum*, *F. sacchari*, *F. incarnatum*, *F. sterilihyphosum*, *F. subglutinans*, *F. succisae*, *G. thapsina*, *F. torulosum*, *F. tricinctum*, *F. udum*, *F. venenatum*, *G. intermedia*, *G. moniliformis*, *F. lateritium clado I*, *F. lateritium clado IIB*, *F. lateritium clado III*, *G. zaeae*, *F. culmorum*, *F. poae*, *F. sambucinum*, *F. sporotrichioides*, *F. foetens*, *F. acutatum*, *F. andiyazi*, *F. redolens*, *F. cereales*, *F. commune*, *F. solani*, *F. acuminatum*, *F. anthophilum*, *F. armeniacum*, *F. avenaceum*, *F. aywerte*, *F. begoniae*, *F. beomiforme*, *F. brevicatenulatum*, *F. bulbicola*, *F. chlamydosporum*, *F. circinatum*, *F. falciforme*, *F. equiseti*, *F. proliferatum* y *F. decemcellulare*.

Se identificaron regiones consenso para *F. oxysporum* y variables para el resto de las especies donde se diseñaron un par de cebadores y una sonda TaqMan® usando el programa PrimerExpress® software versión 2.0 (Applied Biosystems®). La sonda específica se marcó con el fluoróforo FAM en su extremo 5' y una molécula MGB en el extremo 3' para incrementar la T_M y aumentar la especificidad. Para determinar la sensibilidad de la reacción se amplificaron diluciones seriadas (10² a 10⁻⁶) de ADN genómico de *F. oxysporum* de fresa (aislado G2-4). La especificidad de la reacción se comprobó incluyendo en la reacción de amplificación otros aislados de *Fusarium* spp. y de otras especies de hongos no relacionados con el género *Fusarium* (Tabla I.3).

Tabla I.3. Aislados fúngicos usados para comprobar la especificidad de la sonda TaqMan® diseñada para la detección de *F. oxysporum*.

Aislado	Especie	Huésped	Cedido por
Foal GC 1,6	<i>F.oxysporum f.sp allium</i>	Ajo	Dra. M ^a José Basallote
Foal Balazote C2 PL1 DB	<i>F.oxysporum f.sp allium</i>	Ajo	Dra. M ^a José Basallote
Foal GR VV S1 D2 L	<i>F. oxysporum f.sp. allium</i>	Ajo	Dra. M ^a José Basallote
Fod	<i>F. oxysporum f. sp dianthi</i>	Clavel	Dra. Ana Pérez
Fod Candela	<i>F. oxysporum f. sp dianthi</i>	Clavel	Dr. José M ^a Melero
Fod Albatros	<i>F. oxysporum f. sp dianthi</i>	Clavel	Dr. José M ^a Melero
Fo MW-1	<i>F. oxysporum f.sp. asparragi</i>	Espárrago	Dra. M ^a José Basallote
Fo MW-3-1	<i>F. oxysporum f.sp. asparragi</i>	Espárrago	Dra. M ^a José Basallote
Foa GR-4S-C1	<i>F. oxysporum f.sp. asparragi</i>	Espárrago	Dra. M ^a José Basallote
Foa GR-4S-B3	<i>F. oxysporum f.sp. asparragi</i>	Espárrago	Dra. M ^a José Basallote

Focic 7982	<i>F. oxysporum f.sp. ciceris</i> Raza 0	Garbanzo	Dra. Blanca Landa
Focic 8602	<i>F. oxysporum f.sp. ciceris</i> Raza 0	Garbanzo	Dra. Blanca Landa
Focic 8012	<i>F. oxysporum f.sp. ciceris</i> Raza 5	Garbanzo	Dra. Blanca Landa
Focic 8408	<i>F. oxysporum f.sp. ciceris</i> Raza 5	Garbanzo	Dra. Blanca Landa
Fog	<i>F. oxysporum f. sp gladioli</i>	Gladiolo	Dra. Ana Pérez
Fopi 207	<i>F.oxysporum f.sp pisi</i> Raza 5	Guisante	Dra. Blanca Landa
Fopi 35	<i>F.oxysporum f.sp pisi</i> Raza 5	Guisante	Dra. Blanca Landa
Fom	<i>F.oxysporum f.sp melonis</i>	Melón	Dra. Ana Pérez
Fom CR-8101	<i>F.oxysporum f.sp melonis</i>	Melón	Dra. Blanca Landa
Fom CR-10901	<i>F.oxysporum f.sp melonis</i>	Melón	Dra. Blanca Landa
Foc	<i>F. oxysporum f. sp canariensis</i>	Palmera	Dra. Ana Pérez
Fop 2 ^a	<i>Fusarium oxysporum f. sp pini</i>	Pino	Dr. Fernando Alves
Fop 2B	<i>Fusarium oxysporum f. sp pini</i>	Pino	Dr. Fernando Alves
Foly RAF 70	<i>F.oxysporum f.sp lycopersici</i> Raza 1	Tomate	Dra. Blanca Landa
Foly 071	<i>F.oxysporum f.sp lycopersici</i> Raza 0	Tomate	Dra. Blanca Landa
For-ly 10/05-1	<i>F. oxysporum f.sp. radiceis-lycopersici</i>	Tomate	Dr. Julio Tello
For-ly 10/05-20	<i>F. oxysporum f.sp. radiceis-lycopersici</i>	Tomate	Dr. Julio Tello
G2-2	<i>F. oxysporum</i>	Fresa	Dr. Francisco Arroyo
G2-4	<i>F. oxysporum f. sp. fragariae</i>	Fresa	Dr. Francisco Arroyo
E2-1	<i>F. oxysporum</i>	Fresa	Dr. Francisco Arroyo
G3-1	<i>F. proliferatum</i>	Fresa	Dr. Francisco Arroyo
Fp	<i>F. proliferatum</i>		Dra. M ^a José Basallote
Fver CECT 2982	<i>F. verticilloides</i>		CECT
Fsp	<i>F. sporotrichioides</i>		Dra. Ana Pérez
Fsam	<i>F. sambucinum</i>		Dra. Ana Pérez
Fgr	<i>F. graminearum</i>		Dra. Ana Pérez
Fcu	<i>F. culmorum</i>		Dra. Ana Pérez
Fpoe	<i>F. poae</i>		Dra. Ana Pérez
F.av	<i>F. avenaceum</i>		Dra. Ana Pérez
Fsp C2*	<i>F. equiseti</i>		Dra. M ^a José Basallote
M16	<i>Macrophomina phaseolina</i>		Dr. Manuel Avilés
Cac CECT 20240	<i>Colletotrichum acutatum</i>		CECT
Pcac	<i>Phytophthora cactorum</i>		PF-305

Caracterización patogénica de los aislados mediante test de patogenicidad

Para caracterizar patogénicamente los *Fusarium* spp. aislados de plantas de fresa enfermas, durante las prospecciones realizadas en esta tesis, se realizaron un total de nueve pruebas de patogenicidad en condiciones controladas en cámara de cultivo. Los inóculos utilizados fueron aislados monoconídicos (Summerell y col., 2006) de distintas especies de *Fusarium* previamente identificadas morfológica y molecularmente (Tabla I.17). Todos los aislados procedían de España, excepto dos aislados de *F. oxysporum* f. sp. *fragariae* estadounidenses y cinco japoneses de probada patogenicidad en fresa en sus respectivos países, que se usaron como controles de la enfermedad. Se utilizaron plantas de fresa del cultivar Camarosa procedentes de cultivo de meristemo *in vitro* que se aclimataron durante un mes en macetas de 9 cm de diámetro conteniendo turba humedecida estéril (Gramoflor Blumenerde®) (70 min a 121°C, dos días consecutivos) mezclada con perlita estéril en una proporción 1:1 en condiciones controladas de cámara de cultivo, hasta su inoculación.

Incremento del inóculo e inoculación

El inóculo se incrementó en frascos con 150 mL de CPD (DIFCO™) con cinco discos de 8 mm de diámetro tomados del margen en crecimiento activo de las colonias fúngicas en PDA (DIFCO™). Los cultivos se incubaron durante 10 días a temperatura ambiente (25°C) en un agitador orbital a 150 r.p.m. con un fotoperiodo de 12 h. Las suspensiones de conidias se filtraron a través de cuatro capas de gasa estéril, su concentración se estimó mediante conteo en un hematocitómetro (cámara de Thoma) y se ajustó a 10^6 conidias/mL.

Las plantas se extrajeron cuidadosamente del sustrato de la maceta y se inocularon por inmersión de las raíces y la corona en la suspensión de conidias durante 30 min. Como controles se utilizaron plantas que se trataron de forma similar a las inoculadas, excepto por la inmersión en CPD en el que se habían colocado cinco discos de PDA de 8 mm sin micelio de hongo. Las plantas inoculadas se transplantaron a macetas de 13 cm de diámetro con turba humedecida estéril (Gramoflor Blumenerde®) (70 min a 121°C, dos veces) mezclada con perlita estéril (Gramoflor Premium Perlite®)

en una proporción 9:1. Se incluyeron ocho macetas por cada aislado. Todas las macetas se dispusieron durante tres meses en una cámara de cultivo ajustada a 25/18°C y 40-75% HR día/noche y 16 h de luz. La disposición de las plantas en la cámara de crecimiento fue completamente al azar. Las macetas se regaron con agua según las necesidades hídricas de las plantas y se fertilizaron a los 15 días del trasplante con 0,3 g de Osmocote®.

Evaluación de la enfermedad

La patogenicidad de los aislados de *Fusarium* sp. se estimó mediante i) el porcentaje de necrosis en corona, ii) el porcentaje de raíces nuevas, iii) el porcentaje de plantas muertas y iv) en algunos casos, el peso de las plantas.

La observación de la parte aérea de las plantas se realizó semanalmente, anotándose la descripción de los síntomas o su ausencia. Al final de cada ensayo, las plantas retiradas de las macetas se lavaron cuidadosamente bajo el grifo para eliminar los restos de tierra, se dejaron secar superficialmente en un papel de filtro y se observó la sintomatología del sistema radical. Además, se hicieron aislamientos en APD de trozos de raíz, corona y peciolo de las plantas muertas, las plantas con síntomas y de plantas asintomáticas, así como de las testigo no inoculadas.

Análisis estadístico

Los datos se analizaron mediante análisis de varianza (ANOVA) de acuerdo con un diseño completamente al azar. Previamente se realizó la transformación angular ($\sqrt{Y/100}$) de los datos porcentuales. Las medias se compararon utilizando el test de mínima diferencia significativa LSD ($P=0,05$).

Caracterización patogénica de los aislados mediante amplificación específica

Los aislados de *F. oxysporum* caracterizados anteriormente mediante test de patogenicidad, también fueron analizados para determinar la presencia o ausencia de los genes que codifican para el factor de transcripción *ftf1* y el marcador molecular *fofra*.

La extracción de ADN genómico de los aislados se realizó como se ha explicado anteriormente en este capítulo. La amplificación por PCR de un fragmento del gen *ffl1* se realizó según Gómez-Lama (2012) y se llevó a cabo en un volumen total de 25 µL conteniendo 2,5 µL de tampón BIOTAQ™ (Bioline) 1x, 3 mM de MgCl₂, 0,2 µM de cada uno de los cebadores (Tabla I.4), 0,2 mM de cada dNTP, 0,6 U de ADN polimerasa BIOTAQ™ (Bioline) y 50 ng de ADN genómico. Las reacciones se realizaron en un termociclador MJ Research PTC-100 (Bio-Rad) con un programa de desnaturalización inicial de 5 min a 94°C, seguido de 40 ciclos de 1 min a 94°C, 1 min a 65°C y 2 min a 72°C. Los productos de amplificación (796 pb) se separaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% en TAE 0.5x (Sambrook y col., 1989 tesis CGL).

La amplificación por PCR del fragmento *fofra* se realizó según Suga y col., (2013), en un volumen final de 10 µL conteniendo tampón BIOTAQ™ (Bioline) 1x, 2 µM de cada uno de los cebadores (Tabla I.4), 2,5 U de DNA polimerasa BIOTAQ™ (Bioline) y 50-100 ng de ADN genómico. La reacción se llevó a cabo en las condiciones de 2 min a 94°C y 30 ciclos de 1 min a 94°C, 1 min a 63°C y 1 min a 72°C. Los productos de amplificación (239 pb) se separaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 2,5% en TAE 0.5x (Sambrook y col., 1989 tesis CGL).

Como controles negativos se usaron mezclas de reacción sin ADN molde. Los geles se tiñeron con RedSafe™ (Intron Biotechnology) y se visualizaron en un transiluminador. Como marcador de peso molecular se usó una escalera de 100 pb (Intron Biotechnology).

Tabla I.4: Cebadores usados en este estudio para la detección del factor de transcripción *ffl1* y el marcador molecular *fofra* en aislados de *Fusarium oxysporum*

Cebadores	Secuencia (5'-3')	Tamaño	Región	Referencia
B5 M17.5 ^a	CGTTTCCCTACTAGATCACACCCA GCTCCTGTATCTCCTCGGAG	796 pb	<i>ffl1</i>	Ramos y col., 2007
FofraF FofraR	CAGACTGGGGTGCTTAAAGTT AACCGCTAGGGTCGTAACAAA	239 pb	<i>fofra</i>	Suga y col., 2013

Análisis muestras de agua

Durante el último año de muestreo se tomaron muestras de agua de riego en las fincas de Palos de la Fra. y Cartaya. El agua se filtró con ayuda de una jeringa a través de un filtro de 0,45 µm. A partir de estas muestras se extrajo el ADN genómico total mediante el kit de extracción PowerSoil® DNA Isolation Kit de MoBio con modificaciones del primer paso. Antes de comenzar la extracción, el filtro aún húmedo se cortó en pequeños segmentos que se colocaron en los 'Bead Tube' incluidos en el kit. Posteriormente, el proceso continuó según instrucciones del fabricante. La concentración de ADN se determinó en un espectrofotómetro ND-100 NanoDrop (NanoDrop Products, Wilmington, DE). El ADN obtenido se utilizó para detectar y cuantificar, mediante PCR en tiempo real el oomiceto *P. cactorum*.

RESULTADOS

Detección y cuantificación de *F. oxysporum*, *M. phaseolina* y *P. cactorum* en muestras de suelo

Suelos de viveros de altura de Castilla y León

Los resultados de los aislamientos de muestras de suelo en medio de cultivo semiselectivo mostraron que *Fusarium* spp. se detectó en los suelos de viveros de las tres provincias analizadas, siendo los niveles de aproximadamente el doble en los suelos sin desinfestar que en los desinfestados en la provincia de Segovia y muy similares en la provincia de Valladolid y en suelos desinfestados de Ávila. Este sistema de análisis demostró una baja sensibilidad de detección de *M. phaseolina*, ya que no se detectó este patógeno en los suelos de viveros de altura desinfestados o no, durante la campaña 2011/12, aunque sí se detectó mediante PCR en tiempo real. Al disponer de una herramienta molecular para la detección sensible y específica de *M. phaseolina*, *F.*

oxysporum y *P. cactorum* se desestimó el análisis de suelo por métodos tradicionales en las siguientes campañas.

Los resultados de detección y cuantificación de *F. oxysporum* en suelos de viveros de altura mediante PCR en tiempo real mostraron que existen poblaciones de este hongo en los suelos donde se producen las plantas de fresa. La cantidad de *F. oxysporum* en las parcelas de viveros pertenecientes a las provincias de Segovia y Valladolid fue menor en suelos desinfestados con 1,3-D+CP (1,3 dicloropropeno+cloropicrina, 61:35) que en los no desinfestados de las mismas fincas en las tres campañas analizadas (Fig. I.1A). En cambio, en los suelos de viveros de la provincia de Ávila, la cantidad de ADN de *F. oxysporum* fue mayor en suelos desinfestados con MetamNa (N-metildiocarbamato de sodio) o Dazomet (Tetrahidro-3,5-dimetil-1,3,5-tiadiazina-2-tiona) que en no desinfestados en esa misma finca y periodo (Fig.I.1A). Los niveles de *F. oxysporum* en suelos de viveros de altura durante los tres años variaron entre 35,9 y 1845 pg ADN /g suelo y 75,8 y 11260,0 pg ADN /g suelo en suelos no desinfestados.

En viveros de la provincia de Segovia sólo se detectó *M. phaseolina* en suelos desinfestados con 1,3-D+CP el tercer año de prospección y a niveles muy bajos (1,2 pg ADN/g suelo). En las provincias de Ávila y Valladolid, este patógeno se detectó en los tres años de prospecciones con valores variables, independientemente de si los suelos estaban o no desinfestados (Fig I.1B). Los niveles de *M. phaseolina* en suelos de viveros de altura durante los tres años variaron entre 3,5 y 109 pg ADN /g y 11,5 y 275,6 pg ADN /g suelo en suelos no desinfestados

P. cactorum sólo se detectó en suelos sin desinfestar, el primer año de prospecciones en viveros de la provincia de Valladolid y el tercer año en las provincias de Segovia y Ávila con niveles que variaron entre 6,3 y 6992,0 pg ADN/g suelo. No se detectó *P. cactorum* en suelos desinfestados con 1,3-D+CP, MetamNa o Dazomet ningún año de prospección (Fig. I.1C).

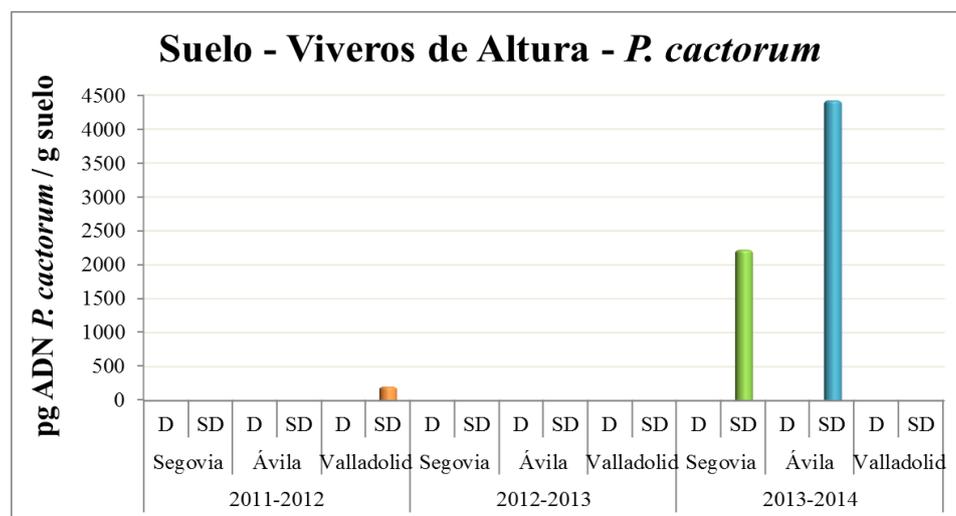
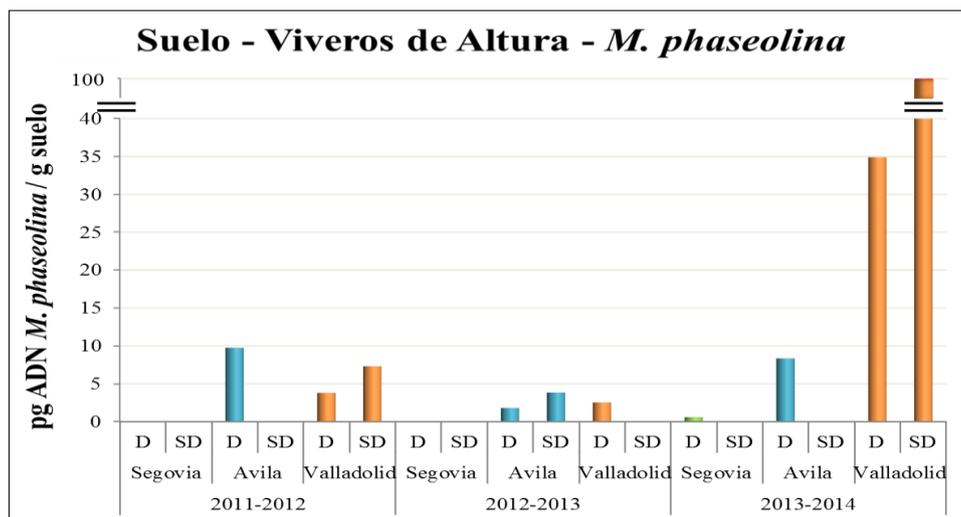
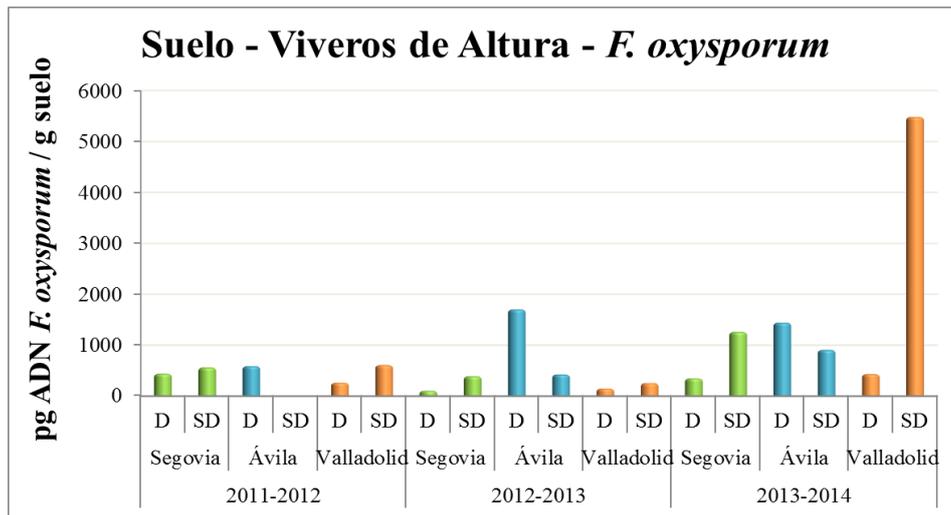


Figura I.1. Cantidad de ADN de A) *Fusarium oxysporum*, B) *Macrophomina phaseolina* y C) *Phytophthora cactorum* por gramo de suelo detectada mediante PCR en tiempo real en viveros de altura pertenecientes a las provincias de Segovia, Ávila y Valladolid durante tres campañas consecutivas (2011/12, 2012/13 y 2013/14).

Suelos de campos de producción de la provincia de Huelva

F. oxysporum se detectó en todos los campos de producción analizados incluso en los suelos desinfectados antes de la plantación. Los niveles aumentaron a lo largo de cada campaña de producción en todas las fincas y, en el caso de Palos de la Fra., también aumentaron a lo largo de las tres campañas (Fig I.2A). Los niveles de *F. oxysporum* en los campos de producción variaron entre 0,0014 y 6,25 ng/g suelo en suelos preplantación y entre 0,00032 y 9,60 ng/g suelo en suelos postplantación. *M. phaseolina* también se detectó en las fincas analizadas de las dos localidades, y los niveles del patógeno fueron superiores al final de la campaña, a pesar de que en algunas fincas no se detectó *M. phaseolina* en suelos desinfectados pre-plantación (Fig. I.2B). Los niveles de este patógenos variaron entre 0,0013 y 1,35 ng/g suelo en suelos preplantación y entre 0,0029 y 2,41 ng/g suelo en suelos post-plantación. *P. cactorum* se detectó a niveles del orden de 1000 veces inferiores que los otros dos patógenos y variaron entre 11 y 24,3 pg/g suelo en suelos preplantación y 11 y 50,1 pg/g suelo en suelos postplantación. No se detectó *P. cactorum* en la finca de Cartaya en la primera campaña (2011-2012), aunque sí en las dos posteriores. Los niveles del patógeno también aumentaron a lo largo de cada campaña en las fincas de las dos localidades, a excepción de la última campaña en la finca de Cartaza (Fig. I.2C).

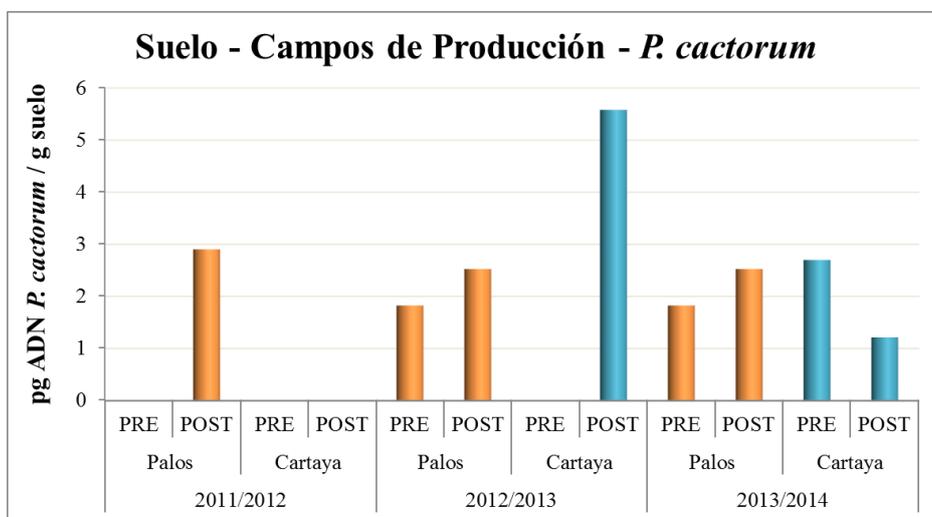
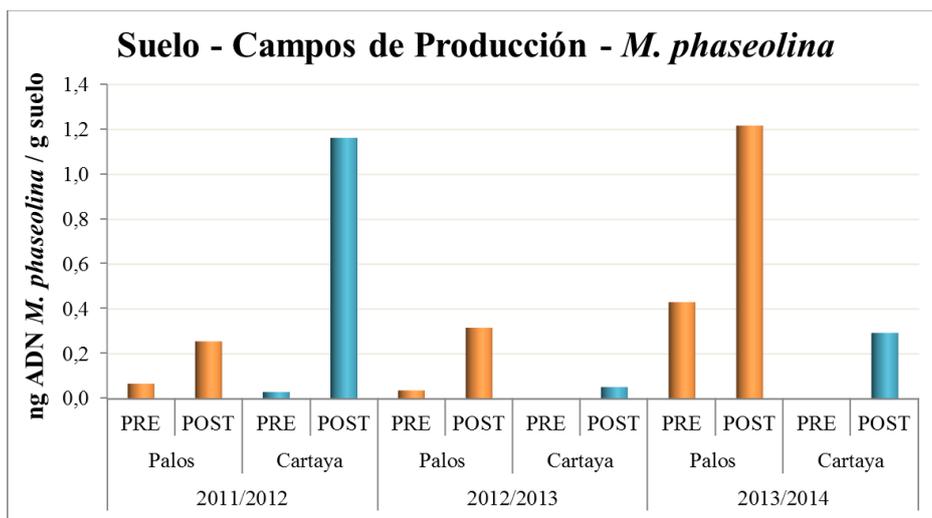
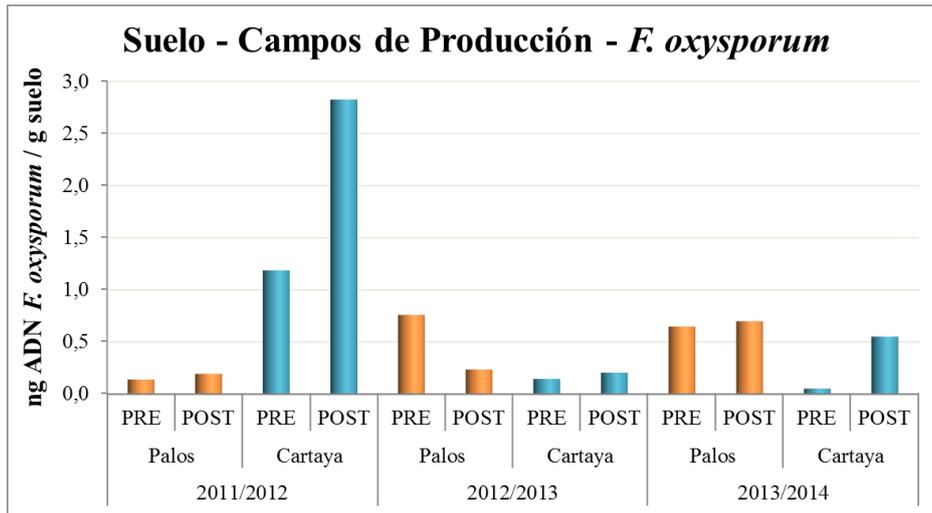


Figura I.2. Cantidad de ADN de A) *Fusarium oxysporum*, B) *Macrophomina phaseolina* y C) *Phytophthora cactorum* por gramo de suelo detectada mediante PCR en tiempo real en suelos de viveros de altura pertenecientes a las provincias de Segovia, Ávila y Valladolid durante tres campañas consecutivas (2011/12, 2012/13 y 2013/14).

Detección y cuantificación de *F. oxysporum*, *M. phaseolina* y *P. cactorum* en material vegetal

Plantas madre prebase

No se detectó *M. phaseolina* ni *P. cactorum* en ninguna de las plantas madre prebase analizadas a lo largo de las tres campañas, por ninguno de los métodos de detección utilizados (aislamiento a partir de tejido en medio de cultivo y PCR en tiempo real). En cambio, se aisló *Fusarium* spp. de un 11,7%, 9,4% y un 12,0% de las plantas analizadas en los años 2011, 2012 y 2013, respectivamente (Fig. I.3A) de los cuales se identificaron un 3,5%, 1,6% y 3,6% como *F. oxysporum* cuando se analizaron mediante PCR en tiempo real (Figura I.3B).

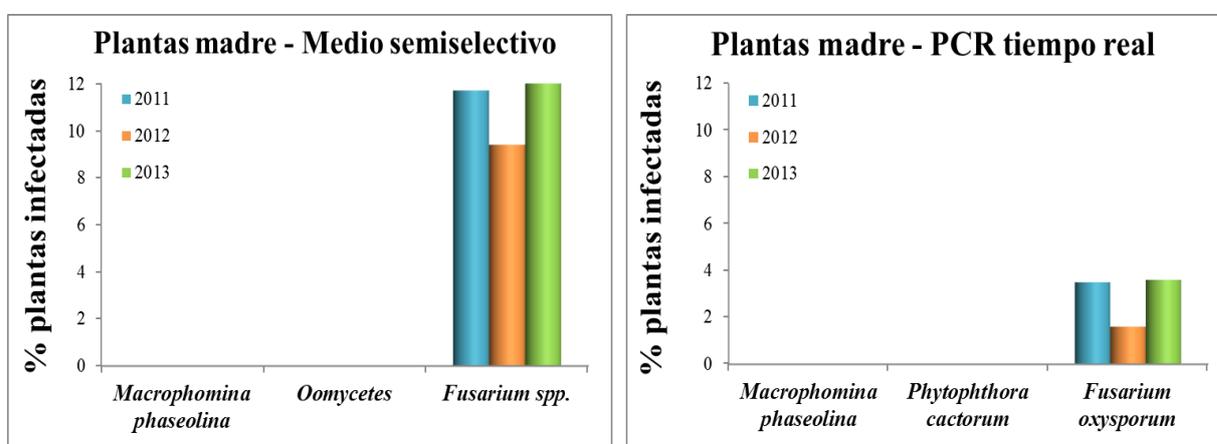


Figura I.3. Porcentaje de plantas madre infectadas con *Macrophomina phaseolina*, oomicetos / *Phytophthora cactorum* y *Fusarium* spp. / *Fusarium oxysporum* detectadas durante los tres años consecutivos (2011, 2012 y 2013) de prospección, mediante aislamiento en medio de cultivo (A) y PCR en tiempo real (B), respectivamente.

Plantas hija certificadas

Los resultados de los aislamientos de tejidos de las plantas hija en medio de cultivo, mostraron que antes de su plantación, el 0,8%, 8,5%, 3,5% de las plantas se encontraban infectadas con con oomicetos y el 16,9%, 16,5% y 30% con *Fusarium* spp., durante las campañas en 2011, 2012 y 2013, respectivamente (Fig. I.4A). Mediante PCR tiempo real se comprobó que *P. cactorum* estaba presente en el 1,2 %, 3% y 15,4%

y *F. oxysporum* en el 5%, 9,5% y 18% de las plantas analizadas en 2011, 2012 y 2013, respectivamente. No se detectó *M. phaseolina* en ninguna de las plantas hija en los tres años analizados por ninguno de los métodos de detección utilizados (Fig. I.4B).

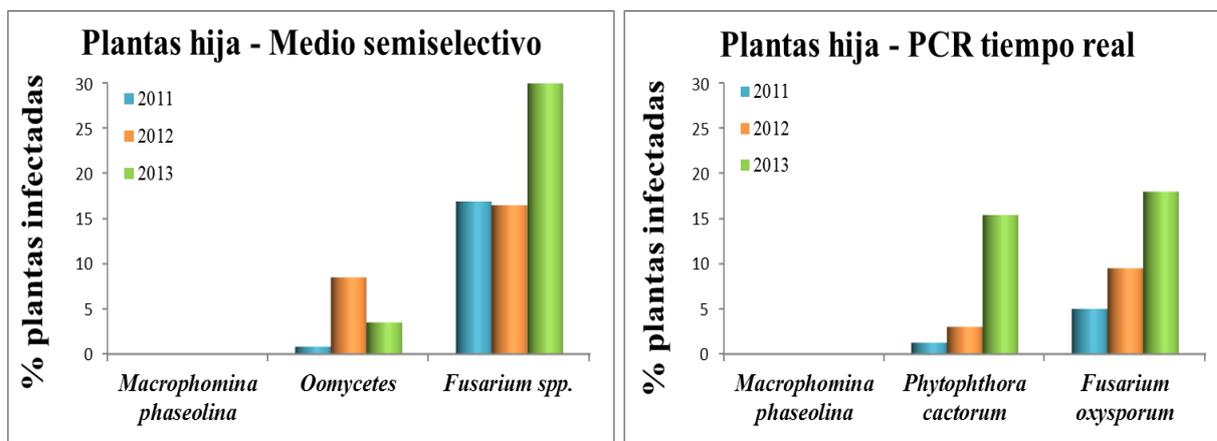


Figura I.4. Porcentaje de plantas hija infectadas con *Macrophomina phaseolina*, oomicetos / *Phytophthora cactorum* y *Fusarium spp.* / *Fusarium oxysporum* detectado durante tres años consecutivos (2011, 2012 y 2013), mediante las técnicas de aislamiento en medio de cultivo (A) y PCR en tiempo real (B), respectivamente.

Plantas muertas en los campos de producción de fruto

Los resultados de los análisis de plantas muertas durante las campañas 2011/12 y 2012/13 en los macrotúneles de Cartaya sembrados con plantas de fresa ‘Sabrina’ indicaron que la muerte de las plantas se concentró en el mes de mayo y fue principalmente causada por *M. phaseolina* y *Fusarium spp.* (Figura I.5A).

En esta misma localidad, en el macrotúnel sembrado con plantas de fresa ‘Fortuna’, se registraron plantas muertas a lo largo de toda la campaña en 2012/13 y 2013/14, principalmente durante los meses de enero a mayo, siendo este último mes el que presentó el mayor número de muertes. En este caso, de las plantas muertas se aislaron *Fusarium spp.* y oomicetos. *M. phaseolina* sólo se aisló de las plantas muertas en los meses cálidos, principalmente en mayo (Figura I.5B).

En la finca de Palos de la Fra., durante la primera campaña, se cultivó la variedad Fortuna. Fue la campaña que mayor muerte de plantas registró de las tres

analizadas. Las plantas murieron a lo largo de toda la campaña con un incremento considerable de plantas muertas en el mes de mayo. De los tejidos de estas plantas se aislaron oomycetes y *Fusarium* spp., además de *M. phaseolina* en el mes de mayo (Figura I.6A). Durante las dos siguientes campañas se cultivó la variedad Splendor. En estas campañas el número de plantas muertas fue mucho menor y se concentró principalmente en el mes de mayo durante la campaña 2012/2013. Estuvo provocada en más de la mitad de los casos por *M. phaseolina*, correspondiendo el resto a oomycetes y *Fusarium* spp. (Figura I.6B). En la campaña 2013/2014, la baja tasa de muerte de plantas se repartió entre los meses de marzo y abril, ya que a principios del mes de mayo se retiraron la totalidad de las plantas del invernadero y no se tomaron datos sobre muerte de plantas en ese mes (Figura I.6C).

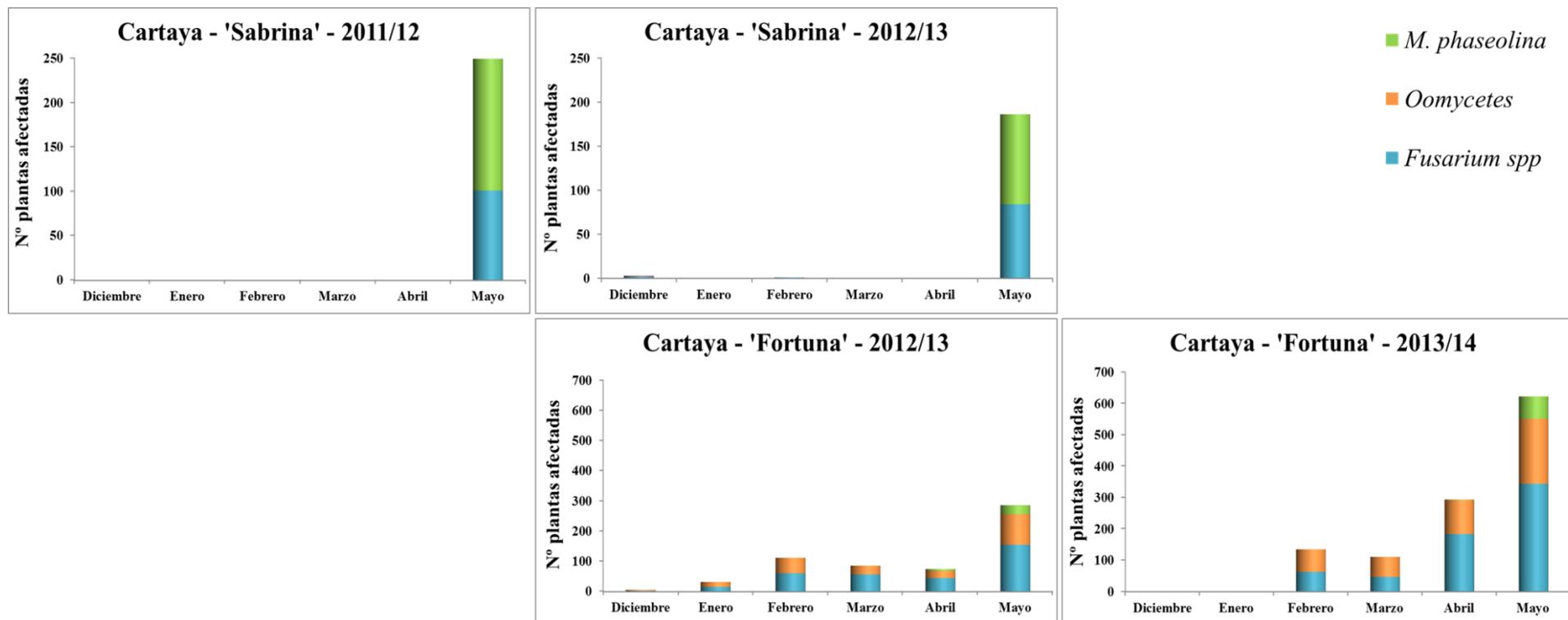


Figura I.5. Número de plantas muertas de las variedades Sabrina (A) y Fortuna (B) en tres macrotúneles de campos de producción de fruto de fresa en la localidad de Cartaya (Huelva) durante tres campañas consecutivas: 2011/12, 2012/13 y 2013/14.

