



TESIS DOCTORAL

“Diversidad genética y patogénica de *Sclerotium rolfsii* Sacc. como factor determinante de epidemias de Podredumbres de raíces”

EFRÉN REMESAL GONZÁLEZ

DIRECTOR: Dr. JUAN A. NAVAS CORTÉS

Córdoba, Octubre de 2011

TITULO: *Diversidad genética y patogénica de Sclerotium rofsii Sacc. como factor determinante de epidemias de podredumbre de raíces*

AUTOR: *Efrén Remesal González*

© Edita: Servicio de Publicaciones de la Universidad de Córdoba. 2012
Campus de Rabanales
Ctra. Nacional IV, Km. 396 A
14071 Córdoba

www.uco.es/publicaciones
publicaciones@uco.es

ISBN-13: 978-84-695-1673-7



“Diversidad genética y patogénica de *Sclerotium rolfsii* Sacc. como factor determinante de epidemias de Podredumbres de raíces”

Memoria redactada para optar al grado de Doctor con Mención Europea por la Universidad de Córdoba, por el Licenciado en Biología:

Efrén Remesal González

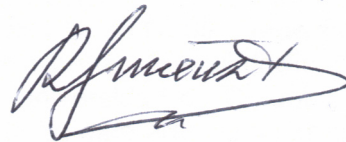
Visto Bueno:

El Director de la Tesis



Dr. Juan A. Navas Cortés
Investigador Científico
Instituto de Agricultura Sostenible, CSIC

El Tutor de la Tesis



Prof. Dr. Rafael M. Jiménez Díaz
Catedrático de Patología Vegetal
Universidad de Córdoba

Córdoba, Octubre de 2011



TÍTULO DE LA TESIS: “Diversidad genética y patogénica de *Sclerotium rolfsii* Sacc. como factor determinante de epidemias de Podredumbres de raíces”

DOCTORANDO/A: EFRÉN REMESAL GONZÁLEZ

INFORME RAZONADO DEL DIRECTOR DE LA TESIS

(se hará mención a la evolución y desarrollo de la tesis, así como a trabajos y publicaciones derivados de la misma).

D. JUAN A. NAVAS CORTÉS, Investigador Científico del Departamento de Protección de Cultivos, Instituto de Agricultura Sostenible, CSIC, Director de la presente Tesis Doctoral

INFORMA:

Que la Tesis Doctoral titulada “**Diversidad genética y patogénica de *Sclerotium rolfsii* Sacc. como factor determinante de epidemias de Podredumbres de raíces**” que ha llevado a cabo el Licenciado en Biología por la Facultad de Biología de Sevilla **D. Efrén Remesal González** bajo mi dirección, ha completado con éxito todos los objetivos planteados en dicho trabajo de investigación.

Que dicha Tesis Doctoral se va a Presentar como un compendio de capítulos donde se recogen los objetivos perseguidos y cumple con todos los requisitos y obligaciones dispuestos en el **Real Decreto 1393/2007, de 29 de octubre, propuestas por la Comisión de Másteres y Doctorado de 24.04.2009, y Aprobadas por Consejo de Gobierno de 30.04.09 y modificadas por Consejo de Gobierno de 24.07.09** de las Normas Reguladoras de los Estudios de Doctorado adaptadas al EEES de la Universidad de Córdoba sobre Indicadores de Calidad del Art 26, 2.a. En cumplimiento de este artículo se presentan dos artículos científicos correspondientes a los Capítulos tercero y quinto de la presente Tesis Doctoral:

Remesal, E., Jordán-Ramírez, R., Jiménez-Díaz, R.M., and Navas-Cortés, J.A. Mycelial compatibility groups and pathogenic diversity in *Sclerotium rolfsii* populations from sugar beet crops in Mediterranean-type climate regions. *Plant Pathology* (En prensa, aceptado 14 septiembre 2011).

Remesal, E., Lucena, C., Azpilicueta, A., Landa, B. B., and Navas-Cortés, J.A. 2010. **First report of Southern blight of pepper caused by *Sclerotium rolfsii* in southern Spain.** *Plant Disease* 94 (2): 280. DOI: 10.1094/PDIS-94-2-0280C.

Ambas revistas presentan un reconocido prestigio internacional en su ámbito. **Plant Pathology** es una revista internacional de Patología Vegetal editada por la

British Society of Plant Pathology con un índice de impacto de 2,237 ocupando la posición 12/75 (Primer Cuartil) en el descriptor "Agronomy" del ISI-JCR. **Plant Disease** es una revista internacional de Fitopatología Aplicada editada por la Sociedad Americana de Fitopatología con un índice de impacto de 2,387 ocupando la posición 44/188 (Primer Cuartil) en el descriptor "Plant Sciences" del ISI-JCR.

Otras publicaciones destacables que han surgido de la presente Tesis Doctoral son dos Abstracts de Congresos Internacionales publicados en revistas incluidas en el ISI-JCR, así como seis contribuciones a congresos tanto de ámbito internacional como nacional:

Meeting abstracts publicados en revistas incluidas en el ISI-JCR

Remesal, E., Landa, B.B., Jiménez-Díaz, R.M., Jiménez-Gasco, M.M., and Navas-Cortes, J.A. 2008. Genetic diversity in *Sclerotium rolfsii* infecting sugar beet in Mediterranean environments. **Phytopathology** 98: S131-S132.

Jordán-Ramírez, R., **Remesal, E.**, Jiménez-Díaz, R.M. and Navas-Cortes, J.A. 2008. Spatial pattern of *Sclerotium* root-rot and its effects on yield components in fall-sown sugar beet crops in Southern Spain. **Journal of Plant Pathology** 90 (2, Supplement): S2.163.

Contribuciones a Congresos Internacionales

Remesal, E., Landa, B.B., Jiménez-Gasco, M.M., and Navas-Cortés, J.A. 2011. Genetic diversity of *Sclerotium rolfsii* populations infecting sugar beet crops in Mediterranean climate-type environments. Tipo de participación: Comunicación oral. Congreso: **6th IOBC/WPRS Working Group Meeting on Multitrophic Interactions in soil**. Córdoba, España. Publicación: Proceedings pág. 73.

Remesal, E., Jordán-Ramírez, R., Jiménez-Díaz, R.M., and Navas-Cortés, J.A. 2011. Pathogenic variability and mycelial compatibility groups in *Sclerotium rolfsii* populations infecting sugar beet crops in Mediterranean climate-type environments. Tipo de participación: Panel. Congreso: **6th IOBC/WPRS Working Group Meeting on Multitrophic Interactions in soil**. Córdoba, España. Publicación: Proceedings pág. 117.

Contribuciones a Congresos Nacionales

Remesal, E., Landa, B.B., Jiménez-Díaz, R.M., Jiménez-Gasco, M.M. y Navas-Cortés, J.A. 2008. Diversidad genética de poblaciones de *Sclerotium rolfsii* en cultivos de remolacha azucarera en regiones de clima mediterráneo. Tipo de participación: Comunicación Oral. Congreso: XIV Congreso Nacional Sociedad Española de Fitopatología, Lugo. Publicación: Libro de Resúmenes pág. 95.

Remesal, E. y Navas-Cortés, J.A. 2008. Medio de cultivo optimizado para la identificación de Grupos de Compatibilidad Miceliar en *Sclerotium rolfsii*. Tipo de participación: Panel. Congreso: **XIV Congreso Nacional Sociedad Española de Fitopatología**, Lugo. Publicación: Libro de Resúmenes pág. 202.

Remesal, E., Landa, B.B., Jiménez-Gasco, M.M., y Navas-Cortés, J.A. 2010. Estructura genética de las poblaciones de *Sclerotium rolfsii* en regiones de clima

mediterráneo. Tipo de participación: Comunicación Oral. Congreso: **XV Congreso Nacional Sociedad Española de Fitopatología**, Vitoria-Gasteiz. Publicación: Libro de Resúmenes pág. 70.

Remesal, E., Jordán-Ramírez, R., Jiménez-Díaz, R.M., y Navas-Cortés, J.A. 2010. Diversidad patogénica entre grupos de compatibilidad micelial de *Sclerotium rolfsii*. Tipo de participación: Panel. Congreso: **XV Congreso Nacional Sociedad Española de Fitopatología**, Vitoria-Gasteiz. Publicación: Libro de Resúmenes pág. 355.

Por todo ello, considero finalizada dicha Tesis Doctoral, y creo que puede ser presentada y tramitada para su exposición y defensa en la Comisión de Doctorado de la Universidad de Córdoba, y autoriza la presentación de la Tesis doctoral.

Córdoba, 21 de Octubre de 2011

Firma del director

A handwritten signature in blue ink, consisting of several overlapping loops and lines, positioned below the text 'Firma del director'.

Fdo.: Juan A. Navas Cortés



TÍTULO DE LA TESIS: “Diversidad genética y patogénica de *Sclerotium rolfsii* Sacc. como factor determinante de epidemias de Podredumbres de raíces”

DOCTORANDO/A: EFRÉN REMESAL GONZALEZ

ESCRITO RAZONADO DEL TUTOR DE LA TESIS Y RESPONSABLE DE LA LÍNEA DE INVESTIGACIÓN

(Ratificando el informe favorable del director. Sólo cuando el director no pertenezca al programa de doctorado).

D. RAFAEL M. JIMÉNEZ DÍAZ, Catedrático de Patología Vegetal del Departamento de Agronomía de la Universidad de Córdoba

INFORMA:

Que la investigación sobre “**Diversidad genética y patogénica de *Sclerotium rolfsii* Sacc. como factor determinante de epidemias de Podredumbres de raíces**”, que ha llevado a cabo el Licenciado en Biología **D. Efrén Remesal González** bajo la dirección del Dr. Juan A. Navas Cortés, Investigador Científico del Departamento de Protección de Cultivos, Instituto de Agricultura Sostenible, CSIC, y la tutoría del que subscribe, ha alcanzado con éxito los objetivos inicialmente propuestos y dado lugar a resultados publicados en revistas del JCR que satisfacen los requisitos de indicios de calidad. En consecuencia, como tutor de la Tesis Doctoral que incluye dicha investigación, considero que puede ser presentada para su exposición y defensa públicas en la Universidad de Córdoba. Asimismo, ratifico el informe del Dr. Navas Cortés sobre la evolución y desarrollo de la Tesis, así como de los trabajos y publicaciones que hasta el momento se han derivado de la misma.

Por todo ello, se autoriza la presentación de la Tesis Doctoral.

Córdoba, 21 de Octubre de 2011

Firma del Tutor y responsable de línea de investigación

Fdo.: Prof. Dr. Rafael M. Jiménez Díaz



Este Trabajo ha sido realizado en el Grupo PAIDI AGR-136 ‘Sanidad Vegetal’ del Departamento de Protección de Cultivos del Instituto de Agricultura Sostenible, CSIC, gracias a la concesión de la beca predoctoral **BES-2006-13693** en el marco del programa de “Formación de Personal Investigador” (FPI) del Ministerio de Educación y Ciencia adscrita al Proyecto de Investigación AGL2005-0751 **“Diversidad genética y patogénica de *Sclerotium rolfsii*, como factor determinante de epidemias de Podredumbres de raíces”**, y al Proyecto de Investigación AGL2002-01418 **“Bases Epidemiológicas para el Control Integrado de enfermedades causadas por hongos de suelo en cultivos de remolacha de siembra otoñal”** financiados por el Ministerio de Educación y Ciencia y el Fondo Social Europeo.

Córdoba, Octubre de 2011

RECONOCIMIENTOS

Para la realización de este trabajo se ha contado con la inestimable colaboración de las siguientes personas y entidades a las que deseamos expresar nuestro reconocimiento por la ayuda prestada:



A todo el equipo Científico y Técnico de la **Asociación de Investigación para la Mejora de la Remolacha Azucarera (AIMCRA)**.

En particular queremos destacar la labor desarrollada por el **Dr. Manuel Gutiérrez Sosa** en la selección y colaboración en las labores de muestreo de las parcelas comerciales de remolacha azucarera afectadas por Podredumbre blanca en el sur de España en las que se han obtenido los aislados de *Sclerotium rolfsii* con los que se llevado a cabo el estudio. Asimismo, al **Dr. Rodrigo Morillo-Velarde** por proporcionar raíces de remolacha azucarera afectadas de Podredumbre blanca procedentes de Bari (Italia) de las que se obtuvieron los aislados de *S. rolfsii* de esta región incluidos en el estudio.



A **D. Miguel Paim, Associação para Desenvolvimento da Beterraba de Portugal (ADB)**, por proporcionar raíces de remolacha azucarera afectadas por Podredumbre blanca de diferentes localidades de Portugal de las que se obtuvieron los aislados de *S. rolfsii* incluidos en el estudio.



A **D. Ramiro Paillalef Monnard, Industria Azucarera Nacional S.A. de Chile (IANSAGRO)**, por proporcionar los aislados de *S. rolfsii* de distintas localidades de Chile incluidos en el estudio.

Finalmente, agradecer la colaboración prestada **a todos los agricultores** en cuyas parcelas comerciales de remolacha azucarera se han llevado a cabo los muestreos realizados en el Sur de España.

A mis padres

“De bien nacidos es ser agradecidos”

Todos y cada uno de los logros personales que he alcanzado se los debo a *mis padres*, ejemplos de educadores, superación, esfuerzo, trabajo, humanidad, respeto... Son mi inspiración y mi orgullo. Esta Tesis Doctoral es por y para ellos.

A mi director de tesis Juan A. Navas Cortés, por darme la oportunidad de llevar a cabo esta investigación, por su total confianza en mi trabajo, por su esfuerzo y dedicación, por sus valiosos consejos y por su incalculable y excelente labor de educador que, sin duda, ha sabido transmitirme.

A mi tutor de tesis Rafael M. Jiménez Díaz, a Blanca B. Landa del Castillo y a Pablo Castillo Castillo, por transmitirme su pasión por la Fitopatología y estar dispuestos en todo momento a atenderme en cualquier necesidad.

Al resto de los miembros del grupo de Sanidad Vegetal del IAS que lo han sido o lo son, por las experiencias vividas y por la amistad y el apoyo que durante estos años me han ofrecido. A todos y cada uno, gracias.

A mi familia y a los amigos de siempre, mi segunda familia, los que etapa tras etapa permanecen incondicionalmente, por una vida juntos.

A Almudena, por su incansable e infinito aliento, por cada gesto, por ser especial, amiga, compañera, todo... y por hacer que los días pasen más deprisa a su lado.

BIOGRAFÍA

Efrén Remesal González nació el 18 de Septiembre de 1980 en Sevilla donde cursó sus estudios de E.G.B., B.U.P. y C.O.U. en el colegio “San Francisco de Paula”.

Accedió a la Universidad de Sevilla en el curso académico 1998-1999 donde realizó sus estudios en la Facultad de Biología, obteniendo el título de Ldo. en Biología en Mayo de 2005. Durante su periodo universitario se le concedió una “Beca-Colaboración” de introducción a la investigación del Ministerio de Educación y Ciencia en el Departamento de Fisiología Vegetal (2003-2004).

En Octubre de 2006 se traslada a Córdoba para comenzar sus estudios de Doctorado en el Grupo de Sanidad Vegetal AGR136 del Dpto. de Protección de Cultivos del Instituto de Agricultura Sostenible (IAS), gracias a la concesión de la beca pre-doctoral BES-2006-13693 en el marco del programa de “Formación de Personal Investigador” (FPI) del Ministerio de Educación y Ciencia adscrita al Proyecto de Investigación AGL2005-0751 financiado por el Ministerio de Educación y Ciencia y el Fondo Social Europeo. Durante este periodo, cursó el Máster de “Producción, Protección y Mejora Vegetal” en la Universidad de Córdoba durante el curso 2006-2007, y realizó estancias pre-doctorales en E.E.U.U. en la Universidad de PennState de Pennsylvania (2007) y en el centro de investigación del USDA en Oregon (2008), así como en el centro INRA de Dijon en Francia (2010).

RESUMEN

Las epidemias causadas por el hongo de suelo *Sclerotium rolfsii* en numerosos cultivos agrícolas de interés económico siguen siendo de las de más difícil manejo, constituyendo aún, por tanto, un importante reto para los fitopatólogos. La dificultad de su manejo está motivada por diversas características de este patógeno, que incluyen el inusual rango de plantas huésped, su amplia distribución en suelos agrícolas a nivel mundial, su poderoso mecanismo de patogénesis con la producción exógena de enzimas degradadoras de la pared celular del huésped, su capacidad para desarrollarse en un amplio rango de condiciones ambientales y su habilidad de persistir en los suelos infestados durante largos períodos de tiempo mediante la formación de estructuras de supervivencia o esclerocios, lo que unido con la recientemente demostrada variabilidad genética de sus poblaciones hacen de este patógeno uno de los de más difícil manejo. Las epidemias causadas por *S. rolfsii* son especialmente severas en zonas de clima templado y subtropical donde las elevadas temperaturas unidas a la elevada humedad de suelo proporcionada por la práctica del regadío dan lugar a condiciones favorables para el desarrollo del hongo, la infección y el rápido desarrollo de la enfermedad.

En España, *S. rolfsii* se encuentra ampliamente distribuido en los suelos agrícolas del Valle del Guadalquivir y las provincias de Cádiz y Huelva en Andalucía. En esta área, las epidemias más severas causadas por *S. rolfsii* se han descrito en cultivos de remolacha azucarera de siembra otoñal, cuyos rendimientos suponen hasta el 40% de la producción total a nivel mundial de este tipo de siembra y siendo en esta región donde el cultivo está más avanzado desde el punto de vista tecnológico y productivo. A pesar de esto, no se han podido implementar hasta la fecha medidas eficientes para combatirlas. La coincidencia de los últimos riegos que recibe el cultivo con las altas temperaturas que se dan en la fecha de recolección, mayo-julio, ofrecen un escenario óptimo para el crecimiento y

desarrollo de *S. rolfsii* y las enfermedades que causa referida como Podredumbre blanca o Mal del esclerocio.

En la actualidad, se dispone de un limitado conocimiento acerca de la estructura y diversidad de las poblaciones de *S. rolfsii*, y éste es nulo en el caso de poblaciones infectando cultivos de remolacha azucarera. Este conocimiento, sería de especial interés para el diseño y desarrollo de medidas eficientes para el control integrado de las enfermedades causadas por este patógeno. En este contexto, la presente Tesis Doctoral se centra en el estudio de dichas poblaciones procedentes de diversas áreas de cultivo de remolacha azucarera de diferentes regiones del mundo en las que se practica el mismo tipo de cultivo de siembra otoñal y bajo unas mismas condiciones climáticas de tipo Mediterráneo, con prevalencia de severas epidemias de Podredumbre blanca, y tiene como objetivo general el generar conocimiento sobre la Fitopatología de *S. rolfsii* en base a su diversidad molecular y patogénica, e inferir, así, la estructura de dichas poblaciones como base para el establecimiento medidas de control eficientes para el manejo de dicha enfermedad y desarrollar estudios epidemiológicos y de dispersión de sus poblaciones. Esta investigación es pionera en este importante hongo fitopatógeno al aunar la caracterización genética a diversos niveles, así como su caracterización patogénica y de virulencia en el estudio de poblaciones de *S. rolfsii*.

En un primer nivel, la variabilidad genética de las poblaciones de *S. rolfsii* se evaluó mediante la ocurrencia de grupos de compatibilidad micelial (GCMs) en una amplia colección de aislados del hongo y su distribución geográfica. Los GCM se establecen en base a las reacciones de compatibilidad-incompatibilidad entre los aislados enfrentados entre sí en un medio de cultivo apropiado. Sin embargo, se ha detectado cierta variabilidad en las características morfológicas de las reacciones incompatibles que a menudo dificulta la clara distinción de las reacciones miceliales entre aislados. Esta limitación asociada a las evidencias macroscópicas se solventó mediante el desarrollo en el transcurso de las primeras fases de esta investigación de un medio de cultivo (medio modificado de Patterson: MPM) que favorece la formación de la zona de

aversión característica de las interacciones incompatibles entre aislados de *S. rolfsii* y permite la identificación inequívoca de las distintas reacciones miceliares.

La determinación de los GCMs se considera como un método indirecto para el estudio de la variabilidad genética entre aislados de hongos fitopatógenos que carecen de fase sexual o ésta rara vez ha sido descrita y, por lo tanto, se considera irrelevante su papel en el ciclo vital. En estos hongos, entre los que se encuentra *S. rolfsii*, se considera que el intercambio genético se produce exclusivamente entre individuos del mismo GCM por lo que permanecen genéticamente aislados de los encuadrados en GCMs diferentes. Este aislamiento genético hace que estas poblaciones puedan diferir en características de tipo morfológico, genético o patogénico. Así, entre los 459 aislados de *S. rolfsii* estudiados en esta Tesis Doctoral procedentes de ocho localidades de Andalucía donde se llevaron a cabo muestreos intensos, así como de cuatro localidades de Chile, una de Italia y cinco de Portugal, se identificaron 12 GCMs. En las parcelas muestreadas intensamente en Andalucía el GCM i fue el más abundante, apareciendo en todas ellas como el único grupo presente o junto a otros representados por un menor número de aislados, excepto en una localidad (Lebrija) donde el GCM más abundante fue el iii, sugiriendo que el GCM i representa a la población original de *S. rolfsii* en Andalucía. Considerando a la totalidad de parcelas muestreadas, el GCM iii fue el más ampliamente distribuido geográficamente ya que fue identificado en 10 de las 18 localidades estudiadas y en todos los países muestreados excepto en Italia. Esto sugeriría que el GCM iii pudo haber sido el que ha sufrido una dispersión más amplia tanto dentro de una misma zona de cultivo como entre áreas de cultivo, por prácticas culturales como por el desplazamiento de vehículos y/o material vegetal. El resto de GCMs identificados mostraron cierta correlación con el origen geográfico de los aislados al estar localmente distribuidos en varias localidades de diferentes países (GCM v), localidades dentro de un país (GCM ii, vi y ix) o en una sola localidad (iv, vii, viii, x, xi, y xii).

Una de las hipótesis de partida en esta Tesis Doctoral fue que los aislados pertenecientes a un mismo GCM serían más similares genéticamente entre sí que a aquellos de GCMs diferentes. En base a esto, se analizó la diversidad genética de los aislados de *S. rolfsii* dentro y entre los distintos GCMs identificados y sus relaciones filogenéticas. En una segunda aproximación, se exploró la posibilidad de encontrar marcadores moleculares para los GCMs que permitiesen su caracterización e identificación rápida y reproducible. Para ello, se realizaron análisis RFLP (Polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción) del gen 5.8S del ADN ribosómico (ADNr) y las regiones espaciadoras internas ITS1/ITS2 que lo flanquean, mediante la digestión de los productos amplificados de dicha región con las enzimas de restricción *AluI*, *RsaI*, *HpaII* y *MboI*. Este análisis reveló la existencia de un nivel de variabilidad reducido entre aislados de *S. rolfsii* pertenecientes a los diferentes GCMs ya que los pertenecientes a un mismo GCM mostraron idénticos patrones de bandas para las cuatro enzimas, mientras que los 12 GCMs identificados se agruparon en tres grupos-RFLP que incluyeron entre uno, tres y ocho GCMs sin que existiese asociación con el origen geográfico de éstos. Por otro lado, dada la escasa resolución de esta aproximación para la adecuada caracterización de los aislados de *S. rolfsii* a nivel de GCM, se abordó el estudio de las secuencias nucleotídicas de regiones específicas de genes codificantes de proteínas ricos en intrones a lo largo de su secuencia, una herramienta molecular apenas explorada hasta la fecha para estudios de variabilidad molecular en *S. rolfsii*. Estas regiones se localizaron en el gen EF1 α que codifica para el factor de elongación de la transcripción 1-alfa y en el gen RPB2 que codifica para la segunda subunidad mayor de la ARN polimerasa II. Considerando ambas secuencias por separado, los análisis de similitud mostraron que los aislados de un mismo GCM compartían idéntica información nucleotídica y que además, era posible caracterizar a los GCMs atendiendo a sus secuencias, ya que eran únicas para la mayoría de ellos. Más aún, al combinar ambas regiones génicas, los 12 GCMs de *S. rolfsii* identificados fueron entonces resueltos, presentando cada uno de ellos secuencias nucleotídicas únicas que permitieron su completa

caracterización. Este resultado se corroboró en “test ciegos” en los que nuevos aislados de *S. rolfsii* no incluidos en la colección inicial, fueron asignados a alguno de los GCMs previamente identificados mediante el análisis tanto de dichas secuencias génicas, con una similitud del 100%, como de las reacciones miceliales en enfrentamientos en medios de cultivo frente a los aislados “tipo” de cada los diferentes GCMs identificados. Por tanto, en la presente Tesis Doctoral se propone un set inicial de aislados “tipo” para la identificación de GCMs en *S. rolfsii* basada en secuencias específicas para cada uno de ellos de los genes EF1 α y RPB2 que permita la rápida y correcta caracterización y clasificación de aislados individuales en los 12 GCMs identificados. Esta herramienta será de gran utilidad para una mejor comprensión de la epidemiología de las enfermedades causadas por *S. rolfsii* así como en el estudio de la dispersión espacial y temporal de las poblaciones de éste.