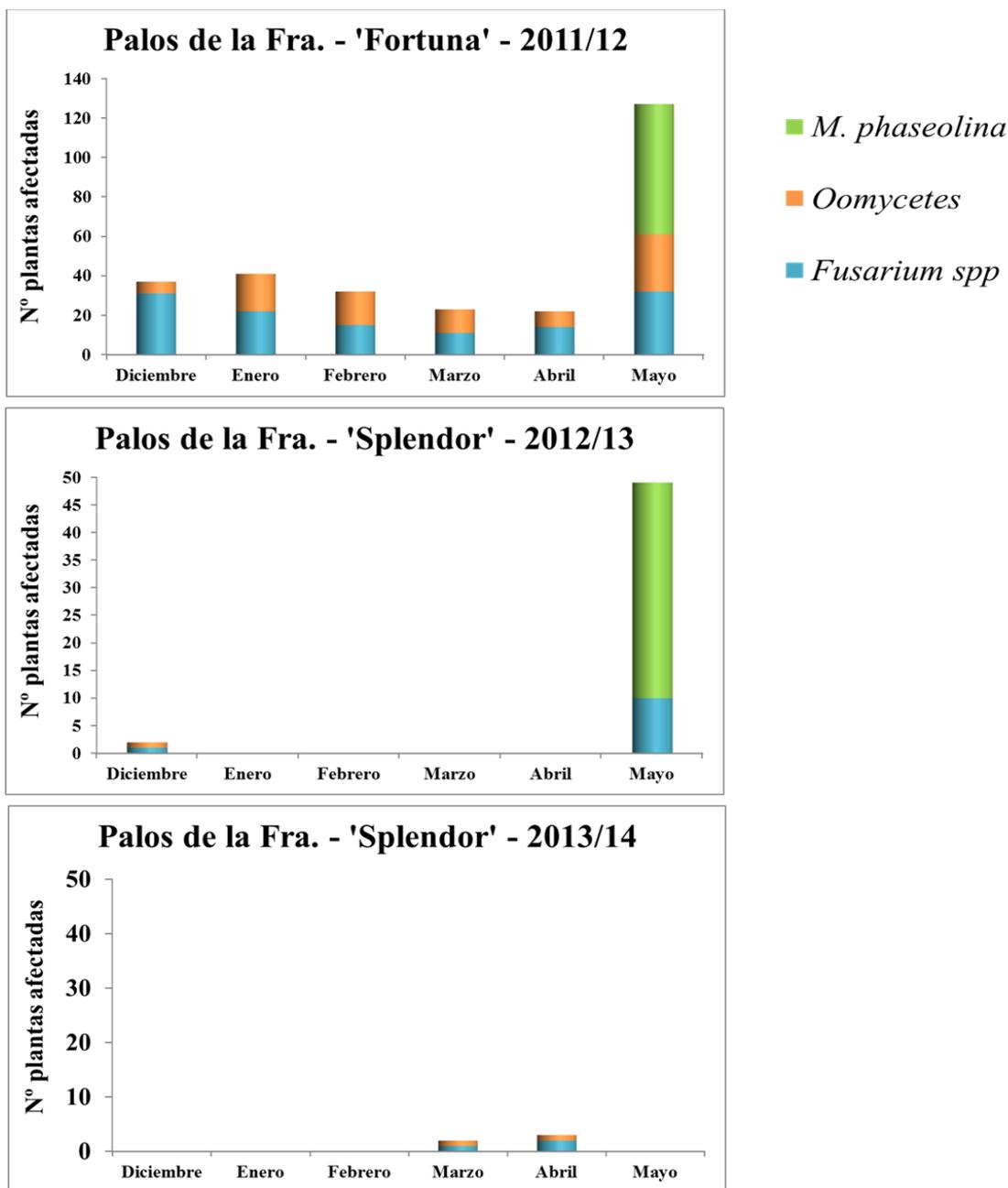


Figura I.6. Número de plantas muertas de las variedades Fortuna y Splendor en dos macrotúneles de campos de producción de fruto de fresa en la localidad de Palos de la Frontera (Huelva) durante tres campañas consecutivas: 2011/12 (A), 2012/13 (B), y 2013/14 (C).

Caracterización molecular de los aislados

De las prospecciones realizadas en viveros de altura y campos de producción de fruto se obtuvieron para su caracterización 93 aislados de *Fusarium* spp, 21 aislados de *M. phaseolina* y 13 aislados de oomicetos, de los cuales se obtuvieron cultivos monospóricos. Los resultados de la identificación mediante amplificación y posterior secuenciación de un fragmento del factor de elongación *EF-1 α* (cebadores EF1 y EF2) de los aislados de *Fusarium* spp., se recogen en la Tabla I.5.

Tabla I.5. Lista de aislados de *Fusarium* spp. utilizados en este trabajo, indicando su identificación a nivel de especie y el año, localidad, fuente y cultivar de procedencia.

Especie	Año ^b	Localidad	Fuente ^b	Cultivar ^b	Aislado ^a
<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>fragariae</i>	-	Japón	-	-	MAFF 305557
<i>F. oxysporum</i> f.sp. <i>fragariae</i>	-	Japón	-	-	MAFF 305558
<i>F. oxysporum</i> f.sp. <i>fragariae</i>	-	Japón	-	-	MAFF 712071
<i>F. oxysporum</i> f.sp. <i>fragariae</i>	-	Japón	-	-	MAFF 727510
<i>F. oxysporum</i> f.sp. <i>fragariae</i>	-	Japón	-	-	MAFF 744009
<i>F. oxysporum</i> f.sp. <i>fragariae</i>	-	EEUU	-	-	NRRL 26438
<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>fragariae</i>	-	EEUU	-	-	ATCC 18138
<i>F. oxysporum</i>	2008/09	Moguer	Planta	-	G2-4
<i>F. proliferatum</i>	2008/09	Moguer	Planta	-	G3-1
<i>F. solani</i>	2010/11	Moguer	Suelo	-	TOR-01
<i>F. oxysporum</i>	2010/11	Moguer	Suelo	-	TOR-02
<i>F. oxysporum</i>	2010/11	Moguer	Suelo	-	TOR-03
<i>F. oxysporum</i>	2010/11	Moguer	Raíz	-	TOR-04
<i>F. oxysporum</i>	2010/11	Moguer	Suelo	-	TOR-06
<i>F. solani</i>	2010/11	Moguer	Suelo	-	TOR-07
<i>F. incarnatum</i>	2010/11	Moguer	Raíz	-	TOR-09
<i>F. solani</i>	2010/11	Moguer	Raíz	-	TOR-11
<i>F. oxysporum</i>	2010/11	Moguer	Raíz	-	TOR-12
<i>F. tricinctum</i>	2010/11	Moguer	Raíz	-	TOR-17
<i>F. oxysporum</i>	2010/11	Moguer	Corona	-	TOR-19
<i>F. acuminatum</i>	2010/11	Moguer	Corona	-	TOR-22

<i>F. proliferatum</i>	2010/11	Moguer	Corona	-	TOR-23
<i>F. acuminatum</i>	2010/11	Moguer	Corona	-	TOR-24
<i>F. oxysporum</i>	2010/11	Moguer	Raíz	-	TOR-25
<i>F. acuminatum</i>	2010/11	Moguer	Raíz	-	TOR-26
<i>F. oxysporum</i>	2010/11	Moguer	Raíz	-	TOR-27
<i>F. acuminatum</i>	2010/11	Moguer	Raíz	-	TOR-28
<i>F. oxysporum</i>	2010/11	Moguer	Raíz	-	TOR-29
<i>F. oxysporum</i>	2010/11	Moguer	Raíz	-	TOR-30
<i>F. oxysporum</i>	2010/11	Moguer	Raíz	-	TOR-31
<i>F. acuminatum</i>	2010/11	Moguer	Raíz	-	TOR-32
<i>F. oxysporum</i>	2010/11	Moguer	Raíz	-	TOR-43
<i>F. oxysporum</i>	2010/11	Moguer	Corona	-	TOR-44
<i>F. equiseti</i>	2010/11	Moguer	Corona	-	TOR-45
<i>F. acuminatum</i>	2010/11	Moguer	Corona	-	TOR-53
<i>F. proliferatum</i>	2010/11	Moguer	Raíz	-	TOR-55
<i>F. oxysporum</i>	2010/11	Moguer	Raíz	-	TOR-56
<i>F. acuminatum</i>	2010/11	Moguer	Raíz	-	TOR-57
<i>F. commune</i>	2010/11	Moguer	Raíz	-	TOR-58
<i>F. oxysporum</i>	2010/11	Moguer	Raíz	-	TOR-60
<i>F. oxysporum</i>	2010/11	Moguer	Raíz	-	TOR-84
<i>F. oxysporum</i>	2010/11	Moguer	Raíz	-	TOR-85
<i>F. oxysporum</i>	2011/12	Segovia	Corona	Splendor	TOR-109 V
<i>F. proliferatum</i>	2011/12	Ávila	Corona	San Andreas	TOR-115 III
<i>F. commune</i>	2011/12	Ávila	Corona	San Andreas	TOR-115 IV
<i>F. oxysporum</i>	2011/12	Ávila	Corona	San Andreas	TOR-115 V
<i>F. oxysporum</i>	2011/12	Ávila	Raíz	San Andreas	TOR-116 I
<i>F. commune</i>	2011/12	Ávila	Raíz	San Andreas	TOR-116 IV
<i>F. avenaceum</i>	2011/12	Palos de la Fra.	Corona	Fortuna	F-POST 2
<i>F. oxysporum</i>	2011/12	Palos de la Fra.	Raíz	Fortuna	F-POST 3
<i>F. oxysporum</i>	2011/12	Palos de la Fra.	Raíz	Fortuna	F-POST 5
<i>F. oxysporum</i>	2011/12	Palos de la Fra.	Raíz	Fortuna	F-POST 6
<i>F. avenaceum</i>	2011/12	Palos de la Fra.	Raíz	Fortuna	F-POST 7
<i>F. avenaceum</i>	2011/12	Palos de la Fra.	Corona	Fortuna	F-POST 10
<i>F. oxysporum</i>	2011/12	Palos de la Fra.	Raíz	Fortuna	F-POST 11
<i>F. oxysporum</i>	2011/12	Palos de la Fra.	Corona	Fortuna	F-POST 13
<i>F. equiseti</i>	2011/12	Palos de la Fra.	Corona	Fortuna	F-POST 15
<i>F. avenaceum</i>	2011/12	Palos de la Fra.	Corona	Fortuna	F-POST 16
<i>F. avenaceum</i>	2011/12	Palos de la Fra.	Corona	Fortuna	F-POST 18
<i>F. oxysporum</i>	2011/12	Palos de la Fra.	Raíz	Fortuna	F-POST 19
<i>F. avenaceum</i>	2011/12	Palos de la Fra.	Corona	Fortuna	F-POST 20
<i>F. oxysporum</i>	2011/12	Palos de la Fra.	Raíz	Fortuna	F-POST 21
<i>F. oxysporum</i>	2011/12	Palos de la Fra.	Raíz	Fortuna	F-POST 30
<i>F. avenaceum</i>	2011/12	Palos de la Fra.	Raíz	Fortuna	F-POST 35
<i>F. oxysporum</i>	2011/12	Palos de la Fra.	Raíz	Fortuna	F-POST 36
<i>F. avenaceum</i>	2011/12	Palos de la Fra.	Corona	Fortuna	F-POST 40

<i>F. avenaceum</i>	2011/12	Palos de la Fra.	Corona	Fortuna	F-POST 41
<i>F.avenaceum</i>	2011/12	Palos de la Fra.	Corona	Fortuna	F-POST 43
<i>F. avenaceum</i>	2011/12	Palos de la Fra.	Corona	Fortuna	F-POST 48
<i>F. solani</i>	2011/12	Cartaya	Corona	Sabrina	F-POST 81
<i>F. oxysporum</i>	2011/12	Cartaya	Corona	Sabrina	F-POST 82
<i>F. oxysporum</i>	2011/12	Cartaya	Corona	Sabrina	F-POST 83
<i>F. oxysporum</i>	2011/12	Cartaya	Corona	Sabrina	F-POST 84
<i>F. oxysporum</i>	2011/12	Cartaya	Corona	Sabrina	F-POST 85
<i>F. oxysporum</i>	2011/12	Cartaya	Raíz	Sabrina	F-POST 86
<i>F. proliferatum</i>	2011/12	Cartaya	Corona	Sabrina	F-POST 90
<i>F. oxysporum</i>	2011/12	Cartaya	Corona	Sabrina	F-POST 91
<i>F. oxysporum</i>	2011/12	Cartaya	Raíz	Sabrina	F-POST 92
<i>F. solani</i>	2012/13	Moguer	Corona	Fortuna	TOR-393
<i>F. solani</i>	2012/13	Moguer	Suelo	-	TOR-397
<i>F. solani</i>	2012/13	Moguer	Suelo	-	TOR-725
<i>F. solani</i>	2013/14	-	-	-	TOR-743
<i>F.proliferatum</i>	2012/13	Cartaya	Corona	Fortuna	F-POST 117
<i>F. oxysporum</i>	2012/13	Cartaya	Corona	Fortuna	F-POST 140
<i>F. oxysporum</i>	2012/13	Cartaya	Corona	Fortuna	F-POST 143
<i>F. commune</i>	2012/13	Cartaya	Corona	Fortuna	F-POST 153
<i>F. oxysporum</i>	2012/13	Cartaya	Corona	Fortuna	F-POST 162
<i>F. solani</i>	2012/13	Cartaya	Raíz	Fortuna	F-POST 164
<i>F. solani</i>	2012/13	Cartaya	Corona	Sabrina	F-POST 169
<i>F. oxysporum</i>	2012/13	Cartaya	Corona	Sabrina	F-POST 170
<i>F. oxysporum</i>	2012/13	Cartaya	Corona	Sabrina	F-POST 172
<i>F. solani</i>	2012/13	Palos de la Fra.	Corona	Splendor	F-POST 174
<i>F. solani</i>	2012/13	Cartaya	Corona	Fortuna	F-POST 176
<i>F. oxysporum</i>	2012/13	Palos de la Fra.	Corona	Splendor	F-POST 179
<i>F. solani</i>	2012/13	-	Raíz	Camarosa	E III

^a MAFF: aislados procedentes del Ministerio de Agricultura, Silvicultura y Pesca de Japón (*Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries of Japan*); ATCC: aislados procedentes de la colección americana de cultivos tipo (*American Type Culture Collection*); NRRL: aislados procedentes de la colección del servicio de investigación agrícola de cultivos tipo de EEUU (*Agricultural Research Service Culture Collection*); G: aislados cedidos por el Dr. Francisco Arroyo; TOR: aislados cedidos por la Dra. Berta de los Santos; F-POST: aislados obtenidos en las prospecciones realizadas durante esta tesis doctoral

^b (-): dato desconocido

Los resultados de la identificación mediante amplificación y posterior secuenciación de un fragmento del factor de elongación *EF-1 α* (cebadores EF446 y EF1035) de los aislados caracterizados morfológicamente como *M. phaseolina*, se recogen en la Tabla I.6.

Tabla I.6. Aislados de *Macrophomina phaseolina* utilizados en este trabajo

Especie	Año	Localidad	Fuente	Cultivar	Aislado^a
<i>M. phaseolina</i>	2006	Gibraleón	Corona	-	M1
<i>M. phaseolina</i>	2006	Gibraleón	Corona	Coral	M2
<i>M. phaseolina</i>	2006	Gibraleón	Corona	-	M3
<i>M. phaseolina</i>	2008	Gibraleón	Corona	-	M16
<i>M. phaseolina</i>					Ar 178/09
<i>M. phaseolina</i>					F59/09
<i>M. phaseolina</i>					F315/11
<i>M. phaseolina</i>	2010/1 1				TOR99
<i>M. phaseolina</i>	2011/1 2	Cartaya	Corona	Sabrina	MAC 1
<i>M. phaseolina</i>	2011/1 2	Cartaya	Raíz	Sabrina	MAC 2
<i>M. phaseolina</i>	2011/1 2	Cartaya	Corona	Sabrina	MAC 3
<i>M. phaseolina</i>	2011/1 2	Cartaya	Corona	Sabrina	MAC 4
<i>M. phaseolina</i>	2011/1 2	Cartaya	Raíz	Sabrina	MAC 5
<i>M. phaseolina</i>	2011/1 2	Cartaya	Corona	Sabrina	MAC 6
<i>M. phaseolina</i>	2011/1 2	Cartaya	Raíz	Sabrina	MAC 7
<i>M. phaseolina</i>	2011/1 2	Cartaya	Corona	Sabrina	MAC 9
<i>M. phaseolina</i>	2011/1 2	Cartaya	Raíz	Sabrina	MAC 10
<i>M. phaseolina</i>	2011/1 2	Cartaya	Corona	Sabrina	MAC 11
<i>M. phaseolina</i>	2011/1 2	Cartaya	Raíz	Sabrina	MAC 12
<i>M. phaseolina</i>	2011/1 2	Cartaya	Corona	Sabrina	MAC 13
<i>M. phaseolina</i>	2011/1 2	Palos de la Fra.	Raíz	Fortuna	MAC 14

^a M: aislados cedidos por el Dr. Manuel Avilés; Ar y F: aislados cedidos por D. Juan Bascón; TOR: aislado cedido por la Dra. Berta de los Santos; MAC: aislados obtenidos en las prospecciones realizadas durante esta tesis doctoral

^b (-): dato desconocido

Los resultados de la identificación mediante amplificación y posterior secuenciación de la región ITS1 del ADN ribosomal (cebadores ITS6 y ITS7) de los aislados caracterizados morfológicamente como oomicetos, se recogen en la Tabla I.7.

Tabla I.7. Oomicetos aislados de una finca comercial de Palos de la Frontera (Huelva) durante la campaña 2011/12.

Especie	Fuente	Cultivar	Aislado
	Viveros		
<i>Pythium rostratifingens</i>	Marifrançis	Candongga	PF 149
	Raíz		
<i>Phytophthora cactorum</i>	Raíz	Fortuna	PF 236
<i>Phytophythium litorale</i>	Corona	Fortuna	PF 239
<i>Phytophthora cactorum</i>	Peciolo	Fortuna	PF 241A
<i>Phytophthora cactorum</i>	Corona	Fortuna	PF 252
<i>Phytophthora cactorum</i>	Corona	Fortuna	PF 253
<i>Phytophthora cactorum</i>	Corona	Fortuna	PF 254
<i>Phytophthora cactorum</i>	Corona	Fortuna	PF 255A
<i>Phytophthora cactorum</i>	Corona	Fortuna	PF 255B
<i>Phytophthora cactorum</i>	Raíz	Fortuna	PF 256
<i>Phytophthora cactorum</i>	Corona	Fortuna	PF 275
<i>Phytophthora cactorum</i>	Corona	Fortuna	PF 305
<i>Phytophythium litorale</i>	Raíz	Fortuna	PF 320

Análisis filogenético de los aislados

Las secuencias *EF-1 α* del conjunto de los aislados de *Fusarium* spp. fueron comparadas entre sí para determinar las relaciones filogenéticas existentes entre ellos y determinar la variabilidad de las poblaciones. Como resultado, se obtuvo un árbol filogenético dividido en dos cluster principales: A y B (Fig. I.7). El cluster A estaba integrado por los aislados de *F. solani*. El cluster B incluía el resto de los aislados de *Fusarium* spp. Dentro del cluster B se distinguían, a su vez, dos clusters: B1 y B2. El cluster B1 estaba formado por tres ramas, a saber: el cluster B11, constituido por los aislados de *F. oxysporum*; el cluster B12 que incluía los aislados de *F. commune*; y el cluster B13 constituido por aislados de *F. proliferatum*. Dentro del cluster B2 se distinguían dos clusters: B21 constituido por aislados de *F. equiseti* y *F. incarnatum* y B22 que incluía aislados de *F. tritinctum*, *F. acuminatum* y *F. avenaceum*.

F. solani presentó la mayor diversidad nucleotídica intrapoblacional de las especies de *Fusarium* analizadas (Tabla I.8) y la especie que mostró la mayor distancia genética con el resto de las especies de *Fusarium* (Tabla I.9). La mayor distancia genética se estableció entre las especies de *F. solani* y *F. acuminatum*.

El análisis filogenético de la región *EF-1 α* de los aislados de *M. phaseolina* demostró una escasa variabilidad entre estos aislados, en el que se distinguieron tres haplotipos que diferían tan solo en un nucleótido (Figura I.8). Por tanto, la variabilidad nucleotídica intrapoblacional calculada fue muy baja ($\pi= 0.002 \pm 0.001$).

El análisis filogenético de la región ITS1 de los aislados oomicetos separó a las poblaciones en tres clusters bien diferenciados. El cluster A estaba formado por todos los aislados de *P. cactorum* entre los que se detectó sólo un haplotipo y por tanto, una variabilidad nucleotídica nula en la población. Las especies de *Phytopythium* y *Pythium* se separaron en clusters B y C (Figura I.9).

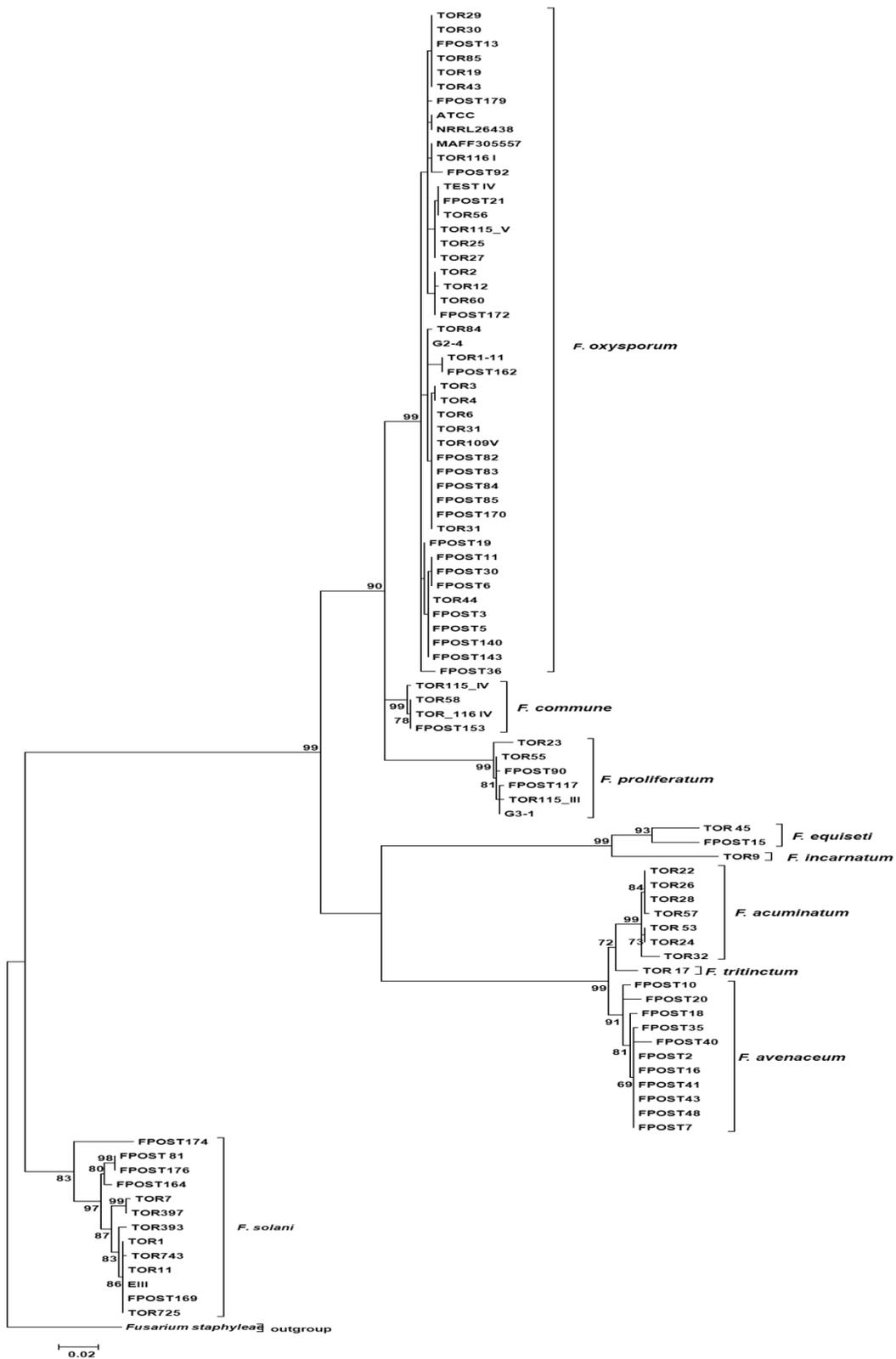


Figura I.7. Árbol filogenético ML (Maximum Likelihood) de 93 aislados de distintas especies de *Fusarium* procedentes de plantas de fresa y suelos de cultivo, basado en la secuencia parcial del gen del factor de elongación 1a (*EF1-α*). Los números en los internodos representan >70% confiabilidad (bootstrap 1.000 réplicas)

Tabla I.8. Diversidad nucleotídica de las distintas especies de *Fusarium* aisladas de suelo y material vegetal del cultivo de la fresa durante tres campañas de cultivo, calculadas en base a la secuencia del factor de elongación-1 α (*EF-1 α*) por el método de Máxima Probabilidad (Tamura y col., 2004).

Especie de <i>Fusarium</i>	Diversidad nucleotídica (π)
<i>F. oxysporum</i>	0.009 \pm 0.002
<i>F. acuminatum</i>	0.005 \pm 0.002
<i>F. avenaceum</i>	0.007 \pm 0.002
<i>F. commune</i>	0.002 \pm 0.001
<i>F. proliferatum</i>	0.007 \pm 0.002
<i>F. solani</i>	0.022 \pm 0.003

Tabla I.9. Distancias genéticas entre las distintas especies de *Fusarium* aisladas de suelo y material vegetal del cultivo de la fresa durante tres campañas de cultivo, calculadas en base a la secuencia del factor de elongación-1 α (*EF-1 α*) por el método de Máxima Probabilidad (Tamura y col., 2004)^a.

Especie de <i>Fusarium</i>	<i>F. oxysporum</i>	<i>F. acuminatum</i>	<i>F. avenaceum</i>	<i>F. commune</i>	<i>F. proliferatum</i>	<i>F. solani</i>
<i>F. oxysporum</i>		0.015	0.015	0.007	0.014	0.011
<i>F. acuminatum</i>	0.171		0.007	0.015	0.015	0.015
<i>F. avenaceum</i>	0.170	0.033		0.015	0.015	0.015
<i>F. commune</i>	0.041	0.156	0.163		0.014	0.010
<i>F. proliferatum</i>	0.088	0.176	0.174	0.070		0.016
<i>F. solani</i>	0.197	0.244	0.238	0.197	0.210	

^a En negro se indica la distancia genética y en azul el error estándar.

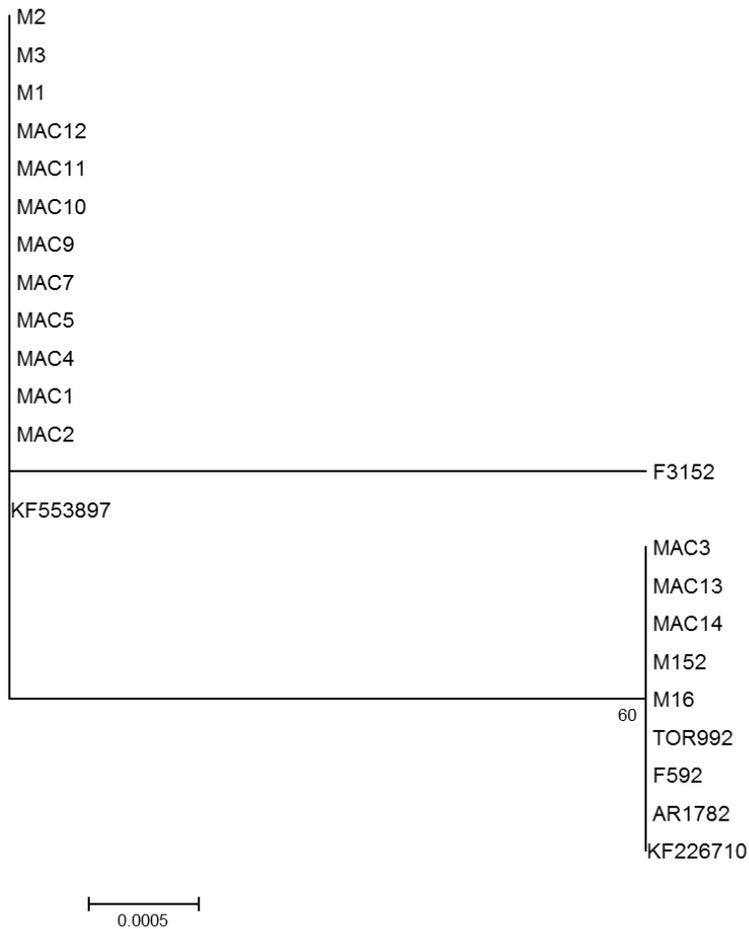


Figura I.8. Árbol filogenético de 21 aislados de *Macrophomina phaseolina* procedentes de plantas de fresa y suelos de cultivo de la provincia de Huelva, basado en la secuencia parcial del gen del factor de elongación 1α (*EF1- α*) siguiendo el modelo Jukes-Cantor (bootstrap 500 réplicas). Se incluyen la secuencia de dos aislados tomados del GenBank (nº acceso KF553897 y KF226710).

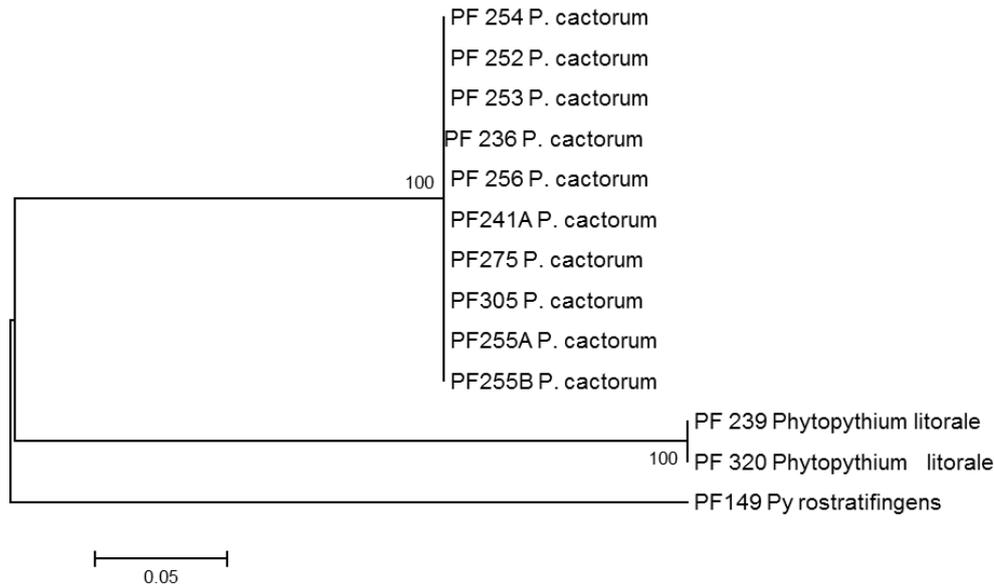


Figura I.9. Árbol filogenético de 13 aislados oomicetos procedentes de plantas de fresa de la provincia de Huelva, basado en la secuencia ITS1 del ADN ribosomal siguiendo el modelo de Máxima Probabilidad (ML) (bootstrap 500 réplicas). La diversidad nucleotídica intrapoblacional = 0

Caracterización patogénica de los aislados mediante test de patogenicidad

Los aislados de *Fusarium* spp. testados en el experimento 1 (Tabla I.10) no mostraron diferencias significativas respecto el control, en cuanto al porcentaje de necrosis en corona. Pero las plantas inoculadas con un aislado de *F. oxysporum* (TOR-27) y con dos de *F. commune* (TOR-115 IV y TOR-116 IV) emitieron una mayor proporción de raíces nuevas que el resto, incluidas las no inoculadas ($P=0,0250$) (Tabla I.10).

Los aislamientos realizados al final del experimento mostraron que los aislados de *F. oxysporum* (TOR 115 V y F-POST 3) y el aislado de *F. proliferatum* (TOR-115 III) fueron capaces de penetrar las plantas y llegar a la altura de la corona. El resto de los aislados se recuperaron principalmente de las raíces. En el caso de las plantas testigo no se aisló ningún *Fusarium* spp.

Tabla I.10. Patogenicidad de aislados de *Fusarium* spp. en plantas de fresa ‘Camarosa’ (Experimento 1)^a

Aislados	Necrosis corona (%) (NS)	Raíces nuevas (%) (<i>P</i> =0,0250)
Control	2,5 ± 2,5	55,0 ± 9,6 cd
<i>F. oxysporum</i>		
TOR-04	5,0 ± 5,0	49,4 ± 8,0 d
TOR-19	0,0 ± 0,0	63,1 ± 4,9 abcd
TOR-27	0,0 ± 0,0	75,6 ± 5,4 ab
TOR-115 V	0,0 ± 0,0	56,3 ± 3,7 bcd
F-POST 3	0,0 ± 0,0	63,8 ± 3,8 abcd
F-POST 6	0,0 ± 0,0	70,6 ± 5,7 abc
<i>F. commune</i>		
TOR-115 IV	0,0 ± 0,0	80,0 ± 5,1 a
TOR-116 IV	1,9 ± 1,3	75,6 ± 5,3 ab
<i>F. proliferatum</i>		
TOR-115 III	0,0 ± 0,0	66,6 ± 11,5 abcd

^aCada valor de la tabla es la media con el error estándar de ocho repeticiones (plantas). El ANOVA se realizó previa transformación angular de los datos porcentuales. Cada valor de la tabla es la media con el error estándar de ocho repeticiones (plantas). NS: no hubo diferencias significativas entre las medias. Cifras seguidas por distintas letras difieren entre sí según el test LSD (*P* ≤ 0,05).

Los aislados de *F. oxysporum* y *F. proliferatum* analizados en el experimento 2 no mostraron síntomas de enfermedad con respecto al control. En cambio, el aislado de *F. solani* (TOR-1) causó la muerte de tres de las ocho plantas inoculadas, ocasionó el mayor porcentaje (*P*=0,0001) de necrosis en corona y disminuyó la emisión de raíces nuevas (*P*=0,0013) (Tabla I.11).

Los aislamientos llevados a cabo tras finalizar el experimento mostraron que todos los aislados analizados fueron capaces de penetrar las plantas a través de las raíces y alcanzar la corona y el peciolo. A partir de las plantas testigo no se aisló ningún *Fusarium* spp.

Tabla I.11. Patogenicidad de aislados de *Fusarium* spp. en plantas de fresa ‘Camarosa’ (Experimento 2)^a

Aislados	Necrosis corona (%) (<i>P</i> =0,0001)	Raíces nuevas (%) (<i>P</i> =0,0013)	Plantas muertas (%)
Control	0,0 ± 0,0 b	73,1 ± 17,1 ab	0
<i>F. oxysporum</i>			
F- POST 19	0,0 ± 0,0 b	63,8 ± 15,1 b	0
F-POST 30	0,6 ± 0,6 b	88,1 ± 7,0 a	0
<i>F. solani</i>			
TOR-01	23,8 ± 9,9 a	42,5 ± 36,5 c	37.5
<i>F. proliferatum</i>			
TOR-23	1,9 ± 0,9 b	47,0 ± 24,1 bc	0

^aCada valor de la tabla es la media con el error estándar de ocho repeticiones (plantas). El ANOVA se realizó previa transformación angular de los datos porcentuales. Cada valor de la tabla es la media con el error estándar de ocho repeticiones (plantas). NS: no hubo diferencias significativas entre las medias. Cifras seguidas por distintas letras difieren entre sí según el test LSD (*P* ≤ 0,05).

En el experimento 3, el aislado de *F. solani* (TOR-11) ocasionó (*P*=0,0332) el mayor porcentaje de necrosis en corona y causó la muerte de tres de las ocho plantas inoculadas (Tabla I.12). El aislado G2-4 de *F. oxysporum* también indujo la muerte de dos de las ocho plantas inoculadas y pequeñas lesiones necróticas en las coronas de las plantas inoculadas (Tabla I.12). El resto de los aislados de *F. oxysporum* y de *F. proliferatum* evaluados en este experimento el experimento 5-1 no ocasionaron síntomas (Tabla I.12).

Los aislamientos llevados a cabo tras finalizar el experimento mostraron que todos los aislados evaluados fueron capaces de penetrar las plantas a través de las raíces y alcanzar la corona y el peciolo, excepto el aislado TOR-19 que sólo fue reaislado a partir de las raíces. Los aislamientos realizados a partir de las plantas no inoculadas (control) resultaron negativos en cuanto a presencia de *Fusarium* spp.