Finalmente, se abordó la caracterización patogénica y de virulencia de las poblaciones de *S. rolfsii* evaluadas en la presente Tesis Doctoral, así como su posible asociación con la variación genética encontrada en los distintos GCMs identificados, sobre un conjunto de 11 especies vegetales seleccionadas por representar al amplio rango de plantas huésped susceptibles que presenta *S. rolfsii* y por incluir, además, especies mono- y dicotiledóneas de interés agrícola que podrían ser alternativas a los cultivos de remolacha azucarera de siembra otoñal en las zonas de producción de regiones con clima de tipo Mediterráneo y cuyas áreas se están reduciendo de manera constante como consecuencia de diferentes procesos de reconversión del cultivo. De este modo, a la hora de diseñar una adecuada rotación de cultivos, es necesario disponer de información a nivel local sobre la prevalencia de los GCMs presentes y de su espectro de plantas huésped susceptibles. Por otro lado, la rotación de cultivos se presenta como una de las pocas medidas de control para la Podredumbre blanca al contribuir a la reducción del inóculo del patógeno en los suelos infestados y al mantenimiento del potencial productivo de los suelos agrícolas. No obstante, la eficiencia de esta medida dependerá de la reacción que los cultivos incluidos en la rotación presenten frente a las

poblaciones del patógeno. En consecuencia, esta investigación respondió a la necesidad de generar conocimiento acerca de los rangos de plantas huésped susceptibles a los distintos GCMs en las regiones de estudio de clima de tipo Mediterráneo y donde esta información no está disponible en la literatura científica. Los resultados obtenidos demostraron que existe una elevada variabilidad patogénica entre los aislados representativos de los diferentes GCMs, así como en el grado de susceptibilidad entre las especies de plantas huésped evaluadas con una interacción significativa entre los grupos de GCMs x especies huésped. El análisis de agregación permitió seleccionar cinco grupos de GCMs y agrupar las especies huésped en el grupo-especies 1 (brócoli, garbanzo, girasol y tomate) y 2 (algodón, pimiento, remolacha azucarera y sandía). Los grupos-GCM 1 (GCMs i y ix), 2 (GCMs ii, iii, vi y viii) y 5 (x, xii) fueron moderadamente virulentos sobre el grupo-especies 1 y ligeramente virulentos frente al grupo-especies 2. En cambio, los grupos-GCM 3 (GCMs iv, v y xi) y 4 (GCM vii) fueron ligeramente virulentos sobre ambos grupos de especies. De la misma forma, para el conjunto de los 12 GCMs, la reacción media de las diferentes especies de plantas huésped se estimó como: altamente susceptible (garbanzo y girasol), susceptible (algodón, pimiento, tomate y sandía), moderadamente resistente (brócoli, melón y remolacha azucarera) y resistente (maíz y trigo). Además, cabe destacar que entre los aislados de *S. rolf sii* pertenecientes a un mismo GCM, existe un bajo nivel de variabilidad patogénica, lo cual sugiere una correlación entre los componentes de un GCM y su capacidad patogénica y de virulencia. En base a estos resultados que muestran claras diferencias en virulencia entre los diferentes aislados de *S. rolf sii*, asociadas además a la diversidad genética de los mismos determinada por los GCMs en los que se agrupan, junto con la ocurrencia de hasta tres GCMs diferentes en una misma parcela o localidad, dificultan la recomendación de la rotación de cultivos como única medida de control frente a la Podredumbre blanca.

Esta Tesis Doctoral ha permitido explorar por vez primera el estudio y caracterización de la estructura genética y patogénica de las poblaciones de *S. rolf sii* infectando cultivos de remolacha azucarera de siembra otoñal

en regiones de clima de tipo Mediterráneo. La información generada en la presente Tesis Doctoral ha permitido establecer las bases para: (i) la inequívoca evaluación de las distintas reacciones miceliares entre los aislados de *S. rolfsii*; (ii) la identificación y caracterización rápida de GCMs en base a marcadores moleculares; (iii) el establecimiento de una colección de referencia de aislados representativos de GCMs para futuros estudios sobre las poblaciones del patógeno; y (iv) la caracterización de la reacción de un conjunto de especies de plantas huésped de interés económico y agrícola frente a las poblaciones de *S. rolfsii* prevalentes en áreas de clima Mediterráneo.

Desde un punto de vista práctico, los resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral permitirán establecer medidas más eficientes de control de las enfermedades causadas por *S. rolfsii* tanto en remolacha azucarera como en otros alternativos que se establezcan en áreas con historia del patógeno. En base a nuestros resultados, dichas medidas deben estar basadas fundamentalmente en los principios de prevención y escape, y deberán ser implementadas mediante la utilización de cultivos no huésped del patógeno o con un nivel adecuado de resistencia a las poblaciones del mismo prevalentes en la zona de cultivo, así como la práctica de la rotación de cultivos que incluya preferentemente cultivos no huésped a *S. rolfsii*.

SUMMARY

Sclerotium rolfsii Sacc., the mycelial stage of the basidiomycete *Athelia rolfsii* (Curzi) Tu & Kimbrough, is a soil-borne plant pathogenic fungus that is able to infect about 500 plant species, mostly dicotyledonous but also monocotyledonous species including many economically agricultural crops like leguminous plants, horticultural crops or woody plants in a wide geographic area comprised between northern and southern latitudes of 38°. These features together with a powerful pathogenesis mechanism with the production of several exogenous host cell degradative enzymes, the optimum development under a wide range of environmental conditions and the ability to survive in soil for long periods forming sclerotia confer difficulty to management of the disease. In addition to that, recently, it has also been demonstrated a high genetic variability among *S. rolfsii* populations. Main disease symptoms caused by this pathogen on affected plants include crown and root rot, stem canker or damping-off and the resulting disease can be referred as southern blight, southern stem rot, or Sclerotium root rot. In spite of that wide geographical distribution epidemics caused by *S. rolfsii* are more severe in tropical and subtropical regions, but also in Mediterranean-type climate areas where germination of sclerotia, mycelial growth and infections are favored by the prevalence of high temperatures and high humidity after irrigation.

In Southern Spain *S. rolfsii* shows a wide distribution in agricultural soils at the Guadalquivir Valley, Huelva and Cádiz where the attacks by this pathogen have been especially relevant in autumn-sown sugar beet crops causing 5 to 80% yield losses. However, in this area none management strategy has attained an effective control of Sclerotium root rot diseases.

Currently, knowledge about *S. rolfsii* population's structure and variability in local field populations associated with different crops is limited, and it is null infecting sugar beet crops. In this scenario, the global objective of this PhD Thesis was the characterization of *S. rolfsii* population structure infecting sugar beet crops in Mediterranean-type climate areas to generate

new information on the genetic and pathogenic variability of the fungus to be of use in the development of a more effective management of Sclerotium root rot diseases and a better understanding of the epidemiology of the diseases they cause.

In a first stage of this PhD Thesis, it was assessed the occurrence and geographical distribution of mycelia compatibility groups (MCGs) among *S. rolfsii* isolates of a large collection of isolates and its geographical distribution. Characterization of fungal populations into MCGs provides an indirect measure of genetic variability among isolates and is particularly relevant for those fungi in which the sexual reproduction has a minimal impact on the disease cycle. In these species, genetic exchange is thought to be limited to somatic compatibility by hyphal anastomosis. Thus, mycelial incompatibility results in separate and distinct gene pools that may display variation because of the lack of genetic exchange between MCGs. In practice, mycelial compatibility test is done by pairing of field isolates placing mycelial plugs of the isolates to be tested on petri dishes with an artificial growth media allowing the unequivocal identification of the compatibility-incompatibility reactions. At the beginning of this research, a range of those reactions were observed in the interaction zone, and although most of them could be classified as compatible - incompatible, some gave rise to ambiguous results. For this reason, firstly it was necessary to develop a reliable media to visualize incompatible reaction (aversion) zones in *S. rolfsii* and to determine if these zones were indicative of mycelial incompatibility. A modification of the Patterson's medium (MPM) was developed in this PhD Thesis to enhance the size, density and distinctiveness of aversion zones between isolates, allowing the unequivocal distinction of compatible and incompatible reactions. The new formulation significantly improved consistent assessment of aversion zone reaction in mycelial compatibility testing in *S. rolfsii* as compared to that estimated by previous media formulations for which visualization of aversion zones was commonly problematic. The usefulness of the optimized medium was corroborated using microscopic observations of the area of contact of hyphal pairings among isolates of *S. rolfsii* in microscope

cover slips cultures that validated mycelial compatibility scoring using this growth medium.

The developed MPM medium allowed identifying 12 MCGs among the 459 *S. rolfsii* isolates obtained from Sclerotium root rot affected sugar beet crops in four Mediterranean-type climate countries (Chile, Italy, Portugal and Spain) and eight intensively sampled sugar beet fields in southern Spain. Among them, MCGs i and iii were the most prevalent among sampled isolates, representing 64.71 and 18.95% of the isolates, respectively. MCG i was identified only in the Iberian Peninsula, being present in all eight locations sampled in southern Spain and one location sampled in central Portugal. MCG iii was less abundant than MCG i but it was the widest distributed MCG, being identified in 10 of the 18 sampled locations from all sampled countries [Chile (two), Portugal (five) and southern Spain (three)] except Italy. MCG v comprised 5.66% of the isolates and was found restricted to two distant field plots in southern Spain and central Portugal. MCG ii comprised 3.92% of the isolates from two locations in Córdoba and Seville provinces at southern Spain. The remaining eight MCGs accounted for 6.75% of the isolates and were locally distributed. MCGs ix, vi, xii, viii, and xi, comprised 10, nine, four, three, and two isolates, respectively, and MCGs iv, vii and x consisted of a single isolate, identified in Bari (southern Italy), Colchagua (Chile) and Chillán (Chile), respectively. Among these five multimember MCGs, MCG viii, ix and xii were identified only in three locations in Chile, MCG vi in two locations in Portugal, and MCG xi in one location in Spain. At field plot level, a relatively low number of MCGs was found within each of the eight sugar beet fields sampled in the Guadalquivir Valley at southern Spain. In these fields, three, two, and one MCGs were identified in one, five and two fields, respectively. MCG i was always present suggesting that such MCG would represent the original population of *S. rolfsii* in Southern Spain.

A baseline hypothesis in this PhD Thesis was that *S. rolfsii* isolates belonging to a given MCG could be more genetically similar to each other than to those in other MCGs. In order to assess the genetic variability within and between MCGs we analysed different molecular markers including

restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis of the internal transcribed spacer (ITS) region of the nuclear ribosomal DNA (rDNA) and sequence analyses of the intron-rich protein-coding genes translation elongation factor-1 alpha (EF1 α) and RNA polymerase II subunit two (RPB2). In a second approach we tried to infer phylogenetic relationships among representative members of these MCGs and explored the possibility of establishing a reference collection of representative isolates of MCGs that might be of help for plant pathologists for subsequent studies in *S. rolfsii* populations.

ITS-RFLP analysis with *AluI*, *HpaII*, *MboI* and *RsaI*, showed low genetic variability among *S. rolfsii* MCGs since clustered the 12 MCGs previously identified into three ITS-RFLP groups. All isolates belonging to the same MCG had identical pattern while the same pattern could be also observed for isolates belonging to different MCGs. Similar results have been observed when using amplified fragment length polymorphism (AFLP) and random amplified polymorphic DNA (RAPD) analyses. On the other hand, the sequences analysis of EF1 α and RPB2 genes, two single copy and intron-rich protein-coding genes that tend to evolve at a higher rate at the species level than other more commonly used regions, had not been studied for *S. rolfsii* to date. Combined cluster analysis using those nucleotide positions showing variability for both EF1 α and RPB2 genes for *S. rolfsii* isolates representative of each MCG, allowed discriminating of all 12 *S. rolfsii* MCGs. The consistency of the combined analysis of EF1 α and RPB2 sequences to assign *S. rolfsii* isolates into a MCG was tested and demonstrated in a blind trial in which a given *S. rolfsii* isolate was assigned to a MCG by using both sequence analysis and mycelial compatibility pairing. These results allowed establish a set of tester isolates for MCG identification in *S. rolfsii* based on the assignment of a MCG to specific EF1 α and RPB2 gene sequences for exacting characterization and classification of individual isolates into the 12 defined MCGs. The relatively cheap and ready accessibility of sequencing for most laboratories will provide a useful molecular tool for a better understanding of the

epidemiology of Sclerotium root rot diseases and to monitor the spatio-temporal spread of *S. rolfsii* isolates.

Finally, pathogenic and virulence variability among and within *S. rolfsii* MCGs were studied to generate information about the host range of *S. rolfsii* populations in crop areas sharing Mediterranean-type climate. This research was carried out on 11 plant species selected as representative of the host range of the pathogen as well as of mono and dicotyledonous species that could be an alternative to sugar beet crops in Mediterranean-type climate areas. This information is a key component for the management of Sclerotium root rot diseases, in particular is essential for the success of the use of host resistance and crop rotation for disease control, as well as for make recommendation on suitable crops as an alternative to sugar beet production in those areas in which this crop is on recession. The results showed that high pathogenic variability occurs among isolates representative of *S. rolfsii* MCGs as well as on the degree of susceptibility among the tested plant species with a MCG x species interaction. Isolates of MCGs i, ii, vii, ix and x were pathogenic to eight host species, whereas isolates of MCGs viii, xi and xii were pathogenic to seven host species, and those of MCGs iv and v were pathogenic to six. Three of the 11 tested plant species, chickpea, pepper and watermelon, were infected by all 12 MCGs, whereas cotton and sunflower were infected by 11 MCGs, tomato by 10, sugar beet by nine, broccoli by eight and melon by only six MCGs. Moreover, according to their disease reaction, MCGs could be grouped into five MCG groups and plant species into species-group 1 (broccoli, chickpea, sunflower and tomato) and species-group 2 (cotton, pepper, sugar beet and watermelon). MCG-groups 1 (MCG i and ix), 2 (MCG ii, iii, vi and viii) and 5 (MCG x and xii) were moderately virulent to species-group 1 and mildly virulent to both species-groups. Moreover, the results also showed a low level of pathogenic variability among *S. rolfsii* isolates within a MCG. Across MCG-groups, chickpea and sunflower were highly susceptible; cotton, pepper, tomato and watermelon susceptible; broccoli, melon and sugar beet, moderately resistant; and corn and wheat were resistant.

To our knowledge, this PhD Thesis represents the first genetic and virulence characterization of *S. rolfsii* populations in a given area on a specific crop. Those results have important implications for the management of Sclerotium root rot of sugar beet in Mediterranean-type of climates, particularly concerning crop rotation and choice of proper crops for use in infested soils previously cropped to sugar beet or other susceptible crops in an area. The occurrence of up to three different MCG within a field plot or locality differing in pathogenic and virulence profiles, make it difficult to recommend a single control measure. Nevertheless, it would be of interest to evaluate the risk of occurrence of severe epidemics on a certain crop based on the prevalence of a given MCG of the pathogen. This information would be of importance particularly for southern Spain and Portugal where vegetable crops, such as carrot, pepper, tomato etc. are becoming alternative crops for sugar beet as a result of the sugar beet production area has been drastically reduced or nearly eliminated, respectively. Consequently, Sclerotium root rot diseases can become an important threat for vegetable crop production in those areas.

In conclusion, the information obtained in this PhD Thesis provide: (i) a technique for the unequivocally characterization of compatible and incompatible mycelial reactions in *S. rolfsii*; (ii) a relatively cheap and ready tool that allows the exact characterization and classification of individual isolates into MCGs; (iii) a set of tester isolates for MCG identification in *S. rolfsii* available for subsequent studies on this pathogen as well on the epidemiology and dynamics of *S. rolfsii* populations; and (iv) a characterization of disease reaction of economically important agricultural crops to *S. rolfsii* populations prevailing in Mediterranean-type areas.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN GENERAL Y OBJETIVOS.....	1
I.1. INTRODUCCIÓN GENERAL.....	3
I.1.1. <i>Sclerotium rolfsii</i> Sacc.....	4
I.1.1.1. Importancia, Gama de huéspedes y Distribución geográfica.....	4
I.1.1.2. Sintomatología.....	6
I.1.1.3. Etiología: taxonomía, nomenclatura y morfología.....	8
I.1.1.4. Ciclo Vital y Patogénesis.....	12
I.1.1.5. Epidemiología.....	15
I.1.1.6. Variabilidad de las poblaciones de <i>Sclerotium rolfsii</i>	20
I.1.2. LA PODREDUMBRE BLANCA DE LA REMOLACHA AZUCARERA DE SIEMBRA OTOÑAL.....	29
I.1.2.1. El cultivo de la Remolacha Azucarera.....	29
Origen del cultivo.....	29
Distribución geográfica y Producción.....	30
Prácticas de cultivo.....	31
I.1.2.2. La Podredumbre blanca en Remolacha Azucarera de siembra otoñal.....	34
Importancia y Distribución geográfica.....	34
Sintomatología.....	35
Ciclo de patogénesis.....	36
Epidemiología.....	37
	xv

Estrategias y Medidas de Control.....	39
I.2. OBJETIVOS.....	46
I.2.1. NATURALEZA DE LA INVESTIGACIÓN PLANTEADA.....	46
I.2.2. OBJETIVOS.....	47
CAPÍTULO II: OPTIMIZACIÓN DE UN MEDIO DE CULTIVO QUE INTENSIFICA LA FORMACIÓN DE LA ZONA DE AVERSIÓN EN LAS REACCIONES MICELIARES ENTRE AISLADOS DE <i>Sclerotium rolfsii</i>.....	49
II.1. RESUMEN.....	51
II.2. INTRODUCCIÓN.....	53
II.3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	55
II.3.1. Aislados.....	55
II.3.2. Medios de Cultivo.....	55
II.3.3. Enfrentamientos y Evaluación de las reacciones miceliales.....	56
II.3.4. Validación de los resultados.....	57
II.3.5. Análisis de datos.....	58
II.4. RESULTADOS.....	59
II.5. DISCUSIÓN.....	69
II.6. LITERATURA CITADA.....	71

CAPÍTULO III: IDENTIFICACIÓN DE GRUPOS DE COMPATIBILIDAD MICELIAR EN POBLACIONES DE <i>Sclerotium rolfsii</i> INFECTANDO CULTIVOS DE REMOLACHA AZUCARERA DE SIEMBRA OTOÑAL EN REGIONES DE CLIMA MEDITERRÁNEO.....	75
III.1. RESUMEN.....	77
III.2. INTRODUCCIÓN.....	79
III.3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	82
III.3.1. Muestreo y Aislamiento de <i>Sclerotium rolfsii</i>	82
III.3.2. Colección de aislados.....	84
III.3.3. Determinación de grupos de compatibilidad micelar.....	84
III.4. RESULTADOS.....	85
III.5. DISCUSIÓN.....	91
III.6. LITERATURA CITADA.....	97
CAPÍTULO IV: DIVERSIDAD MOLECULAR EN POBLACIONES DE <i>Sclerotium rolfsii</i> PROCEDENTES DE REMOLACHA AZUCARERA DE SIEMBRA OTOÑAL EN REGIONES DE CLIMA MEDITERRÁNEO Y USO DE SECUENCIAS GÉNICAS PARA LA CARACTERIZACIÓN DE GCMs.....	101
IV.1. RESUMEN.....	103
IV.2. INTRODUCCIÓN.....	104
IV.3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	107
IV.3.1. Aislados fúngicos y Grupos de compatibilidad micelar.....	107

IV.3.2. Extracción de ADN.....	108
IV.3.3. Amplificaciones por PCR.....	110
IV.3.4. Análisis de los perfiles RFLPs-ITS.....	112
IV.3.5. Secuenciación de ADN.....	113
IV.3.6. Análisis de datos.....	113
IV.4. RESULTADOS.....	115
IV.4.1. Análisis RFLP-ITS.....	115
IV.4.2. Análisis de las secuencias nucleotídicas de las regiones parciales de los genes <i>EF1α</i> y <i>RPB2</i> de <i>S. rolfsii</i>	119
IV.4.3. Análisis filogenético de las secuencias nucleotídicas de las regiones parciales de los genes <i>EF1α</i> y <i>RPB2</i> en <i>S. rolfsii</i>	124
IV.5. DISCUSIÓN.....	126
IV.6. LITERATURA CITADA.....	133
CAPÍTULO V: DIVERSIDAD PATOGENICA EN POBLACIONES DE <i>Sclerotium rolfsii</i> CAUSANTES DE PODREDUMBRE BLANCA EN REMOLACHA AZUCARERA DE SIEMBRA OTOÑAL EN REGIONES DE CLIMA DE TIPO MEDITERRÁNEO.....	139
V.1. RESUMEN.....	141
V.2. INTRODUCCIÓN.....	142
V.3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	145
V.3.1. Especies huésped.....	145
V.3.2. Diseño experimental.....	146

V.3.3. Inóculo de <i>Sclerotium rolfsii</i> y Condiciones para la inoculación y crecimiento de las plantas.....	148
V.3.4. Evaluación de la enfermedad y Análisis de datos.....	148
V.4. RESULTADOS.....	152
V.5. DISCUSIÓN.....	161
V.6. LITERATURA CITADA.....	164
CAPÍTULO VI: DISCUSIÓN GENERAL Y CONCLUSIONES.....	169
VI.1. DISCUSIÓN GENERAL.....	171
VI.2. CONCLUSIONES.....	179
Bibliografía General.....	183

ÍNDICE DE FIGURAS

CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN GENERAL Y OBJETIVOS	1
Fig. I.1 Distribución geográfica de <i>Sclerotium rolfsii</i> . El patógeno está presente en el área comprendida entre los 45° de latitud Norte-Sur (señalada en rojo).....	6
Fig. I.2 Síntomas causados por <i>Sclerotium rolfsii</i> : A , Plantas de pimiento, B , plantas de tomate (Fuente: J.P. Jones para www.apsnet.org) y C , plantas de remolacha mostrando síntomas de marchitez; D , Lesiones en la base del tallo en planta de pimiento; E , Lesiones en la base del tallo en planta de manzano (Fuente: J. Mullen para www.apsnet.org); F , Hoja de higuera con mancha foliar y micelio de <i>S. rolfsii</i> (Fuente: G. W. Simone para www.apsnet.org); G , Superficie del fruto del tomate extensamente colonizada por el hongo como consecuencia del contacto del fruto con suelo infestado (Fuente: J. Mullen para www.apsnet.org) y H , de la raíz de remolacha azucarera colonizado por micelio de <i>S. rolfsii</i> y esclerocios de nueva formación; I , Esclerocios maduros de <i>S. rolfsii</i> (Fuente: North Carolina State University).....	8
Fig. I.3 Morfología de <i>Sclerotium rolfsii</i> : A , Crecimiento de <i>S. rolfsii</i> en condiciones controladas sobre agar patata dextrosa y B , formación de esclerocios; C , Tinción de hifas de <i>S. rolfsii</i> con 4', 6-Diamidino-2-fenilindol diclorhidrato (DAPI): A) anastomosis entre hifas; HP) hifa primaria; HS) Hifas secundarias; D , Conexión en argolla (C) en hifas primarias teñidas con DAPI; E , Estructuras basidiales de <i>Athelia rolfsii</i> : B) basidio; BS) basidiosporas; Es) esterigmas (Fuente: Z.K. Punja para www.apsnet.org).....	11
Fig. I.4 Ciclo vital de <i>Sclerotium rolfsii</i> en manzano. El ciclo es similar para otras especies susceptibles anuales como cacahuete, tomate, pimiento o remolacha (Fuente: Vickie Brewster para www.apsnet.org).	15
Fig. I.5 Reacciones de incompatibilidad (A y C) y compatibilidad (B y D) entre aislados de <i>Sclerotium rolfsii</i> a nivel macroscópico (A y B) y microscópico (C y D) (Fuente: Punja & Grogan, 1983b).....	24
Fig. I.6 Producción de remolacha azucarera en los principales países productores en el mundo en 2009 (FAOSTAT, 2011).....	31
Fig. I.7 Avances de la tasa de producción (A) y la superficie cosechada (B) para 2011 correspondientes a los dos tipos de cultivo de remolacha azucarera que se practican en España. (Fuente: MARM, 2011).....	32
Fig. I.8 Evolución de la superficie cultivada de remolacha azucarera de siembra otoñal en España en los últimos 10 años. (Fuente: MARM, 2011).....	33

Fig. I.9	Ciclo de enfermedad de <i>Sclerotium rolfsii</i> en cultivos de remolacha azucarera de siembra otoñal.....	37
	CAPÍTULO II: OPTIMIZACIÓN DE UN MEDIO DE CULTIVO QUE INTENSIFICA LA FORMACIÓN DE LA ZONA DE AVERSIÓN EN LAS REACCIONES MICELIARES ENTRE AISLADOS DE <i>Sclerotium rolfsii</i>.....	49
Fig. II.1	Reacciones de compatibilidad en auto-enfrentamientos entre colonias del mismo aislado de <i>Sclerotium rolfsii</i> (Sr-419) en diferentes medios de cultivo y concentraciones de colorante alimenticio rojo: A , medio agar patata dextrosa (APD) sin colorante; B , medio de Patterson enmendado con 90 µl/l de colorante.....	59
Fig. II.2	Reacciones miceliarias entre los aislados de <i>Sclerotium rolfsii</i> Sr-167, Sr-401 y Sr-431 en diferentes medios de cultivo enmendados con 180 µl/l de colorante alimenticio rojo en placas de Petri incubadas a 25±1°C durante 5 días en oscuridad, vistas desde la superficie de la colonia (columna izquierda) o desde el reverso (columna derecha). A, B : agar patata dextrosa (APD); C, D : medio de Patterson estándar (MP); E, F : MP suplementado con 25% de glucosa (23,4 g/l final); G, H : MP suplementado con 37,5% de glucosa (25,9 g/l final); I, J : MP suplementado con 50% de glucosa (28,4 g/l final). Las reacciones en la zona de interacción consistieron en una línea de menor densidad de micelio en la superficie de la colonia y una línea roja en el reverso de la colonia de diferente intensidad en función del medio de cultivo utilizado.....	62
Fig. II.3	Intensidad de antagonismo en las reacciones miceliarias entre los aislados de <i>Sclerotium rolfsii</i> Sr-167, Sr-401 y Sr-431 en diferentes medios de cultivo incubados a 25±1°C en oscuridad durante 5 (columna izquierda) o 10 días (columna derecha). A, B : agar patata dextrosa (APD); C, D : medio de Patterson estándar (MP); E, F : MP suplementado con 25% de glucosa (23,4 g/l final); G, H : MP suplementado con 37,5% de glucosa (25,9 g/l final); I, J : MP suplementado con 50% de glucosa (28,4 g/l final). Estos medios de cultivo se suplementaron con 0, 90 o 180 µl/l de colorante alimenticio rojo. La intensidad del antagonismo se determinó en el reverso de la placa de Petri de acuerdo a una escala de 0-3, donde: 0= no antagonismo; 1= aversión leve (zona de antagonismo <1 mm de amplitud); 2= aversión moderada (1-2 mm de amplitud); 3= aversión intensa (>2 mm de amplitud). Cada barra representa la frecuencia de enfrentamientos en cada uno de los tres niveles de la escala de intensidad de antagonismo.....	64
Fig. II.4	Índices medios de intensidad de la zona de aversión para las reacciones miceliarias entre los aislados de <i>Sclerotium rolfsii</i> Sr-167, Sr-401 and Sr-431 sobre diferentes medios de cultivo (A), concentraciones de colorante alimenticio rojo (B) y tiempo de incubación a 25±1°C en oscuridad (C). Las líneas verticales representan los intervalos de confianza del 95% para los índices	

	medios. En cada panel, barras con diferentes letras indican la existencia de diferencias significativas entre los valores medios de los diferentes tratamientos experimentales ($P < 0.05$, ajuste: Tukey). Medios de cultivo: APD, agar patata dextrosa; MP, medio de Patterson estándar; MP-25, MP suplementado con 25% de glucosa (23,4 g/l final); MP-37, MP suplementado con 37,5% de glucosa (25,9 g/l final); MP-50, MP suplementado con 50% de glucosa (28,4 g/l final).....	65
Fig. II.5	Disminución en el valor medio de intensidad de la reacción en la zona de aversión con respecto al medio de cultivo MP-25. Los asteriscos indican una reducción significativa ($P < 0.05$, ajuste: Tukey) en los valores medios de índice de intensidad en la zona de aversión de cada uno de los tratamientos respecto a los estimados para el medio MP-25. Medios de cultivo: APD, agar patata dextrosa; MP, medio de Patterson estándar; MP-25, MP suplementado con un 25% de glucosa (23,4 g/l final); MP-37, MP suplementado con un 37,5% de glucosa (25,9 g/l final); MP-50, MP suplementado con un 50% de glucosa (28,4 g/l final).....	65
Fig. II.6	Intensidad del antagonismo en las reacciones miceliales entre los aislados de <i>Sclerotium rolfsii</i> Sr-167, Sr-395, Sr-401, Sr-419 y Sr-431 en el medio de cultivo de Patterson modificado con un 25% de glucosa (23,4 g/l final) y enmendado con 180 μ l/l de colorante alimenticio rojo incubados a $25 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 5 a 10 días en oscuridad. La intensidad del antagonismo se determinó en el reverso de la colonia siguiendo la escala de 0-3, donde: 0= no antagonismo; 1= aversión leve (zona de antagonismo < 1 mm de amplitud); 2= aversión moderada (1-2 mm de amplitud); 3= aversión intensa (> 2 mm de amplitud). Cada barra representa la frecuencia de enfrentamientos en cada uno de los tres niveles de la escala de intensidad de antagonismo.....	66
Fig. II.7	Reacciones miceliales entre aislados de <i>Sclerotium rolfsii</i> . A, B: anastomosis hifal entre los aislados compatibles Sr-167 y Sr-407. Las flechas señalan los puentes de anastomosis en la imagen A y los núcleos (n) durante su migración a lo largo de ellos durante la fusión en la imagen B (x400). C: Muerte de células hifales de los aislados incompatibles Sr-167 y Sr-431. Las flechas señalan los extremos de las hifas mostrando degeneración celular. Los aislados de <i>S. rolfsii</i> se cultivaron sobre portaobjetos incubados a $25 \pm 1^\circ\text{C}$ en oscuridad durante 2-4 días y teñidos con el fluorocromo de unión a ADN DAPI (4', 6-Diamidino-2-fenilindol diclorhidrato) (x1000). Las imágenes se tomaron usando un microscopio de epifluorescencia Nikon Microphot-FXA equipado con el filtro UV-2A.....	68

CAPÍTULO III: IDENTIFICACIÓN DE GRUPOS DE COMPATIBILIDAD MICELIAR EN POBLACIONES DE <i>Sclerotium rolfsii</i> INFECTANDO CULTIVOS DE REMOLACHA AZUCARERA DE SIEMBRA OTOÑAL EN REGIONES DE CLIMA MEDITERRÁNEO.....	75
Fig. III.1 Parcelas de remolacha azucarera intensamente muestreadas en Andalucía: A , esquema del área de muestreo, 640 m ² ha, dividida en 80 cuadrantes de 4x2 m; B , plantas sintomáticas marcadas en cada cuadrante para el seguimiento de las epidemias de Podredumbre blanca y la posterior toma de muestras de plantas afectadas.....	82
Fig. III.2 Interacción miceliar entre aislados de <i>Sclerotium rolfsii</i> en el medio modificado de Patterson (Capítulo II de esta Tesis Doctoral): A y B , reacciones incompatibles (diferentes GCMs); C y D , reacciones compatibles (mismo GCM). Las flechas indican las zonas de antagonismo.....	86
Fig. III.3 Distribución geográfica de los grupos de compatibilidad miceliar (GCM) identificados a partir de aislados de <i>Sclerotium rolfsii</i> infectando remolacha azucarera en (A) la Península Ibérica (España y Portugal), (B) Italia y (C) Chile.....	89
Fig. III.4 Distribución esquemática de los grupos de compatibilidad miceliar (GCM) de <i>Sclerotium rolfsii</i> en las seis parcelas intensamente muestreadas en Andalucía con más de un GCM y los índices de diversidad de Shannon-Weaver (H') para cada una de ellas. El área muestreada (640 m ²) fue dividida en 80 cuadrantes de 4x2 m, excepto en Lebrija donde el área muestreada fue de 320 m ² y se subdividió en 40 cuadrantes de 4x2 m.....	91
 CAPÍTULO IV: DIVERSIDAD MOLECULAR EN POBLACIONES DE <i>Sclerotium rolfsii</i> PROCEDENTES DE REMOLACHA AZUCARERA DE SIEMBRA OTOÑAL EN REGIONES DE CLIMA MEDITERRÁNEO Y USO DE SECUENCIAS GÉNICAS PARA LA CARACTERIZACIÓN DE GCMs.....	 101
Fig. IV.1 Esquema de las regiones amplificadas para: A , el ADN ribosómico (ITS1-5.8S-ITS2) con los cebadores ITS1/ITS4 (White et al., 1990); B , el gen <i>RPB2</i> que codifica para la segunda subunidad mayor de ARN polimerasa II con los iniciadores b6.9F/b11R1 (Matheny et al., 2006a); y C , el gen <i>EF1α</i> codificante del factor de elongación de la transcripción 1-alfa con los cebadores 595F/1160R (Wendland & Kothe, 1997). Los números indican las secuencias exónicas de cada gen, las flechas bajo los cebadores el sentido de la amplificación de cada uno de ellos y en pares de bases (pb) aparece la longitud total de los amplicones obtenidos.....	111

- Fig. IV.2** Patrones de bandas RFLP-ITS obtenidos para las enzimas *AluI* (A1 y A2), *HpaII* (H1 y H2), *RsaI* (R1 y R2) y *MboI* (M1, M2 y M3) en aislados de *Sclerotium rolfsii* y *S. delphinii*, en geles “ReadyAgarose™ Wide-Mini” al 3% teñidos con bromuro de etidio en tampón TAE 1X. A la derecha de cada imagen, se indica de forma esquemática el tamaño en pares de bases (pb) de cada una de las bandas generadas para cada una de las enzimas..... 117
- Fig. IV.3** Dendrograma inferido mediante análisis UPGMA (“unweighted pair group method using arithmetic averages”) usando el coeficiente de Dice (tolerancia = 1,1%; optimización = 0,9%) basado en la combinación de los perfiles de polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLPs) generados con las enzimas *MboI* (M1, M2, M3), *AluI* (A1), *HpaII* (H1) y *RsaI* (R1) para los 34 aislados representativos de todas las combinaciones posibles de grupo de compatibilidad miceliar (GCM) x localidad. Se indica el GCM, el grupo RFLP-ITS de cada aislado y el tamaño de las bandas generadas. En cada nodo se indican los valores de remuestreo..... 118
- Fig. IV.4** Dendrogramas inferidos mediante el método “complete linkage” en Bionumerics v.6.0 para las secuencias de las regiones parciales del gen *EF1 α* (A) que codifica para el factor de elongación de la transcripción 1-alpha y del gen *RPB2* (B) codificante de la segunda subunidad mayor de la ARN polimerasa II, de los 34 aislados de *Sclerotium rolfsii* representando a todas las combinaciones posibles de grupo de compatibilidad miceliar (GCM) x localidad. En la figura se muestra el árbol óptimo generado tras 1,000 repeticiones indicando en cada nodo la distancia entre secuencias. Las etiquetas para cada aislados indican: GCM / código de referencia / Localidad / País..... 121
- Fig. IV.5** Dendrograma obtenido mediante el método “complete linkage” en Bionumerics v.6.0 para las secuencias de las regiones parciales del gen *EF1 α* que codifica para el factor de elongación de la transcripción 1-alpha y del gen *RPB2* codificante de la segunda subunidad mayor de la ARN polimerasa II, de los 34 aislados de *Sclerotium rolfsii* representando a todas las combinaciones posibles de grupo de compatibilidad miceliar (GCM) x localidad. En la figura se muestra el árbol óptimo generado tras 1,000 repeticiones indicando en cada nodo la distancia entre secuencias. Las etiquetas para cada aislados indican: GCM / código de referencia / Localidad / País..... 123
- Fig. IV.6** Árbol más probable obtenido mediante análisis de Máxima-Parsimonia basado en las posiciones nucleotídicas variables de las secuencias de las regiones parciales del gen *EF1 α* que codifica para el factor de elongación de la transcripción 1-alpha y del gen *RPB2* codificante de la segunda subunidad mayor de la ARN polimerasa II para los 34 aislados de *Sclerotium rolfsii* representando a todas las combinaciones posibles de grupo de compatibilidad miceliar GCM x localidad con idénticas secuencias de nucleótidos. En las ramas del árbol se indica la longitud de las mismas y el valor re muestreo “bootstrap” >50% para un total de 1,000 repeticiones obtenidos en Bionumerics v.6.1..... 126

CAPÍTULO V: DIVERSIDAD PATOGENICA EN POBLACIONES DE <i>Sclerotium rolfsii</i> Sacc. CAUSANTES DE PODREDUMBRE BLANCA EN REMOLACHA AZUCARERA DE SIEMBRA OTOÑAL EN REGIONES DE CLIMA DE TIPO MEDITERRÁNEO.....	139
Fig. V.1 Diseño experimental: A , plantas creciendo en cámaras de cultivo. Cada combinación experimental de aislado <i>Sclerotium rolfsii</i> y especie de planta huésped constó de 8 repeticiones (alveolos) con una planta por alveolo; B , matraz Erlenmeyer conteniendo 100 g de semillas de avena y 50 ml de agua desionizada tras ser esterilizado en autoclave a 121 °C durante 20 min.; y C , síntomas de Podredumbre blanca y muerte de plántulas en girasol causadas por <i>S. rolfsii</i>	151
Fig. V.2 Reacción de enfermedad de 11 especies huésped a la infección por 12 aislados representativos de grupos de compatibilidad miceliar (GCMs) de <i>Sclerotium rolfsii</i> : A , Número de especies huésped para las cuales cada GCMs es patogénico; y B , Número de GCMs que son patogénicos en cada una de las especies huésped. Especies huésped: Al=algodón, Br=brócoli, Gb=garbanzo, Gr=girasol, Ml=melón, Mz=maíz, Pm=pimiento, Rm=remolacha azucarera, Sn=sandía, To=tomate y Tr=trigo.....	153
Fig. V.3 Dendrograma mostrando los resultados del análisis de agregación para las reacciones de enfermedad tras la infección de los 12 aislados representativos de los grupos de compatibilidad miceliar (GCMs) de <i>Sclerotium rolfsii</i> (A) sobre ocho especies huésped (B). Se llevó a cabo un análisis de agrupación jerárquica basado en la matriz de correlación de Spearman entre GCMs o entre especies huésped, respectivamente utilizando el método de Ward. Los grupos funcionales de GCMs se estimaron en base al valor gráficos de silueta de acuerdo al estadístico de Mantel. Especies huésped: Al=algodón, Br=brócoli, Gb=garbanzo, Gr=girasol, Pm=pimiento, Rm=remolacha azucarera, Sn=sandía, y To=tomate.....	154
Fig. V.4 Gráfico de doble entrada que muestra el resultado de los análisis de máxima verisimilitud para las reacciones de enfermedad tras la infección de los 12 aislados representativos de los grupos de compatibilidad miceliar (GCMs) de <i>Sclerotium rolfsii</i> agrupados en cinco grupos-GCM (eje-x) sobre ocho especies huésped (eje-y) agrupadas en los grupos-especie 1 (A) y 2 (B). Los grupos funcionales de GCMs se estimaron en base al valor gráficos de silueta de acuerdo al estadístico de Mantel. Especies huésped: Al=algodón, Br=brócoli, Gb=garbanzo, Gr=girasol, Pm=pimiento, Rm=remolacha azucarera, Sn=sandía, y To=tomate. Para cada grupo-especies, grupos-GCM o especies huésped seguidos de una letra diferente, se indica diferencias significativas ($P < 0,05$) en los valores medios de incidencia de enfermedad. Grupos-GCM con un asterisco indica una incidencia de enfermedad significativamente superior ($P < 0,05$) de dicho grupo-GCM en el grupo-especies 1 comparada con la alcanzada en el grupo-especies 2.....	157

Fig. V.5 Gráfico de doble entrada que muestra el resultado de los análisis de máxima verisimilitud para las reacciones de enfermedad de plantas de girasol (Gr), sandía (Sn) y tomate (To) (eje-x) a la infección de 23 aislados de *Sclerotium rolfsii* representativos de cinco de los grupos de compatibilidad miceliar (GCMs) (eje-y) de *Sclerotium rolfsii* más prevalentes identificados en esta Tesis Doctoral. Los aislados evaluados incluyeron 12 pertenecientes al GCM i, cuatro al GCM iii, tres al GCM v y dos aislados de cada uno de los GCMs vi y xii. Los aislados subrayados corresponden al aislado tipo de cada GCM empleado en los experimentos I y II. Para cada GCM, los aislados seguidos por una letra diferente indican diferencias significativas entre ellos en los valores de incidencia de enfermedad ($P < 0,05$). Los aislados seguidos de un asterisco mostraron diferencias significativas con respecto al aislado tipo ($P < 0,05$)..... 159

ÍNDICE DE TABLAS

CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN GENERAL Y OBJETIVOS.....	1
Tabla. I.1 Comparación de criterios utilizados para la adecuación de las diferentes técnicas de análisis molecular empleadas en estudios de diversidad genética entre poblaciones de <i>Sclerotium rolfsii</i> : polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLPs), polimorfismos de ADN amplificados por iniciadores simples aleatorios (RAPDs) y polimorfismos en la longitud de los fragmentos amplificados (AFLPs). (Fuente: Mueller & Wolfenbarger, 1999).....	28
CAPÍTULO II: OPTIMIZACIÓN DE UN MEDIO DE CULTIVO QUE INTENSIFICA LA FORMACIÓN DE LA ZONA DE AVERSIÓN EN LAS REACCIONES MICELIARES ENTRE AISLADOS DE <i>Sclerotium rolfsii</i>.....	49
CAPÍTULO III: IDENTIFICACIÓN DE GRUPOS DE COMPATIBILIDAD MICELIAR EN POBLACIONES DE <i>Sclerotium rolfsii</i> INFECTANDO CULTIVOS DE REMOLACHA AZUCARERA DE SIEMBRA OTOÑAL EN REGIONES DE CLIMA MEDITERRÁNEO.....	75
Tabla. III.1 Origen geográfico y grupo de compatibilidad miceliar (GCM) de los 459 aislados de <i>Sclerotium rolfsii</i> infectando plantas de remolacha azucarera utilizados en este estudio.....	87
CAPÍTULO IV: DIVERSIDAD MOLECULAR EN POBLACIONES DE <i>Sclerotium rolfsii</i> PROCEDENTES DE REMOLACHA AZUCARERA DE SIEMBRA OTOÑAL EN REGIONES DE CLIMA MEDITERRÁNEO Y USO DE SECUENCIAS GÉNICAS PARA LA CARACTERIZACIÓN DE GCMs.....	101
Tabla. IV.1 Origen geográfico, grupo de compatibilidad miceliar (GCM), perfil de polimorfismo en la longitud del fragmento de restricción (RFLP) y código de los aislados representativos de todas las combinaciones posibles de GCM x localidad y número de acceso en GenBank para las regiones génicas del factor de elongación de la transcripción 1-alfa (<i>EF1 α</i>) y la segunda subunidad mayor de la ARN polimerasa II (<i>RPB2</i>) para los aislados de <i>Sclerotium rolfsii</i> y <i>S. delphinii</i> utilizados en este estudio	109

Tabla. IV.2	Secuencias nucleotídicas de los cebadores utilizados para la amplificación en aislados de <i>Sclerotium rolfsii</i> de las regiones correspondientes al ADN ribosómico (ADNr) y a los genes <i>RPB2</i> , que codifica para la segunda subunidad mayor de ARN polimerasa II, y <i>EF1α</i> , codificante del factor de elongación de la transcripción 1-alfa.....	112
Tabla. IV.3	Matriz de similitud calculada mediante el coeficiente de similitud “fast algorithm” entre las secuencias “tipo” de los aislados representativos de los grupos de compatibilidad miceliar (GCMs) de <i>Sclerotium rolfsii</i> y <i>S. delphinii</i> para las regiones específicas amplificadas de los genes del factor de elongación de la transcripción 1-alfa (<i>EF1 α</i>) y la segunda subunidad mayor de la ARN polimerasa II (<i>RPB2</i>).....	120
CAPÍTULO V: DIVERSIDAD PATOGENICA EN POBLACIONES DE <i>Sclerotium rolfsii</i> Sacc. CAUSANTES DE PODREDUMBRE BLANCA EN REMOLACHA AZUCARERA DE SIEMBRA OTOÑAL EN REGIONES DE CLIMA DE TIPO MEDITERRÁNEO.....		139
Tabla. V.1	Relación de especies huésped evaluadas en esta investigación frente a la inoculación con aislados representativos de los 12 grupos de compatibilidad miceliar de <i>Sclerotium rolfsii</i>	146
Tabla. V.2	Estadísticos del análisis de máxima verosimilitud del efecto de grupos de grupos de compatibilidad miceliar (grupos-GCMs) de <i>Sclerotium rolfsii</i> en la incidencia de Podredumbre blanca en grupos de especies huésped (grupos-especies).....	155
Tabla. V.3	Estadísticos del análisis de máxima verosimilitud del efecto de grupos de grupos de compatibilidad miceliar (grupos-GCM) de <i>Sclerotium rolfsii</i> en la incidencia de Podredumbre blanca en dos grupos de especies huésped (grupos-especies).....	157
Tabla. V.4	Estadísticos del análisis de máxima verosimilitud del efecto de variabilidad patogénica entre aislados de <i>Sclerotium rolfsii</i> pertenecientes a diferentes grupos de compatibilidad miceliar (GCMs).....	160

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN GENERAL Y OBJETIVOS

I.1. INTRODUCCIÓN GENERAL

La Fitopatología es una ciencia cuyo objetivo final consiste en reducir o evitar en lo posible las pérdidas económicas o de rendimiento que ocasionan las enfermedades en los cultivos agrícolas. Es una ciencia integradora de múltiples disciplinas, cuyo desarrollo se enfrenta en la actualidad a las nuevas formas de producción determinadas por una Agricultura Productivista que, en general, han supuesto un aumento en el número y severidad de las enfermedades que afectan a los cultivos. Así, la comparación de las estimaciones de pérdidas realizadas por Cramer (1967) y las últimas disponibles a nivel mundial realizadas por Oerke (2006), indican que los niveles de pérdidas en los cultivos debidas a las enfermedades no solo no han disminuido, sino que incluso se han incrementado ligeramente, lo que demuestra que a pesar de los avances científicos y tecnológicos que se han producido durante estos años, los métodos desarrollados para la protección de los cultivos todavía no son suficientemente eficaces para reducir la magnitud de estas pérdidas, que es el objetivo final de la Fitopatología (Jiménez-Díaz et al., 2003).

La Agricultura Sostenible es un nuevo concepto de Agricultura, situado entre la Productivista y la Ecológica, cuya puesta en práctica debe conducir al desarrollo de sistemas biológicos eficientes, caracterizados por mantener altos niveles de producción mediante la utilización de insumos naturales internos y en los que el uso excesivo de insumos materiales sea sustituido por su utilización eficiente basada en el conocimiento científico y técnico (Jiménez-Díaz, 1998). En este contexto, para el control de las enfermedades en cultivos de plantas es necesario, por tanto, poseer un adecuado conocimiento de la biología de los agentes fitopatógenos y de la epidemiología de las enfermedades que provocan para poder diseñar medidas y estrategias de control más adecuadas y eficientes (Jiménez-Díaz et al., 2003).

I.1.1. *Sclerotium rolfsii* Sacc.

I.1.1.1. Importancia, Gama de huéspedes y Distribución geográfica

Importancia

Sclerotium rolfsii Sacc. es un hongo de suelo necrotrofo facultativo con gran capacidad de crecimiento saprofítico, agente causal de enfermedades de gran significación para la producción agrícola por la magnitud de las pérdidas que ocasionan y la dificultad para combatirlas eficientemente (Aycock, 1966; Punja, 1985). A dicha dificultad contribuyen de forma significativa varios factores como son: a) una amplia gama de plantas cultivadas y no cultivadas susceptibles al patógeno; b) la extensa distribución geográfica de éste; y c) su capacidad de persistir prolongadamente en el suelo mediante la formación de esclerocios. Así, a pesar de los sucesivos esfuerzos de investigación que se han llevado a cabo sobre este hongo desde que fue descrito por Rolfs en 1892 (Rolfs, 1893) en tomate (*Solanum lycopersicum* L.), las enfermedades causadas por *S. rolfsii* continúan siendo de las de más difícil manejo en numerosos cultivos agrícolas.

El valor de las pérdidas económicas y de rendimiento en los cultivos afectados por *S. rolfsii* no se ha cuantificado con precisión, aunque se estima que es elevado. *Sclerotium rolfsii* puede ocasionar desde daños poco severos hasta la pérdida total de las cosechas dependiendo del huésped y las condiciones ambientales. No obstante, se ha señalado a *S. rolfsii* como responsable del 5% de las pérdidas totales de las cosechas en el sur de EE.UU. (Aycock, 1966), del 5 al 10% de las pérdidas en cacahuete (*Arachis hypogea* L.) en Alabama, EE.UU. (Sturgeon, 1986), del 40% en caupí (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) en Benín, Sudáfrica (Adandonon et al., 2005), o del 50% de la producción de remolacha azucarera (*Beta vulgaris* L.) en algunos puntos del sur de España (AIMCRA, 2004).

Gama de huéspedes

La gama de plantas susceptibles a *S. rolfsii* es inusualmente amplia. Sin embargo, la heterogeneidad de resultados entre la gran diversidad de referencias de literatura disponibles, unida a la inestabilidad en cuanto a la denominación taxonómica que ha recibido este hongo desde que fue descrito, contribuyen a que el número de huéspedes sea difícil de determinar de forma precisa. No obstante, Aycock (1966) publicó una amplia lista de plantas susceptibles a *S. rolfsii* que sigue siendo de obligada referencia y que incluye hasta 100 familias y 500 especies de plantas distintas, de las cuales la inmensa mayoría son Angiospermas Dicotiledóneas con hasta 75 familias descritas, principalmente Leguminosas, 86 especies, y Compuestas, 70 especies. También se incluyen Angiospermas Monocotiledóneas, siendo las más abundantes Gramíneas y Liliáceas, y tres especies de Gimnospermas. La particular incidencia de infecciones de *S. rolfsii* en especies de Leguminosas puede ser atribuible a la importancia económica de éstas y a que sean cultivadas extensamente a nivel mundial, ya que por el momento no se ha descrito especialización patogénica alguna de *S. rolfsii* en especies de estas familias.

Entre los cultivos susceptibles a *S. rolfsii* de mayor interés agrícola destacan alfalfa (*Medicago sativa* L.), algodón (*Gossypium* spp. L.), altramuz (*Lupinus* spp.), arroz (*Oryza sativa* L.), banana (*Musa x paradisiaca* L.), cacahuete, café (*Coffea* spp.), caña de azúcar (*Saccharum officinarum* L.), haba (*Vicia faba* L.), melón (*Cucumis melo* L.), patata (*Solanum tuberosum* L.), pepino (*Cucumis sativus* L.), pimiento (*Capsicum annuum* L.), remolacha azucarera, soja (*Glycine max* (L.) Merr.), tomate y zanahoria (*Daucus carota* L.).

Distribución geográfica

La distribución geográfica de *S. rolfsii* abarca prácticamente todas las zonas mundiales de producción agrícola ya que ha sido descrito en

zonas comprendidas entre los 45° de latitud Norte y Sur (Fig. I.1), si bien, es en áreas templadas y tropicales donde es más frecuente debido a que su desarrollo y supervivencia se ven favorecidos por la coincidencia de altas temperaturas con elevada humedad. Así, este hongo es común en países de África, América Central y del Sur, en Australia, Chile, India, Japón y sur de EE.UU., así como en países de la Cuenca Mediterránea, aunque también ha sido descrito en el norte de EE.UU., norte de China e incluso en Siberia (Rusia) (Aycock, 1966; Punja, 1985).