Tabla I.12. Patogenicidad de aislados de *Fusarium* spp. en plantas de fresa ‘Camarosa’ (Experimento 3)^a

Aislados	Necrosis corona (%) ($P=0,0332$)	Raíces nuevas (%) (NS)	Plantas muertas (%)
Control	0,0 ± 0,0 b	85,6 ± 4,3	0
<i>F. oxysporum</i>			
ATCC 18138	0,6 ± 0,6 b	77,5 ± 3,1	0
G2-4	5,6 ± 5,0 ab	81,9 ± 5,3	25
TOR-19	0,6 ± 0,6 b	72,5 ± 7,2	0
TOR-109 V	0,0 ± 0,0 b	80,0 ± 6,1	0
F-POST 11	0,0 ± 0,0 b	78,8 ± 3,4	0
F-POST 13	3,1 ± 1,6 ab	75,6 ± 7,5	0
<i>F. solani</i>			
TOR-11	10,6 ± 5,5 a	60,6 ± 12,0	37,5
<i>F. proliferatum</i>			
G3-1	0,6 ± 0,6 b	76,9 ± 8,4	12,5

^aCada valor de la tabla es la media con el error estándar de ocho repeticiones (plantas). El ANOVA se realizó previa transformación angular de los datos porcentuales. Cada valor de la tabla es la media con el error estándar de ocho repeticiones (plantas). NS: no hubo diferencias significativas entre las medias. Cifras seguidas por distintas letras difieren entre sí según el test LSD ($P \leq 0,05$).

Los aislados de *Fusarium* spp. testados en el experimento 4 no mostraron síntomas de enfermedad con respecto al control. Las diferencias en cuanto al porcentaje de necrosis en corona no fueron significativas y el porcentaje de raíces nuevas fue mayor ($P=0,0025$) en el caso del aislado TOR-116 (Tabla I.13).

El aislado TOR-115 fue el único capaz de penetrar en la planta hasta nivel de peciolo. El resto de los aislados mostraron un bajo nivel de infección (menos de la mitad de las plantas inoculadas). En el caso de las plantas testigo no se reaisló ningún *Fusarium* spp.

Tabla I.13. Patogenicidad de aislados de *Fusarium* spp. en plantas de fresa ‘Camarosa’ (Experimento 4)

Aislados	Necrosis corona (%)	Raíces nuevas (%)
	(NS)	($P=0,0025$)
Control	0,6 ± 0,6	58,8 ± 6,7 bc
TOR-115 mezcla	6,3 ± 2,6	57,5 ± 5,3 bc
TOR-115 masal	6,9 ± 6,2	46,3 ± 9,4 c
TOR-116 mezcla	0,0 ± 0,0	80,6 ± 3,2 a
TOR-116 masal	0,6 ± 0,6	78,8 ± 4,9 a
F-POST 8	1,3 ± 0,8	62,5 ± 4,5 abc
<i>F. oxysporum</i>		
TOR-31	0,6 ± 0,6	73,1 ± 8,3 ab
F-POST 21	0,0 ± 0,0	55,0 ± 7,6 bc
F-POST 36	0,6 ± 0,6	72,5 ± 7,0 ab
<i>F. avenaceum</i>		
F-POST 18	1,3 ± 0,8	71,9 ± 4,0 ab

^aCada valor de la tabla es la media con el error estándar de ocho repeticiones (plantas). El ANOVA se realizó previa transformación angular de los datos porcentuales. Cada valor de la tabla es la media con el error estándar de ocho repeticiones (plantas). NS: no hubo diferencias significativas entre las medias. Cifras seguidas por distintas letras difieren entre sí según el test LSD ($P \leq 0,05$).

En el experimento 5, el aislado de *F. solani* (F-POST 81) fue el único capaz de ($P=0,0001$) ocasionar necrosis en corona, disminuir el peso fresco ($P=0,0003$) y causar la muerte de tres de las ocho plantas inoculadas (Tabla I.14). El resto de los aislados analizados en este experimento no ocasionaron síntoma (Tabla I.14).

Los aislamientos llevados a cabo tras finalizar el experimento mostraron que todos los aislados analizados fueron capaces de penetrar las plantas a través de las raíces, pero sólo el aislado de *F. solani* F-POST-81 fue reaislado a partir de muestras de corona y peciolo. Los aislamientos realizados a partir de las plantas no inoculadas (control) resultaron negativos en cuanto a presencia de *Fusarium* spp.

Tabla I.14. Patogenicidad de aislados de *Fusarium* spp. en plantas de fresa ‘Camarosa’ (Experimento 5)

Aislados	Necrosis corona (%) (<i>P</i> =0.0001)	Raíces nuevas (%) (NS)	Peso fresco (g) (<i>P</i> =0.0003)	Plantas muertas (%)
Control	1,4 ± 1,4 a	67,1 ± 6,4	15.7 ± 1.8 a	0
<i>F. oxysporum</i>				
TOR-84	4,3 ± 2,6 a	63,1 ± 7,7	19.8 ± 1.8 a	0
<i>F. solani</i>				
TOR-07	0.0 ± 0.0 a	47.5 ± 8.4	15.8 ± 1.8 a	0
F-POST 81	38,1 ± 11,8 b	36,3 ± 16,4	8.1 ± 1.8 b	37.5

^aCada valor de la tabla es la media con el error estándar de ocho repeticiones (plantas). El ANOVA se realizó previa transformación angular de los datos porcentuales. Cada valor de la tabla es la media con el error estándar de ocho repeticiones (plantas). NS: no hubo diferencias significativas entre las medias. Cifras seguidas por distintas letras difieren entre sí según el test LSD (*P* ≤ 0,05).

En el experimento 6 únicamente se testaron aislados de *F. solani*. El único aislado que no mostró síntomas de enfermedad fue el aislado F-POST 164. El resto de aislados testados sí causaron enfermedad y difirieron significativamente en su patogenicidad sobre plantas de fresa ‘Camarosa’, determinada tanto por la severidad de las necrosis en corona (*P*=0,0001), como por el porcentaje de raíces nuevas emitidas (*P*=0,0003) y el peso fresco total de las plantas (*P*=0,0001) (Tabla I.15). Los aislados que resultaron más virulentos, ocasionando la muerte de más de la mitad de las plantas inoculadas, fueron TOR-393, TOR-397, TOR-725 y F-POST 169.

Los resultados de los aislamientos mostraron que todos los aislados inoculados fueron capaces de penetrar en la planta hasta nivel de peciolo. En el caso de las plantas testigo no se reaisló ningún *Fusarium* spp.

Tabla I.15. Patogenicidad de aislados de *Fusarium* spp. en plantas de fresa ‘Camarosa’ (Experimento 7)^a

Aislados	Necrosis corona (%) (<i>P</i> =0.0001)	Raíces nuevas (%) (<i>P</i> =0.0003)	Peso fresco (g) (<i>P</i> =0.0001)	Plantas muertas (%)
Control	0.3 ± 0.0 a	99.5 ± 0.0 a	35.0 ± 1.6 a	0
<i>F. solani</i>				
TOR-393	86.8 ± 7.1 d	0.5 ± 0.0 d	2.3 ± 0.2 c	100
TOR-397	43.8 ± 14.1 bc	37.6 ± 18.1 cd	9.4 ± 3.8 bc	62.5
TOR-725	53.1 ± 14.6 bc	25.3 ± 16.2 cd	6.8 ± 2.9 bc	75
F-POST 164	1.1 ± 0.6 a	87.1 ± 10.5 ab	34.0 ± 2.6 a	0
F-POST 169	46.3 ± 14.3 bc	25.3 ± 16.2 cd	6.9 ± 2.9 bc	75
F-POST 174	53.0 ± 17.7 cd	47.1 ± 17.7 c	12.1 ± 4.1 b	50
F-POST 176	53.1 ± 14.7 bcd	50.0 ± 18.7 bc	9.0 ± 2.4 bc	50
E III	21.3 ± 9.6 ab	50.0 ± 50.0 bc	12.7 ± 3.5 b	50

^aCada valor de la tabla es la media con el error estándar de ocho repeticiones (plantas). El ANOVA se realizó previa transformación angular de los datos porcentuales. Cada valor de la tabla es la media con el error estándar de ocho repeticiones (plantas). NS: no hubo diferencias significativas entre las medias. Cifras seguidas por distintas letras difieren entre sí según el test LSD (*P* ≤ 0,05).

En el experimento 7, los aislados de *F. oxysporum* MAFF 723510, NRRL 26438 y F-POST 140 ocasionaron mayor porcentaje de necrosis en las coronas (*P*=0,0001), emitieron menor proporción de raíces nuevas (*P*=0.0001) y disminuyeron significativamente el peso fresco de las plantas (*P*=0,0001), y además causaron la muerte de un alto porcentaje de plantas inoculadas (100, 62,5 y 37,5, respectivamente). Con el aislado F-POST 166 no se observó ningún tipo de síntomas, pero produjo la muerte de una de las plantas inoculadas. En el caso de los aislados F-POST 153, F-POST 170 y F-POST 179 sólo se observó una reducción significativa en el peso fresco total de las plantas inoculadas con respecto al control (*P*=0,0001), pero ninguno de ellos provocó otros síntomas. El resto de los aislados analizados no mostraron síntomas de enfermedad con respecto al control (Tabla I.16).

Los aislamientos llevados a cabo tras finalizar el experimento mostraron que los aislados MAFF 723510 y NRRL 26438 fueron capaces de penetrar en las plantas y alcanzar niveles de peciolo. En cambio, el resto de los aislados aunque penetraron en las

plantas, se establecieron principalmente a nivel de corona. Los aislamientos realizados a partir de las plantas no inoculadas (control) resultaron negativos en cuanto a presencia de *Fusarium* spp.

Tabla I.16. Patogenicidad de aislados de *Fusarium* spp. en plantas de fresa ‘Camarosa’ (Experimento 7)^a

Aislados	Necrosis corona (%) (<i>P</i> =0.0001)	Raíces nuevas (%) (<i>P</i> =0.0001)	Peso fresco (g) (<i>P</i> =0.0001)	Plantas muertas (%)
Control	0.0 ± 0.0 a	43.8 ± 3.2 ab	8.2 ± 0.8 a	0
F-POST 166	5.0 ± 5.0 ab	40.6 ± 6.8 abc	7.0 ± 0.6 abcd	12.5
<i>F. oxysporum</i>				
MAFF 723510	66.25 ± 16.5 c	16.9 ± 5.0 d	1.6 ± 0.2 f	100
NRRL 26438	18.8 ± 14.0 b	20.0 ± 3.5 cd	1.5 ± 0.3 f	62.5
F-POST 140	16.3 ± 12.1 b	31.9 ± 9.3 cd	5.5 ± 0.7 cde	37.5
F-POST 143	0.0 ± 0.0 a	38.1 ± 3.9 abc	7.3 ± 0.6 abc	0
F-POST 162	0.0 ± 0.0 a	53.8 ± 4.5 a	7.0 ± 0.5 abcd	0
F-POST 170	0.0 ± 0.0 a	30.0 ± 4.2 bc	4.4 ± 0.4 e	0
F-POST 172	0.0 ± 0.0 a	43.1 ± 3.0 ab	6.8 ± 0.6 abcd	0
F-POST 179	0.0 ± 0.0 a	43.1 ± 3.9 ab	5.4 ± 0.6 de	0
<i>F. commune</i>				
F-POST 153	1.0 0.0 a	38.8 ± 3.9 abc	6.3 ± 0.7 bcd	0
<i>F. proliferatum</i>				
F-POST 117	4.4 ± 4.4 ab	53.8 ± 3.2 a	7.6 ± 0.8 ab	0

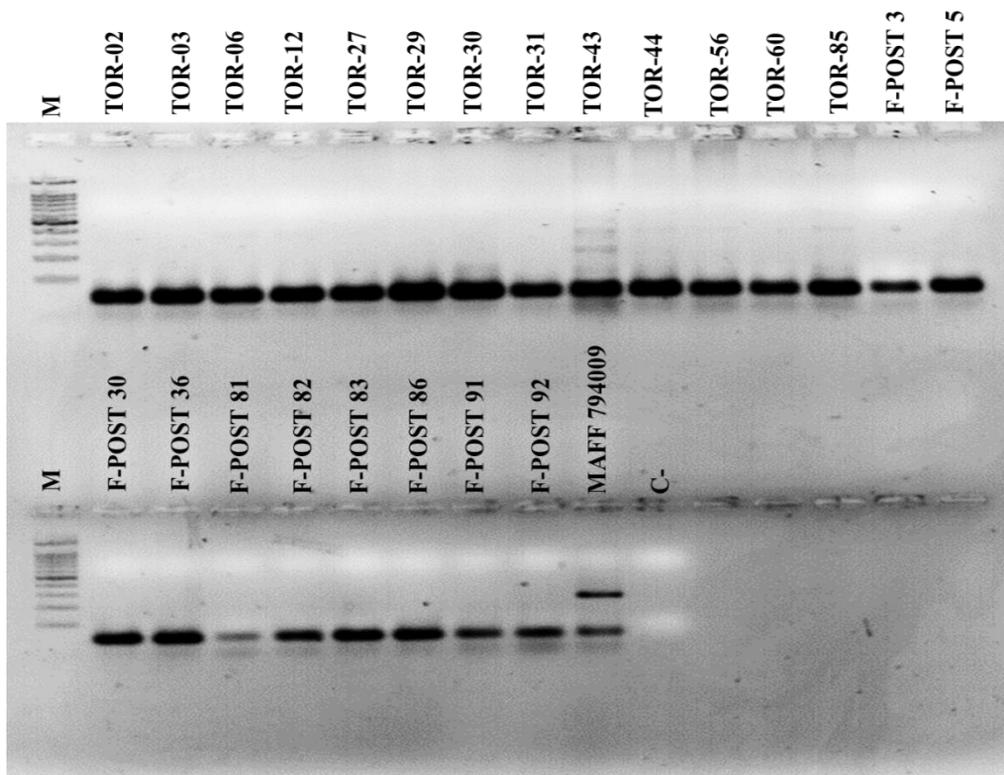
^aCada valor de la tabla es la media con el error estándar de ocho repeticiones (plantas). El ANOVA se realizó previa transformación angular de los datos porcentuales. Cada valor de la tabla es la media con el error estándar de ocho repeticiones (plantas). NS: no hubo diferencias significativas entre las medias. Cifras seguidas por distintas letras difieren entre sí según el test LSD (*P* ≤ 0,05).

Amplificación específica de *ftf1* y *fofra*

Se detectó la presencia del gen *ftf1* en todos los aislados de *F. oxysporum* que resultaron patógenos en los tests de patogenicidad, así como en el *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* y f. sp. *pisi* de probada patogenicidad sobre sus huéspedes (tomate y

guisante, respectivamente), amplificándose mediante PCR un fragmento del tamaño esperado (796 bp). El aislado patógeno F-POST 140 no se comprobó. Sin embargo, en aislados cuya patogenicidad sobre plantas de fresa 'Camarosa' resultó negativa, esta amplificación fue positiva en algunos casos y negativa en otros (Tabla I.17).

Por el contrario, cuando se empleó la pareja de cebadores FofraF/FofraR, diseñados para amplificar el marcador molecular de patogenicidad *fofra*, sólo se detectó el fragmento esperado de 239 pb en el aislado MAFF 744009 de *F. oxysporum* f. sp. *fragariae* japonés. No se amplificó este fragmento en los aislados de *F. oxysporum* f. sp. *fragariae* de EEUU de probada patogenicidad en fresa, ni en ninguno de los aislados procedentes de campos de producción de fruto de la provincia de Huelva, independientemente de que hubieran resultado patogénicos o no (Fig. I.10).



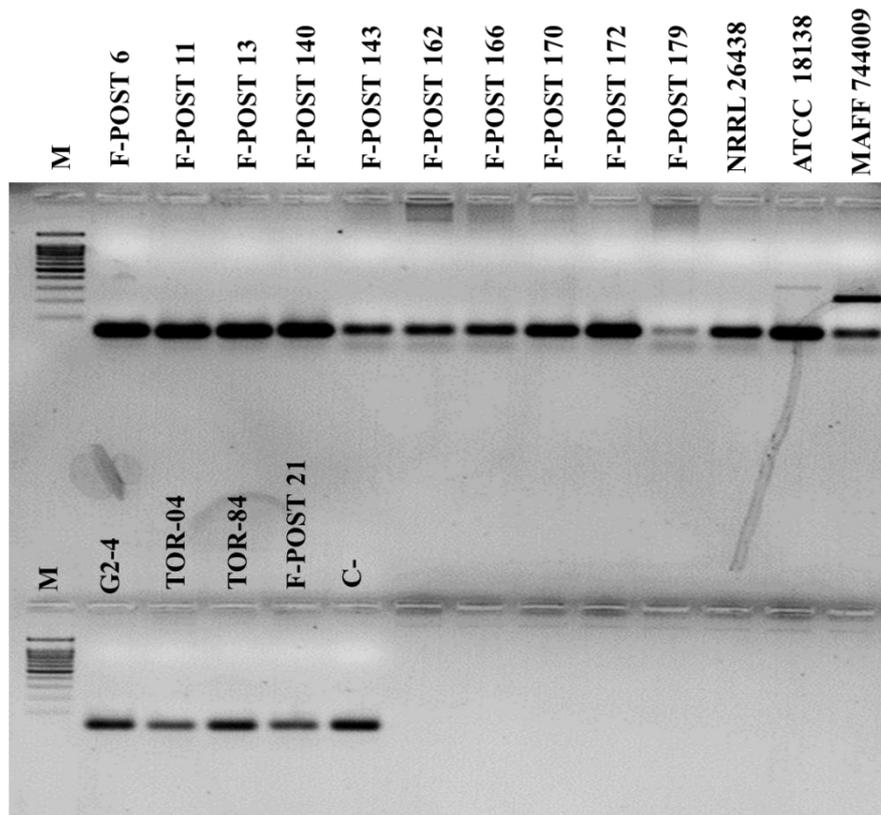


Figura I.10. Resultado de la amplificación por PCR del fragmento *fofra* en aislados de *Fusarium oxysporum* procedentes de campos de cultivo de fruto de fresa de la provincia de Huelva y aislados de *F. oxysporum* f. sp. *fragariae* procedentes de EEUU (NRRL 2638 y ATCC 18138) y Japón (MAFF 744009. M: marcador de peso molecular 100 pb (marca); C-: control negativo (sin ADN molde).

Tabla I.17. Aislados de *Fusarium oxysporum* usados en este estudio, indicando los resultados de los test de patogenicidad en plantas de fresa ‘Camarosa’ y de las amplificaciones por PCR de factor de transcripción *ftf1* y del marcador molecular de patogenicidad *fofra*.

Aislado*	Patogenicidad	<i>ftf1</i>	<i>fofra</i>
MAFF 305557	ND	+	ND
MAFF 305558	ND	+	+
MAFF 712071	ND	+	ND
MAFF 727510	ND	+	ND
MAFF 744009	+	+	+
NRRL 26438	+	+	-
ATCC 18138	-	+	-
G2-4	-	-	-
TOR-02	ND	-	-
TOR-03	ND	+	-

TOR-04	-	+	-
TOR-06	ND	-	-
TOR-12	ND	-	-
TOR-19	- -	ND	ND
TOR-25	ND	ND	ND
TOR-27	-	+	-
TOR-29	ND	+	ND
TOR-30	ND	+	-
TOR-31	- -	+	-
TOR-43	-	+	-
TOR-44	ND	-	-
TOR-56	ND	-	-
TOR-60	ND	-	-
TOR-84	-	+	-
TOR-85	-	+	-
TOR-109 V	-	ND	ND
TOR-115 V	-	ND	ND
TOR-116 I	ND	ND	ND
F-POST 3	-	-	-
F-POST 5	ND	-	-
F-POST 6	-	-	-
F-POST 11	-	-	-
F-POST 13	-	+	-
F-POST 19	-	ND	ND
F-POST 21	-	+	-
F-POST 30	-	-	-
F-POST 36	-	-	-
F-POST 82	-	ND	-
F-POST 83	-	ND	-
F-POST 84	-	ND	ND
F-POST 85	-	ND	ND
F-POST 86	-	ND	ND
F-POST 91	-	ND	-
F-POST 92	-	ND	-
F-POST 140	+	ND	-
F-POST 143	-	ND	-
F-POST 162	-	ND	-
F-POST 170	-	ND	-
F-POST 172	-	ND	-
F-POST 179	-	ND	-
Foly RAF 70	ND	+	-
Fopi 207	ND	+	-
Focic 7982	ND	ND	-

^aMAFF: aislados procedentes del Ministerio de Agricultura, Silvicultura y Pesca de Japón (*Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries of Japan*); ATCC: aislados

procedentes de la colección americana de cultivos tipo (*American Type Culture Collection*); NRRL: aislados procedentes de la colección del servicio de investigación agrícola de cultivos tipo de EEUU (*Agricultural Research Service Culture Collection*); G: aislados cedidos por el Dr. Francisco Arroyo; TOR: aislados cedidos por la Dra. Berta de los Santos; F-POST: aislados obtenidos en las prospecciones realizadas durante esta tesis doctoral; Foly, Fopi y Focic: aislados cedidos por la Dra. Blanca Landa, de probada patogenicidad sobre plantas de tomate, guisante y judía.

^b (+): amplificación positiva; (-): amplificación negativa; y (ND): no determinado

DISCUSIÓN

F. oxysporum se detectó en todos los suelos de viveros de altura analizados, presentándose mayores niveles de inóculo en suelos sin desinfectar que en los desinfestados con 1,3D+CP. En cambio los suelos pertenecientes a la provincia de Ávila, desinfestados con metamNa o dazomet, mostraron niveles de *F. oxysporum* superiores a los suelos sin desinfestar en esta misma provincia, e incluso a los suelos desinfestados con 1,3D+CP en el resto de provincias en ese mismo año, indicando la baja eficacia de estos productos en la disminución de los niveles de *F. oxysporum* en suelo. La presencia de *F. oxysporum* en suelos desinfestados que van a ser dedicados al cultivo de plantas de fresa puede explicar la detección de este hongo en las plantas hija antes de su plantación en los campos de producción de fruto; presencia que ha ido aumentando a lo largo de las tres campañas analizadas (5%, 9.5% y 18.0% de las plantas analizadas en 2011, 2012 y 2013, respectivamente). Otro posible origen de *F. oxysporum* en las plantas hija puede ser una infección previa en las plantas madre, en las que también se detectó este hongo en el 3.5%, 1.6% y 3.6% de las plantas analizadas en los años 2011, 2012 y 2013, respectivamente.

Los dos campos de producción analizados en la provincia de Huelva se desinfestaron con el mismo agente químico 1,3D+CP. En ambos casos se observó cómo los niveles de inóculo de *F. oxysporum* en el suelo aumentaron a lo largo de las tres campañas analizadas, y en el caso de Palos de la Fra. también aumentaron durante los tres años de estudio. Este resultado es indicativo de que los actuales métodos de

desinfestación del suelo no son suficientemente eficaces para disminuir las poblaciones de *F. oxysporum* y que este hongo se va acumulando con el tiempo gracias a su capacidad de formar estructuras de supervivencia de elevada persistencia en el tiempo. Aun así, la incidencia de plantas afectadas con *Fusarium* spp. ha dependido en gran medida de la variedad de fresa que se cultiva cada año. Los resultados de la incidencia de *Fusarium* spp. en los campos de producción analizados mostraron que se detectaron aislados de *Fusarium* spp. en plantas ‘Fortuna’ a lo largo de toda la campaña de producción de fruto (desde diciembre/enero hasta mayo) y en cambio, en las variedades ‘Sabrina’ y ‘Splendor’, el número de las plantas muertas se concentró en el mes de mayo.

Aunque los niveles de aislados patógenos de *F. oxysporum* procedentes del cultivo de la fresa durante las tres campañas analizadas no son alarmantes (sólo uno de los 30 aislados testados resultó positivo en test de patogenicidad), creemos que es necesario establecer un protocolo de alerta para la detección temprana de *F. oxysporum* f. sp. *fragariae*. Se sabe que el uso de material vegetal infectado es una de las principales causas del establecimiento de un nuevo patógeno en un cultivo. En España, el material vegetal de partida para la obtención de plantas madre procede en buena parte de países extranjeros, sobre todo EEUU, donde *F. oxysporum* f. sp. *fragariae* es un patógeno extendido y causa graves pérdidas en la producción de fresa (Islas, 2012). A pesar de los controles fitosanitarios existentes, *F. oxysporum* no está dentro de los hongos que deben ser detectados en el programa de certificación de plantas de fresa. Debido a ello, se podría producir una entrada de *F. oxysporum* f. sp. *fragariae*, procedente de otros países. Una vez establecido en los campos de producción los aislados patógenos podrían propagar la patogenicidad hacia los aislados de *F. oxysporum* no patógenos por transferencia horizontal de cromosomas (portadores de genes de patogenicidad) (Ma y col., 2010).

El hongo de suelo *M. phaseolina* no ha sido detectado en ninguna de plantas madre prebase analizadas en los tres años de análisis. Sin embargo, este patógeno está presente en los suelos de viveros de altura pertenecientes a dos de las tres provincias analizadas (Ávila y Valladolid), incluso en aquellos campos sometidos a tratamientos químicos de desinfección con 1,3D+CP, dazomet o metamNa. Anteriormente, *M. phaseolina* nunca se había referenciado en viveros de altura (Redondo y col., 2012). En el caso de la provincia de Segovia sólo se detectó en la última campaña (2013/14), a

niveles muy bajos, en uno de los campos desinfectados analizados. El hecho de que no se haya detectado *M. phaseolina* en ninguna de las plantas hija analizadas durante el estudio puede ser debido a que los niveles de este hongo en suelo son muy bajos, cuando son comparados con los de *F. oxysporum* y *P. cactorum*. En este sentido, estos niveles podrían no ser suficientes para provocar infección en las plantas hija crecidas en estos suelos, a pesar de que en los viveros de altura también se dan las condiciones propicias de temperatura para que *M. phaseolina* sea infectivo (temperaturas >22°C con un máximo de capacidad infectiva entorno a los 32°C) (Fang y col., 2011). En cuanto a los campos de producción de fruto analizados en la provincia de Huelva, se observaron plantas de fresa muertas por la Podredumbre carbonosa durante todos los años de estudio. Además, en los suelos de los campos de producción se detectó una densidad de inóculo de *M. phaseolina* 50 veces mayor que en los suelos de viveros de altura. En todos los campos analizados el nivel de inóculo fue menor en los suelos desinfectados antes de la plantación que en los suelos muestreados después de la campaña, pero esta desinfección no es del todo completa, puesto que en la mayoría de los campos quedó un nivel residual de inóculo. Todo ello sugiere que el origen de las infecciones por *M. phaseolina* en el cultivo de la fresa radica en los suelos de campos de producción, donde la desinfección no parece ser lo suficientemente eficaz para controlar los niveles de este patógeno.

P. cactorum es un hongo de suelo considerado como organismo nocivo que debe estar excluido en las plantas certificadas de fresa, según la normativa del Reglamento técnico de control y certificación de plantas de vivero de frutales (B.O.E. de 12 de febrero de 2011). A pesar de que no se ha detectado en las plantas madre prebase analizadas, sí se ha detectado mediante PCR en tiempo real en un 1.3, 3.0 y 15.4% de las plantas hija certificadas analizadas en 2011, 2012 y 2013, respectivamente. En viveros de altura, este patógeno no se ha detectado en suelos desinfectados antes de la plantación de fresa, pero sí en suelos no desinfectados, por lo que los métodos de desinfección en estos campos parecen ser los adecuados para la erradicación del patógeno. En este sentido, la presencia de *P. cactorum* en plantas hija se podría explicar por un fallo en la sensibilidad de los sistemas de detección de *P. cactorum* utilizados o por una posible contaminación del agua de riego, tal y como se ha evidenciado en otros cultivos (Rivero y col., 2010; Bienaplf y Balci, 2014).

En los campos de producción de fruto de la provincia de Huelva, se puede establecer una relación entre la variedad de fresa cultivada durante una campaña y la presencia de *P. cactorum* al final de la campaña e inicios de campañas posteriores. En los muestreos de los suelos preplantación desinfestados durante la campaña 2011/2012 no se detectó la presencia de *P. cactorum* en ninguna de las dos fincas analizadas. Al finalizar esta primera campaña, encontramos que el nivel de *P. cactorum* en la finca de Palos de la Fra. era de 3 pg ADN/g suelo y en cambio en la finca de Cartaya no se detectó la presencia del patógeno. Esto concuerda con el hecho de que en Palos de la Fra. se aislaron oomicetos a partir de las plantas muertas durante la campaña y no a partir de las plantas ‘Sabrina’ muertas en Cartaya durante esta campaña. En la siguiente campaña analizada (2012/13) la presencia de *P. cactorum* en la finca de Cartaya sigue siendo negativa, y en cambio en la finca de Palos de la Fra. encontramos un nivel de inóculo de 1,8 ng ADN *P. cactorum*/g suelo. Al terminar esta segunda campaña, observamos que la cantidad de *P. cactorum* en el suelo de las fincas de Cartaya fue bastante alta, lo cual concuerda con la presencia de oomicetos observada en las plantas muertas de la variedad Fortuna sembradas durante esta campaña en uno de los macrotúneles analizados. Durante este mismo año, en la finca de Palos de la Fra. se sembró la variedad Splendor. De las plantas muertas en diciembre se aisló un porcentaje bajo de oomicetos, y el nivel alcanzado del patógeno en el suelo subió de 1,8 a 2,5 ng ADN/g suelo. En la última campaña de estudio, en Palos de la Fra. se volvieron a sembrar plantas de fresa ‘Splendor’ y los niveles de inóculo se comportaron de la misma forma que en la campaña anterior. En el caso de Cartaya, en este último año sí se detectaron grandes cantidades de inóculo al inicio de la campaña, el cual probablemente procedía de la campaña anterior y no fue completamente eliminado por medio de la desinfestación. Al final de la campaña no se retiraron las plantas antes??--> en resultados?? Todo esto sugiere que las infecciones en los campos de producción se originan, a partir de las plantas hija procedentes de vivero y, posiblemente, a través del agua de riego tal y cómo se detectó en una de las campañas en la finca de Cartaya.

Además de la caracterización patogénica de los aislados de *F. oxysporum* presentes en este trabajo, también se llevaron a cabo pruebas de patogenicidad con otros aislados de *Fusarium* spp. En este sentido, se han encontrado aislados de: plantas hija, de plantas en producción muertas y de suelos de campos de producción, pertenecientes a

F. solani, entre los cuales nueve de los once testados resultaron patógenos en los test de patogenicidad realizados en plantas de fresa ‘Camarosa’. De esta forma, a partir de este trabajo se referenció a *F. solani* como un nuevo patógeno detectado en el cultivo de la fresa en España (Pastrana y col., 2014).

De los cuatro aislados de *F. oxysporum* previamente referidos como patógenos de fresa e incluidos en este estudio, sólo tres: uno americano, otro japonés y el último español (NRRL 26438, MAFF 744009 y G2-4, respectivamente) confirmaron su patogenicidad en nuestros tests. Pero el aislado G2-4 no llegó a ser tan virulento como los dos anteriores, o los aislados de *F. solani* patógenos. En cambio, el aislado americano ATCC 1813 no mostró ningún signo de patogenicidad en los ensayos realizados. No se conoce con claridad cuál es la causa de que este aislado, de patogenicidad anteriormente confirmada, no haya resultado patógeno en nuestros experimentos, pero no es la primera vez que sucede algo parecido con aislados de *F. oxysporum*. Weeb y col., 2013 proponen dos posibles explicaciones a este hecho. La primera de ellas se basa en las diferencias en la metodología de inoculación y la segunda, en la forma en la que los aislados son almacenados o mantenidos. En el caso del aislado español, no se observan grandes diferencias en cuanto a la metodología, aunque sí parece que existieron diferencias en las condiciones de crecimiento de las plantas durante el experimento. En el caso del aislado americano, se desconoce tanto la metodología como la forma de almacenamiento, pero lo que queda claro es que es necesario encontrar buenos métodos de almacenamiento y mantenimiento de *F. oxysporum* f.sp. *fragariae* que no alteren su patogenicidad y agresividad. Además, se ha referido en otros trabajos la existencia de genes “prescindibles” de virulencia en cromosomas de *F. oxysporum*. Se desconoce el mecanismo por el cual se pierde este ADN prescindible y la gran frecuencia con la que esto sucede en aislados procedentes del campo (Funnell y col., 2002). El genoma de *F. oxysporum* está constituido por un grupo de cromosomas conservados en todos los aislados (‘core’), y un grupo de pequeños cromosomas polimórficos que confieren patogenicidad y especificidad por el huésped (cromosomas LS ‘Linage Specific’). Los cromosomas LS están ausentes en *F. oxysporum* no patógenos y se pueden transferir horizontalmente entre linajes distintos de *F. oxysporum* confirmando patogenicidad a los aislados que lo reciben (Ma y col., 2013). Del mismo modo, un aislado patógeno puede perder los cromosomas LS cuando

no los requiera, y por tanto la patogenicidad (p.e. después de muchas réplicas sucesivas en medios de cultivo ricos en nutrientes). En este sentido, la transferencia horizontal de los factores relacionados con la especificidad de huésped, entre aislados de *F. oxysporum* procedentes de linajes genéticamente diferentes, puede explicar el aparente origen filogenético de la especialización de huésped y la rápida emergencia de nuevos linajes patogénicos procedentes de fondos genéticos distintos e incompatibles (Ma y col., 2010).

En el presente estudio se ha diseñado una sonda TaqMan® para la detección específica y cuantificación de *F. oxysporum* en muestras de suelo y extractos crudo de material vegetal mediante PCR en tiempo real. Anteriormente, ya se diseñó un protocolo para esta misma detección en muestras de ADN extraído a partir de suelo y de plantas mediante PCR en tiempo real usando la química SYBR®Green (Jiménez-Fernández y col., 2010). Las sondas TaqMan® fueron diseñadas para mejorar la especificidad de la reacción y aumentar la fiabilidad de la cuantificación gracias a la unión complementaria de la sonda específica. Además, otras de las ventajas de la química TaqMan® es que las sondas pueden ser marcadas con diferentes fluoróforos, lo cual permite la detección de varios patógenos en una misma reacción (Aroca y col., 2008; Bilodeau y col., 2009). De esta forma, se podría utilizar una sola reacción de múltiple PCR para la detección de los tres hongos patógenos estudiados en esta tesis.

Existen estudios que reportan técnicas moleculares capaces de diferenciar aislados de *F. oxysporum* patógenos de los no patógenos. Algunos de ellos se basan en la detección de genes reguladores que se expresan de forma específica en los primeros estadios de la infección, como por ejemplo el gen que codifica para el factor de transcripción *ftf1* (Ramos y col., 2007). En este sentido, Gomez-Lama, 2012 puso de manifiesto que todos los aislados de *F. oxysporum* f. sp *dianthi* de alta virulencia, independientemente de la raza, contienen el gen *ftf1* como se demostró mediante amplificación por PCR y que en la gran mayoría (23 de un total de 25) de los aislados de baja virulencia no se detecta dicho gen. En nuestro caso, se detectó la presencia de este factor en todos los aislados reportados como virulentos (en fresa, en guisante y en tomate) a excepción de G2-4, pero además también se detectó en ocho de los 13 aislados testados como no virulentos en test de patogenicidad. De este modo, no se encontró relación entre la presencia del gen *ftf1* y la patogenicidad de los aislados de *F.*

oxysporum de fresa, aunque la presencia de un gen no necesariamente implica su expresión. En este estudio, no consideramos relevante analizar la relación entre el número de copias de *ftf1* y el grado de agresividad de los aislados, tal y como se ha descrito en otros trabajos realizado con *F. oxysporum* f. sp. *phaeoli* (Ramos y col., 2007; Vega-Bartol y col., 2011) o con *F. oxysporum* f. sp. *dianthi* (Gomez-Lama, 2012), ya que en nuestro caso no se encontraron niveles de agresividad diferentes entre los aislados.

La presencia del marcador molecular *fofra* tampoco parece ser una buena herramienta para la discriminación entre aislados patógenos y no patógenos de *F. oxysporum* en fresa. La especificidad de la técnica desarrollada por Suga y col., 2013 en los aislados de *F. oxysporum* f. sp. *fragariae* procedentes de Japón no generó falsos negativos, es decir, todos los aislados japoneses analizados amplificaron la región *fofra*. En cambio, no fue específica para los aislados patógenos procedentes de España y EEUU. Aunque en el sentido contrario, Suga y col., 2013 también encontraron incongruencias en su misma técnica, puesto que encontraron aislados positivos en presencia del marcador y negativos en test de patogenicidad. Los autores de estos cebadores dan tres posibles explicaciones a esta controversia. La primera de ellas se atribuye a que es posible que existan diferencias en la agresividad de los aislados de *F. oxysporum* f. sp. *fragariae* y que los aislados con baja agresividad pueden no ser detectados cuando se ha usado un solo cultivar de plantas de fresa en los test de patogenicidad, como es nuestro caso (cv. Camarosa). La segunda, como ya se comentó anteriormente en esta discusión, es la pérdida de patogenicidad durante las sucesivas réplicas en medio de cultivo enriquecido. La última de las posibilidades que mencionan, y que se clarifica en este estudio, es que existe una alta diversidad genética entre los aislados de *F. oxysporum* f. sp. *fragariae* (Suga y col., 2013) y en el estudio realizado por Suga y col., 2013 sólo se tuvieron en cuenta los aislados japoneses. Por ello, sería conveniente realizar un estudio más amplio con aislados de orígenes geográficos diferentes.

Después de todo lo analizado anteriormente, creemos que las técnicas establecidas en este estudio son lo suficientemente rápidas y sensibles como para ser incluidas en los programas de selección fitosanitaria y en el análisis de plantas madre e hija antes de su siembra en viveros de producción de plantas de fresa, o en campos de

producción de fruto, respectivamente. Además, los desinfectantes de suelo utilizados parecen no ser los adecuados para la erradicación de los patógenos en los campos de cultivo, por lo que habría que considerar el uso de nuevas alternativas de control. En el caso de la detección de *P. cactorum* en el agua de riego de los campos de producción de fruto, se debería de considerar la realización de un estudio mucho más exhaustivo que ayude a clarificar la circulación de este patógeno en los sistemas de riego.