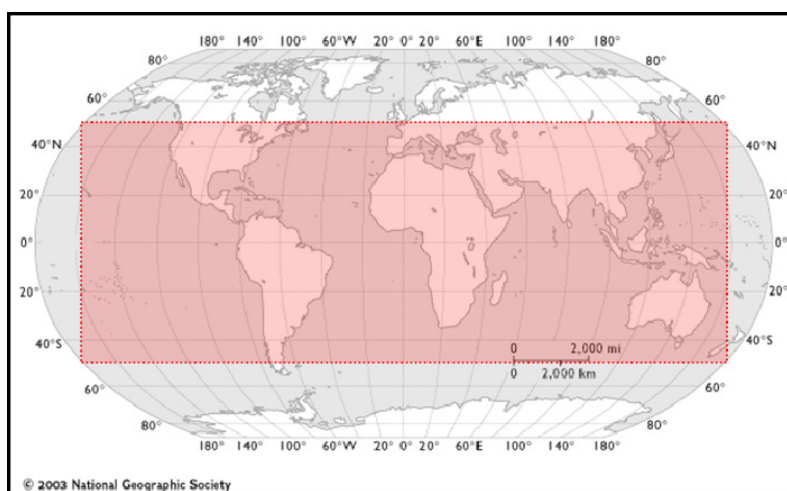


Figura I.1. Distribución geográfica de *Sclerotium rolfsii*. El patógeno está presente en el área comprendida entre los 45° de latitud Norte-Sur (señalada en rojo).

I.1.1.2. Sintomatología

La amplia gama de especies de plantas susceptibles a *S. rolfsii* determina que los síntomas que presentan sean muy diversos. No obstante, en plantas afectadas, los primeros síntomas observables suelen ser la amarillez y marchitez de las hojas como resultado de las lesiones que se producen inicialmente en la raíz y/o base del tallo una vez que éstos han sido infectados (Fig. I.2A-E). Además, este hongo es capaz de infectar cualquier órgano del huésped incluyendo hojas, flores y frutos, siempre que éstos entren en contacto con el suelo infestado y que las condiciones ambientales sean favorables (Aycock, 1966) (Fig. I.2F, G). Síntomas similares, aunque de forma muy puntual, se han descrito en las hojas como consecuencia de la infección causada por las basidiosporas

dispersadas en el aire de manera activa (Almeida et al., 2001; Punja & Grogan, 1983a). En los últimos estadios del proceso infectivo, se observa abundante micelio blanco en la superficie del suelo adyacente a la planta infectada y la formación de esclerocios cuya coloración vira de blanco a marrón oscuro a medida que maduran (Aycock, 1966; Punja, 1985) (Fig. I.2H, I).

Lesiones en la base del tallo y en el cuello de la raíz.

En plantas como tomate, cacahuete, pepino o pimiento se observan inicialmente lesiones en la base del tallo y en el cuello de la raíz previas a la pudrición del córtex localizada varios centímetros por encima y por debajo de la superficie del suelo (Fig. I.2D, E). Síntomas similares han sido descritos para otros patógenos causantes de podredumbre de raíces como *Fusarium* spp. o *Verticillium* spp. (Aycock, 1966; Benlloch, 1943). El tejido xilemático no siempre llega a degradarse por completo, lo que determina que el proceso infectivo no siempre resulte en la muerte de la planta o que plantas muertas permanezcan erectas.

Podredumbre de raíces

El progreso de la infección en el sistema radical de las plantas susceptibles es especialmente rápido cuando se trata de tejidos suculentos como en zanahoria o remolacha. En estos casos la enfermedad siempre comienza por la parte alta de la raíz y resulta en una pudrición blanda de todo el órgano con abundante micelio blanco en su superficie, que confiere una textura aterciopelada, y esclerocios en formación o ya maduros. Síntomas muy similares suelen presentar los tejidos bulbosos en narcisos (*Narcissus* spp.) o los tubérculos de la patata. En estos casos, la infección aparece como pequeñas lesiones circulares que conforme aumentan de tamaño colapsan el tejido infectado (Aycock, 1966) (Fig. I.2H).

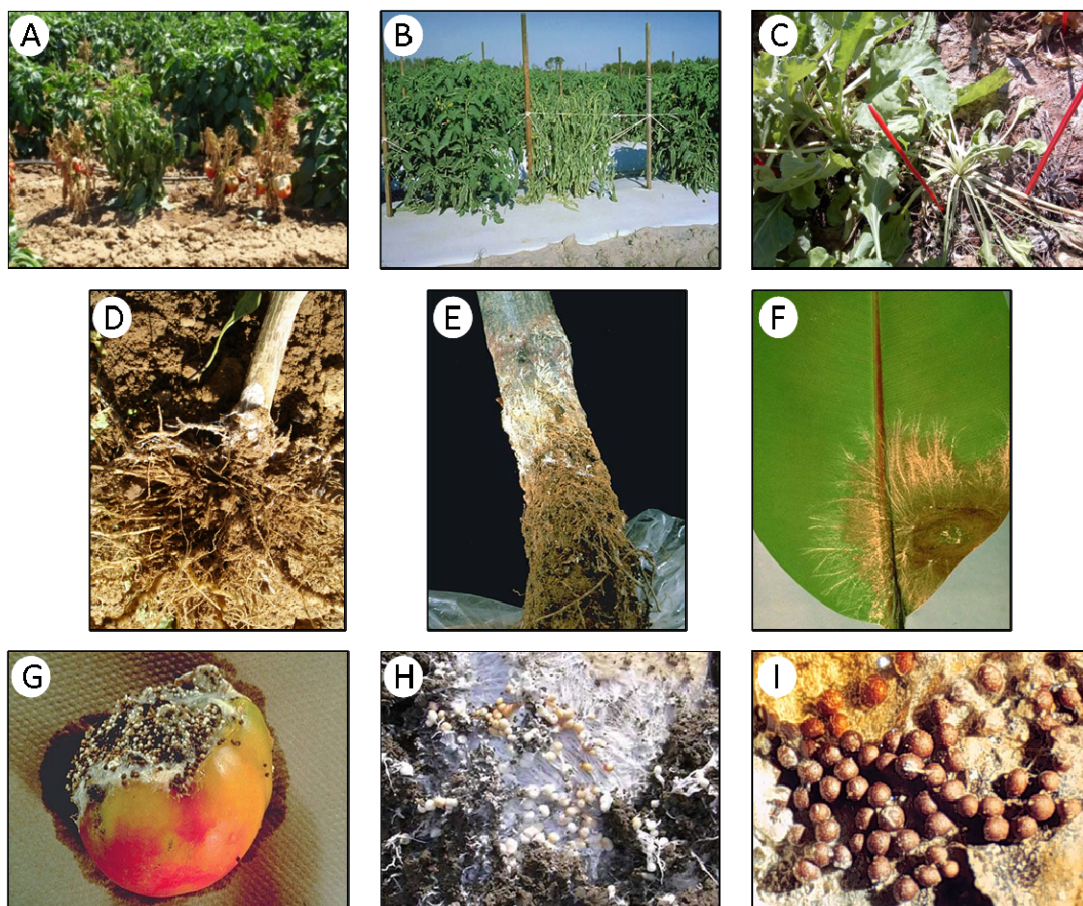


Figura I.2. Síntomas causados por *Sclerotium rolfsii*: **A**, Plantas de pimiento, **B**, plantas de tomate (Fuente: J.P. Jones para www.apsnet.org) y **C**, plantas de remolacha mostrando síntomas de marchitez; **D**, Lesiones en la base del tallo en planta de pimiento; **E**, Lesiones en la base del tallo en planta de manzano (Fuente: J. Mullen para www.apsnet.org); **F**, Hoja de higuera con mancha foliar y micelio de *S. rolfsii* (Fuente: G. W. Simone para www.apsnet.org); **G**, Superficie del fruto del tomate extensamente colonizada por el hongo como consecuencia del contacto del fruto con suelo infestado (Fuente: J. Mullen para www.apsnet.org) y **H**, de la raíz de remolacha azucarera colonizada por micelio de *S. rolfsii* y esclerocios de nueva formación; **I**, Esclerocios maduros de *S. rolfsii* (Fuente: North Carolina State University).

I.1.1.3. Etiología: taxonomía, nomenclatura y morfología.

Taxonomía y nomenclatura

La primera referencia documentada sobre *S. rolfsii* se atribuye a Peter Henry Rolfs y data de 1892 (Rolfs, 1893) y concierne a su papel como agente causal de podredumbre de raíces en cultivos de tomate en Florida, EE.UU, provocando elevadas pérdidas económicas. Sin embargo la primera descripción del agente no tuvo lugar fue hasta 1911 (Saccardo,

1911) cuando se le asignó el nombre de *Sclerotium rolfsii*, reconociendo así los trabajos anteriores llevados a cabo por Rolfs. A este trabajo le siguieron numerosas descripciones de patógenos similares que recibieron diferentes denominaciones taxonómicas aun cuando aparentemente describían al mismo organismo, hecho que dio lugar a gran controversia (Aycock, 1966). A pesar de ello, la denominación más aceptada y que ha llegado a nuestros días ha sido *Sclerotium rolfsii* Sacc. Al desconocerse el estado perfecto o sexual del hongo, se incluyó inicialmente en el género *Sclerotium*, descrito inicialmente por Saccardo (1911) para agrupar a todos aquellos hongos que producían “micelio estéril” y esclerocios.

La fase sexual o teleomorfo de *S. rolfsii* ha sido descrita en raras ocasiones en condiciones naturales, de hecho, se desconoce quién la observó por primera vez. Sí parece claro que la primera descripción en un medio de cultivo es atribuible a Goto (1930) y que posteriores trabajos de Curzi (1932) hicieron que se denominara como *Corticium rolfsii*. Posteriormente, el teleomorfo fue descrito como *Pellicularia rolfsii* (Sacc.) comb. nov. por West (1947) y como *Botryobasidium rolfsii* (Sacc.) comb. nov. por Venkatarayan (1950). En la actualidad, la nomenclatura aceptada para el teleomorfo de *S. rolfsii* es la propuesta por Tu y Kimbrough (1975) como *Athelia rolfsii* (Curzi) Tu & Kimbrough, reconociendo los trabajos previos de Curzi.

La posición taxonómica de *A. rolfsii* ha variado a medida que se han ido resolviendo las relaciones filogenéticas entre los diferentes taxones dentro de la división Basidiomycota. Así, Hibbett et al. (2007) llevaron a cabo una extensa revisión de la clasificación taxonómica del reino de los hongos basada en los estudios de secuencias génicas realizados hasta esa fecha y que permitió reorganizar los taxones establecidos así como describir nuevos grupos en todos los niveles taxonómicos. En base a este trabajo y al posterior de Binder et al. (2010) que profundizan en el estudio de la subclase Agaricomycetidae, podemos establecer la siguiente posición taxonómica para *A. rolfsii*:

Reino: Fungi

División: Basidiomycota

Subdivisión: Agaricomycotina

Clase: Agaricomycetes

Subclase: Agaricomycetidae

Orden: Amylocorticiales

Familia: Atheliaceae

Género: *Athelia*

Especie: *A. rolfsii*

El anamorfo es el estado en que este patógeno se presenta comúnmente en condiciones naturales, de ahí que el nombre de *S. rolfsii* haya sido utilizado de forma más general en lugar de *A. rolfsii* para referirse a este hongo en la literatura fitopatológica y es la que se utilizará en esta Tesis Doctoral.

Morfología

Lo más característico de *S. rolfsii* es la formación de abundante micelio aéreo blanco y la producción de esclerocios como estructura de supervivencia, tanto en condiciones naturales como de laboratorio (Fig. I.3A, B). El crecimiento o desarrollo miceliar se produce de forma rápida ya que una colonia en cultivo sobre medio sintético, por ejemplo agar patata dextrosa (APD), es capaz de alcanzar los 9 cm de diámetro en 3-4 días de incubación a 25°C con la formación de abundante micelio aéreo.

Las hifas de *S. rolfsii* son hialinas, de pared celular delgada, con formación de septos y un gran número de ramificaciones. Esto ha dado lugar a que se diferencien tres tipos de estructuras hifales. Las primarias o

hifas principales, de mayor diámetro (4,5-8 μm), con conexiones en argolla que dan lugar a las secundarias y terciarias, de menor diámetro (2-4,5 μm), y que además pueden anastomosar entre ellas (Icochea, 1966) (Fig. I.3C, D).

Los esclerocios tienden a ser esféricos (0,5-2 mm), formados lateralmente en hifas principales y donde se diferencian tres capas al madurar: una corteza exterior melanizada de dos a cuatro células de espesor, un córtex intermedio de seis a ocho células de espesor y una médula interior compuesta de hifas estrechamente entrelazadas entre sí (Punja, 1985). Los esclerocios de *S. rolfsii* son de color blanquecino en su formación y de color parduzco una vez maduros.

En el estado sexual o teleomorfo, *A. rolfsii*, se forman basidios libres que carecen de la protección que en otros basidiomicetos confiere el himenio. Los basidios son de forma ovalada y sobre ellos se forman cuatro basidiosporas haploides en los extremos de los esterigmas (Fig. I.3E).

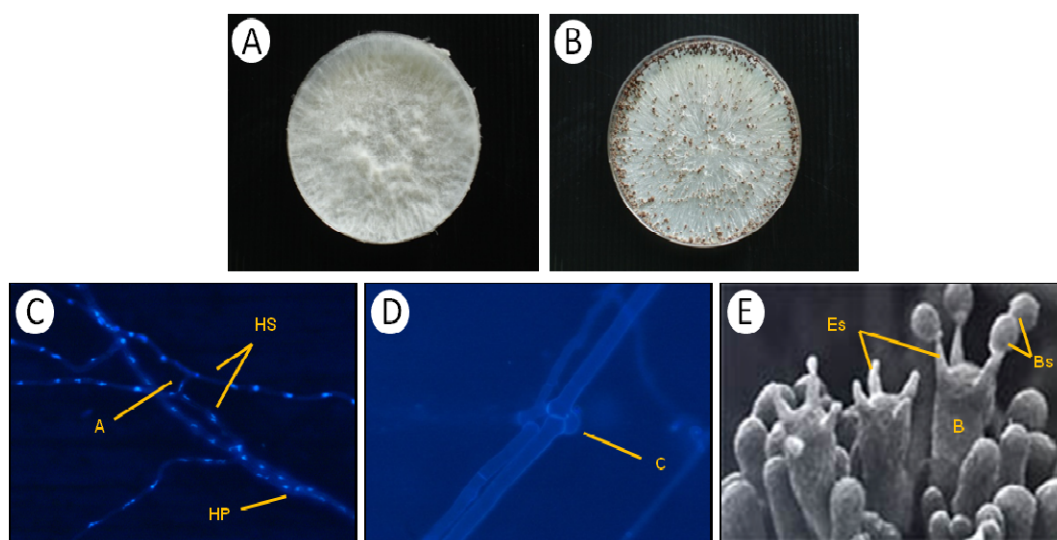


Figura I.3. Morfología de *Sclerotium rolfsii*: **A**, Crecimiento de *S. rolfsii* en condiciones controladas sobre agar patata dextrosa y **B**, formación de esclerocios; **C**, Tinción de hifas de *S. rolfsii* con 4', 6-Diamidino-2-fenilindol diclorhidrato (DAPI): A) anastomosis entre hifas; HP) hifa primaria; HS) Hifas secundarias; **D**, Conexión en argolla (C) en hifas primarias teñidas con DAPI; **E**) Estructuras basidiales de *Athelia rolfsii*: B) basidio; BS) basidiosporas; Es) esterigmas (Fuente: Z.K. Punja para www.apsnet.org).

I.1.1.4. Ciclo Vital y Patogénesis

Sclerotium rolfsii es capaz de persistir en el suelo prolongadamente en quiescencia fungistática mediante esclerocios que se forman en el ambiente natural cuando se reduce la disponibilidad del sustrato o tejido del huésped sobre el que vive el hongo, lo cual va unido normalmente a condiciones ambientales adversas, que permiten al patógeno sobrevivir y dispersarse (Aycock, 1966; Punja, 1985). Los esclerocios constituyen el inóculo primario en la mayoría de las epidemias causadas por *S. rolfsii*, si bien se ha descrito que las basidiosporas pueden llevar a cabo también esta función (Almeida et al., 2001; Punja & Grogan, 1983a) aunque su significación sea mínima en todo caso. Además, estas estructuras propician la dispersión activa del patógeno.

Germinación de los esclerocios y desarrollo miceliar

Un papel fundamental en el proceso de patogénesis lo constituye la germinación de los esclerocios, que puede ser de dos tipos, *hifal o eruptiva* (Punja & Grogan, 1981a), y que es determinada por el tipo de sustrato, la humedad, temperatura, presencia de compuestos volátiles, aireación o actividad de los microorganismos del suelo (Punja & Grogan, 1981b; Punja & Jenkins, 1984; Punja et al., 1984). La *germinación hifal* se caracteriza por el crecimiento individual de las hifas desde las células de la médula del esclerocio, dependiendo el desarrollo y crecimiento de las mismas, así como la capacidad de infectar tejidos susceptibles, de la disponibilidad de una fuente externa de nutrientes. Cuando las condiciones no son favorables, las hifas pueden detener su crecimiento y formar esclerocios secundarios de menor tamaño. Por el contrario, en la *germinación eruptiva* se produce la salida violenta de agregados hifales a través de la corteza del esclerocio que van a consumir los materiales almacenados en el interior para su desarrollo. Este micelio, a diferencia del originado por la germinación hifal, posee la capacidad de infectar los órganos de las plantas susceptibles sin requerimientos nutritivos externos (Punja & Grogan, 1981b).

Patogénesis y desarrollo de la enfermedad

La infección puede producirse en cualquier órgano de la planta siempre que las condiciones ambientales sean favorables, ya que no existe especialización del hongo por los diferentes órganos vegetales ya sean raíces, base de tallos, ramas, hojas, flores, frutos, etc. (Aycock, 1966).

El contacto de las hifas de *S. rolfsii* con la planta estimula la producción por éste de compuestos extracelulares, principalmente ácido oxálico y poligalacturonasas, que ocasionan la muerte de los tejidos vegetales previa a la penetración miceliar (Bateman & Beer, 1965). El ácido oxálico actúa secuestrando calcio de las paredes celulares para formar oxalato cálcico, acidificando los tejidos y generando un pH ácido óptimo para la actividad de las endopoligalacturonasas. La producción de otras enzimas extracelulares, principalmente celulasas (Bateman & Beer, 1965; Punja et al., 1985; Sellam et al., 1982; Van Etten & Bateman, 1969), así como la presión mecánica ejercida por los agregados miceliales en la superficie de los tejidos vegetales (Smith et al., 1986), parece que también juegan un papel importante en dicho proceso.

Se ha descrito igualmente la formación de estructuras especializadas de penetración o apresorios, como vía de entrada para las hifas de *S. rolfsii* en los tejidos susceptibles. Sin embargo, solo se han descrito en infecciones producidas por hifas procedentes de basidiosporas o sobre plántulas, donde la formación de apresorios va seguida de una aparente muerte celular y posterior penetración de las hifas (Higgins, 1927; Milthorpe, 1941; Smith et al., 1986).

El desarrollo miceliar de *S. rolfsii* dentro de la planta se produce tanto inter- como intracelularmente, sin penetrar en los elementos vasculares. A medida que progresa la infección, la actividad enzimática sigue siendo esencial, principalmente encargada de la degradación de las paredes celulares. En esta fase, además de la acción del ácido oxálico, intervienen fosfatasas contenidas en las vacuolas de las células hifales en crecimiento (Hänssler et al., 1975), así como peroxidasas segregadas por la acción enzimática de estas mismas células del hongo (Barnett, 1974),

produciéndose un aumento de su concentración en los tejidos del huésped. El rápido crecimiento de las hifas, así como la producción conjunta de la amplia gama de enzimas referidas, pueden explicar el amplio rango de plantas que *S. rolfsii* es capaz de infectar (Punja, 1985).

En general, transcurridos 2-4 días tras la infección aparecen los primeros síntomas, consistentes en lesiones en la base del tallo y/o marchitez foliar, tras lo cual, la enfermedad sigue desarrollándose hasta que los órganos afectados de las plantas infectadas por *S. rolfsii* presenten el aspecto típico de necrosis, maceración y pudrición. A continuación se diferencian los esclerocios en la superficie de dichos tejidos, pudiendo pasar posteriormente al suelo y permanecer en éste en estado latente y/o en ausencia de huéspedes durante largos periodos de tiempo hasta que las condiciones sean de nuevo favorables para germinar y llevar a cabo un nuevo ciclo de infección. *Sclerotium rolfsii* también puede persistir en el suelo en forma de micelio sobre materia orgánica muerta. En algunos cultivos huésped se han descrito ciclos secundarios de infección en plantas susceptibles si se dan condiciones favorables de alta densidad de las mismas, elevada humedad, alta temperatura y disponibilidad de sustrato, y ocasionados por el crecimiento micelial subterráneo o superficial desde plantas afectadas a plantas sanas adyacentes (Aycock, 1966; Jordán-Ramírez et al., 2009; Smith et al., 1988).

Dispersión de inóculo

Al ser un hongo de suelo en el que la ocurrencia del estado teleomorfo, y por tanto la producción de basidiosporas con dispersión activa, rara vez ha sido descrita en condiciones naturales, se considera que la dispersión de *S. rolfsii*, y en particular de los esclerocios que persisten en el suelo, es pasiva, y se debe principalmente a prácticas culturales tales como el laboreo, maquinaria contaminada o el agua de riego (Aycock, 1966). Además, se ha descrito que los esclerocios pueden dispersarse mediante material vegetal infectado y/o infestado (Aycock, 1966) y conservar su viabilidad tras el paso por el tracto digestivo de

ciertos animales, con lo que la dispersión se podría dar a mayor distancia por esta vía (Domsch et al., 1980; Leach & Mead, 1936).

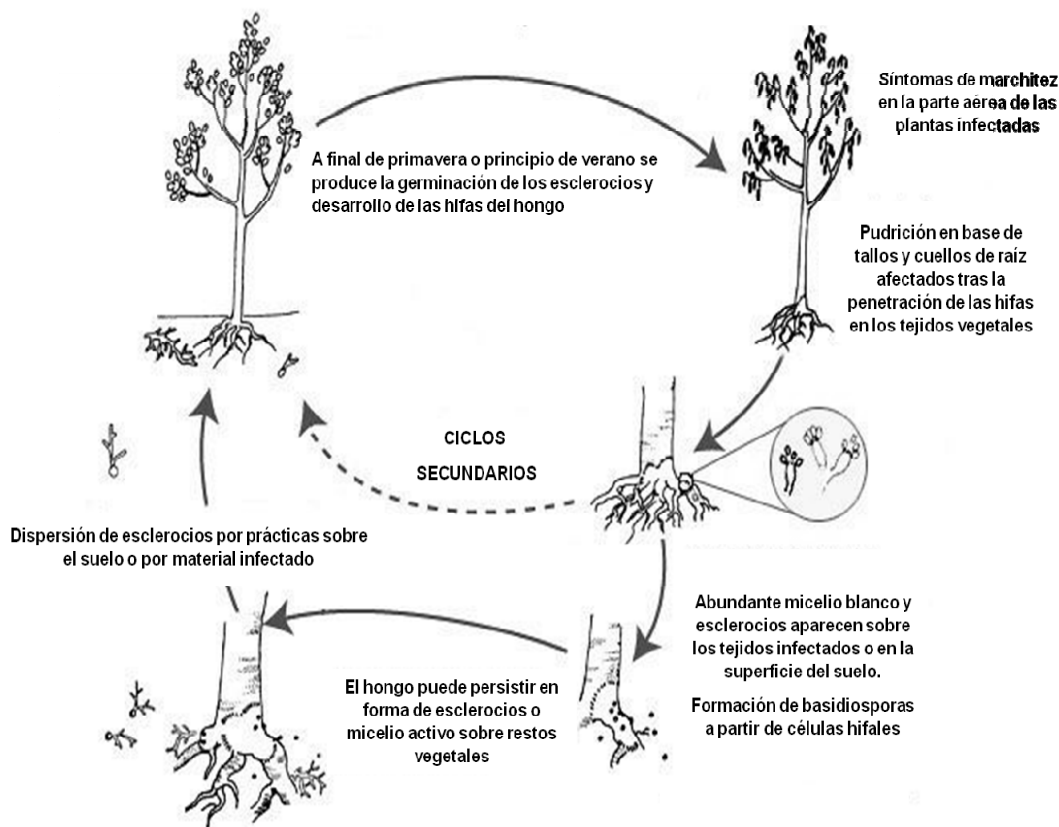


Figura I.4. Ciclo vital de *Sclerotium rolfsii* en manzano. El ciclo es similar para otras especies susceptibles anuales como cacahuete, tomate, pimiento o remolacha (Fuente: Vickie Brewster para www.apsnet.org).

I.1.1.5. Epidemiología

Distribución y densidad de inóculo

El éxito de la infección de un órgano vegetal de un huésped susceptible por parte de los esclerocios de *S. rolfsii* es determinado en gran medida por la densidad y distribución de éstos en los suelos infestados. Sin embargo, la correcta determinación de estas dos variables

es compleja y depende de diversos factores, entre ellos el tamaño de la muestra, el patrón espacial seguido en los muestreos o del proceso de extracción de los esclerocios empleado (Punja et al., 1985). Para la extracción y cuantificación de inóculo viable de *S. rolfsii* en el suelo se han propuesto varios métodos: a) extracción por tamizado húmedo (Punja et al., 1985); b) cribado-flotación (Rodríguez-Kábana et al., 1974); y c) enmienda de suelo con metanol (Backman et al., 1981). Investigaciones realizadas por López-Rivera (1996) demostraron la adecuación de los métodos de cribado-flotación y enmienda de suelo con metanol para la estimación esclerocios viables de *S. rolfsii* en suelos de textura muy diversa precedente de diferentes zonas remolacheras del sur de España.

Los propágulos de los patógenos de suelo siguen, en general, una *distribución* no aleatoria además de presentar un patrón de agregación similar al de las plantas enfermas (Truscott & Gilligan, 2001) que se atribuye a su baja capacidad de dispersión y a prácticas culturales, como el agua de riego o el laboreo, que lleven consigo desplazamientos de suelo. Un patrón similar de distribución siguen los esclerocios de *S. rolfsii* en suelos naturalmente infestados (Rodríguez-Kábana et al., 1974; Shew et al., 1984), en donde el 80% de ellos están ubicados en los 15 cm superiores del perfil del suelo y menos del 2% a más de 30 cm de profundidad (Jauch, 1976).

Una vez completada la fase de supervivencia de *S. rolfsii* en el suelo mediante esclerocios, la extensión del crecimiento micelial desde esclerocios germinados, y por tanto su capacidad para infectar una planta susceptible, está influida por el tipo de germinación eruptiva o hifal de éste y la presencia de compuestos volátiles, tejidos vegetales en descomposición, y disponibilidad de nutrientes (Punja & Grogan, 1981b). La distancia a la que se encuentren los esclerocios de *S. rolfsii* de la superficie del huésped también determinará el éxito o fracaso de los procesos de infección primaria. Gilligan (1985) propuso el término 'patozona' para definir al área circundante al órgano vegetal susceptible desde la cual un propágulo del patógeno puede causar infección. Este concepto es similar al de rizosfera con la salvedad de que frecuentemente

se extiende más allá de la zona de influencia de la raíz, en particular, en aquellos patógenos que no requieren de la estimulación del huésped para germinar y en los que la extensión de la patozona depende de su capacidad de competencia saprofítica. En consecuencia, el perfil de la patozona estará definido por tres componentes elementales: i) la capacidad germinativa del inóculo; ii) el crecimiento del mismo hasta el huésped; y iii) el efecto neto de la susceptibilidad del huésped y la capacidad infectiva del patógeno (Gilligan & Bailey, 1997).

En *S. rolfsii*, el cálculo de la distancia óptima a la que deben localizarse los propágulos del hongo de la superficie del huésped para causar infección es muy complejo, ya que depende de un gran número de factores de naturaleza tanto biótica, como el tipo de germinación, eruptiva o hifal, de los esclerocios (Punja & Grogan, 1981a), la microflora presente en el suelo (Punja, 1986a) y el nivel de susceptibilidad del huésped (Punja, 1985), como abiótica, con la profundidad a la que se encuentran los esclerocios, la humedad y la textura del suelo, o la presencia de abonados nitrogenados o compuestos volátiles (Punja et al., 1984; Punja, 1986b).

La *densidad* de esclerocios de *S. rolfsii* en el suelo está directamente relacionada con el nivel de incidencia de la enfermedad (Backman et al., 1981), sin embargo, para la estimación correcta de la cantidad inicial de esclerocios que contribuyen al inicio de la enfermedad, hay que considerar tanto el momento como la localización del muestreo del suelo, para que sea cercano en el tiempo a la siembra del cultivo y en el espacio a la disposición del huésped en la parcela de cultivo (Punja, 1985).

Factores que influyen en el crecimiento, producción y germinación de esclerocios, y desarrollo de enfermedad

El intervalo de *temperatura* en el que los esclerocios de *S. rolfsii* en el suelo pueden causar infección en un huésped susceptible es muy amplio, si bien, el óptimo se encuentra entre los 25-30°C. Temperaturas inferiores a 20°C y superiores a 36°C limitan el crecimiento del hongo y por tanto la

severidad de las enfermedades causadas por él (Lal et al., 1997; Punja & Jenkins, 1984). Los esclerocios no sobreviven a temperaturas inferiores a 0°C (Punja & Rahe, 1992), lo cual limita la distribución del patógeno a zonas con inviernos templados. Su germinación es óptima a 21-30°C y mínima a temperaturas inferiores a 15°C y superiores a 36°C (Punja, 1985).

La *humedad* del suelo es asimismo determinante para el desarrollo del patógeno. De este modo, el óptimo de germinación de los esclerocios ocurre entre un potencial mátrico de 0 y -1 bar (Punja & Jenkins, 1984), aunque también pueden germinar a niveles muy inferiores, de hecho, *S. rolfsii* puede infectar semillas de soja y arroz a un nivel de humedad del suelo mucho menor de la que necesitan las semillas para germinar (Epps et al., 1951). Por otro lado, si las demás condiciones no son adecuadas para la germinación, la supervivencia de los esclerocios se reduce con alta humedad en el suelo. Al 90-100% de la capacidad de campo los esclerocios no sobreviven tras 45-60 días, estando el óptimo de supervivencia entre 30 y 50% de aquella (Khati et al., 1983). Igualmente, se reduce el crecimiento micelial con el incremento de humedad en el suelo (Punja, 1985).

Los períodos de *fluctuación de humedad y temperatura* pueden incrementar significativamente la incidencia de las enfermedades causadas por *S. rolfsii*, ya que ciclos sucesivos de desecación y humectación estimulan la germinación de los esclerocios (Punja & Grogan, 1981b; Smith, 1972). En consecuencia, será en la superficie del suelo, donde los esclerocios están más expuestos a estas fluctuaciones y donde se encuentran en mayor cantidad (ver apartado anterior), donde se desarrollen más comúnmente las infecciones iniciales por *S. rolfsii*.

Las prácticas culturales que faciliten el contacto del inóculo con la superficie del huésped, así como la rotación de cultivos con huéspedes altamente susceptibles, también elevarán la incidencia de enfermedad (Aycocock, 1966).

La presencia de *sustrato orgánico*, por ejemplo hojas senescentes, pueden favorecer el crecimiento micelial de *S. rolfsii* y, por tanto, el desarrollo de la enfermedad (Beute & Rodríguez-Kábana, 1979b). En este sentido, la utilización de métodos orientados a prevenir la defoliación en cacahuete resultó, sin embargo, en un incremento de la incidencia de enfermedad causada por *S. rolfsii* (Shew & Beute, 1984). Los autores postularon entonces que la prevención de la defoliación generó unas condiciones micro-ambientales en la cubierta intacta del cultivo que favorecieron el desarrollo de la enfermedad, o bien que los fungicidas foliares empleados pudieron haber reducido los niveles de posibles antagonistas en el suelo.

Los *compuestos volátiles*, principalmente alcoholes y aldehídos, estimulan la germinación de los esclerocios y aceleran la tasa de crecimiento micelial en *S. rolfsii* (Punja et al., 1984). Sin embargo, el papel de estos compuestos en el inicio de las epidemias no ha podido ser determinado con claridad, ya que no se ha demostrado su efecto en el suelo a concentraciones biológicamente activas (Punja, 1985). Sí se ha descrito que su efecto sobre la germinación de los esclerocios puede ser directo, afectando a actividades enzimáticas, a la permeabilidad de las membranas celulares o actuando como reguladores metabólicos (Beute & Rodríguez-Kábana, 1979a; Fries, 1973), o bien indirecto, modificando las actividades de microorganismos residentes en el suelo (Gilbert & Linderman, 1971; Linderman & Gilbert, 1969). Por el contrario, la exposición prolongada o a altas concentraciones de estos compuestos puede resultar tóxica para el hongo (Fries, 1973; Linderman & Gilbert, 1969).

Los *productos químicos* no diana para el patógeno pueden tener asimismo efecto sobre la incidencia final de la enfermedad. Este efecto, sin embargo, no siempre ocurre en la misma dirección ya que se han descrito niveles de incidencia más elevados tras la aplicación de ciertos fungicidas (Backman et al., 1975; Shew & Beute, 1984) o menores tras aplicaciones de insecticidas (Backman & Hammond, 1981) o nematicidas (Rodríguez-Kábana et al., 1975).

I.1.1.6. Variabilidad de las poblaciones de *Sclerotium rolfsii*

Los caracteres más estudiados entre los aislados de *S. rolfsii* han sido los *morfológicos*, atendiendo a la tasa de crecimiento micelial, el tipo de micelio y el número, tamaño, forma, peso y color de los esclerocios producidos (Milthorpe, 1941; Punja & Grogan, 1983a, b; Serra & Silva, 2005; Sharma et al., 1991), y los *fisiológicos*, basados en las respuestas del crecimiento micelial, la germinación de esclerocios o la producción de compuestos químicos esenciales en los procesos infectivos, a distintos factores bióticos o abióticos (Epps et al., 1951; Griffin & Nair, 1968; Higgins, 1927; Kritzman et al., 1977; Mathur & Sarbhoy, 1976). Sin embargo, ninguno de estos caracteres ha permitido establecer las diferencias necesarias entre aislados del hongo que permitan caracterizar sus poblaciones o resolver la estructura de las mismas.

El estudio de las poblaciones de *S. rolfsii* toma un nuevo impulso cuando se considera al hongo como de reproducción estrictamente asexual al constatarse que el estado reproductivo sexual, *A. rolfsii*, aun pudiendo ser inducido en condiciones de laboratorio, se observa muy esporádicamente en condiciones naturales (Punja & Grogan, 1983b). En España, no existe constancia de que haya sido descrito hasta el momento. Este hecho sugeriría la predominancia de una **estructura clonal** en las poblaciones naturales del patógeno y asumiría que el flujo de información genética entre los componentes de las mismas solo se producirá a través de la compatibilidad vegetativa. Este fenómeno ya fue descrito por Nakata (1925a, b) o Epps et al. (1951), sin embargo, no fue hasta 1983 cuando Punja y Grogan demostraron que se pueden establecer puntos de unión o puentes de anastomosis entre las hifas de los aislados de *S. rolfsii*, así como que al enfrentar aislados procedentes de diferente origen geográfico o huésped, se podía producir una reacción de aversión entre ellos en la zona de unión. En consecuencia, los aislados de *S. rolfsii* cuyas colonias durante el proceso de crecimiento vegetativo podían fusionarse, empiezan a considerarse compatibles y a asignarse a un mismo **Grupo de Compatibilidad Micelial (GCM)**.

En menor medida se ha estudiado la *variabilidad patogénica* de aislados de *S. rolfsii* en huéspedes susceptibles a pesar de mostrar un elevado grado de variación (Adandonon et al., 2005; Flores-Moctezuma et al., 2006). Así, se han descrito diferentes niveles de severidad de enfermedad inducidos por los aislados estudiados en base al huésped (Adandonon et al., 2005) o al área geográfica (Flores-Moctezuma et al., 2006) del que fueron obtenidos.

Estudio de los Grupos de Compatibilidad Miceliar en hongos (GCM)

La compatibilidad miceliar es uno de los eventos que ocurren durante la compatibilidad somática o vegetativa, definida como la capacidad que manifiestan dos aislados de fusionar sus hifas y formar un heterocarionte estable donde diferentes núcleos comparten un único citoplasma (Worral, 1997). Este fenómeno ha sido muy estudiado en ascomicetos y deuteromicetos, donde se definen *grupos de compatibilidad vegetativa* (GCVs) al poder detectarse la formación de heterocariontes mediante mutantes naturales auxótrofos en la utilización de nitrato capaces de crecer en medios selectivos solo si se produce la compatibilidad somática y la migración de los núcleos entre los aislados (Leslie, 1993; Worral, 1997). En basidiomicetos, por el contrario, el criterio más común para evaluar la compatibilidad somática ha sido el estudio de los *grupos de compatibilidad miceliar* (GCMs) (Worral, 1997) que no requiere de dichos mutantes. Estos grupos, establecidos macroscópicamente, son una evidencia indirecta del fenómeno, ya que las reacciones de incompatibilidad se caracterizan típicamente por la formación de una zona de antagonismo en la unión de las colonias de los aislados enfrentados, caracterizada a su vez por una línea, a menudo pigmentada si se utilizan medios de cultivo adecuados (Kohn et al., 1990), o por una menor densidad de micelio entre ellas.

El fenómeno de la incompatibilidad somática entre aislados de la misma especie o cercanas entre sí, se ha convertido en una herramienta muy útil en estudios taxonómicos, de identificación o poblacionales, así

como en aquellos estudios que se centran en las relaciones genéticas en y/o entre especies (Singleton et al., 1992).

Así, en el estudio de poblaciones de hongos fitopatógenos, los GCMs se consideran válidos para determinar el nivel de variabilidad intraespecífica existente en ellas (Singleton et al., 1992; Leslie, 1993) ya que este carácter genético juega un papel destacado tanto en el intercambio de material celular entre aislados, como a la hora de preservar la identidad genética de los mismos impidiendo el intercambio de material nuclear, citoplásmico o de elementos extracromosómicos (Caten, 1972). Además, se considera que los individuos pertenecientes a GCMs distintos, estarán genéticamente aislados entre sí, constituyendo una estructura clonal que podrían diferir en muchas características incluyendo las morfológicas, fisiológicas, patogénicas o de virulencia (Milgroom, 1996).

El estudio de la variabilidad genética mediante grupos de compatibilidad está muy extendido en diferentes grupos de hongos, siendo las especies más estudiadas a partir de la ocurrencia de éstos en sus poblaciones, especies de basidiomicetos como *Sclerotium cepivorum* (Earnshaw & Boland, 1997), *Rhizoctonia solani* Kuhn (Adams, 1988; Carling et al., 2002; Ciampi et al., 2009; Kuninaga et al., 1997), o de ascomicetos como *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) De Bary (Kohn et al., 1991; Schafer & Kohn, 2006; Malvarez et al., 2007), *Cryphonectria parasitica* (Murrill) Barr (Powel, 1995; Erincik et al., 2011), *Fusarium* spp. (Ploetz & Correll, 1988; Chulze et al., 2000; Bayraktar et al., 2010) o *Verticillium dahliae* Kleb. (Collado-Romero et al., 2006; Dobinson et al., 1998; Korolev et al., 2000).

Grupos de Compatibilidad Miceliar en *Sclerotium rolfsii*

Las investigaciones de Punja y Grogan en 1983 (b) fueron pioneras a la hora de agrupar los aislados de *S. rolfsii* en GCMs. Posteriormente, Punja (1988) propuso una metodología estandarizada para determinar si diferentes aislados eran compatibles o incompatibles entre sí, y ser así

asignados a GCMs. Brevemente, esta metodología consiste en la utilización de placas de Petri conteniendo el medio de cultivo agar patata dextrosa (APD), en las que se colocan enfrentados pequeños discos de micelio de dos, tres o cuatro aislados diferentes, separados 40 mm entre sí, e incubados durante 4-7 días a 27-30°C en oscuridad. Las reacciones de incompatibilidad se distinguen por la formación de un espacio libre de micelio en la zona de interacción entre los aislados (Fig. I.5A), formándose una “zona de antagonismo”, mientras que en el caso de la compatibilidad se produciría un continuo entre las colonias (Fig. I.5B). A nivel microscópico, el fenómeno que determina la incompatibilidad entre los aislados es la lisis de las células hifales en la zona de contacto entre aislados (Fig. I.5C) mientras que en reacciones de compatibilidad se observan fusiones perfectas entre hifas (Fig. I.5D). Esta metodología, y en particular el medio de cultivo sobre el que se realizan los enfrentamientos, se ha seguido empleando en los trabajos sucesivos a la hora de determinar los GCMs entre los aislados *de S. rolfsii* estudiados (Harlton et al., 1995; Cilliers et al., 2000). En el estudio de otros patógenos, en cambio, la rápida, fiable y reproducible determinación de la zona de antagonismo, ha sido optimizada mediante la adición en el medio de cultivo de colorante alimenticio rojo, que permite distinguir una línea roja intensa en la zona de interacción entre dos aislados incompatibles. Esta modificación fue descrita por primera vez por Khon et al. (1991) para *Sclerotinia sclerotiorum* (Libert) de Bary.

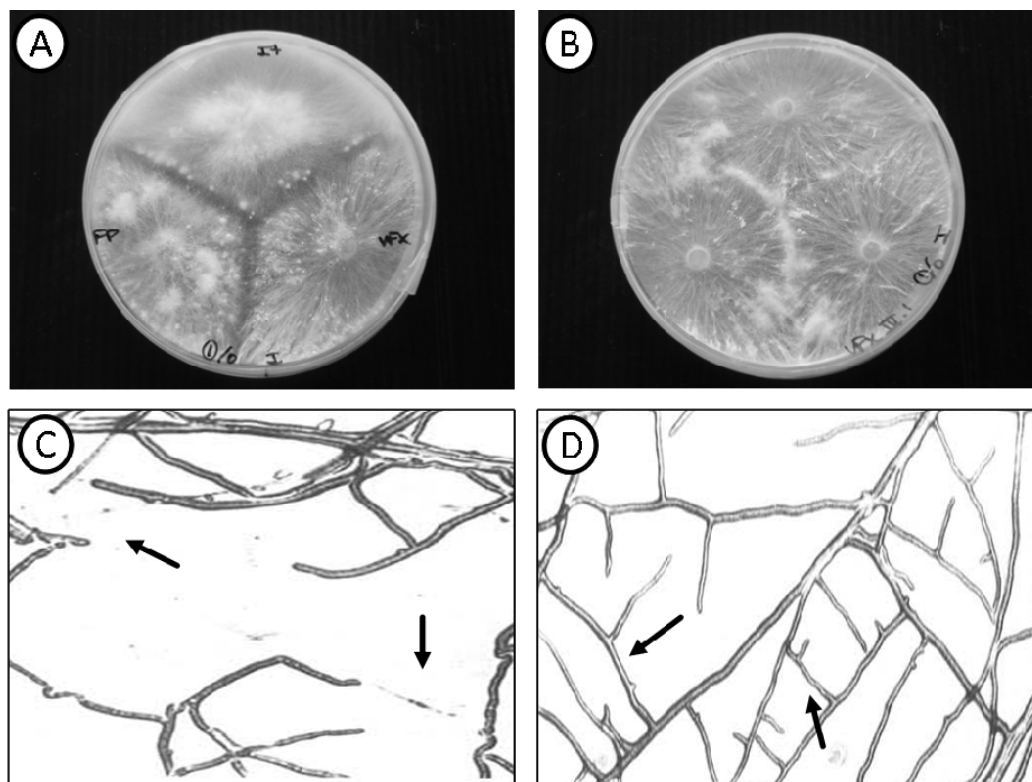


Figura 1.5. Reacciones de **incompatibilidad (A y C)** y **compatibilidad (B y D)** entre aislados de *Sclerotium rolfsii* a nivel macroscópico (A y B) y microscópico (C y D) (Fuente: Punja & Grogan, 1983b).

Variabilidad Genética de las poblaciones de Sclerotium rolfsii y principales técnicas moleculares empleadas para su estudio

En *S. rolfsii*, los estudios mediante el análisis de GCMs se han dirigido a determinar la variabilidad intra- e interespecífica de los mismos, así como a entender la estructura de sus poblaciones. Varios autores han señalado que los aislados de *S. rolfsii* pertenecientes a un mismo GCM son genéticamente más similares entre sí que con respecto a aislados encuadrados en diferentes GCMs (Almeida et al., 2001; Cilliers et al., 2000; Harlton et al., 1995; Nalim et al., 1995; Okabe et al., 1998; Okabe & Matsumoto, 2000; Punja & Sun, 2001), sin embargo, la variabilidad encontrada entre aislados de ciertos grupos y la falta de marcadores que identifiquen y caractericen a éstos de forma inequívoca, han impedido que se puedan caracterizar adecuadamente la estructura de sus poblaciones.

La ocurrencia de los GCMs en *S. rolf sii* puede reflejar la amplia gama de huéspedes susceptibles que posee este patógeno así como la amplia distribución que presenta a nivel mundial, ya que se ha podido identificar con frecuencia un mismo GCM entre aislados procedentes de diferente huésped y/o área geográfica (Almeida et al., 2001; Cilliers et al., 2000; Punja & Sun, 2001). Por el contrario, también existen evidencias de que ciertos GCMs están asociados con el origen geográfico de los aislados (Harlton et al., 1995; Nalim et al., 1995; Okabe et al., 1998). Del mismo modo, se ha podido constatar una gran variabilidad o número de GCMs en una misma área geográfica, lo que indicaría que en las distintas subpoblaciones se están produciendo múltiples introducciones de aislados procedentes de diferentes zonas infestadas que se establecen en forma de nuevos GCMs (Cilliers et al., 2000; Nalim et al., 1995; Punja, 1985). Este hecho se ha atribuido en menor grado al papel que juegan las basidiosporas en la dispersión del patógeno (Punja, 1988).

En el estudio de los GCMs en *S. rolf sii*, las principales técnicas de análisis molecular empleadas están basadas en marcadores moleculares neutrales dirigidos a analizar el genoma completo o bien secuencias concretas de éste:

- *Polimorfismos en la Longitud de los Fragmentos de Restricción (RFLPs)* (Botstein et al., 1980). Revelan variabilidad en el ADN por diferencias en el número y/o longitud de los fragmentos generados tras el tratamiento con enzimas de restricción que reconocen sitios específicos de corte en secuencias de doble cadena. Esta variabilidad puede deberse a la presencia y/o ausencia de sitios de restricción que determinan el número de los fragmentos generados, o a inserciones o deleciones entre los sitios de corte que determinan la longitud de los mismos. Mediante esta técnica se puede analizar el genoma completo o bien secuencias concretas de éste amplificadas previamente por PCR (Higuchi et al., 1993). En *S. rolf sii*, se ha empleado esta técnica para el análisis polimórfico de la región espaciadora interna (ITS) del ADN ribosómico nuclear (ADNr) ITS1-5.8s-ITS2 (Harlton et al., 1995; Nalim et al., 1995; Okabe et al., 1998), que es la secuencia más utilizada en la actualidad para llevar a cabo estudios

relacionados con sistemática, filogenia e identificación en hongos a nivel de especie (Begerow et al., 2010). Los patrones RFLPs de la región ITS del ADNr evidencian cierta variabilidad entre los GCMs de *S. rolfsii*, sin embargo, tanto en colecciones de aislados de EE.UU. (Nalim et al., 1995) o de Japón (Okabe et al., 1998), como a nivel mundial (Harlton et al., 1995), los patrones de bandas aparecen con frecuencia en varios GCMs. Esta técnica sí consigue diferenciar con claridad entre aislados de *S. rolfsii* y *S. delphinii* Welch (Harlton et al., 1995; Nalim et al., 1995), especie muy cercana taxonómicamente y de caracteres morfológicos muy similares que con frecuencia dan lugar a errores en su identificación.

- *Polimorfismos de ADN Amplificados por Iniciadores Simples Aleatorios (RAPDs)* (Williams et al., 1990; Welsh & McClelland, 1990). El uso de cebadores de corta longitud y de secuencia nucleotídica arbitraria, se emplea en esta técnica para permitir su unión a regiones complementarias del genoma, generando así fragmentos amplificados por PCR que varían en número y longitud. La variabilidad entre los aislados analizados se determina por la presencia/ausencia de dichos fragmentos, y en caso de presencia, además, por la longitud de los mismos. Varios autores han empleado esta herramienta molecular para el análisis de las poblaciones de *S. rolfsii* (Almeida et al., 2001; Okabe & Matsumoto, 2000; Punja & Sun, 2001) identificando patrones de bandas que en su mayoría eran característicos de GCMs, si bien, otros eran comunes a varios de estos grupos, y sin relación con el huésped u origen geográfico de los aislados. Esta técnica permite detectar variabilidad intraespecífica en GCMs como consecuencia de mutaciones somáticas que se hayan podido producir en las distintas subpoblaciones del hongo (Punja & Sun, 2001) y, además, sugiere el origen clonal en aquellos otros GCM cuyos aislados comparten idénticos perfiles RAPD como consecuencia de la dispersión del hongo y del reciente establecimiento en un lugar geográfico determinado (Okabe & Matsumoto, 2000; Punja & Sun, 2001).

- *Polimorfismo en la Longitud de los Fragmentos Amplificados (AFLPs)* (Vos et al., 1995). Esta técnica combina los fundamentos de las dos anteriormente mencionadas con el objeto de analizar un mayor número de

loci independientes. A la especificidad, resolución y poder de muestreo de la digestión con enzimas de restricción, une la velocidad y practicidad de la detección de polimorfismos mediante PCR, sin necesidad de disponer de información previa del genoma a estudiar. En primer lugar, se trata el genoma completo con enzimas de restricción que van a cortar en los puntos donde reconozcan sitios de corte, de modo que a los extremos “romos” generados por dichas enzimas se ligarán adaptadores específicos. A continuación, se seleccionan los fragmentos diana mediante cebadores que reconocen específicamente a los adaptadores y que mediante PCR son amplificados. La especificidad de la reacción y, por tanto, la presión de selección sobre los fragmentos, es mayor si dichos cebadores se diseñan añadiendo nucleótidos específicos a su secuencia para obtener un número adecuado de fragmentos para ser analizados. La idoneidad de esta técnica para detectar un mayor número de polimorfismos entre aislados de especies fúngicas fue indicada inicialmente por Majer et al. en 1996, aunque no fue hasta el año 2000 cuando se aplicó para el análisis de poblaciones en *S. rolfsii*. Así, Cilliers et al. (2000) estudiando una colección de aislados del patógeno de Suráfrica, mostraron que el análisis de AFLPs es una herramienta adecuada para evaluar la variabilidad genética entre aislados y GCMs ya que los patrones de bandas obtenidos para los diferentes GCMs los diferenciaba entre sí, a la vez que permitía detectar variabilidad intraespecífica entre ellos.