DETECCIÓN SIMULTÁNEA DE TRES HONGOS
PATÓGENOS DE FRESA MEDIANTE HIBRIDACIÓN
MOLECULAR NO RADIOACTIVA USANDO UNA
POLISONDA

CAPÍTULO II.

DETECCIÓN SIMULTÁNEA DE TRES HONGOS PATÓGENOS DE FRESA MEDIANTE HIBRIDACIÓN MOLECULAR NO RADIOACTIVA USANDO UNA POLISONDA

INTRODUCCIÓN

La detección del patógeno en etapas tempranas de la infección constituye una de las principales vías de control de las enfermedades de plantas. Los métodos basados en la observación de la sintomatología y en los aislamientos tradicionales del patógeno pueden ser indicativos del patógeno o grupo de organismos que están implicados en una enfermedad. Sin embargo, para un diagnóstico definitivo, se requiere la utilización de otros métodos, rápidos, específicos y de suficiente sensibilidad como para garantizar una identificación más precisa del agente causante de la infección. Durante los últimos años, los métodos de detección y diagnóstico se han basado en la hibridación de ácidos nucleicos o la amplificación selectiva de fragmentos del genoma mediante la utilización de cebadores específicos. En el caso de la certificación de plantas, donde lo importante es la detección de los patógenos y no su cuantificación, se están abriendo paso las técnicas de hibridación molecular con sondas específicas no radioactivas, ya que la detección múltiple de patógenos (más de tres) mediante PCR en tiempo real es un proceso muy complejo debido al solapamiento de los espectros de emisión de los fluoróforos y la interacción de los distintos oligonucleótidos (cebadores y sondas) en la reacción de amplificación.

La hibridación molecular sobre soporte sólido se utilizó por primera vez como método de diagnóstico en el caso de patógenos tipo viroide (Owens y Diener, 1981) y posteriormente, se aplicó a la detección de virus de RNA y DNA en tejidos vegetales (Garger y col., 1983; Maule y col., 1983). El método más común de hibridación molecular es la denominada hibridación tipo *dot-blot* basada en la aplicación directa de los ácidos nucleicos sobre un soporte sólido (membranas de nylon o nitrocelulosa) y su posterior hibridación con sondas de secuencia complementaria a la secuencia a detectar. El marcaje de las sondas permite la visualización de las moléculas hibridadas mediante

diferentes métodos de detección. Hasta hace poco, la mayoría de las técnicas de hibridación desarrolladas en biología molecular utilizaban sondas marcadas con precursores radioactivos (fundamentalmente ^{32}P y ^{35}S), pero debido a los riesgos inherentes que conlleva el uso de la radioactividad, y a la dificultad de su utilización en sistemas de diagnóstico rutinario, el uso de sondas marcadas radioactivamente quedó restringido a laboratorios muy especializados por lo que se comenzó a trabajar en el desarrollo de métodos de detección utilizando precursores marcados no radioactivamente (Pallás y col., 1997).

La utilización de precursores no radioactivos para marcar los ácidos nucleicos ha permitido que la técnica de hibridación molecular sea cada vez más utilizada en el campo de la diagnosis. Entre estos precursores no radioactivos, los más usados son los derivados de las moléculas de biotina y digoxigenina, siendo la biotina la primera molécula utilizada para marcar no radioactivamente ácidos nucleicos (Forster y col., 1985) y aplicada en el diagnóstico de virus (Habibi y col., 1987) y viroides (Candresse y col., 1990), pero la presencia de biotina endógena en la planta o la presencia de glicoproteínas que unen biotina puede producir un inaceptable ruido de fondo. Por ello, en los últimos años se ha extendido de forma muy importante el uso del esteroide de origen vegetal digoxigenina como precursor para marcar ácidos nucleicos de forma no radioactiva. Esta molécula se une mediante un brazo espaciador de siete residuos de carbono a nucleótidos de uridina, los cuales son incorporados a la molécula que servirá como sonda.

Habitualmente, en la hibridación molecular no radioactiva se pueden utilizar dos tipos de sondas. En el caso de las sondas de DNA, el nucleótido marcado es incorporado a la molécula utilizando cebadores al azar, o mediante la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). En las sondas de RNA, el nucleótido marcado es incorporado mediante una reacción de transcripción *in vitro* utilizando la RNA polimerasa adecuada. También pueden utilizarse como sondas oligonucleótidos marcados enzimáticamente en su extremo 3'. Una vez hibridada la sonda, la utilización de un anticuerpo frente a la molécula de digoxigenina, conjugado con una enzima (fosfatasa alcalina o peroxidasa), permite la posterior visualización usando el substrato adecuado (colorimétrico, quimioluminiscente, bioluminiscente o fluorescente).

Para reducir en tiempo y dinero el análisis de las muestras, se han desarrollado técnicas de hibridación molecular no radioactiva capaces de detectar simultáneamente hasta diez sondas. En primer lugar, se desarrollaron para procesos de certificación en plantas de tomate (Saldarelli y col., 1996), para la detección de virus patógenos en clavel (Sánchez-Navarro y col., 1999) y en la detección de *Ilarvirus* que afectan a frutales de hueso (Saade y col., 2000). En todos los casos, la mezcla de las correspondientes sondas individuales no redujo la sensibilidad de la detección en comparación con las sondas individuales. Otra alternativa estudiada para la detección múltiple ha sido el uso de polisondas (Herranz y col., 2005). Esta estrategia implica la clonación, en tándem, de las secuencias parciales de cada patógeno diana y permite la síntesis de una única sonda llamada polisonda. Las polisondas han sido desarrolladas para detectar dos, cuatro y hasta seis virus de plantas de tomate (Herranz y col., 2005; Aparicio y col., 2008), cuatro viroides de naranjo (Cohen y col., 2006) y ocho virus y dos viroides patógenos en frutales de hueso (Peiró y col., 2011). En todos estos casos, se confirmó que el uso de las polisondas es comparable al de las sondas individuales en términos de sensibilidad y especificidad.

Hasta el momento, esta técnica no se ha utilizado para la detección de patógenos de plantas distintos a virus y viroides. Durante este trabajo, hemos desarrollado una estrategia de detección múltiple de hongos patógenos para el cultivo de la fresa (*F. oxysporum* f. sp. *fragariae*, *M. phaseolina* y *Verticillium dahliae*), la cual podría implementarse en programas de certificación de plantas de fresa.

OBJETIVO

Diseño de una polisonda para la detección simultánea de los hongos patógenos de fresa *F. oxysporum* f. sp. *fragariae*, *M. phaseolina* y *V. dahliae* mediante hibridación molecular no radioactiva.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material fúngico

Se utilizaron aislados monospóricos crecidos en PDA, raspados y almacenados en tubos a -80°C (Tabla II.1).

Tabla II.1. Aislados fúngicos utilizados para el diseño de sondas marcadas con digoxigenina para hibridación molecular.

Especie	Aislado	Procedente de
<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>fragariae</i>	MAFF 744009	Ministerio de Agricultura, Silvicultura y Pesca de Japón
<i>Fusarium oxysporum</i>	F-POST 143	Este trabajo
<i>Macrophomina phaseolina</i>	MAC-9	Este trabajo
<i>Botryosphaera dothidea</i>	-	Universidad de Córdoba
<i>Verticillium dahliae</i>	F-52	Sanidad vegetal (Huelva)
<i>Verticillium alboatrum</i>	CECT2693	Colección Española de Cultivos Tipo

Material vegetal

Se utilizaron plantas de fresa lavadas bajo el grifo, desinfectadas en una solución de hipoclorito de sodio al 1%, enjuagadas en agua destilada, secadas a temperatura ambiente en papel de filtro estéril y almacenadas en bolsas Bioreba a -80°C (Tabla II.2).

Tabla II.2. Plantas utilizadas para el diseño de sondas marcadas con digoxigenina para hibridación molecular.

Cultivar de fresa	Infectada por	Procedente de
Camarosa	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>fragariae</i>	Inoculación artificial
Fortuna	<i>Macrophomina phaseolina</i>	Inoculación artificial
Splendor	<i>Verticillium dahliae</i>	Campo de cultivo (Huelva)
Camarosa	Planta sana	Cultivo de meristemo <i>in vitro</i>

Extracción de ácidos nucleicos totales

Las extracciones de ácidos nucleicos se realizaron a partir de 0.4 g del micelio crecido de los hongos y de 1 g de tejido de raíz, corona y peciolo de las plantas infectadas. Para ello, el material se pulverizó en un mortero con nitrógeno líquido. Tras transferir el material a un tubo de microcentrífuga previamente enfriado con nitrógeno líquido, se añadió un volumen del tampón de extracción (Glicina 0,35 M, NaOH 48 mM, NaCl 0,34 M, EDTA 40 mM y SDS al 4%), un volumen de fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (25/24/1) y se agitó durante 2 min en un agitador tipo vórtex. Tras centrifugar a 14.000 rpm durante 10 min a 4°C se recuperó el sobrenadante y se añadió un volumen de fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (25/24/1) y se agitó en un agitador tipo vórtex. Este último paso se repitió dos veces más. Posteriormente, se tomó el sobrenadante y se añadió 1/20 volúmenes de AcNa 3M pH 5,2 y 2,5 volúmenes de EtOH absoluto. Esta mezcla se incubó a -20°C durante 30 min. Transcurrido este tiempo, se centrifugó a 14.000 rpm durante 10 min a 4°C. Se eliminó el sobrenadante y el precipitado se resuspendió en 100 µl de agua estéril, utilizando 10 µl para su visualización en geles de agarosa-TAE (Tris-acetato 40 mM, EDTA 1 mM) al 1% (p/v).

Diseño y elaboración de sondas marcadas con digoxigenina

Amplificación y digestión de regiones específicas de F. oxysporum f. sp. fragariae, M. phaseolina y V. dahliae

La amplificación de la región específica seleccionada para cada uno de los hongos en estudio se llevó a cabo con la pareja de cebadores modificados y las condiciones de ciclado reportadas para cada uno de ellos (Tabla II.3). La modificación de los cebadores utilizados consistió en añadir en el extremo 5' la secuencia CACA además del sitio de corte de la enzima *XhoI* (CTCGAG) o *SalI* (GTCGAC) (cebador directo o reverso, respectivamente). Los productos amplificados se analizaron en geles de agarosa al 1% en tampón TAE 1X con 0,05 μ l de bromuro de etidio y se visualizaron en un transiluminador "Vilber Lourmat, ECX-20-M". El marcador de peso molecular utilizado fue la escalera de 1Kb (Thermo Scientific). Posteriormente, los productos se purificaron mediante extracción con fenol-cloroformo y precipitación con etanol y acetato sódico (Sambrook y col., 1989).

La reacción de digestión se realizó en un volumen final de 30 μ L, utilizando 15 U de cada enzima (*XhoI* y *SalI*, Thermo Scientific) y 1x de tampón O (Thermo Scientific). La mezcla se incubó a 37°C durante 2 h para su digestión.

Ligación

Los productos de PCR purificados y digeridos se sometieron a una reacción de ligación con el vector pBluescript®SK(+/-) phagemid (pSK) (Agilent) previamente digerido con la enzima de restricción *XhoI* y desfosforilado. La reacción de ligación para cada hongo se realizó en un volumen final de 5 μ L, utilizando 1 μ L del inserto correspondiente, 0.5 μ L del vector pSK y 0.5 μ L de la enzima DNA ligasa (1-3 U/ μ L, Promega). La mezcla de ligación se incubó a 16°C durante al menos 2 h.

Transformación de las células competentes y purificación del plásmido recombinante.

Para la preparación de células competentes se utilizó la cepa de *E. coli* DH5 α , de alta frecuencia de transformación y que permite la selección de los clones

recombinantes por el crecimiento de colonias blancas (ausencia de coloración azul) al utilizar como substrato cromogénico 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido (X-gal). El método utilizado para la preparación de células competentes fue el descrito por Sambrook y col., (1989). Alícuotas de 50 μ l de células competentes almacenadas a -70°C fueron transformadas con 2,5 μ l de la mezcla de ligación para cada hongo mediante electroporación a 1400 voltios (BioRad® Gene Pulse Xcell Electroporation System). A continuación, las mezclas de ligación se incubaron con 300 μ L de medio Luria-Bertani (LB, Bacto-triptona 1% (p/v), Bacto-extracto de levadura 0,5% (p/v), NaCl 1% (p/v), pH 7,0) a 37°C durante 30 min. Finalmente, se sembraron 150 μ l del cultivo en placas de medio LB sólido suplementado con 50 mg/mL de ampicilina y 30 μ l de X-gal (20 mg/mL) como substrato cromogénico. Las placas se incubaron en posición invertida durante toda la noche a 37°C.

Para la selección de las colonias transformadas con el inserto esperado se llevó a cabo un análisis por PCR en un termociclador Mastercycler Pro (Eppendorf) a partir de una porción de la colonia bacteriana pinchada por un palillo de dientes estéril e introducido en el cóctel de reacción de PCR. Estas reacciones se llevaron a cabo en un volumen de 5 μ l, conteniendo 5 μ M de cada cebador (directo del plásmido pSK y reverso del fragmento insertado), 1x tampón GoTaq® Green MasterMix (Promega), 20 mM MgCl₂, 2 mM dNTPs y 0.03 U GoTaq® DNA polimerasa (Promega). Tras el análisis en gel de agarosa, se seleccionaron como positivas aquellas colonias que presentaron el tamaño de inserto esperado.

Las colonias seleccionadas se inocularon en 5 mL de medio LB líquido suplementado con 50 μ g/mL de ampicilina. Los cultivos se crecieron durante toda la noche a 37°C en agitación, se centrifugaron a 6000 rpm durante 30 s a temperatura ambiente, se descartó el sobrenadante y se procedió a la purificación de los plásmidos recombinantes, portadores de los insertos correspondientes, mediante el kit comercial GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit (Thermo Scientific), siguiendo las indicaciones del fabricante.

Digestión de los plásmidos recombinantes para comprobar el sentido del inserto

La reacción de digestión de los plásmidos se llevó a cabo en un volumen final de 10 μ L, utilizando 0.4 U de la enzima *Apa*I (Thermo Scientific) y 0.2 U de la enzima

*Xho*I (Thermo Scientific), 1x de tampón G (Thermo Scientific) y 2.5 µL de los plásmidos purificados. La reacción de digestión se llevó a cabo durante 1 h a 37°C. Los productos de la reacción se visualizaron en un gel de agarosa-TAE al 1%. Además, los plásmidos recombinantes se secuenciaron con el cebador directo del plásmido (5'-GTAAAACGACGGCCAGT-3') (Servicio secuenciación IBMCP) para confirmar la clonación correcta de los insertos.

Digestión y desfosforilación de los plásmidos recombinantes

La reacción de digestión de los plásmidos se llevó a cabo en un volumen final de 30 µL, utilizando 2 µL del plásmido seleccionado, 15 U de la enzima *Xho*I (Thermo Scientific) y 1x del tampón R. La mezcla se incubó a 37°C durante 2 h. Los productos se purificaron mediante extracción con fenol-cloroformo y precipitación con etanol y acetato sódico (Sambrook et al., 1989). A continuación, el plásmido digerido y purificado se desfosforiló en un volumen final de 15 µl conteniendo 1.5 µl del tampón 10 x y 1.5 µl de la enzima fosfatasa alcalina FastAP (Promega Corp). La reacción de desfosforilación se incubó durante 10 min a 37°C, tras lo cual se procedió a inactivar la fosfatasa incubando la reacción a 75°C durante 10 min. El plásmido linearizado y desfosforilado se purificó con fenol-cloroformo y posterior precipitación con etanol y acetato sódico (Sambrook et al., 1989).

Marcaje de las sondas con digoxigenina

Como se describió previamente por Más y col., 1993 y Pallás y col., 1998, se usó un microgramo del plásmido linearizado con la enzima de restricción *Xho*I, 10 x del tampón de transcripción, 0.5 µl de la mezcla de nucleótidos 10 x (ATP, CTP, GTP 10 mM, UTP 7,5 mM, dig-UTP 2,5 mM), 0.5 µl del tampón de transcripción 10 x, 6 U de inhibidor de RNasa A RiboLock (Thermo Scientific) y 17,5 U de la ARN polimerasa T7 (Takara Bio Inc.) en un volumen final de 5 µL. La reacción se incubó durante 2 h a 37°C. El producto resultante se analizó posteriormente en gel de agarosa-TAE al 1% y tinción con bromuro de etidio.

Un microlitro del producto de la transcripción se diluyó en 10 mL de solución de hibridación para su uso en el proceso de hibridación.

Amplificación de las muestras de estudio

La amplificación de los fragmentos específicos de los hongos a partir de micelio o material vegetal obtenidos en apartados anteriores se realizó en un volumen final de 10 μ L, utilizando 1 x del tampón MyTaq™ HS (Bioline), 1 x DMSO (Bioline), 3 μ M de los cebadores (par de cebadores individual o mezcla de cebadores total) (Tabla II.4), 0.15 μ L ADN polimerasa MyTaq™ HS (Bioline) y 50-60 ng ácidos nucleicos de la muestra. Las reacciones se realizaron en un termociclador MJ Research PTC-100 (Bio-Rad) con un programa de desnaturalización inicial de 3 min a 95°C, seguido de 30 ciclos de 30 s a 95°C, 30 s a 64°C y 15 s a 72°C. Los productos de amplificación se separaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% en TAE 0.5x (Sambrook y col., 1989).

Para comprobar la especificidad de las sondas, se utilizó como control negativo el hongo genéticamente más cercano al patógeno a analizar. Como control negativo de *F. oxysporum* f. sp. *fragariae* se usó un aislado no patógeno de *F. oxysporum* de fresa (F-POST 143). En el caso de *M. phaseolina*, el control negativo utilizado fue el hongo *B. dothidea*, y en el caso de *V. dahliae*, el hongo *V. alboatrum*.

Tabla II.3. Secuencias de cebadores usados en este estudio para la obtención de sondas específicas para la detección de *Fusarium oxysporum* f. sp. *fragariae*, *Macrophomina phaseolina*, *Verticillium dahliae*.

Organismo	Cebadores	Secuencia (5'-3') ^a	Tamaño	Gen diana	Referencia
<i>Fusarium oxysporum</i>	Fofra_ps-F	CACA CTCGAG CAGACTGGGGTGCTTAAAGT	~239 pb	Elemento transponible	Modificado de Suga y col., 2013
	Fofra_ps-R	CACAG TCGAC TTTGTTACGACCCTAGCGGTT			
<i>Macrophomina phaseolina</i>	MpTq_ps-F	CACA CTCGAG ATCCTGTCCGACTGTTCCAG	~150 pb	SCAR	Modificado de Babu y col., 2011
	MpTq_ps-R	CACAG TCGAC CCTGTCCGAGAAACCGAAGAC			
<i>Verticillium dahliae</i>	Vd-F929-947_ps	CACA CTCGAG GCCGTTTCCCGTTACT	~200 pb	IGS	Modificado de Bilodeau y col., 2012
	Vd-R1076-1094_ps	CACAG TCGAC TTTCGCTAGGCCTTCTGACG			

^aLas secuencias señaladas en rojo y azul corresponden al sitio de corte de las enzimas de restricción *XhoI* y *SalI*, respectivamente

Tabla II.4. Secuencias de cebadores usados en este estudio para la amplificación del fragmento específico a hibridar sondas específicas para la detección de *Fusarium oxysporum*, *Macrophomina phaseolina*, *Verticillium dahliae*.

Organismo	Cebadores	Secuencia (5'-3')	Tamaño	Gen diana	Referencia
<i>Fusarium oxysporum</i>	Fofra-F	CAGACTGGGGTGCTTAAAGTT	239 pb	Elemento transponible	Suga y col., 2013
	Fofra-R	AACCGCTAGGGTCGTAACAAA			
<i>Macrophomina phaseolina</i>	MpTq-F	GCCTTACAAGGGTCTCGTCAT	150 pb	SCAR	Babu y col., 2011
	MpTq-R	CCCTTGGCGATGCCGATA			
<i>Verticillium dahlia</i>	Vd-F929-947	CGTTTCCCGTTACTTCT	~200 pb	IGS	Bilodeau y col., 2012
	Vd-R1076-1094	GGATTTCCGGCCCAGAAACT			

Hibridación molecular con sondas marcadas con digoxigenina

Preparación de las membranas

Los productos de amplificación obtenidos a partir de material fúngico y de material vegetal infectado se aplicaron, a razón de un microlitro por cuadro (0.5 x 0.5 cm), en una membrana de nylon cargada positivamente (Roche), se secaron a temperatura ambiente durante 5-10 min y se fijaron mediante exposición a luz ultravioleta durante 3 min o en un entrecruzador de luz ultravioleta (700x100_J/cm²) (Tabla II.5).

Tabla II.5. Esquema correspondiente a la colocación de las muestras en las membranas de nylon usadas para la hibridación molecular con sondas de digoxigenina. Los productos de PCR fijados en la primera y la tercera fila corresponden a amplificaciones realizadas a partir del par de cebadores individual para cada hongo. En el caso de la segunda y cuarta fila, los productos de PCR se originaron a partir de la mezcla de todos los cebadores utilizados en una reacción multiplex. VD: *V. dahliae*; VA: *V. alboatrum*; VD-P: planta infectada con *V. dahliae*; MP: *M. phaseolina*; BD: *Botryosphaera dothidea*; MP-P: planta infectada con *M. phaseolina*; FOF: *F. oxysporum* f. sp. *fragariae*; FO: aislado F-POST 143 de *F. oxysporum* no patógeno en plantas de fresa; TEST: planta sana no inoculada; C+: control positivo formado por el plásmido pSK con el inserto correspondiente. C-: control negativo (sin ADN molde).

Plásmido VD – C+	MP-P	BD	MP	VD-P	VA	VD-P
Plásmido FOF – C+	MP-P	BD	MP	VD-P	VA	VD-P
Plásmido MP – C+	PC-P	PN	PC	FO	FOF-P	FOF
TEST	PC-P	PN	PC	FO	FOF-P	FOF

Hibridación molecular no radioactiva

La hibridación molecular utilizando sondas marcadas con digoxigenina y su posterior detección se realizó siguiendo esencialmente el protocolo descrito por Pallás y col. (1997). En primer lugar, se realizó un bloqueo de los sitios inespecíficos de unión, incubando las membranas en un horno de hibridación (Stuart) a 68°C durante 1-2 h con 10 mL de solución de prehibridación compuesta de 50% de formamida desionizada, 5 x SSC (NaCl 750 mM, citrato sódico 75 mM, pH 7,0), N-lauroilsarcosina 0,1% (p/v), SDS 0,02% (p/v) y 2x agente bloqueante (Roche). A continuación, se retiró la solución

de prehibridación y se añadió la de hibridación, con la misma composición que la anterior pero conteniendo la sonda dig-RNA). Las membranas se incubaron en dicha solución a 55°C durante al menos 8 h. Tras realizar la hibridación, las membranas se lavaron 2 x 5 min a temperatura ambiente con la solución de lavado I (2 x SSC y SDS 0,1%) y a continuación 2 x 30 min a 60°C con la solución de lavado II (0,1 x SSC y SDS 0,1%).

La detección se realizó incubando las membranas 10 min en el tampón de lavado (ácido maleico 0,1 M, NaCl 0,15 M, pH 7,5, Tween-20, 0,3% (v/v) (Sigma P-1379)) para posteriormente incubar durante 30 min con la solución de bloqueo (agente bloqueante 1x, Roche) diluido 1:10 en ácido maleico 0,1 M y NaCl 0,15 M, pH 7,5. A continuación, se incubaron las membranas durante otros 30 min con una solución anti-digoxigenina-fosfatasa alcalina (Anti-Digoxigenin-AP Fab Fragments, Roche) diluida 1:10.000 en la solución de bloqueo. Para eliminar el exceso de anticuerpo no unido, las membranas se lavaron 2 x 15 min con el tampón de lavado, y posteriormente se equilibraron durante 5 min en el tampón de equilibrado (Tris-HCl 0,1 M, NaCl 0,1 M, pH 9,5). Todos los pasos anteriores fueron realizados a temperatura ambiente.

El revelado de las membranas se realizó utilizando el sustrato quimioluminiscente CPD Star 2-cloro-5-(4-metoxiespiro{1,2-dioxietano-3,2'}-(5'-cloro)tricyclo [3.3.1.1^{3,7}] decano}-4-il) fenil fosfato) (Roche). La solución de sustrato fue diluida 1:300 en el tampón de equilibrado. La membrana se incubó junto con esta solución en una bolsa de plástico y en oscuridad durante 5 min en 5 mL de solución/100 cm² de membrana. Después de retirar los restos de sustrato, la membrana se expuso a la película Kodak X-Omat AR durante aproximadamente 30 s. La película se reveló en el revelador Kodak X-Omat 2000.

Detección múltiple

El uso múltiple de esta técnica fue realizado mediante una mezcla de las sonda específicas individuales sintetizadas anteriormente, en una misma solución de hibridación (Saade et al. 2000; Saldarelli et al. 1996; Sánchez-Navarro et al. 1999).

RESULTADOS

Amplificación de las muestras de estudio

Se amplificó un fragmento del tamaño esperado a partir de las muestras ADN procedentes de *F. oxysporum* f. sp. *fragariae*, *M. phaseolina* y *V. dahliae* y de las plantas infectadas con los mismos. Esta amplificación fue negativa en el caso de los hongos *F. oxysporum* no patógeno, *Botryosphaera dothidea* y *V. alboatrum* usados como controles negativos. Se obtuvo el mismo resultado cuando se hicieron las amplificaciones con la mezcla de cebadores en una reacción multiplex (Figura II.1).

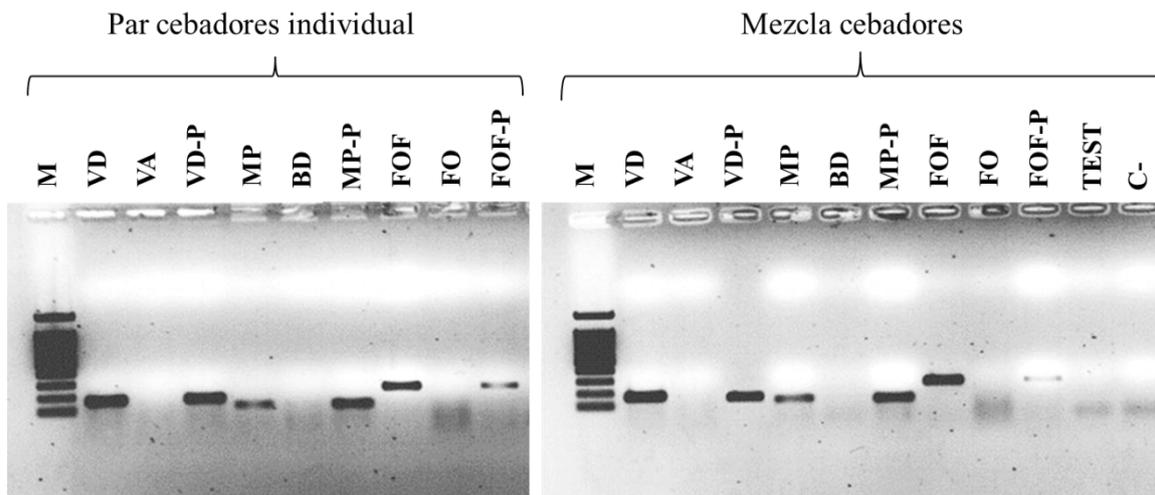


Figura II.1. Resultado de la amplificación por PCR de los fragmentos específicos de *Verticillium dahliae*, *Macrophomina phaseolina* y *Fusarium oxysporum* f. sp. *fragariae* en reacciones de PCR simples o en multiplex. M: marcador de peso molecular 100 pb; VD: *V. dahliae*; VA: *V. alboatrum*; VD-P: planta infectada con *V. dahliae*; MP: *M. phaseolina*; BD: *Botryosphaera dothidea*; MP-P: planta infectada con *M. phaseolina*; FOF: *F. oxysporum* f. sp. *fragariae*; FO: aislado F-POST 143 de *F. oxysporum* no patógeno en plantas de fresa ‘Camarosa’; TEST: planta sana no inoculada; C-: control negativo (sin ADN molde).

Hibridación molecular con sondas marcadas con digoxigenina

Las sondas individuales detectaron específicamente la presencia de los patógenos en muestras procedentes de micelio del hongo o material vegetal infectado.

No se observó señal en las muestras correspondientes a los hongos testigo ni en la planta de fresa sana. El resultado obtenido a partir de la hibridación con la polisonda fue similar al obtenido con cada una de las sondas utilizadas individualmente.

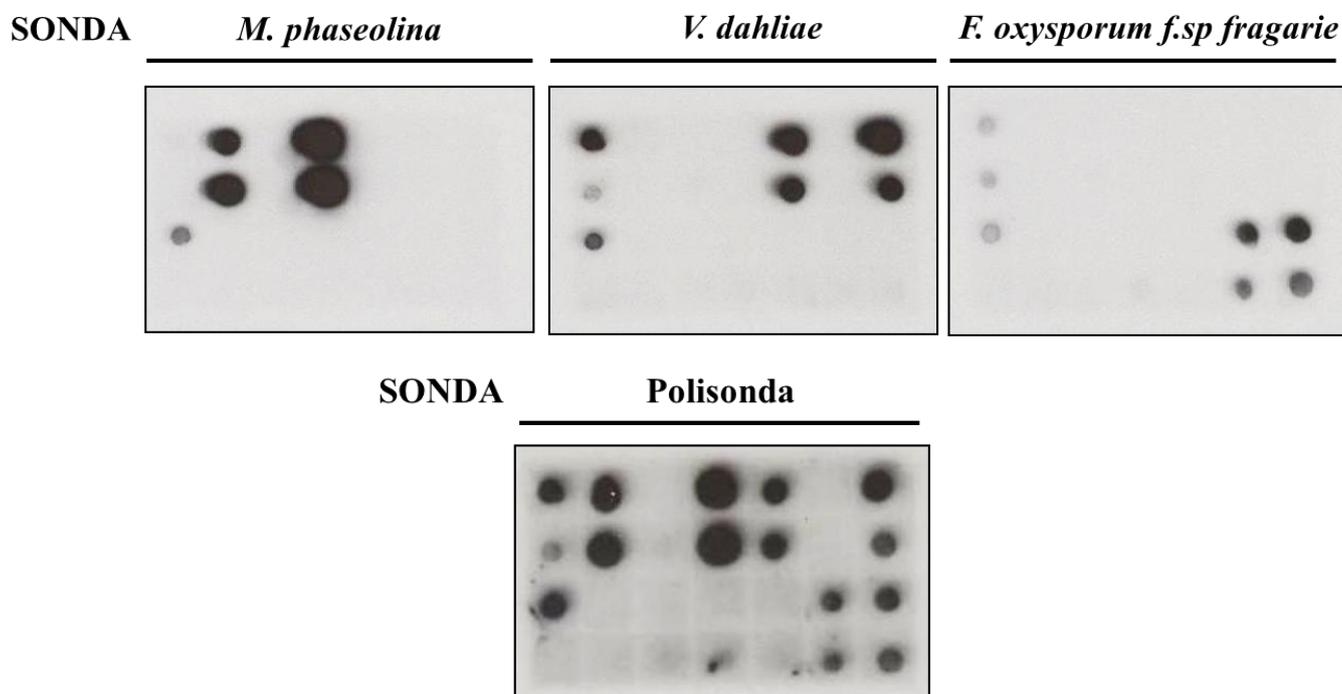


Figura II.2. Determinación de la detección mediante hibridación molecular no radioactiva usando sondas individuales o la mezcla de las mismas. Los productos obtenidos a partir de amplificación se aplicaron a membranas de nylon. Se usó una réplica de la misma membrana para la hibridación con la sonda simple o con la mezcla de las mismas. La hibridación se realizó a una temperatura de 55°C y los lavados de las membranas a 60°C. En el caso de las sondas individuales el sustrato de la reacción se diluyó 1/150 y en el caso de la mezcla de las sondas la dilución fue 1/300. La detección de la quimioluminiscencia se realizó tras 30 s de exposición de la película.

DISCUSIÓN

En este trabajo se ha desarrollado un método de hibridación molecular con sondas no radioactivas para la detección simultánea de hongos patógenos de fresa. En general estas técnicas han sido siempre aplicadas a la detección de virus y viroides, pero nunca antes se había comprobado su eficacia sobre otros patógenos de plantas. Los resultados obtenidos en este estudio nos muestran que, aunque con un paso previo de amplificación, esta técnica es útil para la detección específica de tres de los hongos

patógenos más importantes actualmente en el cultivo de la fresa (*F. oxysporum* f. sp. *fragariae*, *M. phaseolina* y *V. dahliae*). A partir de aquí, los esfuerzos deben ir dirigidos a comprobar la sensibilidad de la técnica, su eficacia en un mayor número de muestras de campo, y su ampliación en cuanto al número de patógenos a detectar.

En cuanto a la ampliación del número de patógenos a detectar, en este estudio también se quiso incluir a otro de los hongos causantes de enfermedad en el cultivo de la fresa, *P. cactorum*. El fragmento elegido en este caso fue el gen de la proteína relacionada con ras (*Ypt1*), muy utilizado para la discriminación entre las especies pertenecientes a este género mediante PCR en tiempo real (Li y col., 2013; Nath y col., 2014), pero no suficientemente discriminatorio en el uso de sondas moleculares (datos no mostrados).

Los resultados de este estudio se presentan como una primera fase de la posible aplicación de esta técnica para la detección múltiple de hongos patógenos de plantas. Además, se podrían desarrollar ‘sondas específicas por cultivo’ que detectarían, en una sola reacción, todos los patógenos comunes en el correspondiente cultivo. En nuestro caso, este método podría ser muy útil en los programas de certificación de plantas madre de fresa.

**EVALUACIÓN DE ESPECIES DE *Trichoderma* Y
Bacillus COMO AGENTES DE CONTROL
BIOLÓGICO DE DOS ENFERMEDADES DE
FRESA OCASIONADAS POR HONGOS
PATÓGENOS DE SUELO**

CAPÍTULO III.

EVALUACIÓN DE ESPECIES DE *Trichoderma* Y *Bacillus* COMO AGENTES DE CONTROL BIOLÓGICO DE DOS ENFERMEDADES DE FRESA OCASIONADAS POR HONGOS PATÓGENOS DE SUELO

INTRODUCCIÓN

La producción en abundancia de alimentos de calidad necesita de un control de las enfermedades de los cultivos por parte de los agricultores de todo el mundo. Además de unas buenas prácticas culturales, existen diferentes técnicas capaces de prevenir, mitigar o controlar estas enfermedades, pero las más utilizadas en los últimos años se han basado principalmente en el uso de fertilizantes químicos y pesticidas. Este hecho ha contribuido a un espectacular incremento en la producción de alimentos en los últimos 100 años (Heydari y Pessarakli, 2010). En este sentido, la producción de fresa en España ha sido altamente dependiente de la utilización de Bromuro de Metilo (BM) o cloropirina, como tratamientos de desinfección de suelo en viveros y campos de producción de fruto de fresa. Sin embargo, la contaminación ambiental causada por el uso excesivo de estos productos químicos, su efecto indeseable sobre otros organismos y el efecto carcinógeno de algunos compuestos, ha llevado a la búsqueda de alternativas respetuosas con el medioambiente y la salud humana. (Heydari y Pessarakli, 2010). Actualmente, existen regulaciones muy estrictas sobre el uso de productos químicos en agricultura, hasta el punto de que debido a la presión política se ha prohibido el uso y la comercialización de más del 70% de las sustancias activas que se usaban regularmente para el control de plagas y enfermedades de plantas. Esto ha ocasionado la reemergencia de patógenos que estaban controlados y la emergencia de otros nuevos.

En los últimos años, se han descrito nuevos hongos de suelo patógenos de fresa en la provincia de Huelva: *Macrophomina phaseolina* (Avilés y col., 2008) y *Fusarium solani* (Pastrana y col., 2014). Algunos autores han asociado el establecimiento de *M.*

phaseolina en el cultivo de la fresa con los cambios en los productos usados para desinfectar el suelo y con su modo de aplicación (Mertely y col., 2005; Zveibil y Freeman 2005; Avilés y col., 2008; Koike, 2008a; Koike y col., 2012a, b). En España, desde su descubrimiento, y debido a la prohibición paulatina del uso de muchos de los fungicidas químicos, la incidencia de *M. phaseolina* en la zona fresera onubense se ha ido incrementando a lo largo de los años (Bascón y col., 2008).

En 2012, se detectó *F. solani* en plantas de vivero de fresa con síntomas de podredumbre de cuello (Redondo y col., 2012) y, durante las dos últimas campañas, en campos de producción de fruto en la zona fresera de Huelva asociado con síntomas de enanismo, marchitez, necrosis y, ocasionalmente, muerte de las plantas (Pastrana y col., 2014). También se ha observado que desde la retirada del BM, el número de plantas con síntomas de enfermedad causados por *Fusarium* spp. en los viveros de altura ha experimentado un considerable aumento (Redondo y col., 2012).

Los métodos químicos disponibles actualmente para el control de estos patógenos en el cultivo de la fresa son ineficaces frente a *M. phaseolina* y desconocidos para *F. solani*. Tanto *M. phaseolina* como *F. solani* son capaces de sobrevivir largos períodos de tiempo en el suelo gracias a la formación de estructuras de resistencia, esclerocios y clamidosporas respectivamente; además, se pueden dispersar fácilmente a través del viento, el suelo y el material infectado. El complejo de especies de *F. solani* es tolerante a compuestos tóxicos para otros hongos (Coleman y col., 2009) y es capaz de degradar pesticidas en el suelo (Coleman y col., 2009). Todo ello ha impulsado la búsqueda de alternativas no químicas para el control de las enfermedades ocasionadas por hongos de suelo, entre las que se encuentra el uso de agentes de control biológico.

El control biológico o biocontrol se puede definir como “la reducción de la densidad de inóculo o de las actividades productoras de enfermedad de un patógeno o parásito, en su estado activo o durmiente mediante uno o más organismos, lograda de manera natural o a través de la manipulación del ambiente del huésped o del antagonista, o por la producción masiva de uno o más antagonistas” (Baker y Cook 1974). Las raíces de las plantas se encuentran rodeadas de forma natural por diversos tipos de microorganismos, algunos de los cuales son capaces de colonizar y mostrar actividades de biocontrol si se les permite crecer vigorosamente (Cook, 1993). Estos microorganismos son capaces de reducir las enfermedades gracias a que compiten con

los patógenos por el alimento, producen metabolitos que inhiben o reducen su crecimiento y/o lo desplazan ocupando su nicho ecológico (Bais y col., 2004; Compant y col., 2005; Emmert y Handelsman, 1999; Haas y Défago, 2005). Aquellos microorganismos que no están naturalmente presentes en el ecosistema de la planta también pueden ser introducidos artificialmente como agentes de control de enfermedades (Cook, 1993). Debido a la facilidad con la que pueden ser cultivados, la mayoría de las investigaciones sobre biocontrol se han centrado en un número limitado de hongos y bacterias, entre los que destacan *Trichoderma* spp. y *Bacillus* spp. (Pal, 2006).