Tabla I.1. Comparación de criterios utilizados para la adecuación de las diferentes técnicas de análisis molecular empleadas en estudios de diversidad genética entre poblaciones de *Sclerotium rolfsii*: polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLPs), polimorfismos de ADN amplificados por iniciadores simples aleatorios (RAPDs) y polimorfismos en la longitud de los fragmentos amplificados (AFLPs). (Fuente: Mueller & Wolfenbarger, 1999).

Criterio ^a	RFLP	RAPD	AFLP
Cantidad de información	Baja	Alta	Alta
Reproducibilidad	Alta	Variable	Alta
Significación de las diferencias genéticas	Alta	Moderada	Alta
Facilidad de uso y desarrollo	Difícil	Fácil	Moderada ^b
Tiempo empleado	Largo	Corto	Corto

^a Criterios establecidos por Karp & Edward (1997) .

^b El análisis de marcadores AFLP es fácil con la utilización de software informáticos o en electroforesis empleando geles de agarosa de baja resolución en lugar de geles de poliacrilamida que requiere de cierta experiencia en su utilización.

Estos marcadores moleculares serían válidos, además, para estimar caracteres importantes desde el punto de vista fitopatológico, como patogenicidad y virulencia, en hongos de reproducción estrictamente asexual, dado que en ellos el genoma completo está ligado de forma efectiva y es transmitido unitariamente entre generaciones dando lugar a que diferentes regiones del mismo compartan la misma historia evolutiva (Milgroom & Fry, 1997).

Otra aproximación al estudio de la variabilidad entre aislados de *S. rolfsii* se ha llevado a cabo con el análisis de *cromatografía líquida de alta resolución* o HPLC (Sarma et al., 2002) que ha permitido detectar tres tipos de compuestos, ácidos fenólicos, el ácido indol acético y el ácido oxálico, como indicadores de dicha variabilidad y cuya concentración en exudados de esclerocios, esclerocios, micelio, y filtrados de cultivos del hongo analizados, resultó ser diferencial entre dos aislados causantes de podredumbre de raíces y lesiones en la parte aérea, respectivamente.

I.1.2. LA PODREDUMBRE BLANCA DE LA REMOLACHA AZUCARERA DE SIEMBRA OTOÑAL.

I.1.2.1. El cultivo de la Remolacha Azucarera

La remolacha azucarera, *Beta vulgaris* L., es una planta de ciclo bianual perteneciente a la familia Chenopodiaceae. Durante el primer año el cultivo se caracteriza por presentar un abundante desarrollo foliar y tener una gran raíz pivotante y engrosada, que sirve como reservorio de nutrientes para la floración o “espigado” que se produce durante el segundo año, haciéndose la raíz fibrosa una vez que se han consumido sus reservas.

El cultivo de esta especie constituye la segunda fuente más importante de obtención de azúcar a nivel mundial tras el cultivo de la caña, con un 40% de la producción total de azúcar en el mundo (FAOSTAT, 2011).

Origen del cultivo

Las primeras citas sobre el uso de la remolacha provienen del siglo VIII a.C. en Babilonia, describiendo el aprovechamiento de hojas y raíces con fines medicinales y alimenticios. No fue hasta 1600 d.C. cuando se descubrieron elevadas concentraciones de sacarosa en raíces engrosadas de algunas variedades por parte de Olivier de Serres, y hasta 1747, cuando Marggraf consiguió extraer un 1,6% de azúcar en forma de cristales cuya naturaleza era la misma que la que provenía del jugo de la caña de azúcar (Zeven & Wet, 1982).

La primera industria azucarera-remolachera se gestó en Francia a principios del siglo XIX, cuando las guerras anglo-francesas impedían la llegada de azúcar de caña procedente de las colonias y su escasez animó a la obtención de azúcar a partir de una fuente alternativa como la remolacha. Así, en 1811 ya existían 32.000 ha de cultivo en Francia. El

desarrollo de esta industria hizo que a finales del siglo XIX existieran fábricas para la extracción de azúcar de remolacha en gran parte de Europa, Estados Unidos y Japón, y en consecuencia, que disminuyera progresivamente la producción de azúcar de caña frente a la obtenida de remolacha desde su completo monopolio a principios de siglo hasta el 34% en 1899. En la actualidad, esta cantidad alcanza el 40% del total de azúcar producido a nivel mundial (FAOSTAT, 2011).

En España, el cultivo de remolacha azucarera se inició en la provincia de Córdoba en 1878, y en 1882 se instaló la primera fábrica azucarera en Alcolea, Córdoba (Morillo-Velarde et al., 2003). Después, el cultivo se extendió con rapidez a Granada, y posteriormente a Málaga, el centro y norte de España, y a Cádiz. En la actualidad, el cultivo de remolacha azucarera forma ya parte de la cultura agrícola en España.

Distribución geográfica y Producción

El cultivo de la remolacha azucarera se encuentra ampliamente distribuido debido a la gran variedad de tipos de suelo en los que puede desarrollarse. La zona principal del cultivo se encuentra en los países de la Unión Europea (UE), con el mayor número de toneladas producidas, destacando Francia y Alemania como los mayores productores. Asimismo se dan importantes cotas de producción en Asia (Rusia y China), Estados Unidos, Egipto o Japón (Fig. 1.6). En España, la producción total de remolacha azucarera en 2009 fue de 4.225.400 t, y de 3.459.200 t en 2010 (datos provisionales, MARM, 2011), ocupando el décimo tercer puesto en el ranking de países productores a nivel mundial. Las previsiones para 2011 indican que habrá un aumento de la producción total del 7% (avances, MARM, 2011).

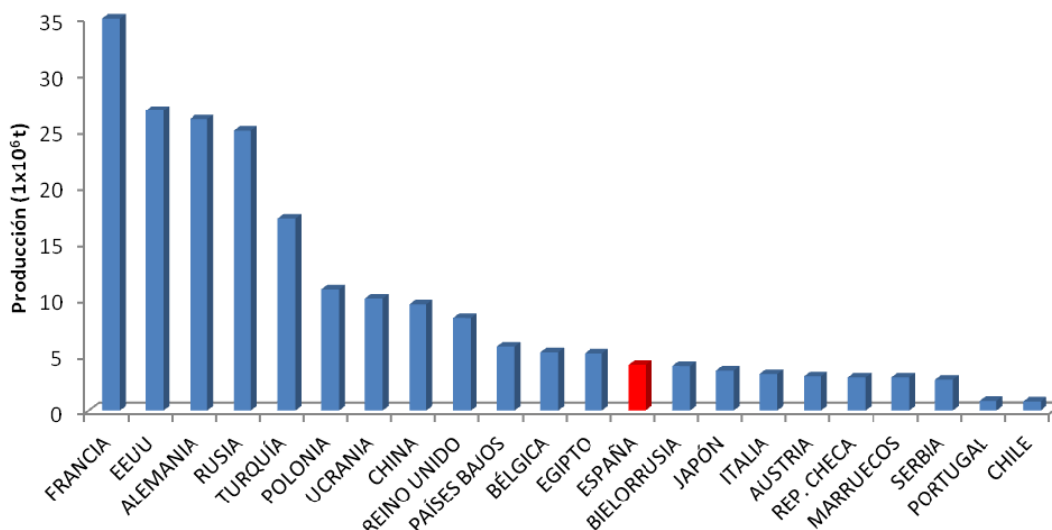


Figura I.6. Producción de remolacha azucarera en los principales países productores en el mundo en 2009 (FAOSTAT, 2011).

Prácticas de cultivo

Existen dos sistemas de cultivo de remolacha azucarera en función de la época de siembra:

- Siembra primaveral en la que el inicio del cultivo se produce a finales de primavera y la recolección tiene lugar a finales de otoño-principios de invierno. Este tipo de siembra es el que predomina a escala mundial.
- Siembra otoñal con inicio del cultivo en otoño, entre octubre y noviembre, y recolección a principios de verano. Esta modalidad de cultivo es relativamente reciente y se da principalmente en países de la Cuenca Mediterránea. Esta modificación en la fecha de siembra y recolección permite una mejor adaptación del cultivo a las condiciones climáticas de los países en donde se practica, caracterizadas por elevadas temperaturas en verano que dificultaban la siembra tradicional en primavera.

En España, se practican los dos sistemas de cultivo, la siembra primaveral en el norte del país, con las mayores cotas de producción y de hectáreas cosechadas (Fig. I.7), y la siembra otoñal en el sur que, sin

embargo, es especialmente relevante a nivel mundial ya que supone hasta el 40% de la producción total de este tipo de siembra, siendo en esta región donde el cultivo está más avanzado desde el punto de vista tecnológico y productivo (FAOSTAT, 2011; MARM, 2011).

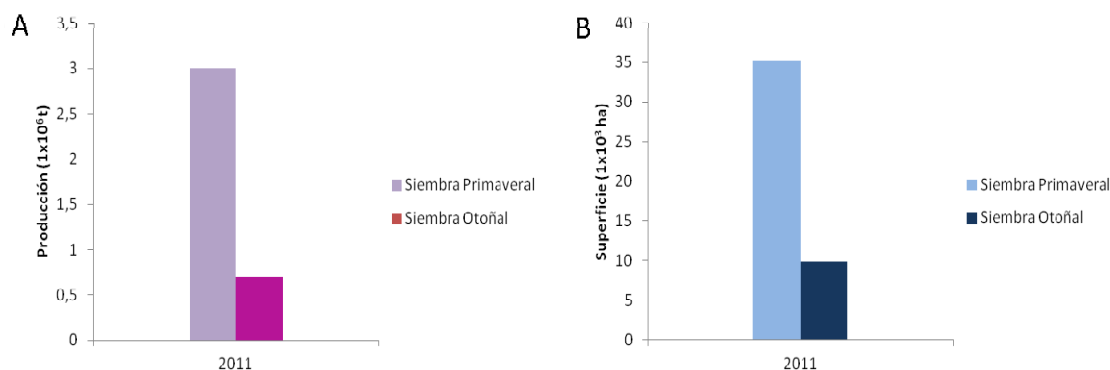


Figura I.7. Avances de la tasa de producción (A) y la superficie cosechada (B) para 2011 correspondientes a los dos tipos de cultivo de remolacha azucarera que se practican en España. (Fuente: MARM, 2011).

La remolacha azucarera de siembra otoñal se practica en zonas en las que la temperatura mínima media del mes más frío es superior a 2°C, el déficit hídrico potencial acumulado durante la estación seca es superior a 500 mm y la temperatura máxima media del mes más cálido es superior a 31°C (López-Bellido, 2003). Estas zonas, se extienden en el área comprendida entre el paralelo 40°N y el Trópico de Cáncer, así como entre el paralelo 40°S y el Trópico de Capricornio (Gutiérrez Sosa, 2006). Por ello, es posible encontrar este tipo de cultivo, además de en España, en Chile, Egipto, India, Italia, Marruecos o Portugal. En Andalucía, la siembra otoñal de remolacha se localiza fundamentalmente en la cuenca de los ríos Guadalquivir, Genil y Guadalete para el cultivo de regadío y en la provincia de Cádiz en secano, fundamentalmente en la campiña y una zona en el término de Jerez de la Frontera. En particular, en el Valle del Guadalquivir las condiciones edafo-climáticas, con inviernos suaves, lluvias localizadas en el periodo otoño-primavera, veranos muy cálidos y secos y suelos arcillosos con alto poder de retención de humedad, reúnen las características apropiadas para la siembra otoñal de remolacha (López-Bellido, 2003).

En Andalucía, los primeros ensayos de siembra otoñal se llevaron a cabo en 1948 con objeto de obtener un nuevo modelo de cultivo surgido de la necesidad de aumentar los rendimientos, ya que en la modalidad de siembra primaveral practicada hasta entonces las altas temperaturas estivales impedían el normal desarrollo del cultivo (Morillo-Velarde et al., 2003). Así, en dichos ensayos se estudiaron las fechas de siembra y recolección más adecuadas, las variedades, la incidencia de espigado, la nutrición y el control de plagas y enfermedades (Morillo-Velarde et al., 2003). Este es el punto de partida de un modelo de cultivo que se extiende a diferentes partes del mundo. Para el establecimiento y consolidación del cultivo de remolacha de siembra otoñal ha sido necesaria, no obstante, desarrollar una tecnología particular y adecuada a sus peculiaridades, que garantice la rentabilidad del cultivo. Gran parte de esta tecnología ha sido desarrollada por la Asociación de Investigación para la Mejora del Cultivo de la Remolacha Azucarera (AIMCRA).

El área de producción de la remolacha azucarera de siembra otoñal en España ha ido decreciendo durante los últimos 10 años (Fig. I.8) de igual forma que ha sucedido en otros países de la Cuenca Mediterránea como Italia o Portugal. En dichas áreas, diferentes cultivos se están implantando como alternativa para la producción agrícola.

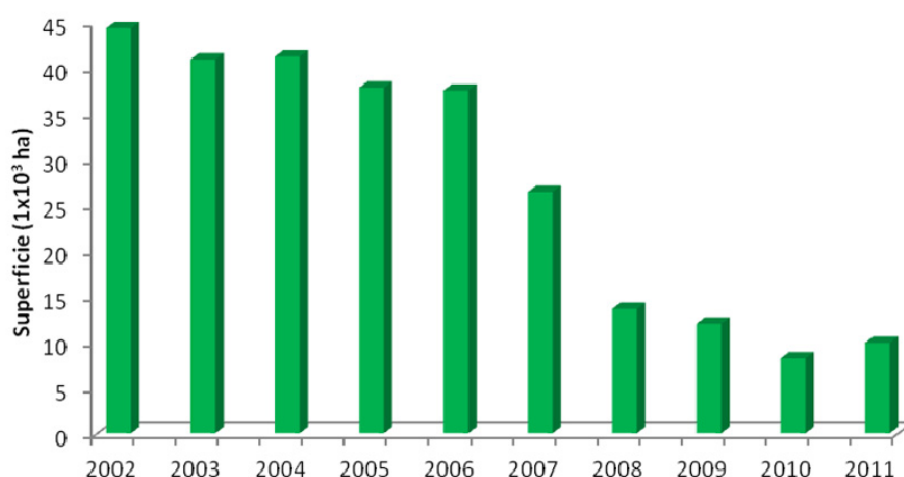


Figura I.8. Evolución de la superficie cultivada de remolacha azucarera de siembra otoñal en España en los últimos 10 años. (Fuente: MARM, 2011).

En la remolacha azucarera se han descrito 59 enfermedades de distinta etiología en diferentes partes del mundo, incluyendo 29 causadas por hongos u oomicetos, 13 por virus, nueve por nematodos, seis por bacterias y dos por fitoplasmas (Harverson et al., 2009). Las especiales condiciones en las que se desarrolla la remolacha azucarera de siembra otoñal tienen importantes repercusiones sobre la sanidad del cultivo, de manera que las características de ésta son diferentes en muchos aspectos de las de la sanidad del cultivo de siembra primaveral. Así, mientras que en las Zona Norte de España las principales enfermedades que afectan al sistema radical de la remolacha son la Podredumbre parda causada por el hongo *Rhizoctonia solani* Kühn y la Rizomanía causada por el virus de la *Necrosis amarillenta de las nerviaciones de la remolacha* (BNYVV), en la Zona Sur las enfermedades más importantes y limitantes que afectan al sistema radical del cultivo son la Podredumbre blanca o Mal del esclerocio causada por *S. rolfsii* y la Lepra causada por el hongo *Physoderma (Urophlyctis) leproides* (Trabut) Magn. Otras enfermedades descritas en el cultivo de siembra otoñal son: Oídio (*Erysiphe betae* (Vaňha) Weltzien), Roya (*Uromyces betae* Kickx), Cercosporiosis (*Cercospora beticola* Sacc.) y el Nematodo del quiste (*Heterodera schachtii* Schmidt) (Gutiérrez-Sosa, 2006).

I.1.2.2. La Podredumbre blanca en Remolacha Azucarera de siembra otoñal

Importancia y Distribución Geográfica

La Podredumbre blanca o Mal del esclerocio es la enfermedad más severa de la remolacha azucarera de siembra otoñal. Los síntomas se manifiestan principalmente en la fase final del ciclo del cultivo, próximo a la recolección, ya que las condiciones climáticas en las que se desarrolla coinciden con las óptimas para la germinación de los esclerocios de *S. rolfsii*, infección y posterior desarrollo de la enfermedad. Como

consecuencia de la infección por el patógeno, las raíces afectadas no son útiles para la extracción de azúcar ni para la alimentación animal. La enfermedad ha sido descrita en todas las áreas productoras de remolacha azucarera de siembra otoñal causando importantes pérdidas de producción. En España, y en concreto en la vega del Guadalquivir, ya en 1941 se citaron pérdidas de hasta un 50% en la producción de remolacha (Benlloch, 1943). Paradójicamente, esta enfermedad aún se mantiene como una de los principales preocupaciones del sector remolachero de siembra otoñal de la Zona Sur de la Península en la actualidad, cuyas pérdidas se han estimado entre el 5 y 80% de la producción total (AIMCRA, 2004). De igual modo, la enfermedad ha sido descrita en el centro de Chile, regiones VI a VIII, (Paillalef-Monnrad, 2004), Italia (Gabellini & Cerato, 2004), Marruecos (Fidah, 1995; Ezzahiri, 2004) y el centro y sur de Portugal (Paim, 2004)

Sintomatología

Los primeros síntomas en las plantas afectadas incluyen la pérdida de vigor y marchitez de las hojas. Dicha marchitez suele estar precedida por lesiones en el cuello de la raíz, en la zona cercana a la superficie del suelo, donde se aprecia un micelio blanco algodonoso cuyo avance, rápido en condiciones de humedad y temperatura adecuadas, termina por cubrir gran parte del órgano afectado y que le da el nombre de Podredumbre blanca a la enfermedad (Aycock, 1966; Benlloch, 1943).

El crecimiento miceliar que se produce sobre la superficie de las raíces es consecuencia del crecimiento saprotrófico del hongo en los tejidos del huésped que resultan necrosados por la infección. Tras la descomposición de los tejidos, aparecen numerosos esclerocios de forma esférica y color de blanco a marrón oscuro, formados a partir del micelio que recubre la raíz. Las plantas afectadas pueden arrancarse del suelo fácilmente debido al daño ocasionado por el hongo, y con frecuencia, son las hojas y la parte superior de la raíz las que se retiran del suelo (Benlloch, 1943).

Ciclo de patogénesis

Los esclerocios de *S. rolfsii* constituyen el inóculo primario característico de las epidemias de Podredumbre blanca en la remolacha de siembra otoñal. Dichos esclerocios se forman en el ambiente natural cuando se reduce la disponibilidad del sustrato o tejido del huésped sobre el que vive el hongo, lo cual va unido normalmente a condiciones ambientales adversas propiciando que el patógeno pueda sobrevivir prolongadamente en el suelo (Aycock, 1966; Leach & Davey, 1938; Punja, 1985) así como dispersarse mediante prácticas culturales que llevan consigo desplazamiento del suelo como el riego y el laboreo. Los esclerocios germinan coincidiendo con las altas temperaturas que se dan a final de primavera-inicio de verano (25-35°C) y con el alto contenido en humedad en el suelo debido a los riegos practicados para satisfacer los elevados requerimientos hídricos del cultivo en su último estadio, donde se produce la mayor cantidad de acumulación de sacarosa en las raíces. En estas condiciones, y cuando la infección ha tenido éxito, el micelio del hongo se extiende rápidamente hasta colonizar por completo los tejidos infectados (Lal et al., 1997). La enfermedad generalmente no tarda más de unas pocas semanas en desarrollarse, y es el período en el cual *S. rolfsii* permanece en estado activo tras la germinación de los esclerocios (Jordán-Ramírez et al., 2009). Sólo si hay disponible más sustrato orgánico, como son las raíces carnosas de remolacha, y las condiciones ambientales son favorables, el micelio del patógeno puede mantenerse en estado activo durante más tiempo. De esta forma, puede tener lugar una dispersión secundaria de inóculo desde las infecciones primarias si la densidad de plantas es alta, dando lugar a rodales de plantas afectadas de diversa extensión en función de la cantidad y distribución espacial de plantas inicialmente afectadas y la ocurrencia de condiciones ambientales favorables para el desarrollo de la enfermedad (Jordán-Ramírez et al., 2009). El ciclo se completa con la formación de nuevos esclerocios sobre los tejidos de las plantas afectadas que se incorporan al suelo, constituyendo estas estructuras la forma de persistir en aquel en ausencia de un huésped susceptible o de las condiciones favorables para el

crecimiento activo del hongo. La viabilidad de los esclerocios puede persistir durante varios años hasta que las condiciones vuelven a ser favorables para llevar a cabo un nuevo ciclo de enfermedad (Aycocock, 1966) (Fig. I.9).

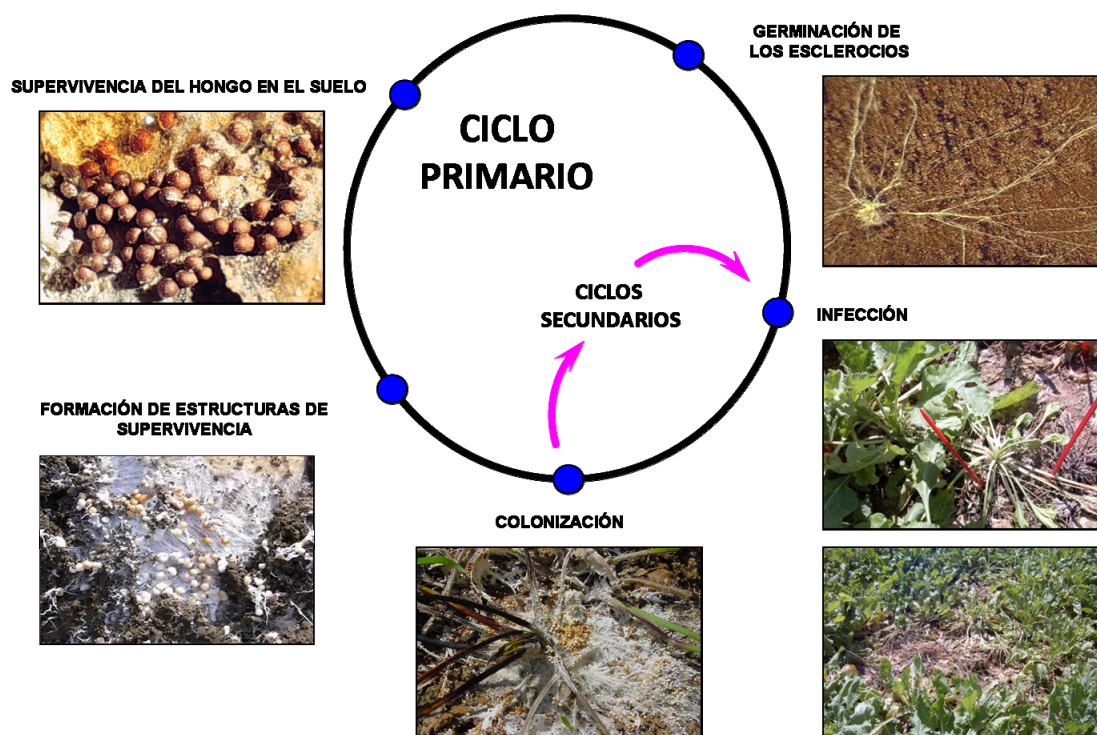


Figura I.9. Ciclo de enfermedad de *Sclerotium rolfsii* en cultivos de remolacha azucarera de siembra otoñal.

Epidemiología

Un factor determinante en las epidemias de Podredumbre blanca en raíces de remolacha azucarera es la densidad de los esclerocios de *S. rolfsii* en el suelo. Así, existe una alta correlación positiva entre la densidad de inóculo, o población de esclerocios viables, y el porcentaje de plantas enfermas en el área donde se localizan (Leach & Davey, 1938; AIMCRA, 2001). Se ha estimado, además, que en la capa arable del suelo (20-30 cm), una densidad de 5,5 esclerocios/cm² puede causar hasta el 70% de incidencia en cultivos de remolacha azucarera (Lal et al., 1997). En el caso de la muerte de plántulas, tan solo sería suficiente con un esclerocio/g de suelo (Kaul et al., 1984).

La longevidad de los esclerocios que se incorporan al suelo determina la severidad de las epidemias en posteriores ciclos del cultivo, ya que solo los que permanezcan viables, son capaces de germinar y causar enfermedad (Lal et al., 1997). Dicha viabilidad decrece en los esclerocios que permanecen en suelos con cierta humedad mientras que los almacenados en condiciones secas pueden sobrevivir hasta 5 años. A su vez, períodos continuos de humedad y desecación provocan un descenso acusado del porcentaje de esclerocios viables debido al lavado de nutrientes en el suelo y posterior colonización por microorganismos, principalmente bacterias, que afectan a la germinación (Kaul et al., 1984; Smith, 1972).

En las condiciones climáticas en las que se desarrolla el cultivo de siembra otoñal, se puede alcanzar desde el mes de Junio la temperatura óptima para el máximo desarrollo de la enfermedad, 30-35°C, un intervalo que, sin embargo, es superior al óptimo para el crecimiento de *S. rolfsii* (Lal et al., 1997). Estas altas temperaturas, junto con la humedad que se genera tras el riego que se aplica al cultivo, van a ser determinantes para la incidencia final de la enfermedad. Temperaturas inferiores a 20°C y superiores a 36°C limitan el crecimiento del hongo y por tanto la severidad de la enfermedad (Lal et al., 1997; Punja & Jenkins, 1984).