Trichoderma spp. es conocido, desde hace muchos años, por su habilidad para actuar como agente de control biológico contra patógenos de plantas. *Trichoderma* actúa sobre el patógeno por medio de micoparasitismo, antibiosis y/o competencia por el alimento y el espacio. También se han demostrado efectos sobre las plantas, tales como la activación de la resistencia sistémica inducida, la mejora del crecimiento y el aumento de la absorción de nutrientes (Harman, 2006). *Trichoderma* spp. es capaz de colonizar la epidermis de la raíz y las capas corticales externas de la planta. Una vez dentro, libera metabolitos bioactivos que inducen mecanismos bioquímicos que limitan su crecimiento a una pequeña área, no proliferando a través de los haces vasculares (Harman, 2006). Estudios de micoparasitismo también han demostrado que la inhibición por parte de *Trichoderma* puede deberse a la secreción de enzimas extracelulares como β -1.3-glucanasas, las cuáles ayudan al micoparásito en la colonización de sus hospedadores. Además, la inhibición del patógeno también puede ser debida a la producción de metabolitos secundarios por parte de los antagonistas, como glioviridina, viridina y gliotoxina (Kamlesh y Gurjar, 2002; Muhammad y Amusa, 2003; Rehman y col., 2013). Entre estos metabolitos secundarios también se encuentran las quitinasas, las cuales son consideradas el componente más efectivo contra hongos patógenos, ya que degradan las paredes celulares compuestas por quitina (Lorito y col., 1996). Debido a todas sus características, este organismo se utiliza en agricultura, tanto para el control de enfermedades como para incrementar el rendimiento de los cultivos.

Bacillus es un género de bacterias Gram-positivas formadoras de esporas. Algunas especies de *Bacillus* pueden ser patógenas para humanos. Otras, las más

importantes para este estudio, son capaces de mejorar el vigor y el desarrollo de las plantas. Su mecanismo de acción es múltiple: por un lado, la bacteria sintetiza antibióticos u otros compuestos que tienen efectos inhibitorios sobre organismos patógenos en la rizosfera (Glick, 1995; Ahmad y col., 2008). Por otro lado, son capaces de potenciar el crecimiento de las plantas a través de las síntesis y excreción de sustancias fitoestimulantes, tales como auxinas y citoquininas (Ahmad y col., 2008); favorecen el acceso de la planta a los nutrientes, a través de la solubilización de fósforo y la reducción de hierro en la rizosfera (Orozco-Mosqueda y col., 2012); e inducen en las plantas resistencia sistémica adquirida (Rampach y Kloepper 1998; Romero y col., 2007).

La mayoría de los agentes de biocontrol se aplican a través del suelo. La supervivencia en la rizosfera y el patrón de colonización de los agentes antagonistas son factores cruciales a tener en cuenta cuando se introduce un agente de biocontrol en el suelo (Cao y col., 2011). Por tanto, en un suelo pobre en nutrientes no se puede esperar obtener un control biológico estable de los patógenos presentes, puesto que para la supervivencia de los antagonistas inoculados, estos deben de competir por los nutrientes con el resto de microorganismos del suelo (El-Hassan y Gowen 2006; Kokalis-Burelle y col., 2002). Por ello, el uso de agentes de biocontrol muestra siempre una alta variabilidad de resultados de eficacia.

El control biológico, especialmente el llevado a cabo por *Trichoderma* y *Bacillus*, se ha considerado un método alternativo eficaz contra las enfermedades de las plantas, es medioambientalmente seguro y, en algunos casos, es la única opción disponible para proteger a las plantas frente a los patógenos (Cook, 1993). Gracias a ello, en los últimos años se han comercializado un gran número de productos basados en estos organismos, para el control de enfermedades fúngicas de las plantas (Ardakani y col., 2009).

OBJETIVO

El objetivo de este estudio fue evaluar la eficacia de aislados 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 del cultivo de la fresa provocadas por *M. phaseolina* y *F. solani*. Para ello, se llevaron a cabo enfrentamientos duales *in vitro*, y ensayos en cámara de cultivo o invernadero, y en condiciones de campo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Aislados fúngicos

Para llevar a cabo los experimentos se utilizó un aislado monoesclerocial de *M. phaseolina* (MAC-9) y un aislado monoconídico de *F. solani* (F-POST 81, número de acceso en el GenBank: KF275032.1), ambos recuperados a partir de plantas muertas, durante la campaña 2011/2012, en campos de producción de fruto de fresa de la provincia de Huelva.

Material vegetal

En todos los casos se usaron plantas de fresa certificadas de la variedad ‘Fortuna’ en los experimentos de control de *M. phaseolina* y ‘Camarosa’ en los experimentos de control de *F. solani*.

Las plantas destinadas al ensayo en cámara de cultivo e invernadero se lavaron bajo el grifo para eliminar restos de tierra, se cortó su parte aérea a ras de la corona, y las raíces a una distancia de unos 7 cm de la corona, se desinfectaron durante 1 minuto sumergiéndolas en una solución de hipoclorito de sodio al 1% y se enjuagaron en ADE.

Las plantas utilizadas para los ensayos en macrotúnel se sumergieron antes de la siembra en un contenedor con agua para eliminar los restos de tierra.

Productos de control biológico y químico

Los productos comerciales usados como agentes de control biológico fueron Prodigy® y Fusbact® (AMC Chemical). Prodigy® (patente EP1594952) es un producto comercializado como polvo mojable seco cuyo principal componente es *Trichoderma asperellum* T18 (10%). Fusbact® (certificado CAAE) es un formulado líquido cuyos componentes principales son *Bacillus megaterium* B157 y *B. laterosporus* B197 (10⁷ UFC/mL) (a partir de este punto referidos como *Bacillus* spp.).

Los productos fungicidas de origen químico utilizados como controles fueron Metiltiofanato-70% (v/v) (Enovit Metil®) para el control de *M. phaseolina* y Carbendazima-50% (p/v) (Maypon® Flow) contra *F. solani*.

Enfrentamientos duales *in vitro*

Los experimentos *in vitro* se realizaron en placas de 90 mm de diámetro con 20 mL de APD en condiciones controladas. Para ello, se sembraron placas con los hongos patógenos *M. phaseolina* y *F. solani*, respectivamente y se incubaron durante 7 días a 25°C en oscuridad. Paralelamente, se sembraron placas con *T. asperellum* y se incubaron durante 3 días a 25°C en oscuridad.

Se sembró un disco de 5 mm de diámetro, con micelio de un cultivo activo del patógeno, a 2,5 cm de la periferia de una placa de APD. Se incubó a 25°C en oscuridad hasta que la colonia alcanzó un diámetro entre 2-2,5 cm (aproximadamente 2 días). En dicho momento, se depositó a una distancia de aproximadamente 5 cm del disco inicial del patógeno, discos de 5 mm de un cultivo de *Trichoderma asperellum* cepa T18. Las placas se incubaron en las condiciones anteriormente citadas (25°C en oscuridad) entre 3 y 7 días. Al finalizar la incubación se determinó el porcentaje de inhibición radial del crecimiento (% IRC) de la colonia de *M. phaseolina* o *F. solani* mediante la fórmula de Royse y Ries (1978):

$$\%IRC = [(R1 - R2) / R1] \cdot 100$$

donde R1 y R2 son el radio mayor y el radio menor desde el disco hasta el punto donde el patógeno y *T. asperellum* se ponen en contacto, respectivamente.

Para evaluar la actividad antagonista de *Bacillus* sp., se colocó en el centro de cada placa un disco de 5 mm de diámetro con micelio del patógeno crecido durante 5 días a 25°C en oscuridad. Tras 48 h, cuatro gotas de 50 µl de una suspensión bacteriana de *Bacillus* sp. (10^7 UFC/mL) se situaron equidistantemente en el borde de la placa. Posteriormente, las placas se incubaron a 25°C durante 7 días en oscuridad y se calculó el % IRC mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ IRC} = [(D1 - D2) / D1] \cdot 100$$

donde D1 es el diámetro de la colonia del patógeno en las placas control y D2 el diámetro en las placas donde se enfrentó a las cepas bacterianas.

En ambos casos, los controles consistieron en cultivos puros de los patógenos sin la presencia de *T. asperellum* o *Bacillus* spp. Los experimentos se repitieron cinco veces y los resultados son una media de las cinco réplicas.

Experimentos en cámara de cultivo e invernadero

Para comprobar el efecto antagonista de los agentes de control biológico *T. asperellum* cepa T18 (Prodigy®) y *Bacillus* spp. (Fusbact®) frente a *M. phaseolina* y *F. solani* en el cultivo de la fresa, se llevaron a cabo dos experimentos en maceta en una cámara de cultivo ajustada a 29/26°C y 60/40% de humedad relativa (día/noche) y 16 h de fotoperiodo (*M. phaseolina*) e invernadero (*F. solani*), durante tres meses. Se incluyeron un total de ocho tratamientos; para cada uno de ellos se dispusieron ocho macetas; y, la unidad experimental estuvo constituida por dos macetas con una planta cada una. El diseño experimental fue en bloques completamente al azar con cuatro repeticiones (bloques).

Los datos procedentes del segundo experimento de *F. solani* no se muestran en el apartado de resultados, puesto que no se consideraron concluyentes debido a problemas técnicos a lo largo del ensayo.

Tratamientos

La aplicación de los tratamientos se llevó a cabo cinco días antes (preventivos) o cinco días después (curativos) de la inoculación con el patógeno. Se probaron dos formas de aplicación preventiva de los agentes de control biológico (ACBs): i) inmersión de raíces y corona en una suspensión del agente de control biológico y ii) aplicación de la suspensión del agente de control biológico mediante riego. Los tratamientos aplicados se detallan en la Tabla III.1.

Tabla III.1. Tratamientos químicos y biológicos evaluados para el control de la Podredumbre carbonosa ocasionada por *Macrophomina phaseolina* y la enfermedad causada por *Fusarium solani* en el cultivo de fresa

Tratamientos	Patógeno	Materia activa	Momento de aplicación	Método de aplicación	Abreviatura
Químicos	<i>M. phaseolina</i>	Metil-tiofanato 70%	Preventivo	Riego	QPR
	<i>F. solani</i>	Carbendazima 50%			
	<i>M. phaseolina</i>	Metil-tiofanato 70%	Curativo	Riego	QCR
	<i>F. solani</i>	Carbendazima 50%			
Biológicos	<i>M. phaseolina</i>	<i>Trichoderma asperellum</i> T 18	Preventivo	Inmersión	TPI
	<i>F. solani</i>				
	<i>M. phaseolina</i>	<i>Bacillus megaterium</i> B197 + <i>B. laterosporus</i> B157	Preventivo	Inmersión	BPI
	<i>F. solani</i>				
	<i>M. phaseolina</i>	<i>Trichoderma asperellum</i> T 18	Preventivo	Riego	TPR
	<i>F. solani</i>				
	<i>M. phaseolina</i>	<i>Bacillus megaterium</i> B197 + <i>B. laterosporus</i> B157	Preventivo	Riego	BPR
	<i>F. solani</i>				
	<i>M. phaseolina</i>	<i>Trichoderma asperellum</i> T 18	Curativo	Riego	TCR
	<i>F. solani</i>				
	<i>M. phaseolina</i>	<i>Bacillus megaterium</i> B197 + <i>B. laterosporus</i> B157	Curativo	Riego	BCR
	<i>F. solani</i>				

Los controles de este experimento consistieron en plantas no tratadas y no inoculadas, plantas no tratadas e inoculadas con su respectivo patógeno, y plantas tratadas con cada uno los formulados químicos o biológicos y no inoculadas con ningún patógeno.

Los tratamientos aplicados mediante inmersión en una suspensión del agente de biocontrol se realizaron justo antes de la plantación. Se prepararon soluciones de Prodigy® al 1% (1 g / 100 mL ADE) y de Fusbact® al 1% (1 mL / 100 mL ADE) y se sumergieron las raíces y la corona de las plantas en la solución correspondiente durante 30 min. Posteriormente, tanto las plantas tratadas por inmersión como el resto, se plantaron en macetas individuales de 16 cm conteniendo turba (Gramoflor Blumenerde®) humedecida, esterilizada previamente en autoclave durante 70 min a 121°C, dos días consecutivos.

Los tratamientos por riego se llevaron a cabo tras la plantación, cinco días antes (preventivos) o cinco días después de la inoculación con el patógeno (curativos), y consistieron en el vertido alrededor de las plantas de 100 mL de una suspensión de Prodigy® al 0.086% (0.086 g / 100 mL ADE), de Fusbact® al 0.45% (0.45 mL / 100 mL ADE), de metiltiofanato-70% al 0.1% (1 g / 1000 mL ADE) o de carbendazima-50% al 0.06% (0.6 mL / 1000 mL ADE). El resto de las plantas se regó con 100 mL de agua. Durante el resto del experimento se regó según necesidad.

Preparación del inóculo e inoculación.

Se sembraron placas de *M. phaseolina* en APD y se incubaron en oscuridad a 28°C durante 15 días. Tras la incubación, el contenido de la placa, incluido el APD, se trituró con una batidora convencional en presencia de 100 mL de ADE por placa hasta obtener una suspensión esclerocial del hongo. Antes de la inoculación se realizó una estimación de la concentración de esclerocios/mL mediante conteo bajo lupa binocular. Las plantas correspondientes se inocularon con 50 mL de esta suspensión de *M. phaseolina* ajustada a 10^5 esclerocios/mL y se colocaron en una cámara de cultivo con condiciones controladas a 29/26°C y 60/40% de humedad relativa (día/noche) y 16 h de fotoperiodo durante tres meses.

Para incrementar el inóculo de *F. solani* se sembraron placas de APD y se incubaron durante 7 días a 25°C con un fotoperiodo de 12 h. Una vez desarrollados los cultivos, se tomaron cinco discos de 5 mm diámetro de micelio del hongo en crecimiento activo y se aportaron a frascos con 100 mL de Caldo de Patata Dextrosa (CPD). Estos se incubaron durante 10 días en un agitador orbital a 150 rpm, 25°C y fotoperiodo de 12 h. La suspensión de conidias utilizada como inóculo se obtuvo filtrando el CPD infestado a través de cuatro capas de gasa estéril. Antes de la inoculación se realizó una estimación de la concentración de conidias/mL mediante conteo en cámara de Thoma. Las plantas correspondientes se inocularon con 50 mL de una suspensión de 10^6 conidias/mL mediante riego alrededor de la planta. Las macetas se colocaron en un invernadero y se dejaron crecer durante tres meses bajo las condiciones ambientales de la zona.

Parámetros observados

Para evaluar la eficacia de los ACBs en el control de ambas enfermedades fúngicas se determinaron diferentes parámetros. En el primer ensayo se determinó la incidencia de la enfermedad (porcentaje de plantas muertas al final del experimento) y el área bajo la curva del progreso de la enfermedad estandarizado (ABCPEE), para ambas enfermedades. En el segundo experimento, en el caso de la Podredumbre carbonosa, también se determinaron la severidad de la enfermedad, expresada como el porcentaje de necrosis en corona y la cantidad de ADN de este patógeno en plantas asintomáticas, sintomáticas y muertas al final del experimento, mediante PCR en tiempo real.

Experimentos en campo

Para comprobar si el efecto antagonista de los ACBs se manifestaba en condiciones de campo, se llevó a cabo un experimento en un macrotúnel perteneciente a las instalaciones del centro IFAPA Las Torres-Tomejil (Alcalá del Río - Sevilla). El macrotúnel de dimensiones 25 x 7 m estaba cubierto con plástico de polietileno transparente de 150 μ m de espesor y en su interior se dispusieron 84 contenedores con

un volumen aproximado de 100 L/contenedor (30 x 45 x 85 cm, alto x ancho x largo). Para cada tratamiento se incluyeron cuatro contenedores, cada uno con ocho plantas, distribuidos siguiendo un diseño experimental en bloques completamente al azar.

Preparación y desinfestación del suelo

Se utilizó suelo procedente de fincas de producción de fruto de fresa de Moguer (Huelva), desinfestado con cloropicrina a razón de 5kg/ha aplicada por goteo bajo plástico de polietileno durante 21 días (Figura III.1).

En el fondo de los contenedores se dispuso una capa de grava de unos 3 cm, sobre la que se vertió suelo estéril con un volumen aproximado de 100 L. Previamente, y para proporcionar una buena nutrición a las plantas, se añadieron al suelo desinfestado 150 g/contenedor de Osmocote® Pro 16-11-10 (N-P-K) + 2MgO + TE de liberación lenta (8-9 meses) (Everris).



Figura III.1. Disposición de un sistema de tubos en emparrillado sobre el suelo para realizar la desinfección con cloropicrina, a razón de 5kg/ha aplicada por goteo (A); posterior cobertura con polietileno transparente (150 μ m) durante 21 días (B).

Preparación del inóculo e inoculación del suelo

Para conseguir el inóculo de *M. phaseolina* se sembraron placas de APD y se incubaron a 28°C en oscuridad durante 15 días. Una vez crecidas, el contenido de la placa, incluido el APD, se trituró con una batidora convencional en presencia de 25 mL de ADE por placa. Se obtuvo una suspensión con 10⁴ esclerocios de *M. phaseolina*/mL, de consistencia espesa para poder mezclarla bien con la tierra. Se delimitó en cada contenedor la zona de plantación para cada una de las plantas y en cada una de ellas, se mezclaron 22,5 mL de la suspensión esclerocical con 100 g de suelo a unos 8 cm de profundidad.

F. solani se incrementó durante diez días en CPD como se ha descrito anteriormente en el experimento en invernadero. La suspensión obtenida se ajustó con ADE a 10^7 conidias/mL y se mezcló con talco industrial a razón de 100 mL por cada 100 g de talco previamente esterilizado durante 20 min a 120°C tres días consecutivos. Tras la homogeneización, el talco infestado se secó a temperatura ambiente durante 3 semanas para permitir la formación de clamidosporas de *F. solani*. Antes de la inoculación del suelo, se determinó el número de unidades formadoras de colonias (UFC) por gramo de talco. Para ello, se tomaron tres réplicas de 1 g de talco infestado y se diluyeron en 100 mL ADE. A partir de esta dilución, se hicieron nuevas diluciones seriadas ($1:10^2$, $1:10^3$, $1:10^4$). Tres réplicas de 1 mL de cada dilución se dispensaron en placas de APD con estreptomicina (APDE) y se incubaron a 25°C durante 5 días con un fotoperiodo de 12 h. El talco infestado de *F. solani* (10^7 UFC/g talco) se mezcló con el suelo de los contenedores a lo largo de la línea de plantación a razón de 200 g de talco por línea de cuatro plantas, a 8 cm de profundidad.

Los contenedores se cubrieron con plástico negro para evitar el crecimiento de malas hierbas, simulando las condiciones del cultivo en campos de producción de fruto de Huelva. Las plantas crecieron en el macro túnel bajo las condiciones ambientales de la zona durante todos los meses de campaña, desde diciembre a junio 2013-2014, siguiendo el manejo de cultivo de la zona de producción fresera de Huelva.

Tratamientos

Se aplicaron tratamientos preventivos y curativos. Los tratamientos preventivos se aplicaron el mismo día de la plantación mediante inmersión de la planta en una suspensión de Prodigy® al 1% (1 g / 100 mL ADE), de Fusbact® al 1% (1 mL / 100 mL ADE), de metiltiofanato-70% al 0.1% (1 g / 1000 mL ADE) o de carbendazima-50% al 0,06% (0,6 mL / 1000 mL ADE) durante un par de minutos, respectivamente. Posteriormente, tanto las plantas tratadas por inmersión como el resto se plantaron en los contenedores del macrotúnel que contenían suelo inoculado o sin inocular.

Los tratamientos curativos se aplicaron cuando se detectaron los primeros síntomas de enfermedad (marzo 2014) y se llevaron a cabo en tres aplicaciones sucesivas, separadas una semana cada una de ellas, mediante riego a una dosis de 1% Prodigy, 1% Fusbact, 0.1% de metiltiofanato-70% y 0.06% de carbendazima-50%,

respectivamente. Así, se ensayaron un total de seis tratamientos: *T. asperellum* preventivo por inmersión (TPI), *Bacillus sp.* preventivo por inmersión (BPI), químico preventivo por inmersión (QPI), *T. asperellum* curativo por riego (TCR), *Bacillus sp.* curativo por riego (BCR) y químico curativo por riego (QCR). Los controles de este experimento consistieron en plantas no tratadas e inoculadas con su correspondiente patógeno, y plantas tratadas pero no inoculadas con ningún patógeno. Durante el resto del experimento, los contenedores se regaron según necesidad.

Densidad de inóculo de M. phaseolina y F. solani en el suelo

Cuatro meses después de la inoculación (marzo 2014), se cuantificaron las poblaciones viables de *M. phaseolina* y *F. solani* existentes en el suelo. El conteo de UFC/g suelo de *F. solani* se llevó a cabo de la misma forma explicada anteriormente en este capítulo. En el caso de *M. phaseolina*, se tomaron muestras a 10 cm de profundidad con una barrena de 3 cm de diámetro. Se añadieron 10 g de este suelo homogeneizado a un vaso de precipitado de 1 L de capacidad conteniendo 250 mL de una solución al 0.4% de hipoclorito de sodio. El suelo y la solución se mezclaron con una batidora convencional en dos pasos de mezcla durante 30 s y reposo por 3 min, repetidos hasta un total de tres veces. La mezcla final se pasó a través de un tamiz de 45 µm y los residuos que permanecieron en el tamiz se lavaron bajo el grifo durante un minuto. Posteriormente, el contenido residual del tamiz se lavó con 100 mL de ADE sobre un vaso de precipitado en agitación. Se sembraron en césped alícuotas de 1 mL de la solución en agitación en cinco placas con medio PDA-DOPCNB preparado con uno o dos días de antelación. Las placas se incubaron en oscuridad a 28°C durante 7 días y se cuantificó el número de UFC de *M. phaseolina* con ayuda de una lupa binocular. Para ambos hongos, el número de UFC/g de suelo se expresó mediante la media del número de colonias / placa multiplicado por el factor de dilución correspondiente.

Parámetros observados

Se tuvieron en cuenta diferentes parámetros a la hora de evaluar la eficacia de los productos de control biológico contra ambas enfermedades fúngicas: i) la incidencia de la enfermedad (porcentaje de plantas muertas al final del experimento); ii) el área

bajo la curva del progreso de la enfermedad estandarizada (ABCPEE), iii), la severidad de la enfermedad, (porcentaje de necrosis en corona ocasionado por *M. phaseolina*); y iv) la producción, medida como el peso de frutos / planta.

Aislamiento de los patógenos del material vegetal

En todos los experimentos realizados, para confirmar la infección de las plantas inoculadas con los patógenos se llevaron a cabo aislamientos en APD de tejidos de corona, raíz y peciolo de todas las plantas sintomáticas y no sintomáticas de la forma descrita en el capítulo I.

Análisis estadístico

Los datos se analizaron mediante análisis de varianza (ANOVA) de acuerdo con un diseño en bloques al azar. Previamente se realizó la transformación angular de los datos porcentuales (incidencia y necrosis en corona). Las medias se compararon utilizando el test de mínima diferencia significativa LSD ($P=0,05$).

RESULTADOS

Enfrentamientos duales *in vitro*

Los experimentos duales *in vitro* entre *T. asperellum* T18 y los dos hongos patógenos, mostraron una inhibición radial del crecimiento de *M. phaseolina* del 54,9% y del 39,3% de *F. solani* (Figura III.2). Durante todo el experimento se observó un crecimiento más rápido del ACB T18 que el de ambos patógenos.

En el enfrentamiento dual entre *Bacillus* sp. y *M. phaseolina*, el nivel de inhibición del crecimiento fue mayor cuando se usó *B. megaterium* (49,8%) que con *B. laterosporus* (30,2%). Cuando se utilizó la combinación de ambas cepas como producto comercial (Fusbact®) se alcanzó un porcentaje de IRC del 42,5%, algo mayor a la media de ambas cepas por separado (Figura III.2). El porcentaje de IRC provocado por

B. megaterium (39,4%) sobre *F. solani* fue mayor que el causado por *B. laterosporus* (30,4%). En esta ocasión, el porcentaje de IRC del producto comercial Fusbact® (36,7%) fue mucho más cercano al de la cepa con mayor inhibición (Figura III.2).

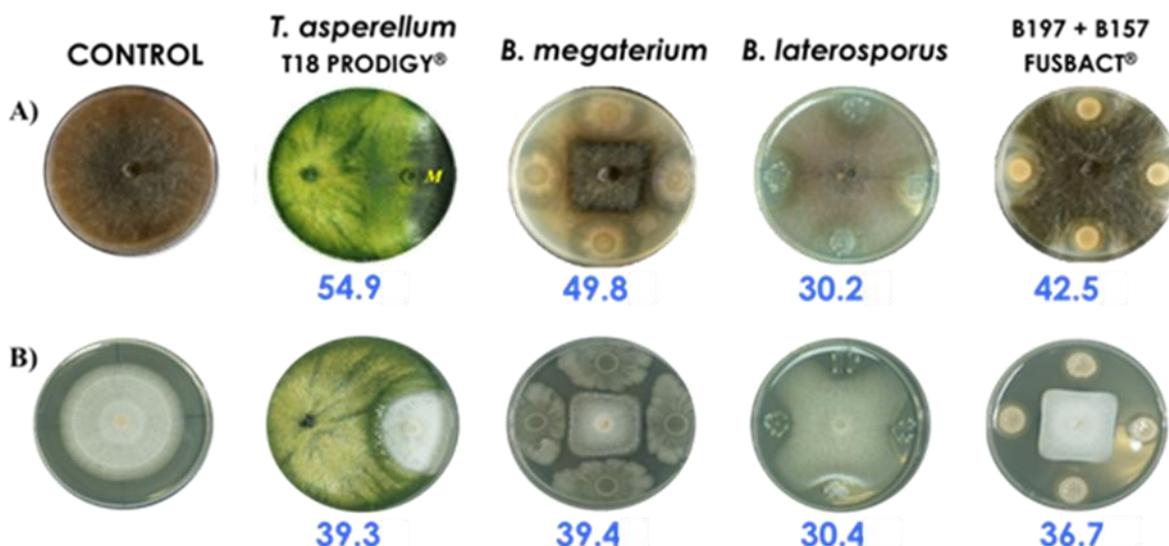


Figura III.2. Enfrentamientos duales entre *M. phaseolina* (A) o *F. solani* (B) y los agentes de control biológico. De izquierda a derecha, se muestra el crecimiento de los hongos patógenos: en ausencia de agente de control biológico (control), y enfrentados con: *Trichoderma asperellum* T18 (Prodigy®), *Bacillus megaterium* B197, *Bacillus laterosporus* B157 y *Bacillus megaterium* B197 + *Bacillus laterosporus* B157 (Fusbact®). Los números bajo las placas indican el porcentaje de inhibición radial del crecimiento del patógeno.

Experimentos en cámara de cultivo e invernadero

En el primer experimento de control de *M. phaseolina* en condiciones controladas, los resultados mostraron que la aplicación de *T. asperellum* de forma preventiva por inmersión (TPI) redujo significativamente, respecto al control, la incidencia de plantas muertas por la Podredumbre carbonosa en un 25,2% ($P=0.0003$), de forma similar que el tratamiento con QCR (37,6%). No obstante, el tratamiento más efectivo fue QPR con un 50% menos de plantas muertas. Del mismo modo, la aplicación preventiva por inmersión de *Bacillus* sp. (BPI) redujo la incidencia de plantas muertas respecto al control (12,9%), aunque no de forma significativa (Tabla _). Todos

los tratamientos, salvo los ACBs curativos aplicados por riego (TCR y BCR), fueron capaces de reducir significativamente el ABCPEE ($P=0.0002$) (Tabla III.2).

No se observaron síntomas de la enfermedad en las plantas correspondientes al testigo agua y a los testigos tratados no inoculados.

Tabla III.2. Efecto de diferentes tratamientos de control químico y biológico sobre la Podredumbre carbonosa causada por *Macrophomina phaseolina* en plantas de fresa ‘Fortuna’ incubadas en condiciones controladas^a. Experimento 1

Tratamientos ^b	Plantas muertas ^c	ABCPEE ^c
	(%) ($P=0.0003$)	($P=0.0002$)
Control	100 ± 0,0 a	79,5 ± 2,3 a
QPR	50 ± 0,0 d	31,8 ± 3,9 ef
QCR	62.4 ± 12.4 cd	29,0 ± 6,0 f
TPI	74,8 ± 14,3 bc	51,1 ± 6,0 cde
BPI	87.1 ± 12,4 ab	40,3 ± 14.0 def
TPR	100 ± 0,0 a	56,3 ± 8,4 bcd
BPR	100 ± 0,0 a	54,5 ± 1,9 bcd
TCR	100 ± 0,0 a	66,5 ± 3,1 abc
BCR	100 ± 0,0 a	73,9 ± 8,6 ab

^aEn cámara de crecimiento ajustada a 29/26°C y 60/40% de humedad relativa (día/noche) y 16 h de fotoperiodo, durante tres meses.

^b**Control:** inoculado con el patógeno y no tratado; **QPR:** metil-tiofanato 70% aplicado de forma preventiva por riego; **QCR:** metil-tiofanato 70% aplicado de forma curativa por riego; **TPI:** *Trichoderma asperellum* T18 aplicado de forma preventiva por inmersión; **BPI:** *Bacillus megaterium* B197 + *Bacillus laterosporus* B157 aplicado de forma preventiva por inmersión (Fusbact®); **TPR:** *Trichoderma asperellum* T18 aplicado de forma preventiva por riego; **BPR:** *Bacillus megaterium* B197 + *Bacillus laterosporus* B157 aplicado de forma preventiva por riego (Fusbact®); **TCR:** *Trichoderma asperellum* T18 aplicado de forma curativa por riego; **BCR:** *Bacillus megaterium* B197 + *Bacillus laterosporus* B157 aplicado de forma curativa por riego (Fusbact®).

^c Cada valor de la tabla es la media con el error estándar de cuatro bloques (repeticiones) con dos plantas por bloque. Cifras seguidas por distintas letras difieren entre sí según el test LSD ($P \leq 0,05$).

En el segundo experimento de control de *M. phaseolina*, los resultados mostraron que la aplicación de BPI o TPI redujo significativamente ($P=0,0007$) en un 74,7 y 62,4%, respectivamente, la incidencia de plantas muertas por la Podredumbre carbonosa con respecto al tratamiento control. Los niveles de reducción de la enfermedad conseguidos por dichos tratamientos fueron similares a los obtenidos por el fungicida químico (87,1 y 74,7%, en aplicación preventiva y curativa, respectivamente) (Tabla III.3).

Del mismo modo, ambos agentes de biocontrol aplicados de forma preventiva por inmersión redujeron significativamente ($P=0,0016$) el ABCPEE de la enfermedad (Tabla III.3) alcanzando niveles similares al fungicida químico.

Respecto a los síntomas de Podredumbre carbonosa, todos los tratamientos, excepto *Bacillus* sp. aplicado preventivamente por riego (BPR), redujeron significativamente ($P=0,0016$) el porcentaje de necrosis en corona con respecto al control (Tabla III.3).

No se observaron síntomas de la enfermedad en las plantas correspondientes al testigo agua y a los testigos tratados no inoculados.

La cuantificación mediante PCR en tiempo real de los niveles de *M. phaseolina* presentes en las plantas inoculadas, y sometidas a los distintos tratamientos, mostró que la menor colonización se obtuvo con QPR que fue el único que se diferenció significativamente ($P=0,0013$) del control, aunque la aplicación de BPI o TPI también disminuyó los niveles del patógeno en la planta (Tabla III.3).

Tabla III.3. Efecto de diferentes tratamientos de control biológico y químico sobre la Podredumbre carbonosa causada por *Macrophomina phaseolina* en plantas de fresa ‘Fortuna’ incubadas en condiciones controladas^a. Experimento 2.

Tratamientos^b	Plantas muertas^c (%) (<i>P</i> =0.0007)	ABCPEE^c (<i>P</i> =0.0016)	Necrosis corona^c (%) (<i>P</i> =0.0016)	ng ADN hongo / g planta^c (<i>P</i> =0.0013)
Agua	100 ± 0.0 a	51,8 ± 10.4 a	38,8 ± 3.8 a	36.9 ± 7.9 ab
QPR	12,9 ± 12.4 c	5,3 ± 4.8 c	10,3 ± 6.0 c	5.0 ± 2.0 c
QCR	25,3 ± 14.3 c	12,8 ± 8.0 c	6,4 ± 2.3 c	26.5 ± 6.4 abc
TPI	37,6 ± 23.7 bc	20,3 ± 12.7 bc	9,4 ± 2.1 c	20.0 ± 7.5 bc
BPI	25,3 ± 14.3 c	8,3 ± 4.8 c	9.0 ± 7.0 c	15.4 ± 10.1 bc
TPR	74,8 ± 24.8 ab	48,3 ± 16.0 a	8,3 ± 3.0 c	31.6 ± 5.0 ab
BPR	74,8 ± 14.3 ab	46,4 ± 12.0 a	28,8 ± 7.5 ab	48.3 ± 10.0 a
TCR	74,8 ± 14.3 ab	41,1 ± 10.5 ab	11,3 ± 2.1 c	27.8 ± 8.0 abc
BCR	100 ± 0.0 a	46,4 ± 9.4 a	14,4 ± 2.1 bc	36.3 ± 8.3 ab

^aEn cámara de crecimiento ajustada a 29/26°C y 60/40% de humedad relativa (día/noche) y 16 h de fotoperiodo, durante tres meses.

^b**Control:** inoculado con el patógeno y no tratado; **QPR:** metil-tiofanato 70% aplicado de forma preventiva por riego; **QCR:** metil-tiofanato 70% aplicado de forma curativa por riego; **TPI:** *Trichoderma asperellum* T18 aplicado de forma preventiva por inmersión; **BPI:** *Bacillus megaterium* B197 + *Bacillus laterosporus* B157 aplicado de forma preventiva por inmersión (Fusbact®); **TPR:** *Trichoderma asperellum* T18 aplicado de forma preventiva por riego; **BPR:** *Bacillus megaterium* B197 + *Bacillus laterosporus* B157 aplicado de forma preventiva por riego (Fusbact®); **TCR:** *Trichoderma asperellum* T18 aplicado de forma curativa por riego; **BCR:** *Bacillus megaterium* B197 + *Bacillus laterosporus* B157 aplicado de forma curativa por riego (Fusbact®).

^cCada valor de la tabla es la media con el error estándar de cuatro bloques (repeticiones) con dos plantas por bloque. Cifras seguidas por distintas letras difieren entre sí según el test LSD (*P* ≤ 0,05).

En el experimento de control de *F. solani* llevado a cabo en invernadero, TPI y TPR, resultaron tan eficaces como la carbendazima, impidiendo el desarrollo de la enfermedad. A pesar de que BPI fue capaz de reducir la incidencia de plantas muertas a la mitad, con respecto al tratamiento control, esta diferencia no fue significativa, al igual

que la del resto de los tratamientos. Ese mismo efecto se observó respecto al ABCPEE ($P=0.0419$) (Tabla III.4). No se observaron síntomas de la enfermedad en las plantas correspondientes al testigo agua y a los testigos tratados no inoculados.

Tabla III.4. Efecto de diferentes tratamientos de control biológico y químico sobre la enfermedad causada por *Fusarium solani* en plantas de fresa ‘Camarosa’ incubadas en condiciones de invernadero^a.

Tratamiento	Plantas muertas ^b	ABCPEE ^b
	(%) ($P=0.0371$)	($P=0.0419$)
Control	50.0 ± 20.2 a	51.5 ± 23.3 a
QPR	0.0 ± 0.0 b	0.0 ± 0.0 b
QCR	0.0 ± 0.0 b	0.0 ± 0.0 b
TPI	0.0 ± 0.0 b	0.0 ± 0.0 b
BPI	25.3 ± 14.3 ab	19.3 ± 11.2 ab
TPR	0.0 ± 0.0 b	0.0 ± 0.0 b
BPR	37.6 ± 23.7 a	17.0 ± 9.8 a
TCR	25.3 ± 14.3 ab	19.3 ± 11.2 ab
BCR	37.6 ± 12.4 a	26.7 ± 9.0 ab

^aEn condiciones de invernadero durante tres meses.

^b**Control:** inoculado con el patógeno y no tratado; **QPR:** metil-tiofanato 70% aplicado de forma preventiva por riego; **QCR:** metil-tiofanato 70% aplicado de forma curativa por riego; **TPI:** *Trichoderma asperellum* T18 aplicado de forma preventiva por inmersión; **BPI:** *Bacillus megaterium* B197 + *Bacillus laterosporus* B157 aplicado de forma preventiva por inmersión (Fusbact®); **TPR:** *Trichoderma asperellum* T18 aplicado de forma preventiva por riego; **BPR:** *Bacillus megaterium* B197 + *Bacillus laterosporus* B157 aplicado de forma preventiva por riego (Fusbact®); **TCR:** *Trichoderma asperellum* T18 aplicado de forma curativa por riego; **BCR:** *Bacillus megaterium* B197 + *Bacillus laterosporus* B157 aplicado de forma curativa por riego (Fusbact®).

^cCada valor de la tabla es la media con el error estándar de cuatro bloques (repeticiones) con ocho plantas por bloque. Cifras seguidas por distintas letras difieren entre sí según el test LSD ($P \leq 0,05$).

Experimentos en campo

El tratamiento con TPI redujo en un 50% ($P=0,0279$) con respecto al control el número de plantas muertas por *M. phaseolina* en condiciones de campo, del mismo modo que el fungicida químico aplicado de forma curativa (QCR) (Tabla III.5). El resto de los tratamientos no se diferenciaron significativamente del control inoculado.

En cuanto al progreso de la Podredumbre carbonosa (ABCPEE), no hubo diferencias significativas entre los tratamientos, aunque TPI y QCR disminuyeron en promedio hasta en un 43% el ABCPEE (57,1 y 42,6%, respectivamente) (Tabla III.5). El porcentaje de necrosis en corona también se vio significativamente ($P=0,0118$) reducido con respecto al control, tras la aplicación de estos dos tratamientos (Tabla III.5). No se observaron síntomas de la enfermedad en las plantas correspondientes al testigo agua y a los testigos tratados no inoculados (datos no incluidos en la tabla por ser todos los valores 0). Cuando se analizaron los rendimientos no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos, aunque se obtuvieron valores muy dispares, entre 11,2 y 33 g/planta respectivamente, para TCR y QPI en las plantas inoculadas y tratadas (Tabla III.5). Mientras que en los tratamientos control no inoculados los rendimientos oscilaron entre 26 y 70 g/planta, para el fungicida y *T. asperellum* aplicados como curativos por riego (QCR y TCR, respectivamente) (datos no mostrados en la tabla).

Tabla III.5. Efecto de diferentes tratamientos de control químico y biológico sobre la Podredumbre carbonosa causada por *Macrophomina phaseolina* y sobre los rendimientos de las plantas de fresa ‘Fortuna’, en un macrotúnel bajo las condiciones convencionales de cultivo en campo.

Tratamientos ^a	Plantas muertas ^b (%) (<i>P</i> =0.0279)	ABCPEE ^b (NS)	Necrosis corona ^b (%) (<i>P</i> =0.0118)	g fruta / planta ^b (NS)
Agua	100.0 ± 0.0 a	65.3 ± 11.8	62.0 ± 14.3 a	22.2 ± 13.1
QPI	100.0 ± 0.0 a	51.0 ± 45.3	48.6 ± 11.5 a	33.0 ± 14.9
QCR	50.0 ± 28.8 b	37.5 ± 13.0	1.3 ± 1.2 b	20.3 ± 7.3
TPI	45.8 ± 15.7 b	28.0 ± 12.0	8.0 ± 4.7 b	26.0 ± 15.6
BPI	100.0 ± 0.0 a	56.5 ± 10.6	39.2 ± 13.0 ab	24.4 ± 13.8
TCR	75.0 ± 25.0 ab	47.3 ± 16.5	38.8 ± 10.1 ab	11.2 ± 2.5
BCR	100.0 ± 0.0 a	60.0 ± 55.7	36.0 ± 12.7 ab	17.7 ± 4.2

^a **Control:** inoculado con el patógeno y no tratado; **QPI:** metil-tiofanato 70% aplicado de forma preventiva por inmersión; **QCR:** metil-tiofanato 70% aplicado de forma curativa por riego; **TPI:** *Trichoderma asperellum* T18 aplicado de forma preventiva por inmersión; **BPI:** *Bacillus megaterium* B197 + *Bacillus laterosporus* B157 aplicado de forma preventiva por inmersión (Fusbact®); **TCR:** *Trichoderma asperellum* T18 aplicado de forma curativa por riego; **BCR:** *Bacillus megaterium* B197 + *Bacillus laterosporus* B157 aplicado de forma curativa por riego (Fusbact®).

^b Para cada tratamiento se dispusieron cuatro repeticiones (contenedores de 100 L de capacidad) con ocho plantas de fresa cada uno, que se colocaron en un macrotúnel, de acuerdo con un diseño en bloques completamente al azar. Cada valor de la tabla es la media con el error estándar de las cuatro repeticiones. Cifras seguidas por distintas letras difieren entre sí según el test LSD (*P* ≤ 0,05). NS = no hubo diferencias significativas entre las medias.

En el caso de *F. solani*, los tratamientos con TPI y BPI disminuyeron, similarmente al tratamiento QCR (56,0-60.8%, *P*=0.0094) la incidencia de plantas muertas con respecto control, pero con algo menos de eficacia que el tratamiento químico aplicado preventivamente por inmersión (QPI) que redujo en un 80% la incidencia de la enfermedad. Respecto a las ABCPEE se observó un efecto similar, correspondiendo las menores a los dos tratamientos químicos y a BPI, que redujeron cerca de 10 veces el ABCPEE respecto al control inoculado no tratado (Tabla III.6). En ninguno de los tratamientos control no inoculados se detectaron síntomas.

Todos los tratamientos, excepto TCR en plantas inoculadas y tratadas y QCR en plantas no inoculadas tratadas (22,2 y 26 g/planta), indujeron una mayor producción de frutos de fresa que el control inoculado (26,8g/planta) no tratado, pero esas diferencias sólo fueron significativas a $P=0,0102$ (Tabla III.6).

Tabla III.6. Efecto de diferentes tratamientos de control químico y biológico sobre la enfermedad ocasionada por *F. solani* y sobre los rendimientos de las plantas de fresa ‘Camarosa’, en un macrotúnel bajo las condiciones convencionales de cultivo en campo.

Tratamientos ^a	Plantas muertas (%) ^b ($P=0.0094$)	ABCPEE ^b ($P=0.0018$)	g fruto / planta ^b ($P=0.102$)
Agua	85.3 ± 8.6 a	32.0 ± 2.7 a	26.8 ± 7.2 a
QPI	16.7 ± 16.6 c	3.8 ± 3.7 b	66.6 ± 25.3 ab
QCR	33.4 ± 23.5 bc	3.3 ± 2.3 b	107.9 ± 62.8 b
TPI	33.4 ± 23.5 bc	17.3 ± 14.1 ab	45.1 ± 10.5 a
BPI	37.5 ± 23.9 bc	3.7 ± 3.6 b	44.7 ± 23.1 a
TCR	54.2 ± 20.8 ab	33.3 ± 2.4 a	22.2 ± 4.6 a
BCR	62.5 ± 14.2 ab	24.5 ± 4.0 a	35.9 ± 11.0 a

^a **Control:** inoculado con el patógeno y no tratado; **QPI:** metil-tiofanato 70% aplicado de forma preventiva por inmersión; **QCR:** metil-tiofanato 70% aplicado de forma curativa por riego; **TPI:** *Trichoderma asperellum* T18 aplicado de forma preventiva por inmersión; **BPI:** *Bacillus megaterium* B197 + *Bacillus laterosporus* B157 aplicado de forma preventiva por inmersión (Fusbact®); **TCR:** *Trichoderma asperellum* T18 aplicado de forma curativa por riego; **BCR:** *Bacillus megaterium* B197 + *Bacillus laterosporus* B157 aplicado de forma curativa por riego (Fusbact®).

^bPara cada tratamiento se dispusieron cuatro repeticiones (contenedores de 100 L de capacidad) con ocho plantas de fresa cada uno, que se dispusieron en un macrotúnel, de acuerdo con un diseño en bloques completamente al azar. Cada valor de la tabla es la media con el error estándar de las cuatro repeticiones. Cifras seguidas por distintas letras difieren entre sí según el test LSD ($P \leq 0,05$). NS = no hubo diferencias significativas entre las medias.

Aislamiento de los patógenos del material vegetal

Los hongos patógenos se recuperaron de todas las plantas de fresa con síntomas de enfermedad, mientras que de las plantas tratadas no inoculadas, sólo se aislaron los ACBs aplicados. Los aislamientos de las plantas no inoculadas y no tratadas resultaron negativos. También se aisló el patógeno correspondiente a partir de un bajo porcentaje de las plantas inoculadas que no mostraron síntomas de enfermedad al finalizar los experimentos.

*Evolución de las poblaciones de *M. phaseolina* y de *F. solani* en el suelo*

Cuatro meses después de la infestación del sustrato el número de propágulos viables de *M. phaseolina* en el suelo permaneció invariable (10^4 UFC /mL) (Tabla III.7), mientras que el nivel de inóculo de *F. solani* fue 100 veces menor (10^5 UFC/g de suelo) (Tabla III.8) que al inicio del experimento (10^7 UFC/g talco) (Figura III.3).

Tabla III.7. Número de unidades formadoras de colonias de *M. phaseolina* por gramo de suelo cuatro meses después de la inoculación.

Muestra	Promedio nº colonias (UFC/mL)	UFC/g suelo
1	13,0 ± 1,4	1300
2	29,6 ± 2,7	2960
3	7,4 ± 1,6	740

Tabla III.8. Número de unidades formadoras de colonias de *F. solani* por gramo de suelo cuatro meses después de la inoculación.

Muestra	Promedio nº colonias (dilución 10^{-2}) (UFC/mL)	UFC/g suelo
1	171,7 ± 17,9	5.16×10^5
2	218,3 ± 20,9	6.55×10^5
3	67,0 ± 4,9	2×10^5

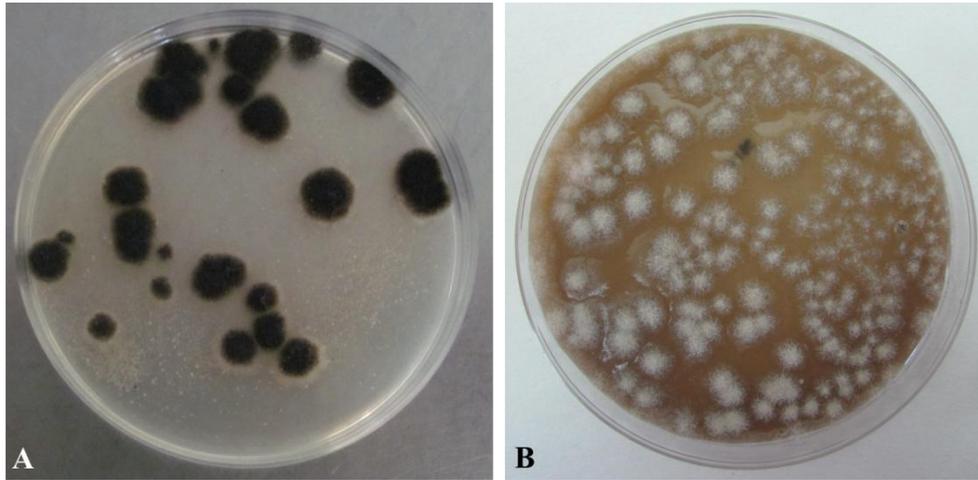


Figura III.3. Colonias de *M. phaseolina* (A) y *F. solani* (B) procedentes de muestras de suelo de los compartimentos estancos usados en el experimento bajo macrotúnel.

DISCUSIÓN

En los enfrentamientos duales realizados *in vitro*, un método mucho más rápido que los experimentos realizados en invernadero o campo (Renwick y col., 1991; Anandhakumar y col., 2008), se observó el efecto antagónico de los formulados de *T. asperellum* T18 (Prodigy®) y de *B. megaterium* B157 y *B. laterosporus* B197 (Fusbact®), frente a *M. phaseolina* y *F. solani*. Ambos fueron capaces de inhibir el crecimiento radial *in vitro* de los dos patógenos en más de un 30%. La eficacia de los dos agentes de control biológico (ACBs) fue similar frente a *F. solani*. Sin embargo, *T. asperellum* inhibió en mayor grado el desarrollo de *M. phaseolina* que *Bacillus* spp. Aunque estos resultados no siempre son reproducibles en condiciones *in vivo* (Harman y Lumsden, 1990), en nuestro caso se corroboraron en los experimentos llevados a cabo en plantas.

El momento y el método de aplicación de los ACBs y de los fumigantes en general, juegan un importante papel en su eficacia frente al patógeno. Las ventajas de los tratamientos preventivos se basan en impedir o reducir la presencia del hongo patógeno. En el cultivo de la fresa, una práctica muy extendida es el “mojado” de las plantas antes de su plantación en suelo, que consiste en sumergirlas en un fungicida químico como tratamiento preventivo de enfermedades. Para reproducir estas prácticas culturales en nuestro trabajo se han comparado tratamientos aplicados mediante

inmersión de la raíz y la corona de las plantas en una suspensión del ACB, con tratamientos por riego con esa misma suspensión, y con un fungicida químico convencional aplicado de la misma manera.

Los resultados obtenidos en los experimentos *in vivo* muestran la eficacia del formulado comercial de *T. asperellum* T18 en el control biológico de *M. phaseolina* cuando se aplicó por inmersión de las raíces en una suspensión del producto, antes del trasplante (TPI), que fue similar a la obtenida con el fungicida químico (metiltiofanato) aplicado mediante riego, cinco días antes (QPR) y después de la plantación (QCR). Además, los resultados bajo condiciones convencionales de campo fueron consistentes con los observados en macetas en cámara de ambiente controlado donde los tratamientos más eficaces para el control de *M. phaseolina* fueron TPI y QCR. El efecto de TPI y QCR en el control de *F. solani* fue similar al observado frente a *M. phaseolina*. No obstante, su eficacia en invernadero fue mayor que la obtenida en condiciones de campo, ya que en el primer caso ambos tratamientos impidieron el desarrollo de la enfermedad causada por *F. solani*.

La efectividad de *Bacillus* spp. como ACB de *M. phaseolina* fue menos consistente que la mostrada por *T. asperellum* T18, variando su eficacia en función de las condiciones experimentales. Cuando se aplicó como tratamiento preventivo de la Podredumbre carbonosa por inmersión (BPI), en los experimentos en ambiente controlado, mostró un comportamiento similar a TPI y QCR (en el segundo experimento), pero en condiciones de campo, independientemente del momento y del modo de aplicación, resultó totalmente inefectivo. Así, pudo haber una mayor eficiencia en la colonización de las raíces de las plantas por *Bacillus* spp. en macetas y en ambiente controlado que en condiciones naturales. Las condiciones que se obtienen en un ensayo en maceta en cámara de cultivo, donde la raíz de la planta, el patógeno y los agentes de control biológico están restringidos a un espacio limitado y en unas condiciones óptimas de crecimiento, son muy distintas a las que se consiguen en un experimento en campo, donde las condiciones son más variables y dependientes de la climatología.

Bacillus es capaz de colonizar rápidamente las raíces de las plantas después de la inoculación y esta colonización es un requisito necesario para impedir la infección de la planta por el hongo patógeno y, por tanto, para reducir la incidencia de la enfermedad

(Cao y col., 2011). El hecho de que este proceso sea tan crucial puede ser el responsable de la variabilidad encontrada en la eficacia de este tratamiento según el ambiente en el que se desarrollaron los experimentos. También habría que comprobar si la viabilidad del formulado de *Bacillus* spp. es la misma en condiciones controladas que en condiciones de campo.

La efectividad de los tratamientos por inmersión de raíces en una suspensión de inóculo de *B. velezensis*, se ha referido previamente en el control de la Fusariosis de la fresa ocasionada por *F. oxysporum* f. sp. *fragariae* (Nam y col., 2008). En otros cultivos, el agente de biocontrol se aplica sobre semillas (Adekunle y col., 2006; Rojo y col., 2007; Abeysinghe y col., 2007; Kakvan y col., 2013) o mediante la mezcla de éste con el sustrato, justo en el momento de la plantación (Cao y col., 2011; Abdel-Monain y col., 2014). *Bacillus subtilis* aplicado a las semillas de judía antes de la siembra redujo significativamente la podredumbre radical ocasionada por *F. solani* f. sp. *phaseoli* respecto al control no tratado, relacionándose ese hecho con la colonización de la rizosfera de las plantas por el ACB y con una disminución de la densidad de inóculo del patógeno en el suelo (Abeysinghe, 2007).

Los resultados de este trabajo también muestran que la aplicación del ACB de forma curativa, es decir, después de la inoculación del patógeno o una vez que se detectan los primeros síntomas de enfermedad en campo, no son efectivos, debido posiblemente a que el patógeno ya está presente en el suelo y ha ocupado su nicho en la rizosfera de la planta. Los tratamientos curativos tienen la ventaja de permitir el control de las enfermedades de forma más específica y localizada tanto en el espacio como en el tiempo. En los ensayos llevados a cabo en campo bajo macrotúnel, los tratamientos curativos se aplicaron tres veces mediante riego, simulando el manejo del cultivo convencional de fresa en la provincia de Huelva. Aun así, los tratamientos preventivos con los agentes de biocontrol fueron siempre más eficaces que los curativos.

Otra de las características de los ACB es su capacidad de aumentar los parámetros de crecimiento de las plantas. En estudios en invernadero se ha observado cómo la aplicación de *T. harzianum* es capaz de aumentar la producción de fruto por planta en tomate (Sundaramoorthy y Balabaskar, 2013_De Abdel) y la aplicación de *T. gamsii* la aumenta en cereales y legumbres (Rinu y col., 2013). Recientemente, también se ha referido en el patosistema berenjena / *F. oxysporum* f. sp. *melongenae* el efecto

positivo inducido en el cultivo por diferentes especies de *Trichoderma*, que no sólo redujeron significativamente la severidad de la Fusariosis, sino que incrementaron el vigor de las plantas y la cantidad y calidad de los frutos de berenjena (Abdel-Monaim, 2014). En nuestro estudio, el tratamiento con *T. asperellum* T18 no indujo incremento en los rendimientos respecto de las plantas control infectadas no tratadas. No obstante, otros autores en estudios de biocontrol realizados en fresa frente a *Botrytis cinerea* y *Phytophthora cactorum* (Kowalska y col., 2011; Porras y col., 2009), tampoco encontraron diferencias significativas en el desarrollo y los rendimientos del cultivo respecto del control no tratado en el primer año, pero sí las observaron a partir del segundo año de experimentación.

En general, la existencia de variabilidad entre los experimentos de biocontrol realizados en campo no es extraña y la incapacidad para conseguir resultados significativos en estas condiciones es el principal problema en el desarrollo de productos de control biológico (De Anand, 2008). En este sentido, la variación en los resultados puede ser debida a diferentes factores bióticos y abióticos, así como a la virulencia de las cepas que naturalmente infectan los suelos. Aun así, nuevas repeticiones en condiciones de campo serían necesarias para poder evaluar de forma totalmente satisfactoria estos productos de control biológico.

A pesar de que la aplicación de los agentes de biocontrol no influye en el rendimiento de frutos producidos por planta, sí lo hace en el rendimiento total de la cosecha, pues disminuyen el número total de plantas muertas y afectadas por la enfermedad y por tanto aumentan el rendimiento total de la finca.

Las conclusiones obtenidas en este estudio nos muestran que las formulaciones utilizadas en estos experimentos son capaces de ofrecer una base para la supresión de enfermedades provocadas por hongos patógenos y podrían ser utilizadas, para mejorar la producción del cultivo de la fresa, como alternativa biológica al uso de compuestos químicos.

**PATOGENICIDAD DE AISLADOS DE *Fusarium*
oxysporum Y *Fusarium solani* DE FRESA EN OTROS
CULTIVOS HORTÍCOLAS DE INTERÉS
ECONÓMICO EN ANDALUCÍA**

CAPÍTULO IV.

PATOGENICIDAD DE AISLADOS DE *Fusarium oxysporum* Y *Fusarium solani* DE FRESA EN OTROS CULTIVOS HORTÍCOLAS DE INTERÉS ECONÓMICO EN ANDALUCÍA

INTRODUCCIÓN

Uno de los géneros fúngicos mejor estudiados a lo largo de la historia ha sido *Fusarium* Link. La importancia de este género se debe a que engloba a algunas de las especies de hongos patógenos más destructivas para la agricultura: el complejo de especies de *Fusarium oxysporum* (CEFO) y el complejo de especies de *Fusarium solani* (CEFS). Cada complejo de especies incluye tanto cepas patógenas como no patógenas, indistinguibles morfológicamente. Los aislados pertenecientes a ambos complejos se reproducen asexualmente y se encuentran distribuidos a lo largo de todo el planeta (Baayen y col., 2000; Lievens y col., 2008; Aoki y col., 2014). Son capaces de sobrevivir durante muchos años como macro y microconidias en los restos de cultivos infectados y como clamidosporas en el suelo, lo que hace que los restos orgánicos y el suelo sean un reservorio de inóculo para cultivos posteriores y que el control de estos hongos sea muy complicado (Abawi y Lorbeer, 1972; Brayford, 1996).

Las cepas no patógenas se definen como aquellas para las cuáles aún no se han identificado plantas huéspedes (Lievens y col., 2008). Entre las cepas patógenas, existen más de 100 especies de plantas que son huéspedes del CEFO (Lievens y col., 2008) y al menos 111 del CEFS (Bogale y col., 2009), entre las que se encuentran cultivos importantes como ajo, espárrago, fresa y tomate (Romberg y Davis, 2007; Lievens y col., 2008; Molinero-Ruíz y col., 2011; Leoni y col., 2013; Borrego-Benjumea y col. Capítulo libro, Fang y col., 2013; Pastrana y col., 2014). En general, tanto el CEFO como el CEFS, poseen un amplio rango de huéspedes. En cambio, los aislados patógenos usualmente sólo infectan a una o a un conjunto de especies de plantas, asignándosele el nombre de *formae speciales* basado en la especificidad de huésped (Booth, 1971; Armstrong y Armstrong, 1976). En la práctica, los aislados son normalmente asignados a una única *forma specialis* después de la realización de una prueba de patogenicidad en un cultivo determinado. Sin embargo, la patogenicidad de estos aislados es raramente, o nunca, comprobada en otros huéspedes. Por esta razón, la

utilidad del concepto *formae speciales* puede ser engañosa cuando se refiere a aislados de *F. oxysporum* y *F. solani* (Elmer, 2001). A nivel molecular, se ha asumido que aislados englobados dentro de una misma *forma specialis* son más similares genéticamente que aislados con otra especificidad de huésped (Kistler, 1997). Sin embargo, hay algunos ejemplos en los que aislados dentro de una *forma specialis* pueden estar más relacionados con aislados no patógenos o con aislados que pertenecen a otra *forma specialis* (Kistler, 1997; Recorbet y col., 2003; Lievens y col., 2008).

Actualmente, hay referidas más de 120 *formae speciales* para *F. oxysporum* y 12 para *F. solani* (Michielse y Rep 2009; Aoki y col., 2014). *F. oxysporum* f. sp. *fragariae* (*Fof*), como ya hemos comentado anteriormente, ha sido descrito en los principales países productores de fresa. *Fof* es capaz de infectar las plantas de fresa penetrando a través de la raíz y afectando al crecimiento y desarrollo de raíces y corona; esta infección se traduce en una rápida marchitez y, en algunos casos, muerte de las plantas (Fang y col., 2011, 2012).

No existe ninguna referencia sobre si *Fof* es específico de fresa, o por el contrario es capaz de infectar y/o producir síntomas en otros cultivos hortícolas de interés económico en Andalucía, como pueden ser ajo, espárrago y tomate. Tampoco existen estudios disponibles acerca de la patogenicidad de las respectivas *formae speciales cepae*, *asparagi* y *radicis-lycopersici* en el cultivo de la fresa. *Fusarium oxysporum* f. sp. *cepae* (*Foc*) es patógeno para especies de *Allium* sp. (ajo, cebolla y puerros), así como para espárrago (*Asparagus officinalis*) (Leoni y col., 2013). Los síntomas en las plantas de ajo infectadas con *Foc* son la curvatura, clorosis y/o necrosis de los ápices de las hojas que avanza progresivamente hacia abajo, y lesiones de color castaño-rojizo en el disco basal, en los tejidos de reserva, y en las raíces, que se van necrosando a medida que avanza la enfermedad. Cuando el hongo infecta en estadios tempranos del desarrollo de la planta se puede observar un crecimiento reducido de la misma. (compendium of onion and garlic diseases).

F. oxysporum f. sp. *asparagi* (*Foa*) fue descrito basándose en pruebas de patogenicidad que demostraron cierto nivel de especificidad hacia espárrago. Los síntomas provocados por *Foa* en espárrago comienzan con la amarillez de los ápices de algunos frondes, la cual progresa hasta la base de la planta en pocos días. En algunos casos los tejidos se van necrosando hasta que la planta muere. Diferentes estudios han

mostrado que aislados de *F. oxysporum* patógenos para espárrago también son capaces de provocar enfermedad en ajo, apio, cebolla, gladiolo y lupino (Elmer, 2001; Molinero-Ruiz y col., 2011).

F. oxysporum f. sp. *radicis-lycopersici* (Forl) infecta a tomate (*Solanum lycopersicum*), pero también puede provocar podredumbre de raíz y tallo en múltiples huéspedes de diferentes familias de plantas (Menzies y col., 1990). La infección de las plantas de tomate por Forl se produce a través de lesiones en las raíces, o de los puntos de inserción de las raíces secundarias en las principales. Es muy frecuente que el hongo se aísle cerca de las lesiones y no se propague sistémicamente. Las plantas infectadas pueden marchitarse y morir o permanecer en un estado de debilidad, con la consiguiente pérdida de producción. Además, las raíces dañadas pueden ser colonizadas fácilmente por patógenos secundarios (Szczechura y col., 2013).

F. solani f. sp. *cucurbitae* ha sido la única *formae speciales* descrita en nuestro país (referencia) afectando calabaza, calabacín y sandías injertadas (García-Jiménez y col., 1997; Armengol y col., 2000; Gómez-Vázquez y col., 2008). Aunque también existen referencias de *F. solani* como patógeno de guisante (Tello y col., 1988), judía (Tello y col., 1985), espárrago (Corpas-Hervias y col., 2006) y ajo (Basallote y col., 2011). También se ha detectado recientemente como patógeno en fresa causando enanismo, marchitez y/o muerte en las plantas infectadas en campos de producción (Pastrana y col., 2014), y podredumbre de cuello en viveros de altura (Redondo y col., 2012). Las *forma specialis* de *F. solani* son mucho menos conocidas o frecuentes que las de *F. oxysporum*, pero del mismo modo que las de este, pueden ocasionar enfermedad en uno o en varios huéspedes de diferentes familias botánicas (Chung y col. 2011; Romberg y Davis, 2007). Como en el caso de *Fof*, se desconoce si los aislados de *F. solani* procedentes de fresa son capaces de causar enfermedad en otros cultivos, o por el contrario, son específicos de fresa.

OBJETIVOS

Evaluar si la especificidad de las cepas patógenas de *F. oxysporum* y *F. solani* procedentes de plantas de fresa son específicas de este huésped o son capaces de causar enfermedad en plantas de ajo, espárrago y tomate.

Determinar si las *formae speciales* de *F. oxysporum* descritas como patógenas para ajo, espárrago y tomate son capaces de causar enfermedad en el cultivo de la fresa.

MATERIALES Y MÉTODOS

Para resolver los objetivos propuestos se realizaron dos tipos de experimentos utilizando plantas crecidas en condiciones *in vitro* y en sustrato. El sustrato utilizado varió dependiendo del cultivo, pero en todos los casos se esterilizó previamente en autoclave durante 70 min a 121°C, dos días consecutivos.

En ambos experimentos, las plantas se dispusieron siguiendo un diseño experimental completamente al azar con 16 u ocho repeticiones (experimentos *in vitro* y en sustrato, respectivamente).

Material Vegetal

Fresa

En el experimento *in vitro* se utilizaron plantas de un mes del cultivar Camarosa obtenidas mediante cultivo de meristemas por la Dra. Mayte Ariza (IFAPA – Centro Churriana) y proporcionadas en tubos individuales conteniendo medio Hoagland-Knop (Tuite, 1969).

Para el experimento en sustrato se utilizaron plantas de fresa ‘Camarosa’ frescas, proporcionadas por D. Antonio Refoyo (Fresas Nuevos Materiales S.A.). Las plantas se sembraron en turba humedecida (Gramoflor Blumenerde®) estéril y se incubaron durante 10 días en una cámara con ambiente controlado ajustada a 25/18°C y 40-75% HR día/noche y 16 h de luz.

Ajo

Se utilizaron dientes de ajo, sin ningún tipo de lesión y de tamaño intermedio, del cultivar Morado de Castilla-La Mancha proporcionados por la cooperativa Santa

Mónica de Balazote (Albacete). Se realizó una limpieza exhaustiva de los dientes de ajo bajo el agua del grifo, especialmente del disco basal. Se desinfectaron superficialmente en una solución acuosa de hipoclorito de sodio al 1% durante 5 min y se dejaron secar en papel de filtro estéril en una cámara de flujo laminar. En los experimentos *in vitro*, los dientes de ajo se introdujeron en condiciones de asepsia, en botes de cristal de 100 mL con 40 mL de medio Hoagland-Knop (Tuite, 1969). A continuación, se sellaron los botes y se incubaron durante 7-10 días a 18° C con un fotoperiodo de 12 h hasta su inoculación.

Para el experimento en sustrato, los dientes se sembraron directamente en macetas de plástico de 1,3 L conteniendo sustrato infestado.

Espárrago

Semillas de espárrago del cultivar Ciprés se desinfectaron superficialmente en una solución acuosa de hipoclorito de sodio al 1% durante 2 min. Se enjuagaron dos veces con agua destilada estéril (ADE) durante 2 min, a intervalos de 5 min, y una tercera vez durante 17 h. Se secaron entre una inmersión y otra sobre papel de filtro estéril y, finalmente, se dispusieron en placas de Petri conteniendo agar-agua (AA) al 0,6% para su germinación (6-7 semillas/placa). Las placas se incubaron a 28°C en oscuridad durante 7-10 días hasta que emitieron una radícula de 1-1,5 cm. En los experimentos *in vitro*, las semillas germinadas se transfirieron, individual y asépticamente, a tubos de vidrio (15 x 2,2 cm) conteniendo 20 mL de medio Hoagland-Knop (Tuite, 1969). A continuación, se sellaron los tubos y se dispusieron durante dos semanas en una cámara de cultivo ajustada a 25°C y con un fotoperiodo de 12 h.

En el experimento en sustrato, las semillas germinadas se sembraron en bandejas con vermiculita estéril, y se mantuvieron durante 21 días en las mismas condiciones descritas para la fresa. Transcurrido este tiempo, las plantas se trasplantaron a macetas con sustrato infestado.

Tomate

Semillas del cultivar Marmande Cuarenteno se desinfectaron de la misma forma que las de espárrago, pero se germinaron directamente en tubos de ensayo con medio

Hoagland-Knop (Tuite, 1969) para los experimentos *in vitro*. Para el experimento en sustrato, las semillas se sembraron en bandejas de plástico con vermiculita estéril y se mantuvieron durante 15 días en una cámara de crecimiento ajustada a las condiciones descritas previamente. Transcurrido este tiempo, las plantas se trasplantaron a macetas con sustrato infestado.

Aislados fúngicos

Se utilizaron cultivos monoconídicos almacenados en suelo estéril a 4°C o conservados a -80°C de un aislado de *Fusarium oxysporum* f. sp. *fragariae* (*Fof*) procedente de una planta de fresa con síntomas de enfermedad en Fukuoka (Japón) (Suga y col., 2013); un aislado de *F. solani* recuperado de una planta hija de fresa 'Camarosa' sin síntomas, cuya patogenicidad se probó previamente (Pastrana y col., 2014); y tres aislados de *Fusarium oxysporum* de probada patogenicidad en ajo (*Foc* Bal, Basallote y Melero, 2011), espárrago (*Foa* 4, Corpas-Hervías y col., 2006), o tomate (*Forl* Poc411, J. Gómez comunicación personal).

Incremento del inóculo

Los aislados se repicaron a placas de Agar Patata Dextrosa (APD) (DIFCO™) y se incubaron a 25°C durante 2 días en oscuridad y otros 5 días con un fotoperiodo de 12 h. Una vez transcurrido el periodo de incubación se cortaron cinco discos de 8 mm de diámetro de APD con micelio en crecimiento activo y se añadieron a frascos de cristal conteniendo 100 mL de Caldo de Patata Dextrosa (CPD) (DIFCO™). Los frascos se dispusieron en un agitador orbital a 150 r.p.m. y se incubaron a temperatura ambiente durante 10 días. Como testigo negativo se incluyeron frascos con CPD con discos de APD sin colonizar. Todas las pruebas de patogenicidad *in vitro* y las de fresa en sustrato, se llevaron a cabo con inóculo incrementado en CPD.

Para incrementar el inóculo de las pruebas de patogenicidad realizadas en sustrato con plantas de ajo, espárrago y tomate, se añadieron dieciséis discos de APD de

5 mm de diámetro, con micelio en crecimiento activo del aislado correspondiente, a un bote de vidrio de 500 mL de capacidad con 400 mL de una mezcla arena:harina de maíz:agua (AMA) (9:1:2, v:v:v) previamente esterilizada 70 min a 121°C, dos días consecutivos. La incubación se realizó durante 15 días a 25°C en oscuridad. Los botes se agitaron cada dos días para facilitar la aireación y colonización del sustrato por parte del hongo. Los botes testigo se sembraron con discos de APD sin colonizar.

Inoculación

En las pruebas de patogenicidad *in vitro*, y en la realizada con fresa en sustrato, la suspensión de conidias utilizada como inóculo se obtuvo filtrando el CPD infectado a través de cuatro capas de gasa estéril. Antes de la inoculación se realizó una estimación de la concentración de conidias/mL mediante conteo en cámara de Thoma. Las plántulas *in vitro* se inocularon con 1 mL (espárrago y tomate) ó 2 mL (ajo y fresa) de una suspensión ajustada a 10^6 - 10^7 conidias/mL, aplicada con una micropipeta a lo largo del sistema radical, y se incubaron durante tres semanas bajo las condiciones descritas anteriormente. Como control se usaron plántulas a las que se les añadió 1 mL de ADE. Se utilizaron ocho plantas por aislado.

Las plantas de fresa de un mes de edad crecidas en sustrato se desenterraron, y las raíces y coronas se sumergieron en una suspensión ajustada a 10^7 conidias/mL (20 mL/planta) durante 30 min. Las plantas testigo se trataron de forma idéntica, pero fueron sumergidas en ADE. Transcurridos los 30 min se trasplantaron individualmente a macetas de 13 cm de diámetro con turba humedecida estéril. Se incluyeron ocho macetas por cada aislado. Todas las macetas se dispusieron en una cámara de cultivo con las condiciones descritas previamente, durante tres meses. La disposición de las plantas en la cámara de crecimiento fue completamente al azar. El riego se realizó según necesidad.

Las pruebas de patogenicidad de ajo, espárrago y tomate en sustrato, se llevaron a cabo mezclando el AMA colonizado por el aislado correspondiente con turba estéril en la proporción 1:4, (v:v). Esta mezcla se vertió en macetas de 13 cm de diámetro a las que se trasplantaron una (espárrago) o dos (ajo y tomate) plantas por maceta.

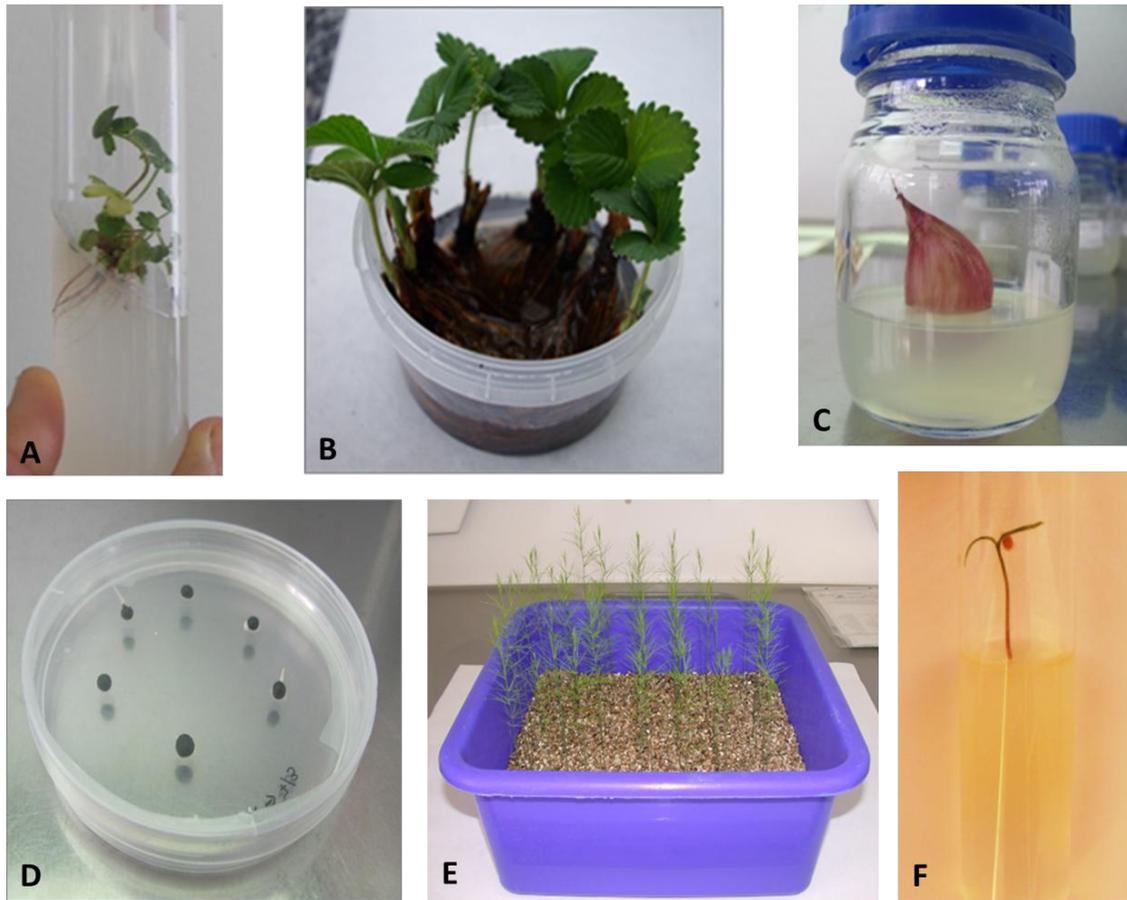


Figura IV.1. Germinación, inoculación y siembra del material vegetal. **A)** Plantas *in vitro* de fresa 'Camarosa' obtenidas mediante cultivo de meristemos; **B)** Inoculación plantas hijas 'Camarosa' mediante inmersión en una suspensión de inóculo; **C)** Germinación de diente de ajo 'Morado de Castilla - La Mancha' en medio Hoagland-Knop; **D)** Semillas de espárrago germinadas en agar-agua; **E)** Plántulas de espárrago 'Ciprés' creciendo en vermiculita; **F)** Semilla de tomate 'Marmande Cuarenteno' germinada en tubo de ensayo con medio Hoagland-Knop.

En los experimentos en sustrato, las plantas se fertilizaron a los 15 días del trasplante con 0,3 g de Osmocote® (ajo, fresa y tomate) o con 0,2 g de Floranid® Permanent (espárrago).