La humedad de suelo juega asimismo un importante papel en el desarrollo de enfermedad, refiriéndose mayor incidencia de Podredumbre blanca en cultivos de remolacha en regadío (Lal et al., 1997). En general, la incidencia de la Podredumbre blanca es mayor en suelos arenosos y bien drenados, que en aquellos de textura fina que conservan más la humedad y permiten menor aireación (Punja, 1985). Éste hecho parece estar determinado por la alta sensibilidad de *S. rolfsii* a la reducción de oxígeno en el suelo consecuencia de la humectación (Griffin & Nair, 1968; Punja, 1985). La situación descrita puede, no obstante, no ser aplicable a la Zona Sur de España. Los suelos predominantes en las zonas remolacheras de esta área son, en general, suelos arcillosos o franco-arcillosos, expansibles, con alta capacidad de retención de agua, pero al mismo tiempo elevada porosidad que facilita su oxigenación. Además, en

este tipo de suelos es frecuente la aparición de grietas o fisuras debidas por una parte de los ciclos de humectación-desección de arcillas expansibles por las altas temperaturas, y de otra a la presión ejercida por el crecimiento de la raíz de la remolacha. Este proceso permite el acceso de oxígeno a capas profundas del suelo, lo que unido a la existencia de humedad en éstas, favorecería la germinación de los esclerocios situados en esta parte del perfil del suelo, y de esta manera causar infección e incrementar la incidencia de ciclos secundarios de infección. La concurrencia de todos estos factores puede modificar sustancialmente las condiciones específicas de temperatura y humedad que favorecen el desarrollo de la enfermedad en nuestras condiciones.

Con frecuencia, *S. rolfsii* aparece asociado a otros hongos de suelo en las raíces de las plantas enfermas de remolacha azucarera como son *Rhizoctonia* spp., *Phytium* spp. o *Fusarium* spp. Esto determina que se localicen más zonas afectadas y que la planta muestre menor resistencia a ser colonizada por *S. rolfsii* (Rama, 1981).

Estrategias y Medidas de Control

La puesta en práctica de estrategias de control integrado de las enfermedades causadas por *S. rolfsii* constituye todavía un reto importante para los fitopatólogos. Esto es debido a que el establecimiento de dichas estrategias requiere la aplicación secuenciada o simultánea de un conjunto de medidas de lucha, cuya adecuación y eficiencia dependen en gran medida del conocimiento que se disponga sobre la ecología y diversidad genética del patógeno y la epidemiología de las enfermedades que causa.

Las estrategias de control de la Podredumbre blanca en remolacha azucarera van encaminadas a prevenir la aparición y el desarrollo de la enfermedad en base a la eliminación del patógeno, escape a la infección, desarrollo de resistencia al patógeno y la protección de la planta. Para ello, las medidas de control aplicables comprenden:

1. Utilización de suelos libres de *S. rolfsii* o con contenido mínimo de éste.

La elección de suelos libres de inóculo, o con contenido mínimo del patógeno, evita el aumento progresivo del inóculo en el suelo de éste capaz de causar enfermedad severa. Por ello, una de las primeras decisiones en los sistemas agrícolas es la elección del suelo para el cultivo en base no solo a criterios agronómicos o de fertilidad, sino en particular por su estado sanitario. La elección de suelos libres de *S. rolfsii* puede estar basada en el conocimiento de la historia de la parcela (i.e., secuencia temporal de cultivos susceptibles; datos de ataques por enfermedades causadas por el patógeno en años anteriores, etc.), o directamente en la información proporcionada por el análisis del contenido del patógeno en el suelo (Leach & Davey, 1938; Punja et al., 1985).

2. Prácticas de cultivo para reducir el inóculo en el suelo o la cantidad de enfermedad.

La infestación de suelos fértiles por agentes fitopatógenos no excluye necesariamente su utilización para la producción agrícola, pero requiere la reducción o eliminación del inóculo existente en el suelo. Para ello, en *S. rolfsii* se han descrito las siguientes medidas de control:

- *Eliminación de los restos vegetales* de cultivos previos que hayan sido infectados por *S. rolfsii*, ya que posee una gran capacidad saprofítica para sobrevivir y continuar su ciclo sobre ellos actuando como fuente de inóculo para epidemias en el siguiente cultivo (Aycocock, 1966). Esta medida es particularmente importante en cultivos como remolacha, zanahoria o patata en los que pueden quedar raíces carnosas o tubérculos en el suelo sobre los que el patógeno puede desarrollarse saprofiticamente de forma óptima.
- La *solarización* del suelo se ha mostrado como un método efectivo para reducir tanto la viabilidad de los esclerocios como el desarrollo de la enfermedad causada por *S. rolfsii* (Elad et al., 1980; Mihail & Alcorn, 1984; Singh et al., 1990), aunque solo resulta viable desde un punto de vista técnico y económico en pequeños rodales (AIMCRA, 1998). Esta medida puede reducir la viabilidad de los esclerocios hasta en un 90% (Singh et al.,

1990). Se ha descrito que esta acción puede ser tanto directa, al alcanzar la temperatura letal para los esclerocios de *S. rolfsii*, estimada por Elad et al. (1980) en 50°C durante 4-6 h, como indirecta, ya que a temperaturas subletales, los esclerocios son más vulnerables a la acción de otros microorganismos del suelo (Mihail & Alcorn, 1984), o bien por favorecer el desarrollo de microorganismos antagonistas que reduzcan la viabilidad de los esclerocios de *S. rolfsii* en los suelos infestados (Grinstein et al., 1979; Katan, 1981). Investigaciones llevadas a cabo en Andalucía indican que la solarización del suelo ha de llevarse a cabo en los períodos de máximas temperaturas estivales ya que si se lleva a cabo durante períodos no óptimos, aun teniendo un efecto debilitador en la germinación y subsecuente capacidad de producción de esclerocios, no proporciona un nivel de control adecuado de la enfermedad (López-Rivera, 1996). Similarmente, la práctica de la solarización en combinación con enmiendas del suelo con restos vegetales potencia el efecto de la reducción del inóculo de *S. rolfsii* en el suelo, pero no incrementa la reducción de la incidencia de enfermedad alcanzada tras un tratamiento único de solarización (Romero Ávila, 1999). Sin embargo, en ambos casos, dado el carácter extensivo del cultivo de remolacha, la aplicación generalizada de estas medidas como método de control de la enfermedad es extremadamente dificultosa.

· Empleo de *enmiendas orgánicas e inorgánicas* sobre el suelo, principalmente con compuestos nitrogenados como nitrato cálcico, cianamida (Leach & Davey, 1942) urea o sulfato de amonio (Canullo & Rodríguez-Kábana, 1992; Lal et al., 1997). Estos compuestos consiguieron reducir la incidencia de la enfermedad en remolacha azucarera a través de la estimulación de microorganismos antagonistas que reducen el crecimiento de *S. rolfsii*, además de provocar tanto la inhibición en la germinación de los esclerocios como un aumento en los niveles de resistencia del huésped (Mukhopadhyay & Upadhyay, 1983). La aplicación de esta medida en solitario, es aplicable solo en sistemas agrícolas a pequeña escala debido al alto coste que conlleva (Punja, 1985). Además es importante adecuar la dosis aplicada en los tratamientos ya que

elevadas cantidades de estos compuestos repercuten en la calidad de la raíz debido al alto pH que generan en el suelo.

· La *inundación del suelo* es un método de control que llega a ser efectivo, ya que priva a *S. rolfsii* del oxígeno necesario e incrementa la actividad microbiana (Garren, 1961; Khati et al., 1983). Sin embargo debe llevarse a cabo con precaución puesto que la humedad beneficia al patógeno. La inundación debe prolongarse el tiempo necesario para provocar la pérdida completa de viabilidad de los esclerocios para no tener un efecto contrario al deseado (Garren, 1961). La inundación es la forma de control más adecuada en zonas de cultivo como India donde se cultiva arroz con inundación continua (Aycock, 1966).

· La *rotación de cultivos* es una de las medidas más empleadas ya que la utilización continuada de un suelo con cultivos susceptibles da lugar a que en él aumente progresivamente el inóculo capaz de causar enfermedad. La efectividad de esta medida sobre *S. rolfsii*, sin embargo, se ve reducida por el amplio rango de huéspedes que posee, la variabilidad de sus poblaciones y la persistencia de los esclerocios en el suelo. En este escenario, la elección de los cultivos que entren en la rotación debe estar basada en su reducido nivel de susceptibilidad y que, por tanto, contribuyan a una reducción en los niveles de inóculo que permita una menor incidencia de la enfermedad en años posteriores (Punja, 1985). La rotación más recomendada en la actualidad es la que incluye cereales, por ejemplo, maíz o trigo (AIMCRA, 2010). Se ha descrito también una reducción en las infecciones por *S. rolfsii* en cacahuete al incluir la rotación maíz, maíz-trigo o soja (Garren, 1961), o incluyendo cebolla (Zeidan et al., 1986), que aun siendo susceptible al patógeno, sus extractos bulbares o exudados radicales inhiben tanto del crecimiento micelial como la germinación de los esclerocios mostrando cierta actividad fungicida.

· *Adelanto de la fecha de siembra y recolección* como medida de escape a la enfermedad haciendo que el ciclo agronómico del cultivo se complete antes de que se den las condiciones óptimas de alta temperatura y humedad que favorezcan la germinación de los esclerocios y el desarrollo

de enfermedad severa (AIMCRA, 2010; Tinsdale, 1921). En parcelas con antecedentes de Podredumbre blanca puede ser una de las medidas más efectivas, recomendándose la siembra temprana en Octubre y la cosecha a finales de Mayo-principios de Junio (AIMCRA, 2010). Esta medida ha sido también efectiva en la India para obtener mayores rendimientos en los cultivos, provocados por una menor incidencia de plantas afectadas, sembrando en la primera mitad de noviembre (Tewari, 1971).

3. Utilización de cultivares resistentes al patógeno

El empleo de *cultivares resistentes o con reducido nivel de susceptibilidad* a *S. rolfsii*, se perfila como una de las medidas más eficientes para el manejo sostenible e integrado del cultivo (AIMCRA, 2006). Desafortunadamente, todos los cultivares estudiados hasta la fecha en ensayos de tolerancia varietal, han presentado cierta susceptibilidad frente al patógeno (Lal et al., 1997) y solo se han encontrado menores niveles de incidencia de la enfermedad en ciertos genotipos como IISR-2, LS-6, IISR Comp.-1 (Srivastava et al., 1994) o SC 01 (AIMCRA, 2006). Estos cultivares menos susceptibles, sin embargo, no alcanzan los niveles de rendimiento en azúcar necesarios para ser comercializadas de forma generalizada.

4. Control biológico.

La aplicación de *agentes de control biológico* no ha conseguido ser tan efectiva frente a la Podredumbre blanca de la remolacha azucarera de siembra otoñal en condiciones de campo como en condiciones controladas. No obstante, existen numerosos estudios que señalan a diferentes microorganismos como potenciales agentes de biocontrol de *S. rolfsii*: *Talaromyces flavus* Klocker. (Madi et al., 1997), *Gliocladium virens* von Arx. (Ristaino et al., 1994), *Trichoderma harzianum* Rifai. (Bhagat & Pan, 2007; Benhamou & Chet, 1996; Ganesan et al., 2007); *Pseudomonas fluorescens* Migula. o *P. aeruginosa* Migula. (Singh et al., 2003; Kishore et al., 2005), o especies del género *Streptomyces* (Errakhi et al., 2007). El mayor interrogante de esta medida radica en la dinámica de las poblaciones de estos agentes, de forma que persistan en el suelo con

niveles de población adecuados para un control eficiente en años sucesivos, y la variabilidad de su eficiencia debida a la influencia de diversos factores ambientales y del patosistema. No obstante, el principal obstáculo en el desarrollo de esta medida es el elevado coste que supone su aplicación, solo asumible en cultivos con rendimientos más elevados.

5. Control químico

La aplicación de ciertos *fungicidas* se ha mostrado efectiva para inhibir tanto la germinación de los esclerocios como el crecimiento micelial (Punja, 1985), sin embargo, la toxicidad que presentan gran parte de ellos para la salud humana y el medio ambiente, hace que la mayoría de los formulados que han sido estudiados estén autorizados en la actualidad. Así, productos como bromuro de metilo (Haas, 1976), captafol (Brown & Hendrix, 1980), cicloheximida, succinato de cadmio, carboxin, captan o pentacloronitrobenzeno (PCNB) (Punja et al., 1982; Singh et al., 1982) proporcionan un control adecuado de la enfermedad. En Andalucía, diversas investigaciones realizadas por AIMCRA indican que la enfermedad puede ser controlada adecuadamente mediante la aplicación de varias materias activas de fungicidas de la familia de las estrobilurinas que pueden alcanzar una reducción de la incidencia de enfermedad de entre 50 a 65% (azoxystrobin 25%) (AIMCRA, 1998, 1999), o del 68% en la intensidad de enfermedad (trifloxistrobin 37,5% + ciproconazol 16%) (AIMCRA, 2006). No obstante estos resultados no fueron consistentes en diversos ensayos o campañas. En cualquier caso, no existe en la actualidad ningún producto fitosanitario registrado para el control de Podredumbre blanca en remolacha azucarera en España (<http://www.marm.es/es/agricultura/temas/medios-de-produccion/productos-fitosanitarios/fitos.asp>) (actualización 7 de junio de 2011).

6. Producción integrada de remolacha azucarera de siembra otoñal en Andalucía.

La producción integrada de remolacha azucarera se viene practicando en Andalucía desde 2006 y está regulada en su actualización más reciente por la ORDEN de 2 de noviembre de 2010, por la que se modifica el Reglamento Específico de Producción Integrada de Remolacha azucarera para siembra otoñal, aprobado mediante Orden de 11 de mayo de 2009 (BOJA 219, 10 noviembre 2010, pp. 29-55). En lo concerniente a la Podredumbre blanca, dicho reglamento establece las siguientes medidas para su manejo integrado: 1) Rotación con cultivos no huéspedes (maíz, trigo, algodón, cebolla y ajo); 2) Evitar cultivo anterior huésped (girasol, tomate, zanahoria, remolacha de mesa, patata, melón); 3) Recolección temprana; 4) Limpia de malas hierbas; 5) Solarización dirigida a focos; 6) Eliminación manual de plantas aisladas; 7) Limpieza de aperos, en especial maquinaria de recolección; 8) Drenaje; 9) Uso de vertedera; 10) Delimitar rodales detectados mediante encalado en zanja perimetral; 11) Evitar regar en horas de más calor.

I. 2. OBJETIVOS

I.2.1. NATURALEZA DE LA INVESTIGACIÓN PLANTEADA

Sclerotium rolfsii es un hongo de suelo cosmopolita con una distribución a nivel mundial y una inusual gama de cultivos susceptibles. Además, es capaz de persistir en suelos infestados durante largos períodos de tiempo mediante la formación de estructuras de supervivencia especializadas o esclerocios. Estas características, determinan que las epidemias causadas por este patógeno, especialmente severas en zonas subtropicales, sean de las de más difícil manejo en numerosos cultivos agrícolas.

En Andalucía, región con clima de tipo Mediterráneo, se ha descrito que *S. rolfsii* está ampliamente distribuido en los suelos agrícolas del área del Valle del Guadalquivir, siendo la remolacha azucarera el cultivo más atacado por este patógeno en donde causa la enfermedad conocida como Podredumbre blanca y para la que no se han podido desarrollar, hasta la fecha, medidas eficientes para combatirlo. La mayor incidencia de este patógeno en la remolacha azucarera en Andalucía se debe en gran medida a la práctica en esta zona de la siembra otoñal. Esta modalidad de siembra es peculiar de ciertas áreas de la Cuenca del Mediterráneo de Europa y África, así como de países de clima Mediterráneo como Chile y California (EE.UU.). La siembra otoñal supone modificar el ciclo productivo del cultivo de remolacha, de manera que obliga a la planta a desarrollar su ciclo vegetativo durante el invierno y primavera, y a que el cultivo complete su ciclo productivo antes de que las altas temperaturas del verano interfieran con la actividad de la planta. Sin embargo, es en la fase final de desarrollo del cultivo cuando se dan condiciones de elevada temperatura y humedad de suelo como consecuencia de la aplicación de riego que favorecen en gran medida la germinación de los esclerocios residentes en el suelo, el crecimiento del hongo y posterior desarrollo de la enfermedad que hacen que sea considerada la enfermedad de etiología fúngica más importante y limitante de la remolacha de siembra otoñal en el Sur de España, donde se

le considera una enfermedad endémica.. Este mismo escenario es posible encontrarlo, además, en diferentes regiones de Chile, Egipto, India, Italia, Marruecos o Portugal.

En la actualidad, existe un escaso conocimiento acerca de la estructura y diversidad de las poblaciones de *S. rolfsii*, lo cual, es de especial interés para el desarrollo de medidas eficientes de control para un manejo integrado de las enfermedades causadas por este patógeno. En este sentido, se considera que la unidad funcional en las poblaciones de *S. rolfsii* son los grupos de compatibilidad miceliar (GCMs) formados por individuos somáticamente compatibles entre sí, capaces de fusionar sus hifas e intercambiar material genético. Entre los diferentes GCMs, dicho intercambio genético no es posible por la incompatibilidad que manifiestan los diferentes aislados y este hecho, determina que aparezcan subpoblaciones estancas y aisladas entre sí que pueden diferir en características esenciales de tipo morfológico, genético o patogénico.

Además, actualmente no existen investigaciones sobre la estructura y diversidad de las poblaciones de *S. rolfsii* infectando cultivos de remolacha azucarera de siembra otoñal en regiones de clima de tipo Mediterráneo. Por lo tanto, la presente Tesis Doctoral se centra en el estudio de la estructura de dichas poblaciones en Andalucía infectando cultivos de remolacha azucarera de siembra otoñal en base a la diversidad genética y patogénica de las mismas, para generar información útil en el desarrollo de medidas eficientes de control de la Podredumbre blanca.

I.2.2. OBJETIVOS

El objetivo general de esta Tesis Doctoral es generar conocimiento sobre la estructura y diversidad genética y patogénica de las poblaciones de *S. rolfsii* infectando cultivos de remolacha azucarera de siembra otoñal en Andalucía y otras zonas del mundo que comparten las mismas condiciones de clima Mediterráneo, que permitan establecer las bases científicas para el desarrollo de estrategias eficientes para el control integrado de la Podredumbre blanca.

Los objetivos específicos son:

1. Desarrollar un medio de crecimiento adecuado para evaluar de forma inequívoca el tipo de interacciones miceliales entre los aislados de *Sclerotium rolfsii*.
2. Analizar la existencia de grupos de compatibilidad miceliar (GCMs) y su distribución geográfica entre las poblaciones de *S. rolfsii* en países de clima Mediterráneo en los que se practica la siembra otoñal de remolacha azucarera.
3. Determinar la diversidad molecular entre los aislados de *S. rolfsii* pertenecientes a un mismo o distintos GCMs mediante el análisis de los patrones de marcadores moleculares RFLPs ('restriction fragment length polymorphism') y secuencias de genes conservados y otras regiones de ADN, utilizando aislados de *S. rolfsii* procedentes de plantas infectadas de diverso origen geográfico.
4. Determinar la diversidad patogénica entre los aislados de *S. rolfsii* pertenecientes a un mismo o distintos GCMs sobre cultivos susceptibles de interés económico en los suelos agrícolas del Valle del Guadalquivir.
5. Determinar la estructura de las poblaciones de *S. rolfsii* en función de sus características genéticas y de virulencia.

CAPÍTULO II

**OPTIMIZACIÓN DE UN MEDIO DE CULTIVO
QUE INTENSIFICA LA FORMACIÓN DE LA
ZONA DE AVERSIÓN EN LAS REACCIONES
MICELIARES ENTRE AISLADOS DE
*Sclerotium rolfsii***

II.1. RESUMEN

En un amplio rango de especies fúngicas se pueden identificar entre sus aislados dos tipos de reacciones miceliales, compatibles e incompatibles. La correcta determinación de éstas, es crucial para conocer las relaciones existentes entre estos aislados, así como en el establecimiento de los grupos de compatibilidad miceliar (GCMs) presentes en sus poblaciones y que es considerado como un carácter válido para el estudio de su variabilidad genética intraespecífica.

La compatibilidad miceliar es uno de los eventos que acontecen durante la compatibilidad vegetativa, definida esta última por la formación de un heterocarionte estable como resultado de la fusión de hifas de aislados de una misma especie. Mientras que la compatibilidad vegetativa se pone de manifiesto mediante la utilización de mutantes nutricionales, las reacciones de compatibilidad miceliar son un fenómeno que puede evidenciarse de forma simple utilizando un medio de cultivo adecuado. La incompatibilidad miceliar se caracteriza por la aparición de una “zona de antagonismo o aversión” en el área de interacción entre las diferentes colonias fúngicas enfrentadas.

En *Sclerotium rolfsii* se ha descrito la ocurrencia de reacciones de compatibilidad-incompatibilidad miceliar entre sus aislados cuando son enfrentados en el medio de cultivo Agar Patata Dextrosa (APD), sin embargo, se ha comprobado que para ciertos aislados, la determinación del tipo de reacción miceliar no siempre es posible mediante este medio de cultivo. Por ello, la presente investigación explora diferentes métodos basados en el uso de diferentes medios de cultivo, en sus composiciones originales o enmendados con diferentes concentraciones de glucosa y/o colorante alimenticio rojo, con el objeto de determinar el más adecuado para la formación y desarrollo de la zona de aversión característica de reacciones de incompatibilidad y poder, de este modo, identificarlas de forma inequívoca.

A partir de una colección de aislados de *S. rolfsii* obtenidos de plantas de remolacha azucarera de siembra otoñal de distinta procedencia

geográfica, se seleccionaron cinco aislados representativos de aquellos que presentaban reacciones miceliarias ambiguas que no permitían su caracterización en GCMs. En los enfrentamientos entre estos aislados, se evaluaron un total de 15 tratamientos a partir de los medios APD y de Patterson (MP), enmendados con glucosa y/o colorante alimenticio rojo en diferentes concentraciones. Los eventos que ocurrieron durante la compatibilidad micelar se corroboraron a nivel microscópico a partir de enfrentamientos de estos mismos aislados sobre portaobjetos y posterior tinción de las hifas en la zona de contacto entre ellas con el fluorocromo de unión a ADN DAPI (4', 6-Diamidino-2-fenilindol diclorhidrato).

Los resultados de esta investigación permitieron obtener un método fiable y reproducible basado en el uso del medio de Patterson modificado con un 25% adicional de glucosa (23,4 g/l final) y 180 µl/l de colorante alimenticio rojo, que permite determinar de forma inequívoca los tipos de reacciones miceliarias y su caracterización en GCMs de aislados de *S. rolfssii* y que puede ser determinada tras tan solo 5 días de incubación a 25°C en oscuridad. En este medio de cultivo mejorado, las reacciones incompatibles se caracterizan por la formación de una línea roja visible en el reverso de la placa de Petri en la zona de contacto entre las colonias de los aislados enfrentados. Este medio de cultivo incrementa significativamente la intensidad de la reacción de interacción micelar de aislados de *S. rolfssii* en relación a los dos medios de cultivo estándar (APD y MP) utilizados para este fin hasta el momento, en los cuales, la intensidad de la interacción micelar es significativamente inferior y la visualización de las reacciones miceliarias es en ocasiones problemática. La utilidad del método desarrollado se validó con observaciones microscópicas del área de contacto de hifas de aislados de *S. rolfssii* en microcultivos en portaobjetos que corroboraron la reacción de compatibilidad micelar asignada mediante el medio de cultivo.

II.2. INTRODUCCIÓN

Los grupos de compatibilidad micelar (GCMs) son considerados como un carácter genético sencillo y poco costoso para determinar la variación intraespecífica en poblaciones fúngicas (Leslie, 1993). Los GCMs se definen en base a las reacciones de compatibilidad-incompatibilidad que manifiestan los aislados de ciertos grupos de hongos, particularmente en Aphyllophorales (Basidiomycota) (Worrall, 1997) y Helotiales (Ascomycota) (Kohn et al., 1990, Kohn et al., 1991). Las reacciones de incompatibilidad entre aislados de una misma especie se caracterizan por el desarrollo en la zona de interacción de las dos colonias en crecimiento de un área distintiva de demarcación, conocida como “barrera” o “zona de aversión”. Por el contrario, las reacciones de compatibilidad se caracterizan por un crecimiento continuo de las dos colonias sin que se aprecie interacción entre ellas (Leslie, 1993; Worrall, 1997). De este modo, aislados compatibles entre sí se agrupan en un mismo GCM, mientras que los incompatibles lo hacen en GCMs distintos. De esta forma, en estudios realizados en *Sclerotinia sclerotiorum* (Kohn et al., 1990), *Sclerotium cepivorum* (Earnshaw & Boland, 1997) o *S. rolfsii* (Punja & Grogan, 1983), la incompatibilidad micelar fue descrita en base a la formación en la zona de contacto de las dos colonias de una línea de reacción visible y la presencia de un área con escaso desarrollo de micelio, eventos que no se dieron en la compatibilidad micelar. La compatibilidad micelar se considera como uno de los eventos asociados con la compatibilidad vegetativa, definida, a su vez, como la capacidad de dos aislados de fusionarse y formar un heterocarionte estable (Kohn et al., 1991).

En la práctica, la compatibilidad micelar se determina enfrentando discos de micelio de los aislados a evaluar en placas de Petri sobre un medio de cultivo con una base de agar. Aunque esta técnica es metodológicamente simple, la determinación de GCMs requiere, no obstante, de un medio de cultivo que permita la identificación inequívoca de las reacciones de compatibilidad-incompatibilidad que se den en la zona de interacción de las colonias enfrentadas. Punja y Grogan (1983) describieron por primera vez la ocurrencia de interacciones miceliales

entre aislados de *S. rolfsii*. Estos autores indicaron que para la determinación de GCMs en *S. rolfsii*, los enfrentamientos entre aislados del hongo podían llevarse a cabo utilizando el medio completo de migración de Snider y Raper (MC) (Snider & Raper, 1958), Agar Patata Dextrosa (APD) o APD enmendado con 0,1% de extracto de levadura. Desde entonces, el único medio de cultivo utilizado para la identificación de GCMs en poblaciones de *S. rolfsii* ha sido el APD (Adandonon, 2005; Almeida et al., 2001; Cilliers et al., 2002; Harlton et al., 1995; Nalim et al., 1995; Punja & Sun, 2001; Sarma et al., 2002).