Síntomas de la enfermedad

La observación de los síntomas se llevó a cabo semanalmente hasta un total de tres semanas o tres meses, en los experimentos *in vitro* o en sustrato, respectivamente. Una vez finalizados los experimentos, se sacaron las plántulas de los recipientes de vidrio o de las macetas, se lavaron sus raíces con agua, se secaron y se realizaron las observaciones de los síntomas en la parte aérea y en las raíces de las plantas. En esta lectura final, se asignó un valor a la sintomatología mostrada en cada una de las plantas utilizando una escala de severidad diferente para cada uno de los cultivos y tipo de experimento (*in vitro* o sustrato).

Escala de severidad para fresa

Valor	<i>In vitro</i>
1	No síntomas
2	Necrosis apical raíces
3	Necrosis afectando < 50% del sistema radical y/o pocas raíces y/o dos hojas necrosadas
4	Necrosis afectando > 50% del sistema radical y/o raíces achaparradas y/o más de tres hojas necrosadas
5	4 + necrosis afectando a menos del 50% de los peciolo
6	4 + necrosis afectando a más del 50% de los peciolo

Escala de severidad para ajo

Valor	<i>In vitro</i>	En sustrato
1	No síntomas	No síntomas
2	Necrosis apical raíces	Necrosis apical raíces
3	2 + Necrosis disco basal	2 + Necrosis disco basal y/o podredumbre acuosa + <50% sistema aéreo necrosado
4	3 + Necrosis extensas raíces	3 + Necrosis extensas raíces y/o pobre sistema radical + >50% sistema aéreo necrosado
5	4 + Lesión o necrosis tejidos de reserva	4 + Lesión o necrosis tejidos de reserva y/o muy pobre sistema radical

Escala de severidad para espárrago

Valor	<i>In vitro</i>	En sustrato
1	No síntomas	No síntomas
2	Necrosis apical raíces	Necrosis apical raíces
3	Necrosis en los puntos de inserción de las raíces y/o necrosis extensa en la raíz	Necrosis en los puntos de inserción de las raíces y/o necrosis extensa en la raíz
4	3+ Necrosis rizoma + Raíces abortadas	3+ Necrosis rizoma + Necrosis y/o clorosis de frondes
5	4 + Necrosis del tallo	4+ Necrosis del tallo y/o seca de cladodios

Escala de severidad para tomate

Valor	<i>In vitro</i>	En sustrato
1	No síntomas	No síntomas
2	Necrosis apical raíces	Necrosis apical raíces
3	Necrosis extensa en raíz en los puntos de inserción de las raíces + Amarillez y/o defoliación	Necrosis afectando <50% raíz y en los puntos de inserción de las raíces + Amarillez y/o defoliación
4	3+ Necrosis en la base del tallo	3+ necrosis afectando >50% raíz + Necrosis en la base del tallo
5	Planta muerta	Planta muerta



Figura IV.2. Comparación de síntomas, al final del experimento en sustrato, entre las plantas testigo (izquierda) y las plantas inoculadas con *F. solani* (derecha). A) Fresa 'Camarosa'; B) Ajo 'Morado de Castilla la Mancha'; C) Espárrago 'Cipres'; y D) Tomate 'Marmande Cuarenteno'.

Tras la lectura de síntomas, las plantas se pesaron. Además, se midió la longitud de las hojas en las plantas de ajo, la longitud de la raíz y del tallo de las plantas de espárrago y tomate y, en fresa, se determinó el porcentaje de raíces nuevas, el porcentaje de necrosis de la corona y el número de estolones y de frutos producidos. Cuando la maceta (unidad experimental) contenía dos plantas, se utilizó la media de los datos de ambas.

Se realizaron aislamientos en APD de trozos de raíz, disco basal y tejidos de reserva de los dientes de ajo; de raíz principal, raíces secundarias, rizoma y base del tallo en el caso de las plántulas de espárrago; de raíz, zona de inserción de los cotiledones y base del tallo, en tomate; y de raíz, corona y peciolos, en las plantas de fresa.

Análisis estadísticos

Los datos se analizaron mediante análisis de varianza (ANOVA) de acuerdo con un diseño completamente al azar. Previamente se realizó la transformación angular ($\sqrt{Y/100}$) de los datos porcentuales. Las medias se compararon utilizando el test de mínima diferencia significativa LSD ($P=0,05$).

RESULTADOS

Desarrollo de síntomas en los cuatro cultivos

Fresa

Todos los aislados inoculados en plantas de fresa *in vitro* ocasionaron necrosis en raíces, hojas y peciolos. En las plantas inoculadas, independientemente del aislado, los porcentajes de necrosis en cada una de las zonas afectadas difirieron significativamente ($P=0.0001$) de las plantas control, siendo más severos los causados por el aislado de *Fusarium oxysporum* patógeno de fresa (*Fof*) (Tabla IV.1).

Tabla IV.1. Patogenicidad *in vitro* de aislados de distintas *formae speciales* de *F. oxysporum* y de *F. solani* en plantas de fresa ‘Camarosa’.

<i>Fusarium</i> spp. ^a	Severidad ^b ($P=0.0001$)
<i>Foc</i>	4.1 ± 0.2 bc
<i>Foa</i>	4.0 ± 0.3 bc
<i>Forl</i>	4.3 ± 0.3 b
<i>Fof</i>	5.9 ± 0.1 a
<i>Fs</i>	3.5 ± 0.2 c
Control	2.0 ± 0.0 d

^a *Foc* (*Fusarium oxysporum* f. sp. *cepae*); *Foa* (*Fusarium oxysporum* f. sp. *asparagi*); *Forl* (*Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*); *Fof* (*Fusarium oxysporum* f. sp. *fragariae*) y *Fs* (*Fusarium solani*).

^b Escala de severidad 1- 5, dónde 1= planta sin síntomas y 5= planta con necrosis afectando a más del 50% del sistema radical, y/o raíces achaparradas, y/o más de tres hojas necrosadas, y necrosis afectando a más del 50% de los peciolo. Cada valor de la tabla es la media con el error estándar de 16 repeticiones. Cifras seguidas por distintas letras difieren entre sí según el test LSD ($P \leq 0,05$).

En el experimento en sustrato, *Fof* fue el único aislado de *F. oxysporum* capaz de ocasionar síntomas de necrosis, marchitez, enanismo y muerte de plantas (62 %), redujo la emisión de raíces nuevas y anuló la emisión de estolones. Además, redujo significativamente ($P=0.0001$) el peso de las plantas respecto a los aislados restantes, y disminuyó el número de frutos producidos por planta. Las plantas inoculadas con el aislado de espárrago (*Foa*) y con el de ajo (*Foc*) produjeron un mayor número de frutos, y las correspondientes a los aislados de *Foa* y de tomate (*Forl*) desarrollaron mayor número de estolones, en relación con las plantas testigo y, como consecuencia, incrementaron el peso de las plantas en un 94 % (*Foa*), 77 % (*Forl*) y 38 % (*Foc*) (Tabla IV.2).

Tabla IV.2. Patogenicidad de aislados de distintas *formae specialis* de *F. oxysporum* en plantas de fresa ‘Camarosa’ cultivadas en sustrato.

<i>Fusarium</i> spp. ^a	Raíces nuevas (%) ^b (NS) ^c	Necrosis Corona (%) ^b (NS)	Estolones (N°) ^b (P=0.0001)	Frutos (N°) ^b (P=0.0015)	Peso (g) ^b (P=0.0001)
<i>Foa</i>	60.6 ± 9.5	8.2 ± 4.1	4.8 ± 0.7 a	9.8 ± 2.1 a	63.0 ± 5.4 a
<i>Forl</i>	61.3 ± 3.0	8.2 ± 3.6	4.8 ± 0.6 a	2.8 ± 1.0 b	57.5 ± 3.1 a
<i>Foc</i>	54.4 ± 5.9	8.8 ± 2.1	2.4 ± 1.1 b	9.3 ± 2.0 a	44.8 ± 4.9 b
<i>Fof</i>	38.1 ± 3.8	26.3 ± 11.1	0.0 ± 0.0 c	1.9 ± 1.4 b	10.8 ± 3.5 d
Control	50.0 ± 9.8	10.0 ± 3.4	0.5 ± 0.3 c	7.5 ± 1.2 a	32.4 ± 3.7 c

^a*Foa* (*Fusarium oxysporum* f. sp. *asparagi*); *Forl* (*Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*); *Foc* (*Fusarium oxysporum* f. sp. *cepa*) y *Fof* (*Fusarium oxysporum* f. sp. *fragariae*).

^b Cada valor de la tabla es la media con el error estándar de ocho repeticiones. NS= no hubo diferencias significativas entre las medias. Cifras seguidas por distintas letras difieren entre sí según el test LSD ($P \leq 0,05$).

^c NS= no hubo diferencias significativas entre las medias.



Figura IV.3. Plantas de fresa 'Camarosa'. A) Tras finalizar el experimento *in vitro*, planta testigo sana (izquierda) y plantas inoculadas con *Fof* con síntomas de flacidez, necrosis en raíces y peciolo, y clorosis y necrosis en hojas. Al finalizar el experimento en sustrato: B) a la izquierda planta testigo sin síntomas de enfermedad, y a la derecha planta inoculada con *Fof* con síntomas de necrosis y clorosis en hojas, marchitez y enanismo; C) sistema radical sano y desarrollado de una planta testigo (izquierda) y a la derecha el de una planta inoculada con *Fof*, el cual presenta una escasa formación de raíces nuevas; D) Detalle de corona necrosada en una planta inoculada con *Fof*.

Los aislamientos realizados en las plantas de fresa inoculadas en el experimento *in vitro* resultaron positivos en raíz, corona y peciolo para todos los aislados inoculados. En cambio, en el experimento en sustrato, sólo *Fof* fue aislado desde raíz, corona y peciolo; el resto de aislados sólo se recuperó a partir de las raíces.

Ajo

Los primeros síntomas observados *in vitro*, una semana después de la inoculación, fueron necrosis apical en las raíces y en el disco basal de las plantas inoculadas con el aislado patógeno de ajo (*Foc*) y con los aislados patógenos de fresa (*Fof* y *Fs*). Esta necrosis se extendió a través de las raíces y del disco basal en todas las

plantas inoculadas con *Fs*, y en algunas inoculadas con *Fof*. Ocasionalmente, aparecieron necrosis en los tejidos de reserva en plantas inoculadas con *Fs* y *Fof*, tres semanas después de la inoculación. En cambio, en todas las plantas inoculadas con *Foc* aparecieron lesiones necróticas en los tejidos de reserva diez días después de la inoculación, las cuales fueron aumentando con el tiempo (Tabla IV.3) . En las plantas testigo se observaron pequeñas necrosis en las raíces y en el disco basal al finalizar el experimento, pero el resultado de los aislamientos de estas lesiones resultó negativo. Todos los aislados fueron recuperados en los aislamientos realizados a partir de la raíz, del disco basal y de las lesiones en los tejidos de reserva, en las plantas de ajo inoculadas con los tres aislados.

Al final del experimento en sustrato, todas las plantas de ajo inoculadas presentaban hojas completamente necrosadas y otras con necrosis en los ápices, aunque *Foc* y *Fs* provocaron síntomas más severos que *Fof*. Las mayores diferencias de síntomas ($P=0.0001$) entre aislados se observaron en la parte radical, donde las plantas inoculadas con *Fof* apenas presentaban necrosis, mientras que las inoculadas con *Foc* y *Fs* mostraban grandes extensiones necrosadas en las raíces y en el disco basal. Además, las plantas inoculadas con *Foc* mostraron un pobre sistema radical y las inoculadas con *Fs* tuvieron un tamaño más reducido que las plantas control. Esto se reflejó en el peso de las plantas, que fue significativamente menor en las plantas inoculadas con ambos aislados (*Fs* y *Foc*) que en las plantas control. (Tabla IV.3). No obstante, no se observaron diferencias significativas en la altura entre las plantas inoculadas y las de control. Todos los aislados fueron recuperados en los aislamientos realizados a partir de la raíz, el disco basal y de las lesiones en los tejidos de reserva, en las plantas de ajo inoculadas con los tres aislados.

Tabla IV.3. Patogenicidad *in vitro* y en sustrato de aislados de *F. oxysporum* y *F. solani* en plántulas de ajo ‘Morado de Castilla-La Mancha’.

<i>Fusarium</i> spp. ^a	<i>In vitro</i>	En sustrato		
	Severidad ^{bc} (<i>P</i> =0.0011)	Severidad ^{bc} (<i>P</i> =0.0001)	Longitud (cm) ^c (NS) ^d	Peso (g) ^c (<i>P</i> =0.015)
<i>Foc</i>	4.6 ± 0.2 a	3.9 ± 0.2 a	32.2 ± 2.7	8.9 ± 1.4 c
<i>Fof</i>	3.6 ± 0.3 bc	2.8 ± 0.3 b	36.1 ± 2.4	12.4 ± 1.0 ab
<i>Fs</i>	4.1 ± 0.1 ab	4.1 ± 0.1 a	27.3 ± 1.8	10.0 ± 1.1 bc
Control	2.8 ± 0.4 c	2.2 ± 0.3 b	31.0 ± 2.7	13.6 ± 0.5 a

^a *Foc* (*Fusarium oxysporum* f. sp. *cepae*); *Fof* (*Fusarium oxysporum* f. sp. *fragariae*) y *Fs* (*Fusarium solani*).

^b Escala de severidad 1- 5, dónde 1 = planta sin síntomas y 5 = planta con necrosis apical de las raíces, necrosis del disco basal y/o podredumbre acuosa, necrosis extensas en raíces, más de un 50% del sistema aéreo necrosado, lesión o necrosis en los tejidos de reserva y/o muy pobre sistema radical.

^c Cada valor de la tabla es la media con el error estándar de 16 u ocho repeticiones (experimentos *in vitro* y en sustrato, respectivamente). Cifras seguidas por distintas letras difieren entre sí según el test LSD (*P* ≤ 0,05).

^d NS: no hubo diferencias significativas entre las medias.



Figura IV.4. Plantas de ajo 'Morado de Castilla-La Mancha' tras finalizar el experimento *in vitro* (A y B) y en sustrato (C, D y E). A) Plantas testigo sanas. B) Plantas inoculadas con *Foc* mostrando síntomas de escaso desarrollo, raíces necrosadas, necrosis del disco basal y en los tejidos de reserva. C) Comparación entre el sistema aéreo de una planta testigo sana (izquierda) y dos plantas inoculadas con *Foc* (derecha) con hojas completamente necrosadas. D) Sistema radical sano de una planta testigo (izquierda) comparado con el de dos plantas inoculadas con *Foc*, las cuales presentan un pobre sistema radical con grandes extensiones necrosadas y discos basales también necrosados. E) Detalle de necrosis en los tejidos de reserva de una planta inoculada con *Foc*.

Espárrago

La sucesión de síntomas en las plantas de espárrago inoculadas *in vitro* comenzó una semana después de la inoculación, con necrosis apical y achaparramiento en algunas raíces. Dos semanas después, las plantas inoculadas con *Foa*, *Fof* y *Fs* también mostraron necrosis extensas en las raíces y en el rizoma. Las plantas inoculadas con *Foa* fueron las únicas que presentaron síntomas aéreos, consistentes en necrosis de tallos en la segunda y tercera semana después de la inoculación. Los testigos no mostraron

ningún tipo de síntoma durante el tiempo que duró el ensayo (Tabla). Los resultados de los aislamientos de las plantas inoculadas resultaron positivos para *Fs* y *Fof* en raíz y rizoma, pero no en tallo; *Foa* se recuperó de todos los tejidos analizados.

Tabla IV.4. Patogenicidad *in vitro* de aislados de *F. oxysporum* y *F. solani* en plántulas de espárrago ‘Ciprés’.

<i>Fusarium</i> spp. ^a	Severidad ^{bc} (<i>P</i> =0.0001)	Longitud tallo (cm) ^c (NS) ^d	Longitud raíz (cm) ^c (NS)
<i>Foa</i>	3.9 ± 0.2 a	12.0 ± 0.5	4.1 ± 0.6
<i>Fof</i>	3.4 ± 0.3 a	13.1 ± 0.4	5.0 ± 0.7
<i>Fs</i>	3.9 ± 0.1 a	13.1 ± 0.5	6.2 ± 0.2
Control	1.4 ± 0.1 b	13.3 ± 0.9	5.2 ± 0.6

^a *Foa* (*Fusarium oxysporum* f. sp. *asparagi*); *Fof* (*Fusarium oxysporum* f. sp. *fragariae*) y *Fs* (*Fusarium solani*)

^b Escala de severidad 1- 5, dónde 1= planta sin síntomas y 5= planta con necrosis extensa en la raíz, en los puntos de inserción de las raíces secundarias con la raíz principal, en el rizoma, en el tallo y con raíces abortadas. Cifras seguidas por distintas letras difieren entre sí según el test LSD (*P* ≤ 0,05).

^c Cada valor de la tabla es la media con el error estándar de 16 repeticiones.

^d NS= no hubo diferencias significativas entre las medias

Al final del experimento en sustrato, todas las plantas de espárrago inoculadas con *Foa* y *Fs*, y el 50% de las inoculadas con *Fof* mostraron síntomas de clorosis y necrosis de tallos y cladodios. En el sistema radical, sólo se observaron síntomas de necrosis en las plantas inoculadas con *Foa* y *Fs*; el resto de plantas presentó sistemas radicales totalmente sanos. No hubo diferencias significativas respecto al testigo en la longitud de la raíz y del tallo, ni en el peso de las plantas, aunque se observó que las plantas inoculadas con *Fs* permanecieron más pequeñas y pesaron menos que el resto (Tabla IV.5). Los tres aislados se recuperaron de raíz, rizoma y tallo de las plantas inoculadas.

Tabla IV.5. Patogenicidad de aislados de *F. oxysporum* y *F. solani* en plantas de espárrago ‘Ciprés’ cultivadas en sustrato.

<i>Fusarium</i> spp.	Severidad ^{bc} (<i>P</i> =0.0001)	Longitud raíz (cm) ^c (NS) ^d	Longitud tallo (cm) ^c (NS)	Peso (g) ^c (NS)
<i>Foa</i>	4.6 ± 0.3 a	32.3 ± 2.3	58.1 ± 4.5	11.9 ± 1.5
<i>Fof</i>	2.5 ± 0.3 b	29.0 ± 2.3	63.4 ± 4.5	10.9 ± 1.5
<i>Fs</i>	4.5 ± 0.2 a	30.9 ± 2.3	49.9 ± 4.5	9.1 ± 1.5
Control	1.2 ± 0.1 b	26.6 ± 2.4	54.4 ± 4.8	10.4 ± 1.6

^a *Foa* (*Fusarium oxysporum* f. sp. *asparagi*); *Fof* (*Fusarium oxysporum* f. sp. *fragariae*) y *Fs* (*Fusarium solani*).

^b Escala de severidad 1- 5, dónde 1= planta sin síntomas y 5= planta con necrosis extensa en la raíz, en los puntos de inserción de las raíces secundarias con la raíz principal, en el rizoma, necrosis y o clorosis de tallos, y/o seca de cladodios.

^c Cada valor de la tabla es la media con el error estándar de ocho repeticiones. Cifras seguidas por distintas letras difieren entre sí según el test LSD (*P* ≤ 0,05).

^d NS= no hubo diferencias significativas entre las medias.

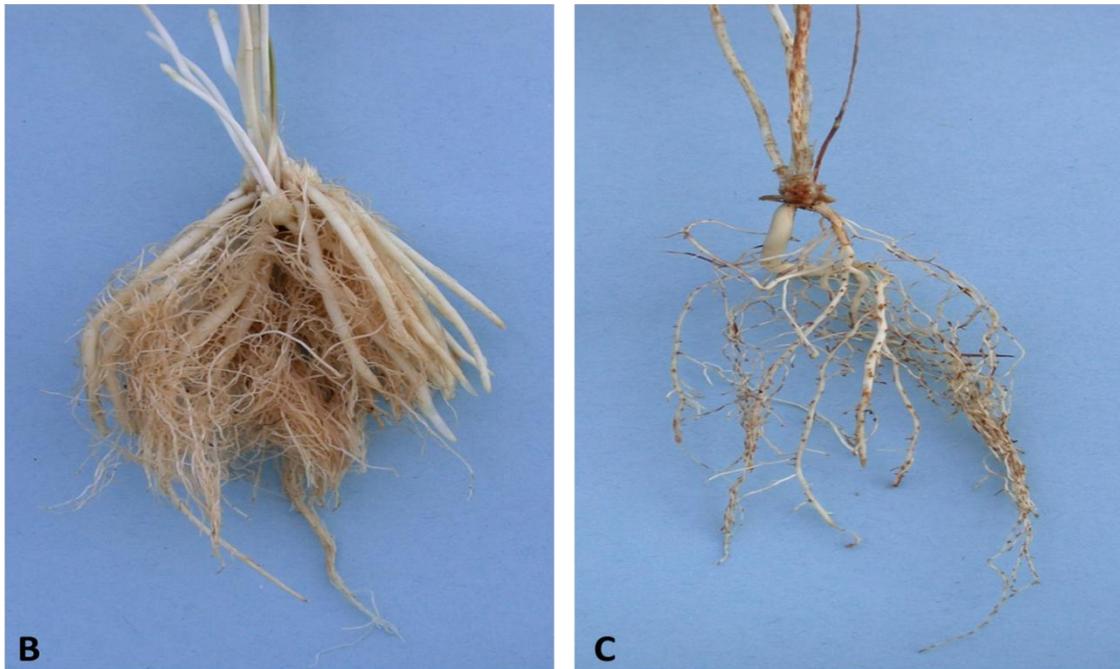
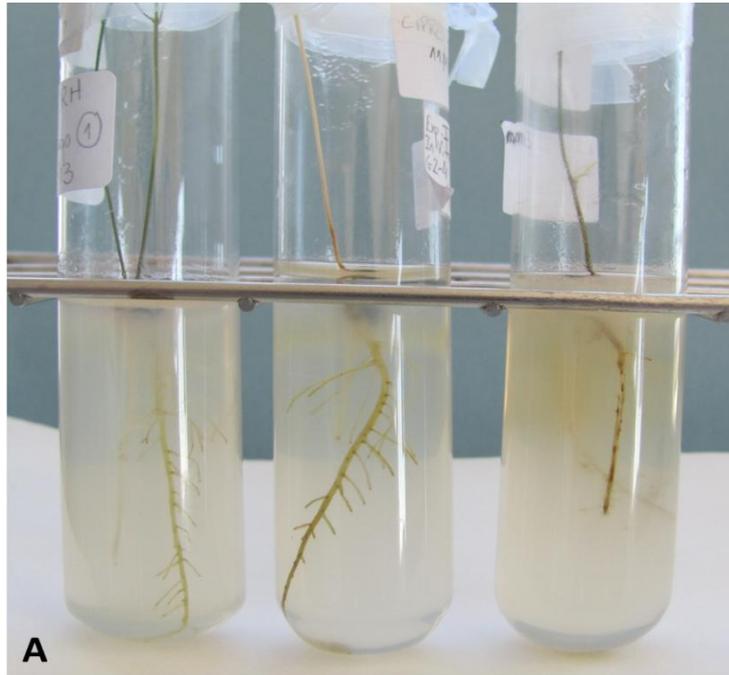


Figura IV.5. Plantas de espárrago 'Ciprés' tras finalizar el experimento *in vitro* (A) y en sustrato (B y C). A) Planta testigo sin síntomas (izquierda) y plantas inoculadas con *Foa* (centro) y *Fof* (derecha) con síntomas de necrosis y achaparramiento de raíces y necrosis en la base del tallo. B) Sistema radical sano de planta testigo. C) Planta inoculada con *Foa* con sistema radical escasamente desarrollado y con lesiones necróticas.

Tomate

Los síntomas de las plantas *in vitro* inoculadas con *Fof* y *Fs* fueron muy similares durante todo el experimento y consistieron en necrosis extensa en las raíces y en la base del tallo, además de lesiones necróticas y/o defoliación de algunas hojas. Todas las plantas inoculadas con el aislado patógeno de tomate *Forl* desarrollaron además necrosis más extensas, un sistema radical significativamente más corto ($P=0.0227$) y murieron a las dos semanas después de la inoculación. Las plantas testigo presentaron necrosis apical en algunas raíces desde la primera lectura de síntomas (Tabla IV.6). Todos los aislados fueron recuperados en los aislamientos realizados a partir de la raíz, el cuello y el tallo de las plantas de tomate inoculadas, mientras que los aislamientos de las plantas testigo resultaron negativos.

Tabla IV.6. Patogenicidad *in vitro* de aislados de *F. oxysporum* y *F. solani* en plántulas de tomate ‘Marmande Cuarenteno’.

<i>Fusarium</i> spp. ^a	Severidad ^{bc} ($P=0.0001$)	Longitud tallo (cm) ^c (NS) ^d	Longitud raíz (cm) ^c ($P=0.0227$)
<i>Forl</i>	5.0 ± 0.0 a	4.1 ± 0.7	2.8 ± 0.4 b
<i>Fof</i>	2.9 ± 0.1 b	6.0 ± 0.1	3.8 ± 0.3 ab
<i>Fs</i>	3.0 ± 0.1 b	5.5 ± 0.3	3.8 ± 0.3 ab
Control	2.3 ± 0.2 b	5.6 ± 0.4	4.4 ± 0.5 a

^a *Forl* (*Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*); *Fof* (*Fusarium oxysporum* f. sp. *fragariae*) y *Fs* (*Fusarium solani*).

^b Escala de severidad con valores del 1 al 5, dónde 1 corresponde a una planta de tomate sin síntomas y 5 a una planta muerta.

^c Cada valor de la tabla es la media con el error estándar de 16 repeticiones. Cifras seguidas por distintas letras difieren entre sí según el test LSD ($P \leq 0,05$).

^d NS= no hubo diferencias significativas entre las medias.

Al finalizar el experimento en sustrato, la parte aérea de todas las plantas, incluyendo las testigo, mostró algunas hojas cloróticas y/o necrosadas, siendo este síntoma más acusado en las plantas inoculadas con *Forl*. En dichas plantas también se observaron necrosis extensas en las raíces, mientras que el resto mostró un sistema radical sano. Además, *Forl* y *Fs* fueron capaces de provocar muerte en una de las ocho plantas testadas. La longitud del tallo de las plantas inoculadas con *Forl* y *Fs* fue

significativamente ($P=0.0001$) menor que la de las plantas control. Además, *Fs* ocasionó una disminución de peso del 28% ($P=0.0003$) respecto al de las plantas control (Tabla IV.7). Todos los aislados fueron recuperados en los aislamientos realizados a partir de la raíz, el cuello y el tallo de las plantas de tomate inoculadas.

Tabla IV.7. Patogenicidad de aislados de *F. oxysporum* y *F. solani* patógenos de fresa en plantas de tomate ‘Marmande Cuarenteno’ cultivadas en sustrato.

<i>Fusarium</i> spp. ^a	Severidad ^{bc} ($P=0.0001$)	Longitud tallo (cm) ^c ($P=0.0001$)	Longitud raíz (cm) ^c (NS) ^d	Peso (g) ^c ($P=0.0003$)
<i>Forl</i>	3.9 ± 0.2 a	38.6 ± 1.4 b	20.5 ± 1.7	23.9 ± 0.7 a
<i>Fof</i>	1.4 ± 0.2 b	47.8 ± 1.6 a	23.6 ± 2.0	24.4 ± 1.3 a
<i>Fs</i>	1.6 ± 0.2 b	37.0 ± 1.9 b	21.6 ± 0.8	18.0 ± 0.8 b
Control	2.0 ± 0.3 b	43.7 ± 0.9 a	24.9 ± 1.4	25.0 ± 1.5 a

^a *Forl* (*Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*); *Fof* (*Fusarium oxysporum* f. sp. *fragariae*) y *Fs* (*Fusarium solani*).

^b Escala de severidad 1- 5, donde 1 = planta sin síntomas y 5 = planta muerta.

^c Cada valor de la tabla es la media con el error estándar de ocho repeticiones. Cifras seguidas por distintas letras difieren entre sí según el test LSD ($P \leq 0,05$).

^d NS= no hubo diferencias significativas entre las medias.

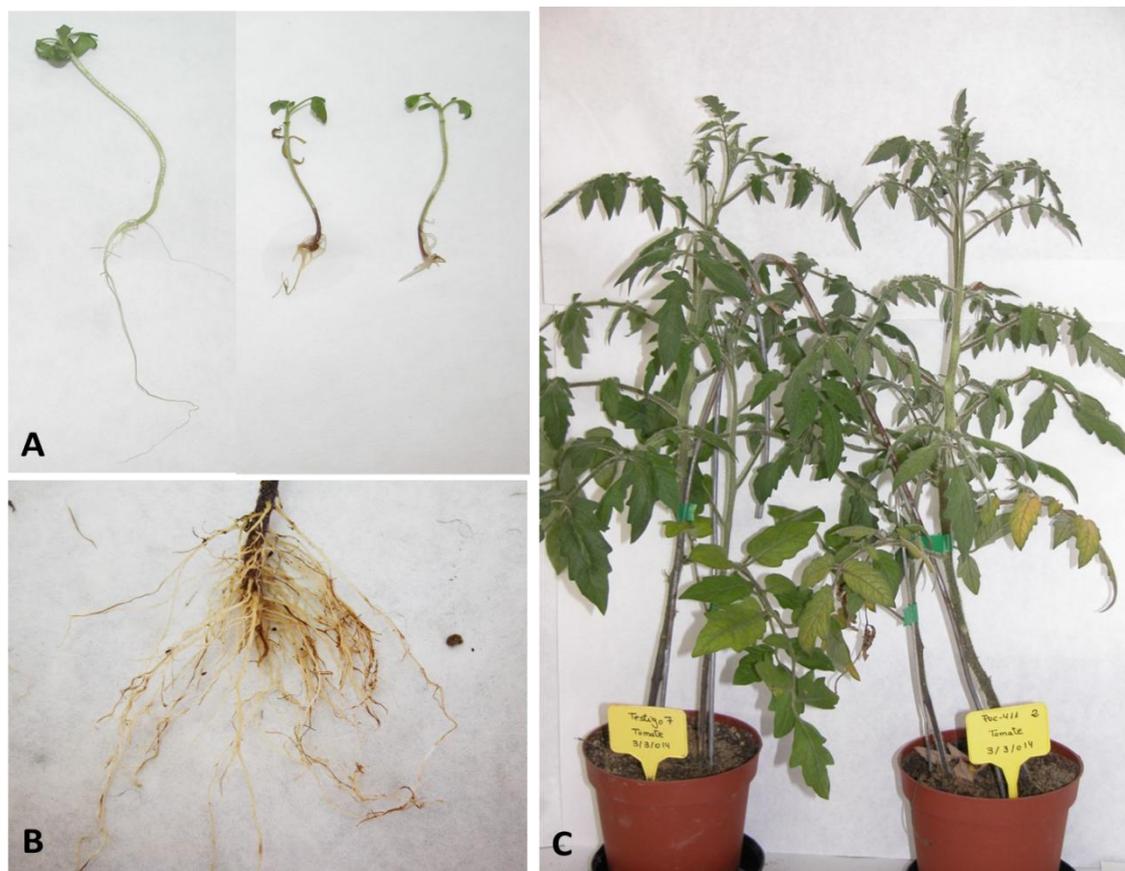


Figura IV.6. Plantas de tomate 'Marmande Cuarenteno' tras finalizar el experimento *in vitro* (A) y en sustrato (B y C). A) Planta testigo sin síntomas (izquierda) y a la derecha plantas inoculadas con *Forl* mostrando síntomas de acortamiento y necrosis de raíces, necrosis en la base del tallo, lesiones necróticas en algunas hojas y enanismo; B) Necrosis en raíces y base del tallo de planta de tomate inoculada con *Forl*. C) Planta testigo sana (izquierda) y planta inoculada con *Forl* (derecha) con síntomas de clorosis y necrosis en las hojas.

DISCUSIÓN

En este trabajo se ha querido estudiar si aislados patógenos de fresa, pertenecientes a los complejos de especies de *F. oxysporum* y *F. solani*, son capaces de ocasionar enfermedad en otros cultivos o, por el contrario, son específicos de fresa. En general, los estudios realizados para comprobar el rango de huésped de un patógeno se diseñan con el objetivo de encontrar posibles cultivos rotacionales que minimicen un desarrollo epidémico del patógeno (Molinero-Ruíz y col., 2011; Leoni y col., 2013; Weeb y col., 2013). Aunque el cultivo de fruto de fresa en nuestro país se desarrolla como monocultivo era importante llevar a cabo este tipo de estudio epidemiológico, al

tratarse de hongos patógenos con una elevada capacidad de supervivencia en el suelo. Por ello, para realizar este estudio, se eligieron cultivos económicamente importantes para Andalucía (ajo, espárrago y tomate) en los que *F. oxysporum* y *F. solani* son capaces de causar enfermedad (Romberg y Davis, 2007; Lievens y col., 2008; Molinero-Ruiz y col., 2011; Leoni y col., 2013; Borrego-Benjumea y col., 2013).

F. oxysporum f. sp. *fragariae* ha sido descrito como patógeno en los principales países productores de fresa (Fang y col., 2013). En todas estas descripciones, se asignó a *F. oxysporum* el adjetivo de *forma specialis* tras confirmar su patogenicidad en plantas de fresa, pero en ninguna de ellas se estudió el posible rango de huésped de sus aislados. En este trabajo se ha demostrado que *F. oxysporum* patógeno de fresa (*Fof*) es capaz de infectar a plantas de ajo, espárrago y tomate, aunque la severidad de los síntomas causados en estos cultivos es mucho menor que los causados por aislados de *F. oxysporum* patógenos de cada uno de ellos (*Foc*, *Foa* y *Forl*, respectivamente).

Del mismo modo, los aislados de *F. oxysporum* patógenos de ajo, espárrago y tomate fueron capaces de infectar plantas de fresa *in vitro*, aunque causaron síntomas menos severos que los ocasionados por *F. oxysporum* f. sp. *fragariae*. Sin embargo, en los experimentos en sustrato infectaron las plantas de fresa pero no ocasionaron síntomas. Esto corrobora los resultados obtenidos en trabajos previos, en los que ninguna de las tres *formae speciales* mostró un rango de patogenicidad limitado a un solo huésped (Menzies y col., 1990; Elmer, 2001; Leoni y col., 2013).

Las *formae speciales* de *F. solani* son mucho menos conocidas o frecuentes que las de *F. oxysporum*. Algunas de ellas, son capaces de ocasionar enfermedad en un solo huésped, como por ejemplo *F. solani* f.sp. *phalaenopsis*, el cual es patógeno solamente para orquídeas (Chung y col., 2011). En cambio, otras *formae speciales* como por ejemplo *F. solani* f.sp. *eumartii*, poseen un amplio rango de huésped (Romberg y Davis, 2007). Los resultados obtenidos en este estudio confirman que el aislado de *F. solani* procedente de fresa causó pérdidas en el vigor de todas las plantas inoculadas de ajo, espárrago y tomate, disminuyendo su altura y peso, tanto en los ensayos *in vitro* como en los de sustrato, siendo el síntoma más acusado el enanismo; y además, fue capaz de provocar síntomas de enfermedad en ajo y espárrago. Estos síntomas fueron similares a los descritos para la fresa (Pastrana y col., 2014), por lo que se puede concluir que el aislado de *F. solani* procedente de fresa no es específico de este cultivo sino que, por el

contrario, puede producir enfermedad en otros cultivos hortícolas importantes para la agricultura andaluza como el ajo, el espárrago y el tomate, disminuyendo el vigor de las plantas y afectando por tanto a su producción. Por ello, es necesario establecer estrategias de control que impidan el incremento en el suelo de las poblaciones de éste patógeno emergente en el cultivo de la fresa.

En los ensayos *in vitro*, se ha puesto de manifiesto la capacidad de los aislados de *F. oxysporum* de infectar y provocar síntomas de enfermedad en todos los cultivos. Sin embargo, en los ensayos de inoculaciones cruzadas realizados en sustrato, condiciones más cercanas a las naturales, todos los aislados infectaron las raíces de los cuatro cultivos evaluados pero no desarrollaron síntomas de enfermedad (plantas de fresa inoculadas con *Foc*, *Foa* y *Forl*) o mostraron síntomas poco severos y no significativamente diferentes al testigo (plantas de ajo, espárrago y tomate inoculadas con *Fof*). La discrepancia entre los resultados obtenidos en los ensayos *in vitro* en relación con los observados en sustrato podría deberse a diferencias metodológicas tales como el método de inoculación, la naturaleza (conidias o clamidosporas) o concentración del inóculo de los patógenos, al distinto estado fenológico de las plántulas en el momento de la inoculación y/o a las condiciones de cultivo de las plantas tras la inoculación.

Las poblaciones de *F. oxysporum* y *F. solani* son capaces de persistir durante muchos años en restos de plantas infectadas y en el suelo en forma de estructuras de resistencia (clamidosporas) (Abawi y Lorbeer, 1972; Brayford, 1996). Por lo tanto, estos resultados tienen consecuencias epidemiológicas importantes, ya que un suelo donde se haya cultivado previamente ajo, espárrago o tomate, no sería adecuado para cultivar fresa, a menos que se controlen las poblaciones de *F. oxysporum* y *F. solani* presentes en el mismo. De lo contrario, se podrían alcanzar niveles de inóculo capaces de infectar y provocar síntomas de enfermedad en estos cultivos.

Por todo expuesto anteriormente, consideramos que es importante continuar con este tipo de estudio de rango de huéspedes incluyendo cultivos como la frambuesa y el arándano, que en los últimos años están sustituyendo al de la fresa en las principales zonas productoras de la provincia de Huelva. Sería interesante conocer si existen especies de *Fusarium* patógenas para estos cultivos, capaces de infectar a fresa y,

paralelamente, determinar si los patógenos de fresa como *Fusarium oxysporum f. sp. fragariae* y *F. solani* afectan a frambuesa y arándano.

CONCLUSIONES

1. Los hongos de suelo *Fusarium oxysporum*, *Macrophomina phaseolina* y *Phytophthora cactorum* están presentes en suelo y material vegetal en los distintos estadios del cultivo de las fresa, en viveros de producción de plantas de fresa (viveros de altura) y en campos de producción de fruto de la provincia de Huelva. Por un lado, las medidas culturales encaminadas a la desinfección del suelo no son lo suficientemente eficaces para la eliminación de las poblaciones de estos hongos en el suelo. Por otro lado, el uso de plantas certificadas de vivero no implica la ausencia de estos patógenos en las mismas.
2. El uso de herramienta moleculares basadas en PCR en tiempo real han permitido la detección y cuantificación de *F. oxysporum*, *M. phaseolina* y *P. cactorum* en muestras de suelo, y su detección en material vegetal a partir de extractos crudos de plantas sin necesidad de extracción de ADN.
3. Se han aislado y caracterizado molecularmente nueve especies de *Fusarium* en el cultivo de la fresa en España. Entre la población de *F. oxysporum* sólo se detectó un aislado capaz de causar enfermedad en este cultivo. La amplificación por PCR del factor de transcripción *ffl1* o del fragmento *fofra* no resultaron métodos moleculares efectivos para la diferenciación de aislados de *F. oxysporum* patógenos de no patógenos de fresa. Sin embargo, se ha descrito a *F. solani* como nuevo patógeno del cultivo de la fresa. La variabilidad genética de la población de este hongo es alta y presenta la mayor distancia genética con el resto de las especies de *Fusarium* caracterizadas en el cultivo de la fresa.
4. Las poblaciones de *M. phaseolina* y *P. cactorum* caracterizadas en el cultivo de la fresa en este estudio son genéticamente homogéneas con muy baja o nula variabilidad genética en las regiones *EF-1 α* e *ITS1*, respectivamente.
5. Se ha desarrollado un protocolo de hibridación molecular no radiactiva mediante el uso de una polisonda para la detección simultánea de tres hongos patógenos de fresa (*F. oxysporum* f. sp. *fragariae*, *M. phaseolina* y *Verticillium dahliae*).
6. *F. oxysporum* f. sp. *fragariae* patógeno de fresa es capaz de infectar, aunque con escasa severidad, a plantas de ajo, espárrago y tomate. Del mismo modo, los aislados de *F. oxysporum* patógenos de ajo, espárrago y tomate son capaces de infectar plantas de fresa causando síntomas poco severos (en plantas *in vitro*) o no causando síntomas (en plantas en sustrato).

7. *F. solani* no es específico del cultivo de la fresa y puede ocasionar enfermedad en ajo, espárrago y tomate, disminuyendo el vigor de las plantas y afectando por tanto a su producción.
8. La aplicación del formulado comercial Prodigy® basado en el aislado T18 de *Trichoderma asperellum* mediante inmersión de las plantas en una suspensión del mismo antes de su plantación, constituye una alternativa eficaz para el control biológico de las enfermedades provocadas por *M. phaseolina* y *F. solani* en el cultivo de la fresa.

BIBLIOGRAFÍA

- Abawi, G. S., & Lorbeer, J. W. (1972). Several aspects of ecology and pathology of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cepae*. *Phytopathology*, 62(8), 870-876.
- Abdel-Monaim, M. F. (2013). Improvement of Biocontrol of Damping-off and Root Rot/Wilt of Faba Bean by Salicylic Acid and Hydrogen Peroxide. *Mycobiology*, 41(1), 47-55. doi: 10.5941/MYCO.2013.41.1.47
- Ahamad, S., Srivastava, M., (2000). Biological control of dry root rot of chickpea with plant products and antagonistic microorganisms. *Annals of Agricultural Research*. 21, 450-451.
- Agrios, G.N. (2005) *Plant Pathology*. St. Louis, MO: Academic Press.
- Aoki, T., O'Donnell, K., & Geiser, D. M. (2014). Systematics of key phytopathogenic *Fusarium* species: current status and future challenges. *Journal of General Plant Pathology*, 80(3), 189-201. doi: 10.1007/s10327-014-0509-3
- Aparicio, F., Soler, S., Aramburu, J., Galipienso, L., Nuez, F., Pallás, V. and López, C. 2009. Simultaneous detection of six RNA plant viruses affecting tomato crops using a single digoxigenin-labelled polyprobe. *Eur. J. Plant Pathol.* 123:117-123.
- Armengol, J., José, C. M., Moya, M. J., Sales, R., García-Jiménez, J. (2000). *Fusarium solani* f. sp. *cucurbitae* race 1, a potential pathogen of grafted watermelon production in Spain. *Bulletin OEPP/EPPO* 30, 179-183.
- Armstrong, G. M., & Armstrong, J. K. (1976). Common hosts for *Fusarium oxysporum* *formae speciales spinaciae* and *betae*. *Phytopathology*, 66(5), 542-545.
- Armstrong, G. M., and Armstrong, J. K. (1981). *Formae speciales* and races of *Fusarium oxysporum* causing wilt diseases. En: Nelson, P. E., Toussoun, T. A. y Cook, R. J. (The Pennsylvania State University Press). *Fusarium: Diseases, Biology, and Taxonomy*, 391-399. Pennsylvania.
- Arroyo, F. T., Llergo, Y., Aguado, A., & Romero, F. (2009). First Report of Fusarium Wilt Caused by *Fusarium oxysporum* on Strawberry in Spain. *Plant Disease*, 93(3), 323-U345. doi: 10.1094/pdis-93-3-0323b
- Avilés, M., Castillo, S., Bascon, J., Zea-Bonilla, T., Martín-Sánchez, P.M., Pérez-Jiménez, R.M., (2008). First report of *Macrophomina phaseolina* causing crown and root rot of strawberry in Spain. *Plant Disease*. 57, 382.
- Baayen, R. P., O'Donnell, K., Bonants, P. J. M., Cigelnik, E., Kroon, L., Roebroeck, E. J. A., & Waalwijk, C. (2000). Gene genealogies and AFLP analyses in the *Fusarium oxysporum* complex identify monophyletic and nonmonophyletic

formae speciales causing wilt and rot disease. *Phytopathology*, 90(8), 891-900. doi: 10.1094/phyto.2000.90.8.891

- Baino, O., Conci, V.C., Ramallo, J.C. (2010). Enfermedades de *Fragaria x ananassa* Duch. *Atlas Fitopatológico Argentino* 3, 739
- Baino, O. M., Salazar, S. M., Ramallo, A. C., Kirschbaum, D. S. (2011). First report of *Macrophomina phaseolina* causing strawberry crown and root rot in north-western Argentina. *Plant Disease* 95 (11), 1477.
- Bascón, J. (2009). Aumento de la incidencia de la podredumbre carbonosa causada por *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goidanich en el cultivo del fresón en la provincia de Huelva. *Agrícola Vergel* 324, 37-40.
- Benlioğlu, S., Yıldız, A., Döken, T. (2004). Studies to determine the causal agents of soil-borne fungal diseases of strawberries in Aydin and to control them by soil disinfection. *Journal of Phytopathology* 152, 509-513
- Bogale, M., Steenkamp, E. T., Wingfield, M. J., y Wingfield, B. D. (2009). Diverse *Fusarium solani* isolates colonise agricultural environments in Ethiopia. *European Journal of Plant Pathology*, 124(3), 369-378. doi: 10.1007/s10658-008-9422-y
- Booth, C. 1971. The Genus *Fusarium*. Commonwealth Mycological Institute, Kew, Surrey, England.
- Bowers, G.R.; Russin, J.S. (1999) Soybean disease management. En: Heatherly, L.G. y Hodges, H.F. (CRC Press). Soybean Production in the Midsouth, 231-271, Washington DC.
- Brayford, D. (1996). *Fusarium oxysporum* f. sp. *cepae*. *Mycopathologia*, 133(1), 39-40.
- Calatrava, J. (2002). South-western Spain strawberry growers awareness of the Methyl Bromide phase-out and their willingness to pay for alternatives. *Proc. International Conference on Alternatives to Methyl Bromide. The Remaining Challenges*. Seville 5-8 March: 302-306.
- Candresse, T. Macquaire, G., Brault, V., Monsion, M., and Dunez, J. 1990. 32P and biotin-labelled in vitro transcribed cRNA probes for the detection of *potato spindle tuber viroid* and *chrysanthemum stunt viroid*. *Res. Virol.* 141:97-107.
- Cao, Y., Zhang, Z., Ling, N., Yuan, Y., Zheng, X., Shen, B., & Shen, Q. (2011). *Bacillus subtilis* SQR 9 can control *Fusarium* wilt in cucumber by colonizing plant roots. *Biology and Fertility of Soils*, 47(5), 495-506. doi: 10.1007/s00374-011-0556-2
- Ceja-Torres, L. F., Mora-Aguilera, G., Teliz, D., Mora-Aguilera, A., Sanchez-Garcia, P., Munoz-Ruiz, C., Tlapal-Bolanos, B., De la Torre-Almaraz, R. (2008). Fungi

- prevalence and etiology of strawberry dry wilt under different crop management systems. *Agrociencia*, 42(4), 451-461.
- Cho, C.T., Moon, B.J. (1984). Studies on the wilt of strawberry caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *fragariae* in Korea. *Korean Journal of Plant Protection*, 23, 74-81
- Chung, W. C., Chen, L. W., Huang, J. H., Huang, H. C., & Chung, W. C. (2011). A new 'forma specialis' of *Fusarium solani* causing leaf yellowing of *Phalaenopsis*. *Plant Pathology*, 60, 244-252. doi: 10.1111/j.1365-3059.2010.02376.x
- Cohen, O., Batuman, O., Stanbekova, G., Sano, T., Mawassi, M., & Bar-Joseph, M. (2006). Construction of a multiprobe for the simultaneous detection of viroids infecting citrus trees. *Virus Genes*, 33, 287–292.
- Coleman, J. J., Rounsley, S. D., Rodriguez-Carres, M., Kuo, A., Wasmann, C. C., Grimwood, J., . . . Vanetten, H. D. (2009). The genome of *Nectria haematococca*: contribution of supernumerary chromosomes to gene expansion. [Research Support, U.S. Gov't, Non-P.H.S.]. *PLoS Genet*, 5(8), e1000618. doi: 10.1371/journal.pgen.1000618
- Colla P., Gilardi G., Gullino M. L. (2012). A review and critical analysis of the European situation of soilborne disease management in the vegetable sector. *Phytoparasitica* 40, 515–523
- Corpas-Hervias, C.; Melero-Vara, J.M.; Molinero-Ruíz, M.L.; Zurera-Muñoz, C.; Basallote-Ureba, M.J. (2006). Characterization of isolates of *Fusarium* spp. obtained from *asparagus* in Spain. *Plant Dis.* 90 (11) 1441-1451
- Christakopoulos, P., Nerinckx, W., Kekos, D. Macris, B., Claeysens, M. (1996). Purification and characterization of two low molecular mass alkaline xylanases from *Fusarium oxysporum* F3. *Journal of Biotechnology*, 51, 181-189
- De Cal et al. 2005. Effect of chemical fumigation on soil fungal communities in Spanish strawberry nurseries. *Applied Soil Ecology* 28, 47-56.
- Delserone, L. M., K. McCluskey, D. E. Matthews, and H. D. VanEtten. 1999. Pisatin demethylation by fungal pathogens and nonpathogens of pea: Association with pisatin tolerance and virulence. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 55: 317-326.
- Dhingra, O. D., Sinclair, J. B. (1975). Survival of *Macrophomina phaseolina* sclerotia in soil: Effects of soil moisture, carbon:nitrogen ratios, carbon sources, and nitrogen concentrations. *Phytopathology* 65, 236-240
- Domínguez Morales, P. (2012). Evaluación agronómica de selecciones avanzadas del Programa Nacional de Mejora Genética de Fresa (*Fragaria x ananassa* Duch.),

en diferentes sistemas de cultivo y valoración de parámetros de calidad del fruto. (Tesis doctoral). Universidad de Córdoba, Córdoba.

- Fang, X. L., Phillips, D., Li, H., Sivasithamparam, K., Barbetti, M. J. (2011a). Severity of crown and root diseases of strawberry and associated fungal and oomycete pathogens in Western Australia. *Australasian Plant Pathology* 40 (2), 109-119
- Fang, X., Phillips, D., Li, H., Sivasithamparam, K., & Barbetti, M. J. (2011b). Comparisons of virulence of pathogens associated with crown and root diseases of strawberry in Western Australia with special reference to the effect of temperature. *Scientia Horticulturae*, 131, 39-48. doi: 10.1016/j.scienta.2011.09.025
- Fang, X., You, M. P., & Barbetti, M. J. (2012). Reduced severity and impact of *Fusarium* wilt on strawberry by manipulation of soil pH, soil organic amendments and crop rotation. *European Journal of Plant Pathology*, 134(3), 619-629. doi: 10.1007/s10658-012-0042-1
- Fang, X. L., Phillips, D., Verheyen, G., Li, H., Sivasithamparam, K., Barbetti, M. J. (2012b). Yields and resistance of strawberry cultivars to crown and root diseases in the field and cultivar responses to pathogens under controlled environmental conditions. *Phytopathologia Mediterranea* 51(1), 69-84
- faostat.fao.org/
- Fravel, D., Olivain, C., Alabouvette, C. (2003) *Fusarium oxysporum* and its biocontrol. *New Phytologist*, 157, 493-502
- Funnell, D. L., and H. D. VanEtten. 2002. Pisatin demethylase genes are on dispensable chromosomes while genes for pathogenicity on carrot and ripe tomato are on other chromosomes in *Nectria haematococca*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 15: 840-846.
- García-Jiménez, J.; Armengol, J.; Moya, M.J.; Sales, R. (1997). First report of *Fusarium solani* f. sp. *cucurbitae* Race 1 in Spain. *Plant Disease*. 81, 1216
- García-Sinovas, D., Andrade-Benítez, M.A., Becerril-Polanco, M. (2012). Los viveros de altura de planta de fresa en Castilla y León. *Vida Rural*. Julio 2012
- García-Sinovas, D., Andrade-Benítez, M. A., De Cal, A., Redondo, C., Becerril, M., Martínez-Treceño, A., López-Aranda, J. M. (2012a). *Horticultura global* (302) 46
- Garger, S. J., Turpen, T., Carrington, J. C., Morris, T. J., Dodds, J. A., Jordan, R. L., and Grill, L. K. 1983. Rapid detection of plant RNA viruses by dot blot hybridization. *Plant Mol. Biol. Rep.* 1:21-25.
- Garibaldi, A., G. Gilardi, and M. L. Gullino. 2004. Seed transmission of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae*. *Phytoparasitica*, 32, 61-65.

- Gerlach, W. (1981). The present concept of *Fusarium* classification. In: Nelson PE, Toussoun TA, Cook RJ. (eds), *Fusarium: Disease, Biology and Taxonomy*. University Park, PA, USA, Pennsylvania State University Press, 1981, pp. 413–426.
- Golzar, H., Phillips, D., Mack, S. (2007). Occurrence of strawberry root and crown rot in western Australia. *Australasian Plant Disease Notes* 2 (1), 145-147
- Gómez, J.; Guerra-Sanz, J. M.; Sánchez-Guerrero, M. C.; Serrano, Y.; Melero-Vara, J. M. (2008). Crown Rot of Zucchini Squash Caused by *Fusarium solani* f. sp. *cucurbitae* in Almería Province. *Plant Disease*. 92 (7) 1137
- González, F.J., Walls, S., Mancilla, M. (2005). Detección mediante PCR-RFLP de *Fusarium oxysporum* f. sp. *fragariae* agente causal de fusariosis en frutilla. *Boletín Micológico* 20, 63-72
- Gordon, T. R., Okamoto, D., Jacobson, D. J. (1989). Colonization of muskmelon and nonsusceptible crops by *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* and other species of *Fusarium*. *Phytopathology*, 79, 1095-1100
- Gordon, T. R., Martyn, R. D. (1997). The evolutionary biology of *Fusarium oxysporum*. *Annual Review of Phytopathology*, 35, 111-128
- Harman, G. E. (2006). Overview of Mechanisms and Uses of *Trichoderma* spp. *Phytopathology*, 96(2), 190-194. doi: 10.1094/PHYTO-96-0190
- Herranz, M. C., Sánchez-Navarro, J. A., Aparicio, F., & Pallás, V. (2005). Simultaneous detection of six stone fruit viruses by non-isotopic molecular hybridization using a unique riboprobe or 'polyprobe'. *Journal of Virological Methods*, 124, 49–55.
- Heydari, A., & Pessarakli, M. (2010). Review on Biological control of fungal plant pathogens using microbial antagonists. *Journal of Biological Sciences* 10(4), 273-290.
- Hutton, D. G., Gomez, A. O., & Mattner, S. W. (2013). *Macrophomina phaseolina* and Its Association with Strawberry Crown Rot in Australia. *International Journal of Fruit Science*, 13(1-2), 149-155. doi: 10.1080/15538362.2012.698143
- Jana, T. K., Singh, N. K., Koundal, K. R., and Sharma, T. R. (2005). Genetic differentiation of charcoal rot pathogen, *Macrophomina phaseolina*, into specific groups using URP-PCR. *Canadian Journal of Microbiology* 51, 159-164.

- Jiménez-Gasco, M. M., Milgroom, M. G., Jiménez-Díaz, R. M. (2004). Stepwise evolution of races in *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* inferred from fingerprinting with repetitive DNA sequences. *Phytopathology* 94, 228–235.
- Kakvan, N., Heydari, A., Zamanizadeh, H. R., Rezaee, S., & Naraghi, L. (2013). Development of new bioformulations using *Trichoderma* and *Talaromyces* fungal antagonists for biological control of sugar beet damping-off disease. *Crop Protection*, 53, 80-84. doi: 10.1016/j.cropro.2013.06.009
- Katan, J. (1971). Symptomless carriers of the tomato *Fusarium* wilt pathogen. *Phytopathology*, 61, 1213-1217
- Kistler, H. C. (1997). Genetic diversity in the plant-pathogenic fungus *Fusarium oxysporum*. *Phytopathology*, 87(4), 474-479. doi: 10.1094/phyto.1997.87.4.474
- Kistler, H. C. (2001). Evolution of host specificity in *Fusarium oxysporum*,. En: B. A. Summerell, J. F. Leslie, D. Backhouse, W. L. Bryden, L. W. Burgess (eds.), *Fusarium: Paul E. Nelson Memorial Symposium*. (pp. 70-96). APS Press, St. Paul, Minnesota.
- Koike, S. T. (2011). Strawberry plant collapse. *Annual Strawberry Meeting*. cesantacruz.ucdavis.edu/files/73969.pdf
- Koike, S. T. (2008). Crown rot of strawberry caused by *Macrophomina phaseolina* in California. *Plant Disease*, 92(8), 1253-1253. doi: 10.1094/pdis-92-8-1253b
- Koike, S. T., Kirkpatrick, S. C., Gordon, T. R. (2009). *Fusarium* Wilt of Strawberry Caused by *Fusarium oxysporum* in California. *Plant Disease* 93 (10), 1077
- Lemanceau, P., Bakker, P. S. H. M., DeKogel, W. J., Alabouvette, C., Schippers, B. (1993). Antagonistic effect of nonpathogenic *Fusarium oxysporum* Fo47 and pseudobactin 358 upon pathogen *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi*. *Applied Environmental Microbiology*, 59, 74-82
- Leoni, C., Vries, M., Braak, C. J. F., Bruggen, A. H. C., & Rossing, W. A. H. (2013). *Fusarium oxysporum* f.sp. *cepae* dynamics: in-plant multiplication and crop sequence simulations. *European Journal of Plant Pathology*, 137, 545-561. doi:10.1007/s10658-013-0268-6
- Leslie, J. F., Summerell, B. A. (2006). The *Fusarium* laboratory manual, 1st edn. Backwell Publishing, Iowa, USA

- Li, M., Inada, M., Watanabe, H., Suga, H., & Kageyama, K. (2013). Simultaneous Detection and Quantification of *Phytophthora nicotianae* and *P. cactorum*, and Distribution Analyses in Strawberry Greenhouses by Duplex Real-time PCR. *Microbes and Environments*, 28(2), 195-203. doi: 10.1264/jsme2.ME12177
- Lievens, B., Rep, M., & Thomma, B. P. (2008). Recent developments in the molecular discrimination of formae speciales of *Fusarium oxysporum*. *Pest Manag Sci*, 64(8), 781-788. doi: 10.1002/ps.1564
- Lodha, S., Sharma, S. K., and Aggarwal, R. K. (1997). Solarization and natural heating of irrigated soil amended with cruciferous residues for improved control of *Macrophomina phaseolina*. *Plant Pathology* 46, 186-190
- López-Aranda, J.M. (2008). El cultivo de la fresa en Huelva. En Ed. Junta de Andalucía. Consejería de Agricultura y Pesca, La fresa de Huelva (103-172). Sevilla.
- López-Aranda, J.M., Soria, C., Miranda, L., Domínguez, P., Medina-Mínguez, J.J. (2009). The strawberry industry in Spain: an update. *3º Simposio Nacional sobre Pequeños Frutos (III. Ulusal Üzümsü Meyveler Sempozyumu)*. Universidad de Kahramanmaras (Turquía). Libro abstracts 8-9.
- Ma, L.J., van der Does, H.C., Borkovich, K.A., Coleman, J.J., Daboussi, M.J., Di Pietro, A., Dufresne, M., Freitag, M., Grabherr, M., Henrissat, B., Houterman, P.M., Kang, S., Shim, W.B., Woloshuk, C., Xie, X., Xu, J.R., Antoniw, J., Baker, S.E., Bluhm, B.H., Breakspear, A., Brown, D.W., Butchko, R.A., Chapman, S., Coulson, R., Coutinho, P.M., Danchin, E.G., Diener, A., Gale, L.R., Gardiner, D.M., Goff, S., Hammond-Kosack, K.E., Hilburn, K., Hua-Van, A., Jonkers, W., Kazan, K., Kodira, C.D., Koehrsen, M., Kumar, L., Lee, Y.H., Li, L., Manners, J.M., Miranda-Saavedra, D., Mukherjee, M., Park, G., Park, J., Park, S.Y., Proctor, R.H., Regev, A., Ruiz-Roldan, M.C., Sain, D., Sakthikumar, S., Sykes, S., Schwartz, D.C., Turgeon, B.G., Wapinski, I., Yoder, O., Young, S., Zeng, Q., Zhou, S., Galagan, J., Cuomo, C.A., Kistler, H.C. and Rep, M. (2010) Comparative genomics reveals mobile pathogenicity chromosomes in *Fusarium*. *Nature*, 464, 367–373.
- Maas, J.L. (1998). Compendium of strawberry diseases 2nd Edition. APS Press. St. Paul Minnesota, USA.
- Manjunatha, S. V., Naik, M. K., Khan, M. F. R., & Goswami, R. S. (2013). Evaluation of bio-control agents for management of dry root rot of chickpea caused by *Macrophomina phaseolina*. *Crop Protection*, 45, 147-150. doi: 10.1016/j.cropro.2012.09.003

- Manici, L. M., Caputo, F., & Baruzzi, G. (2005). Additional experiences to elucidate the microbial component of soil suppressiveness towards strawberry black root rot complex. *Annals of Applied Biology*, 146(4), 421-431. doi: 10.1111/j.1744-7348.2005.040051.x
- Matsuo, T. (1972). Taxonomic studies on phytopathogenic *Fusaria*. *Annals of the Phytopathological Society of Japan*, 38, 167-169
- Maule, A. J., Hull, R., and Donson, J. 1983. The application of spot hybridization to the detection of DNA and RNA viruses in plant tissues. *J. Virol. Methods* 6:215-224.
- Mayék-Pérez, N., López-Castañeda, C., González-Chavira, M., Garcia-Espinosa, R., Acosta-Gallegos, J., Martínez de la Vega, O., y Simpson, J. (2001). Variability of Mexican isolates of *Macrophomina phaseolina* based on pathogenesis and AFLP genotype. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 59, 257-264.
- Medina-Mínguez, J.J. (2008). Origen del cultivo: un pionero. En: Ed. Junta de Andalucía. Consejería de Agricultura y Pesca, La fresa de Huelva (15-48).Sevilla.
- Mena, A.J., Palacios de Garcia, M.E., Gonzalez, M.A. (1975). Strawberry root diseases caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *fragariae* and *Rhizoctonia fragariae*. *Revista Agronómica del Noroeste Argentino*, 12, 299-307
- Menzies, J. G., Koch, C., & Seywerd, F. (1990). Additions to the Host Range of *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*. *Plant Disease*, 74, 569-572.
- Mertely, J., Seijo, T., Peres, N. (2005) First report of *Macrophomina phaseolina* causing a crown rot of strawberry in Florida. *Plant Disease* 84, 434.
- Michielse, C. B., & Rep, M. (2009). Pathogen profile update: *Fusarium oxysporum*. [Review]. *Mol Plant Pathol*, 10(3), 311-324. doi: 10.1111/j.1364-3703.2009.00538.x
- Mihail, J. D. (1992). *Macrophomina*. En: Singleton, L. S., Mihail, J. D., y Rush, C. M. (Eds. American Phytopathological Society) *Methods for Research on Soilborne Phytopathogenic Fungi*. (134-136). St Paul, MN.
- Miranda, L., Domínguez, P., Soria, C., Talavera, M., Chamorro, M., Romero, F., De los Santos. B., Medina-Mínguez, J. J., López-Aranda, J. M. (2012). Nuevos resultados en la evaluación de desinfectantes de suelos para el cultivo de la fresa. *Agrícola Vergel* 353, 1-6

- Mitra, J., Mukherjee, P. K., Kale, S. P., Murthy, N. B. K. (2001). Bioremediation of DDT in soil by genetically improved strains of soil fungus *Fusarium solani*. *Biodegradation* 12, 235–245.
- Molinero-Ruiz, L., Rubio-Pérez, E., González-Domínguez, E., & Basallote-Ureba, M. J. (2011). Alternative Hosts for *Fusarium* spp. Causing Crown and Root Rot of *Asparagus* in Spain. *Journal of Phytopathology*, 159(2), 114-116. doi: 10.1111/j.1439-0434.2010.01723.x
- Nam, M. H. (2009). Biological Control of Strawberry Fusarium Wilt Caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *fragariae* Using *Bacillus velezensis* BS87 and RK1 Formulation. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 19(5), 520-524. doi: 10.4014/jmb.0805.333
- Nam, M.H., Kang, Y.J., Lee, I.H., Kim, H.G., Chun, Ch. (2011). Infection of daughter plants by *Fusarium oxysporum* f. sp. *fragariae* through runner propagation of strawberry. *Korean Journal of Horticultural Science and Technology*, 29 (3), 273-277
- Nath, V. S., Hegde, V. M., Jeeva, M. L., Misra, R. S., Veena, S. S., Raj, M., . . . Darveekaran, S. S. (2014). Rapid and sensitive detection of *Phytophthora colocasiae* responsible for the taro leaf blight using conventional and real-time PCR assay. *Fems Microbiology Letters*, 352(2), 174-183. doi: 10.1111/1574-6968.12395
- Ndiaye, M., Termorshuizen, A. J., y van Bruggen, A. H. C. (2007). Combined effects of solarization and organic amendment on charcoal rot caused by *Macrophomina phaseolina* in the Sahel. *Phytoparasitica* 35, 392-400.
- Nelson, P. E., Toussoun, T. A., Cook, R. J. (eds), *Fusarium: Disease, Biology, and Taxonomy*. (1981). Pennsylvania State University Press, University Park, PA
- Nelson, P. E., Toussoun, T. A., Marasas, W. F. O. (1983). *Fusarium* species: An illustrated manual for identification. Pennsylvania State University Press, University Park, USA
- Nelson, P. E., Burgess L. W., Summerell B. A. (1990). Some morphological and physiological characters of *Fusarium* species in sections *Liseola* and *Elegans* and similar new species. *Mycologia* 82: 99-106.

- Nelson, P. E., Dignani, M. C., Anaissie, E. J. (1994). Taxonomy, biology, and clinical aspects of *Fusarium* species. *Clinical Microbiology Reviews*, 7, 479-504
- Nirenberg HI. (1995). Morphological and phytopathological differentiation of *Fusarium* strains within the *Martiella* section. In: International Seminar on Fusarium Mycotoxins, Taxonomy and Pathogenicity, Martina Franca, Italy, 1995, pp. 147.
- O'Donnell, K., E. Cigelnik. (1997). Two divergent intragenomic rDNA ITS2 types within a monophyletic lineage are nonorthologous. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 7, 103-116
- O'Donnell, K., Kistler, H.C., Cigelnik, E. and Ploetz, R.C. (1998). Multiple evolutionary origins of the fungus causing Panama disease of banana: concordant evidence from nuclear and mitochondrial gene genealogies. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95, 2044–2049
- O'Donnell, K. (2000). Molecular phylogeny of the *Nectria haematococca-Fusarium solani* species complex. *Mycologia* 92, 919–938.
- Owens, R. A., and Diener, T. O. 1981. Sensitive and rapid diagnosis of *potato spindle tuber viroid* disease by nucleic acid hybridization. *Science* 213:670-672.
- Oyarzun, P. J., Postma, J., Luttikholt, A. J. G, Hoogland, A. E. (1994). Biological control of foot and root rot in pea caused by *Fusarium solani* with nonpathogenic *Fusarium oxysporum* isolates. *Canadian Journal of Botany*, 72, 843-852
- Pal, K. K., & McSpadden Gardener, B. (2006). Biological Control of Plant Pathogens. *The Plant Health Instructor*. doi: 10.1094/phi-a-2006-1117-02
- Pallás, V., Más, P., Sanchez-Navarro, J.A., 1998. Detection of plant RNA viruses by nonisotopic dot-blot hybridization. *Methods Mol. Biol.* 81, 461–468.
- Papavizas, G. C. (1977). Some factors affecting survival of sclerotia of *Macrophomina phaseolina* in soil. *Soil Biol. Biochem.* 9:337-341.
- Pastrana, A. M., Capote, N., De los Santos, B., Romero, F., & Basallote-Ureba, M. J. (2014). First Report of *Fusarium solani* Causing Crown and Root Rot on Strawberry Crops in Southwestern Spain. *Plant Disease*, 98(1), 161-161.
- Pratt, R. G. (2006). A direct observation technique for evaluating sclerotium germination by *Macrophomina phaseolina* and effects of biocontrol materials on survival of sclerotia in soil. *Mycopathologia* 162, 121-131

- Pelayo-Zaldívar, C., Ebeler, S.E., Kader, A.A. (2005). Cultivar and harvest date effects on flavor and other quality attributes of California strawberries. *Journal of Food Quality*. 28(1) 78-97.
- Rafin, C., Potin, O., Veignie, E., Sahraoui, A. L. H., Sancholle, M. (2000). Degradation of benzo[a]pyrene as sole carbon source by a non white rot fungus, *Fusarium solani*. *Polycyclic Aromatic Compounds* 21: 311–329.
- Recorbet, G., Steinberg, C., Olivain, C., Edel, V., Trouvelot, S., Dumas-Gaudot, E., Gianinazzi, S., Alabouvette, C. (2003). Wanted: pathogenesis-related marker molecules for *Fusarium oxysporum*. *New Phytologist*, 159(1), 73-92. doi: 10.1046/j.1469-8137.2003.00795.x
- Redondo, C.; Villarino, M.; Larenas, J.; Melgarejo, P.; De Cal; A. (2012). Enfermedades emergentes en los viveros de altura de fresa tras la retirada total del bromuro de metilo en 2009. *XVI Congreso Nacional de la SEF*. Málaga Septiembre 2012.
- Rodríguez, A., Perestelo, F., Carnicero, A., Regalado, V., Pérez, R., De la Fuente, G., Falcon, M. A. (1996). Degradation of natural lignins and lignocellulosic substrates by soil-inhabiting fungi imperfecti. *FEMS Microbiology and Ecology*, 21, 213-219
- Rojo, F. G., Reynoso, M. M., Ferez, M., Chulze, S. N., & Torres, A. M. (2007). Biological control by *Trichoderma* species of *Fusarium solani* causing peanut brown root rot under field conditions. *Crop Protection*, 26(4), 549-555. doi: 10.1016/j.cropro.2006.05.006
- Romberg, M. K., & Davis, R. M. (2007). Host Range and Phylogeny of *Fusarium solani* f. sp. *eumartii* from Potato and Tomato in California. *Plant Disease*, 91(5), 585-592. doi: 10.1094/pdis-91-5-0585
- Romero MC, Salvioli ML, Cazau MC, Arambarri AM (2002) Pyrene degradation by yeasts and filamentous fungi. *Environmental Pollution* 117:159–163.
- Saade, M., Aparicio, F., Sanchez-Navarro, J.A., Herranz, M.C., Myrta, A., Di-Terlizzi, B., Pallás, V., 2000. Simultaneous detection of the three ilarviruses affecting stone fruit trees by nonisotopic molecular hybridisation and multiplex reverse-transcription polymerase chain reaction. *Phytopathology* 90, 1330–1336.
- Saldarelli, P., Barbarossa, L., Grieco, F., Gallitelli, D., 1996. Digoxigeninlabelled riboprobes applied to phytosanitary certification of tomato in Italy. *Plant Dis.* 80, 1343–1346.

- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Manniatis, T., 1989. *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*, second ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sanchez, S., Gambardella, M., Henriquez, J. L., & Diaz, I. (2013). First Report of Crown Rot of Strawberry Caused by *Macrophomina phaseolina* in Chile. *Plant Disease*, 97(7), 996-996. doi: 10.1094/pdis-12-12-1121-pdn
- Sanchez-Navarro, J.A., Cañizares, M.C., Cano, E.A., Pall'as, V., 1999. Simultaneous detection of five carnation viruses by non-isotopic molecular hybridization. *J. Virol. Methods* 82, 167–175.
- Santoyo, G., Orozco-Mosqueda, M. d. C., & Govindappa, M. (2012). Mechanisms of biocontrol and plant growth-promoting activity in soil bacterial species of *Bacillus* and *Pseudomonas*: a review. *Biocontrol Science and Technology*, 22(8), 855-872. doi: 10.1080/09583157.2012.694413
- Saparrat MCN, Martinez MJ, Tournier HA, Cabello MN, Arambarri AM (2000) Production of ligninolytic enzymes by *Fusarium solani* strains isolated from different substrata. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 16:799–803.
- Sharifi, K., Mahdavi, M. (2011). First report of strawberry crown and root rot caused by *Macrophomina phaseolina* in Iran. *Iranian Journal of Plant Pathology*, 47 (4), 161.
- Shi, J., Mueller W. C., Beckman C. H.. (1992). Vessel occlusion and secretory activities of vessel contact cells in resistant or susceptible cotton plants infected with *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 40: 133-147.
- Srivastava, A.K., Singh, Tanuja, Jana, T.K., Arora, D.K., Singh, T., 2001. Induced resistance and control of charcoal rot in *Cicer arietinum* by *Pseudomonas fluorescens*. *Canadian Journal of Botany* 79, 787-795.
- Szczechura, W., Staniaszek, M., & Habdas, H. (2013). *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* – the cause of fusarium crown and root rot in tomato cultivation. *Journal of plant protection research*, 53(2), 172-176.
- Su, G., Suh, S. O., Schneider, R. W., y Russin, J. S. (2001). Host specialization in the charcoal rot fungus, *Macrophomina phaseolina*. *Phytopathology* 91, 120-126.
- Teetor-Barsch, G. H.; Roberts, D. W. (1983). Entomogenous *Fusarium* species. *Mycopathologia*, 84, 3-9
- Tello, J. C., Lacasa, A., Molina, R. (1985). Una nota fitopatológica sobre el complejo parasitario del pie de la judía (*Phaseolus vulgaris*). *ITEA* 61:57-69.

- Tello, J. C., Lacasa, A.; Navas, A. (1988). Prospección de micosis en el cultivo del guisante (*Pisum sativum* L.) en Murcia. *Phytoma España* 1:46-53.
- Temporini, E. D., and H. D. VanEtten. 2004. An analysis of the phylogenetic distribution of the pea pathogenicity genes of *Nectria haematococca* MPVI supports the hypothesis of their origin by horizontal transfer and uncovers a potentially new pathogen of garden pea: *Neocosmospora boniensis*. *Current Genetics* 46: 29-36.
- Thilagavathi, R., Saravanakumar, D., Ragupathi, N., & Samiyappan, R. (2007). A combination of biocontrol agents improves the management of dry root rot (Macrophomina phaseolina) in greengram. *Phytopathologia Mediterranea*, 46, 157-167.
- van der Molen, G. E., Labavitch J. M., Devay J. E. (1986). *Fusarium* induced vascular gels from banana, *Musa acuminata*, roots: A partial chemical characterization. *Physiologia Plantarum* 66: 298-302.
- Waalwijk, C., De Koning, J. R. A., Baayen R. P., Gams, W. (1996). Discordant groupings of *Fusarium* spp. from sections *Elegans*, *Leseola* and *Daminia* bases on ribosomal ITS1 and ITS2 sequences. *Mycologia* 88, 793-803
- Webb, K. M., Case, A. J., Brick, M. A., Otto, K., Schwartz, H. F. (2013). Cross Pathogenicity and Vegetative Compatibility of *Fusarium oxysporum* Isolated from Sugar Beet. *Plant Disease*, 97(9), 1200-1206. doi: 10.1094/pdis-11-12-1051-re
- Williamson, M., Fernandez-Ortuño, D., Schnabel, G. (2012). First Report of *Fusarium* Wilt of Strawberry Caused by *Fusarium oxysporum* in South Carolina. *Plant Disease*, 96(6), 911-911. doi: 10.1094/pdis-02-12-0164-pdn
- Winks, B.L., Williams, Y.N. (1965). A wilt of strawberry caused by a new form of *Fusarium oxysporum*. *Queensland journal of agricultural and animal sciences* 22, 475-479
- Wyllie, T. D. (1988). Charcoal rot of Soybean current status. In Wyllie, T. D. y Scott, D. H. (APS Press). Soybean Diseases of the North Central Region, 106–113. St. Paul, MN

www.fepex.es

www.juntadeandalucia.es/agriculturaypesca/portal/

- Zhao, X., Zhen, W., Qi, Y., Liu, X., and Yin, B. (2009). Coordinated effects of root autotoxic substances and *Fusarium oxysporum* Schl. f. sp. *fragariae* on the

growth and replant disease of strawberry. *Frontiers of Agriculture in China* 3, 34-39

Zveibil, A., Freeman, S. (2005) First report of crown and root rot in strawberry caused by *Macrophomina phaseolina* in Israel. *Plant Disease* 81, 1014

Zveibel, A., Mor, N., Gnaymen, N., Freeman, S. (2012). Survival, host-pathogen interaction, and management of *Macrophomina phaseolina* on strawberry in Israel. *Plant Disease* 96 (2), 265-272