Durante el transcurso de la presente Tesis Doctoral, el medio APD sintético fue el empleado para evaluar la ocurrencia de GCMs en una colección de aislados de *S. rolfsii* obtenidos de raíces de plantas de remolacha azucarera afectadas por Podredumbre blanca en diversas localidades de la Península Ibérica, Chile e Italia (Capítulo III de esta Tesis Doctoral). Las reacciones miceliales observadas entre los aislados enfrentados permitieron clasificarlos en la mayoría de los casos como compatibles o incompatibles, sin embargo, algunos enfrentamientos ofrecieron resultados ambiguos y no fue posible discernir el tipo de reacción. En un primer intento de superar esta dificultad, se evaluó un método similar utilizado para la determinación de GCMs en *S. sclerotiorum* por Kohn et al. (1990) y que consistió en el empleo del medio de Patterson (Patterson, 1986), enmendado con colorante alimenticio de color rojo. Este medio mejoró la visualización de la reacción en la zona de interacción de los aislados enfrentados, sin embargo, en torno al 25% de los enfrentamientos continuaban sin poder ser clarificados y encuadrados en GCMs.

Por tanto, la presente investigación fue llevada a cabo con el objeto de desarrollar un medio de cultivo adecuado para la caracterización inequívoca de la reacción de incompatibilidad o zona de aversión entre los aislados de *S. rolfsii* y así, determinar si dichas zonas eran indicativas de incompatibilidad miceliar. Para optimizar la formación de la zona de aversión en *S. rolfsii*, se evaluaron diferentes medios de cultivo, en su composición original o suplementados con diferentes concentraciones de

glucosa y/o diferentes concentraciones de colorante alimenticio rojo, sobre un conjunto de aislados seleccionados por su dificultad a la hora de clasificarlos como compatibles o incompatibles en medios de cultivo estándar. Una vez se determinaron las condiciones óptimas para la formación de la zona de aversión característica e inequívoca de reacciones de incompatibilidad, dicha caracterización a nivel macroscópico se comparó con observaciones a nivel microscópico para corroborar el tipo de reacción miceliar.

II.3. MATERIAL Y MÉTODOS

II.3.1. Aislados

Los aislados seleccionados para el estudio se obtuvieron de plantas afectadas por Podredumbre blanca causada por *S. rolfsii*, procedentes de Andalucía (aislados Sr-167 y Sr-395), sur de Portugal (aislados Sr-419 y Sr-431) y sur de Italia (aislado Sr-401). Estos aislados eran representativos de aquellos que mostraron dificultad a la hora de determinar el tipo de reacción de compatibilidad o incompatibilidad al ser enfrentados entre sí empleando el medio de cultivo APD estándar (Capítulo III de esta Tesis Doctoral).

II.3.2. Medios de Cultivo

Se evaluaron varios medios de cultivo y enmiendas de los mismos para determinar las condiciones en las que las zonas de aversión aparecieran mejor definidas entre aislados de *S. rolfsii*. En un primer experimento, los aislados Sr-167, -401 y -431 se enfrentaron entre sí para cada uno de los cinco medios de cultivo (tratamientos) analizados. Los tratamientos 1 y 2 consistieron, respectivamente, en el medio APD Difco®

(APD) y el medio de Patterson (MP: 0,68 g KH_2PO_4 , 0,5 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,15 g KCl, 1,0 g NH_4NO_3 , 18,4 g glucosa, 0,5 g extracto de levadura, 15,0 g agar, 1,0 l agua destilada y 200 ml de una solución de elementos metálicos (Vogel, 1964) cuya composición es: 95 ml de agua destilada, 5,0 g ácido cítrico anhidro, 5,0 g $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1,0 g $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0,25 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0,05 g $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0,05 g H_3BO_3 , 0,05 g $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) (Patterson, 1986). Los tratamientos 3, 4 y 5, consistieron en el MP enmendado con cantidades crecientes de glucosa en un 25 (MP-25), 37,5 (MP-37) y 50% (MP-50), lo cual supuso una concentración final de 23,4, 25,9 y 28,4 g/l de glucosa, respectivamente. Cada uno de los cinco tratamientos se evaluó, además, con 0, 90 y 180 $\mu\text{l/l}$ de colorante alimenticio rojo (McCormick Corp., Dallas, Texas, EE.UU.), para obtener un total de 15 medios de cultivo.

II.3.3. Enfrentamientos y Evaluación de las reacciones miceliarias

Para la obtención de micelio en crecimiento activo se colocó un esclerocio de cada uno de los aislados de *S. rolfsii* en placas de Petri con APD que se incubaron a $25 \pm 1^\circ\text{C}$ en oscuridad durante 5 días. Tras la germinación de los esclerocios y posterior desarrollo miceliar, se transfirieron discos de micelio de cada una de las colonias en crecimiento activo a nuevas placas Petri conteniendo los medios de cultivo en los que posteriormente se llevarían a cabo los enfrentamientos. A partir de estos cultivos, se tomaron discos de micelio del extremo de las colonias para enfrentarlos en los diferentes medios de cultivo y combinaciones experimentales. Así, en cada placa de Petri (90 mm de diámetro), se colocaron discos de micelio de cada uno de los tres aislados evaluados, equidistantes entre sí a 40 mm de distancia, con cuatro repeticiones. De la misma forma, para cada aislado evaluado se dispusieron placas Petri en las que los tres discos de micelio pertenecían a un mismo aislado (auto-enfrentamientos). Las placas Petri se incubaron a $25 \pm 1^\circ\text{C}$ en oscuridad durante 10 días. El experimento se repitió dos veces.

Las reacciones miceliales entre los aislados se evaluaron a los 5 y 10 días de crecimiento. En cada una de ellas se estimó la intensidad del antagonismo en función de la escala 0-3, donde: 0= no antagonismo; 1= aversión leve (zona de antagonismo <1 mm de amplitud); 2= aversión moderada (1-2 mm de amplitud); 3= aversión intensa (>2 mm de amplitud).

II.3.4. Validación de los resultados

El medio de cultivo seleccionado como el óptimo para la evaluación de las reacciones miceliales, fue validado en un segundo experimento en el cual los tres aislados de *S. rolfsii* empleados previamente se enfrentaron con dos nuevos aislados, Sr-395 y Sr-419 en todas las combinaciones posibles de acuerdo a lo descrito en el apartado anterior. Del mismo modo, todos los enfrentamientos se repitieron cuatro veces y el experimento en dos ocasiones.

Además, todas las evaluaciones hechas a nivel macroscópico de las reacciones miceliales entre los aislados, fueron examinadas en estudios microscópicos siguiendo el procedimiento descrito por Earnshaw y Boland (1997). Brevemente, se colocaron portaobjetos de vidrio (75x25 mm) cubiertos por una fina capa de APD obtenida por la inmersión de los mismos en APD fundido, en placas de Petri que contenían dos piezas de papel de filtro humedecido con agua estéril sobre varillas de cristal curvadas. Éstos se inocularon con dos discos de micelio de 2 mm de diámetro tomados del extremo en crecimiento activo de cultivos individuales de los aislados de *S. rolfsii*, que se colocaron a 15 mm de distancia. Los portaobjetos se incubaron a $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ en oscuridad durante 2-4 días. En el momento en el que las hifas en crecimiento comenzaron a contactar, se observaron directamente o teñidas con el fluorocromo de unión a ADN DAPI (4', 6-Diamidino-2-fenilindol diclorhidrato) siguiendo el método de tinción descrito por Martin (1987) y por el cual, los portaobjetos se sumergieron en formaldehído al 3% durante 2 min para fijar las hifas y, a continuación, se lavaron durante 1 min en agua estéril por inmersión. Una vez que se secaron por completo, se sumergieron consecutivamente en

una solución DAPI 1 ppm en agua estéril durante 1-10 minutos, incrementando en 1 minuto el tiempo de cada inmersión. Para eliminar el exceso de DAPI en la preparación, se repitió el proceso en agua estéril. Una vez que los portaobjetos se secaron por completo, se observaron inmediatamente bajo un microscopio de epifluorescencia Nikon Microphot-FXA equipado con el filtro UV-2A (Nikon Inc., Melville, NY, EE.UU.). En estas preparaciones microscópicas se determinó la presencia de fusiones hifales, así como otro tipo de interacciones como la aversión entre hifas. La fusión hifal se consideró como perfecta cuando las paredes de las células hifales se fusionaron en el punto de contacto y no se produjo la plasmólisis de las mismas (Begueret et al., 1994).

II.3.5. Análisis de datos

Los experimentos tuvieron un diseño factorial con dos factores (medio de cultivo y concentración de colorante alimentario rojo) con medidas repetidas (estimaciones a los 5 y 10 días de crecimiento). El test *F* de dos colas previo indicó que no existía heterogeneidad de la varianzas entre las dos repeticiones de cada experimento, por lo que los análisis se realizaron combinando los datos de ambos experimentos. Los datos de intensidad de antagonismo se analizaron mediante un procedimiento no-paramétrico para análisis de datos ordinales (Shah & Madden, 2004). El efecto global de los dos factores en el estudio, así como del tiempo de incubación sobre la intensidad del antagonismo, se determinó mediante el análisis de varianza de los datos transformados en rangos utilizando los módulos RANK y MIXED del paquete estadístico SAS (versión 9.1.3; SAS Institute, Cary, NC, EE.UU.). Los valores medios de los rangos calculados mediante el método de mínimos cuadrados se utilizaron para la comparación de medias entre tratamientos (ajuste=Tukey) utilizando el macro MULT de SAS (<https://www.uni-hohenheim.de/bioinformatik/beratung/toolsmacros/sasmacros/mult.sas>). Adicionalmente, se realizaron contrastes lineales de un grado de libertad para evaluar el efecto de las combinaciones de tratamientos experimentales de interés.

II.4. RESULTADOS

La formación de la zona de aversión y el tipo de interacción entre los aislados incompatibles de *S. rolfsii* estuvieron determinados principalmente por el medio de cultivo empleado y la concentración de colorante alimenticio rojo utilizada (Figs. II.2 a II.4). Las interacciones de los aislados consigo mismos (auto-enfrentamientos) se identificaron sin dificultad como reacciones de compatibilidad en todos los aislados y combinaciones de medio de cultivo y concentración de colorante evaluadas. Estas interacciones se caracterizaron por la formación de un crecimiento micelial continuo de las colonias enfrentadas y, por tanto, ausencia de zonas de aversión en la zona de contacto entre ellas (Fig. II.1).

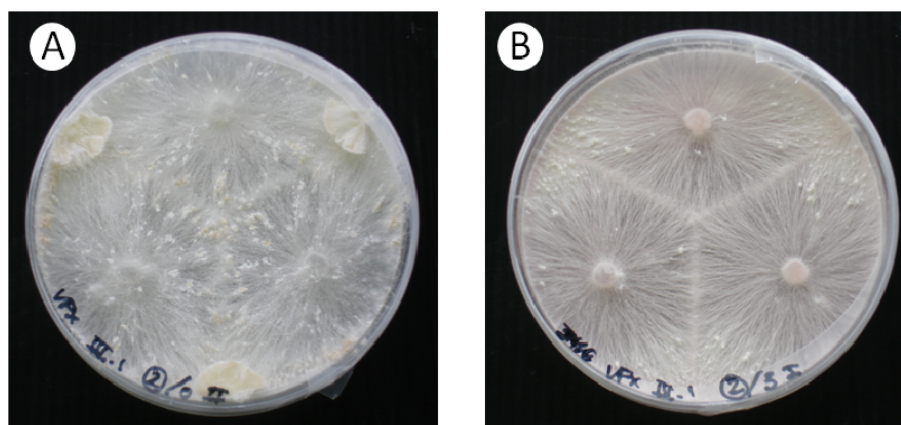


Figura II.1. Reacciones de compatibilidad en auto-enfrentamientos entre colonias del mismo aislado de *Sclerotium rolfsii* (Sr-419) en diferentes medios de cultivo y concentraciones de colorante alimenticio rojo: **A**, medio agar patata dextrosa (APD) sin colorante; **B**, medio de Patterson enmendado con 90 µl/l de colorante.

En las reacciones incompatibles, por el contrario, se produjo una interacción visible entre las colonias fúngicas enfrentadas, caracterizada por la formación de una línea roja en el reverso de la placa unida a una zona de escaso desarrollo de micelio aéreo en la superficie de la colonia. Aunque esta zona de aversión se manifestó claramente tanto en la superficie de la colonia como en el reverso de la placa de Petri, fue más evidente en su reverso, por lo que fue en éste en el que se evaluó la

intensidad de antagonismo (Fig. II.2). La frecuencia de cada uno de los valores de intensidad de la reacción para el conjunto de enfrentamientos evaluados y para cada uno de los medios de cultivo, concentraciones de colorante alimenticio rojo y tiempo de evaluación se muestran en la Figura II.3 y los resultados de los análisis estadísticos en la Figura II.4. En ninguno de los tratamientos sin colorante se observó con claridad las zonas de aversión en el reverso de las placas de Petri para ninguno de los enfrentamientos entre aislados (Fig. II.3), por lo que estos datos no fueron incluidos en el análisis estadístico. En el resto de combinaciones experimentales, la intensidad del antagonismo en las reacciones incompatibles estuvo determinada por el tipo de medio de cultivo ($F = 16,21$, $P < 0,001$) (Fig. II.4A), y en menor medida por la concentraciones de colorante ($F = 5,84$, $P = 0,028$) (Fig. II.4B) o el momento de la evaluación ($F = 5,71$, $P = 0,034$) (Fig. II.4C). No se observaron efectos significativos ($F < 3,32$, $P > 0,057$) para las interacciones entre estos tres factores.

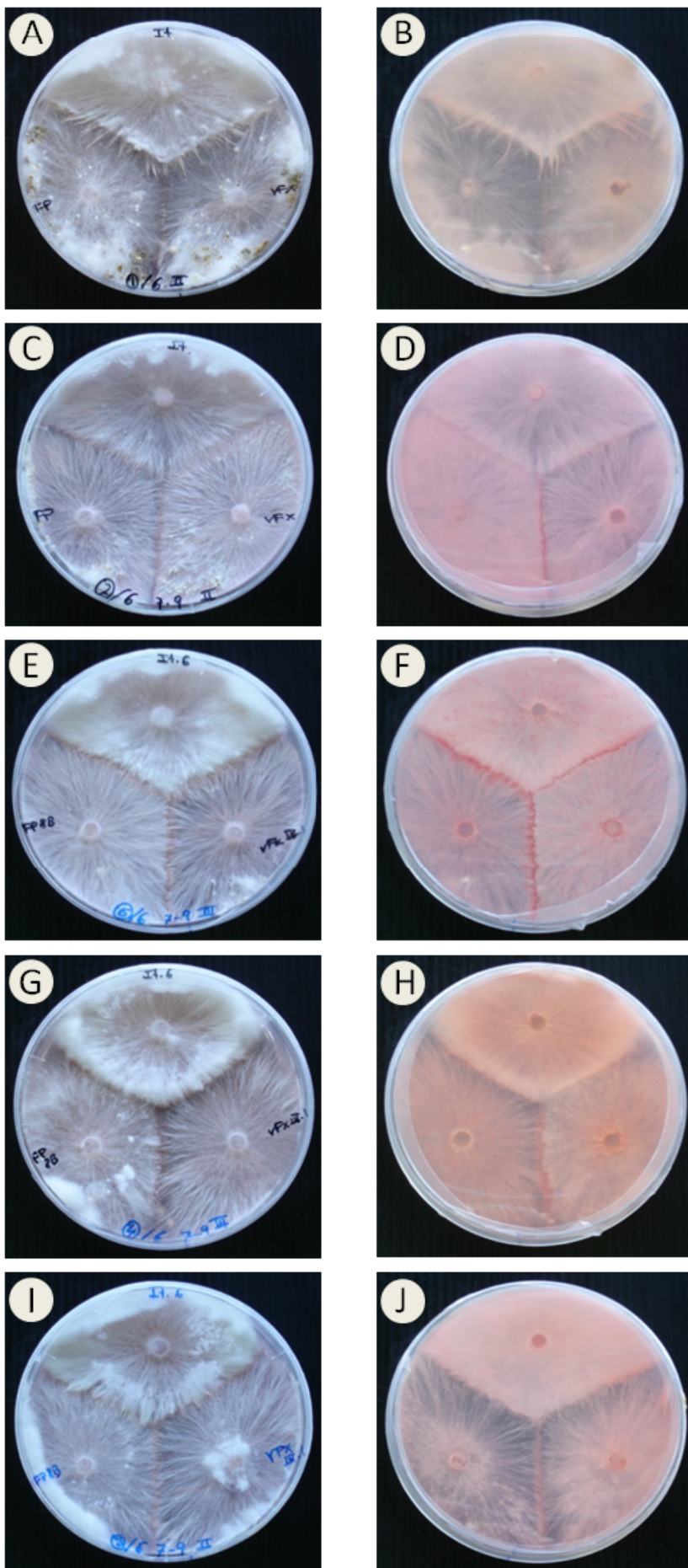


Figura II.2. Reacciones miceliales entre los aislados de *Sclerotium rolfsii* Sr-167, Sr-401 y Sr-431 en diferentes medios de cultivo enmendados con 180 µl/l de colorante alimenticio rojo en placas de Petri incubadas a 25±1°C durante 5 días en oscuridad, vistas desde la superficie de la colonia (columna izquierda) o desde el reverso (columna derecha). **A, B:** agar patata dextrosa (APD); **C, D:** medio de Patterson estándar (MP); **E, F:** MP suplementado con 25% de glucosa (23,4 g/l final); **G, H:** MP suplementado con 37,5% de glucosa (25,9 g/l final); **I, J:** MP suplementado con 50% de glucosa (28,4 g/l final). Las reacciones en la zona de interacción consistieron en una línea de menor densidad de micelio en la superficie de la colonia y una línea roja en el reverso de la colonia de diferente intensidad en función del medio de cultivo utilizado.

En general, el índice medio de intensidad de la reacción de aversión más alto ($64,44 \pm 1,53$) se obtuvo para el medio MP-25, i.e., MP estándar suplementado con un 25% adicional de glucosa (23,4 g/l) (Fig. II.4A). En este medio de cultivo, el 75 y 25% de los enfrentamientos mostraron una aversión moderada o intensa, respectivamente, cuando se enmendó con 90 µl/l de colorante, mientras que fue intensa en la mayoría de los enfrentamientos (91,7%) con 180 µl/l de colorante (Fig. II.2E, F; Fig. II.3E). Estos resultados no variaron con el tiempo de incubación de 5 o 10 días (Fig. II.3F).

El resto de combinaciones experimentales de este mismo medio de cultivo suplementado con concentraciones mayores de glucosa (MP-37 y MP-50) o concentración estándar (MP), mostraron índices de intensidad significativamente inferiores ($P < 0,05$) y no mostraron diferencias significativas entre ellos ($P \geq 0,05$) (Fig. II.4A). Así, el índice medio de intensidad de antagonismo decreció hasta valores de $46,47 \pm 4,09$ y $30,53 \pm 3,89$ para los medios de cultivo MP-37 (25,9 g de glucosa/l) y MP-50 (28,4 g de glucosa/l), respectivamente, alcanzando un valor intermedio de $41,94 \pm 7,11$ para el MP estándar (18,0 g de glucosa/l). En estos tres medios de cultivo, predominaron las reacciones de aversión moderadas en el 47,2% de los enfrentamientos, observándose una reacción ligera o intensa en el 29,2 y 23,6% de los mismos, respectivamente (Fig. II.3C, D, G-J). La intensidad de las reacciones de aversión fueron además similares para las dos concentraciones de colorante evaluadas, pero la intensidad de las mismas se incrementó con el tiempo de incubación, siendo estimadas como intensa en el 30,4% de los enfrentamientos tras 10 días de

incubación frente al 16,7% que alcanzaron este nivel máximo de intensidad a los 5 días de incubación (Fig. II.3C, D, G-J).

El valor de intensidad medio más bajo ($P < 0,05$) fue de $19,13 \pm 2,29$ para el medio de cultivo APD (Fig. II.4A). En este medio de cultivo enmendado con cualquiera de las dos concentraciones de colorante, no se observó en ningún caso reacciones de aversión intensas. Estas reacciones fueron calificadas como leves (91,7% de los enfrentamientos) o entre leves y moderadas (50% de los enfrentamientos) cuando se añadieron 90 y 180 $\mu\text{l/l}$ de colorante, respectivamente, tras 5 días de incubación (Fig. II.3A, B). A los 10 días, en cambio, mientras que la aversión siguió observándose levemente en medio enmendado con 90 $\mu\text{l/l}$ de colorante, progresó hasta moderada con 180 $\mu\text{l/l}$ de colorante (Fig. II.3A, B).

En base a los resultados obtenidos, el medio de cultivo MP con una concentración final de glucosa de 23,4 g/l (MP-25) y 180 $\mu\text{l/l}$ de colorante alimenticio rojo (medio modificado de Patterson: MPM) fue el medio de cultivo más efectivo para maximizar el tamaño, la densidad y la identificación de las zonas de aversión para el conjunto de aislados evaluados. Esta nueva formulación mejoró significativamente ($P < 0,019$) los valores de intensidad de antagonismo estimada para los medios de cultivo APD y MP estándar que son los medios actualmente utilizados para la identificación de GCMs en *S. rolfsii* y *S. sclerotiorum*. Así, comparados con los valores estimados para el medio de cultivo MPM, los índices medios de intensidad se incrementaron de 1,90 (disminución de la tasa media de un 35,6) a 11,34 (disminución de la tasa media de un 68,5) para el medio de cultivo APD y de 1,58 (disminución de la tasa media de un 27,6) a 1,98 (disminución de la tasa media de un 37,1) para el medio de cultivo MP estándar (Fig. II.5).

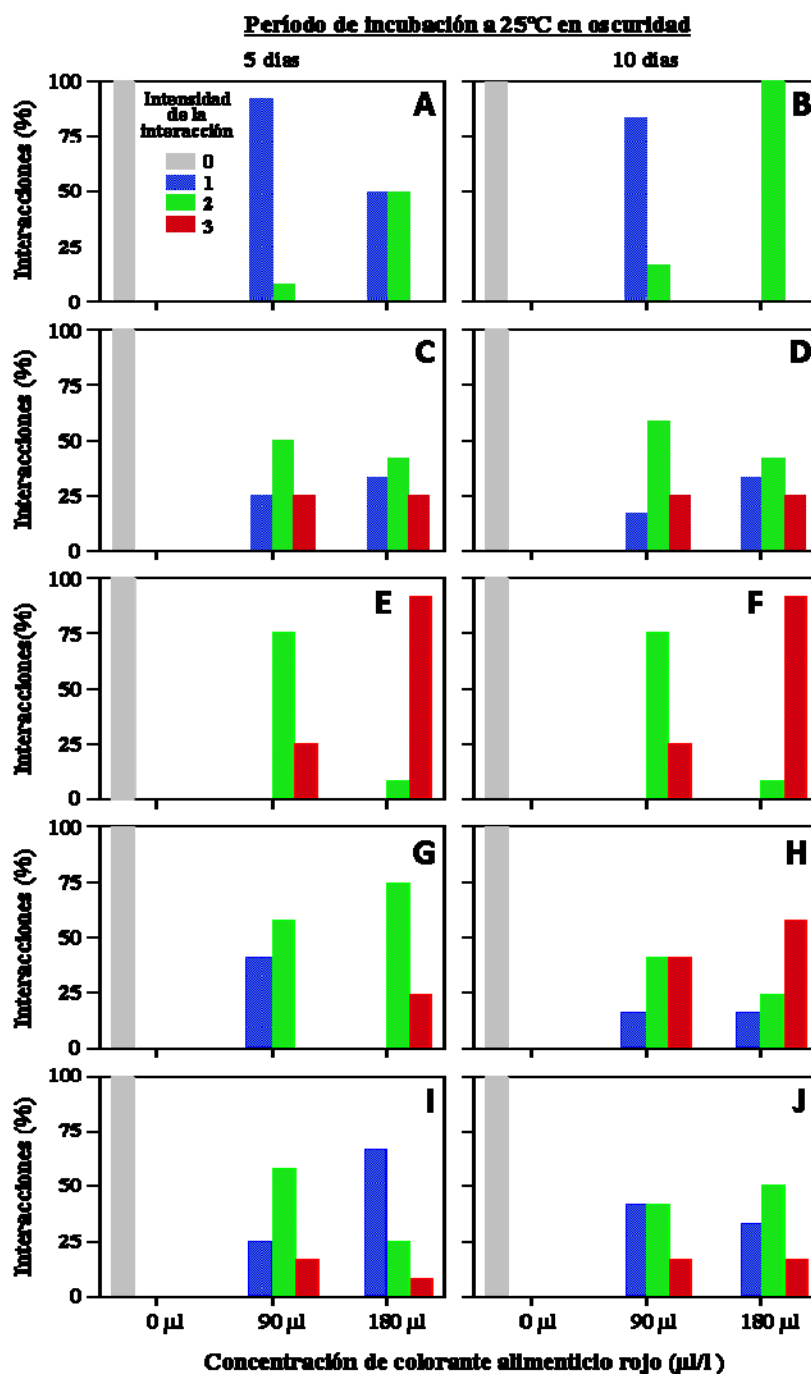


Figura II.3. Intensidad de antagonismo en las reacciones miceliarias entre los aislados de *Sclerotium rolfsii* Sr-167, Sr-401 y Sr-431 en diferentes medios de cultivo incubados a $25\pm 1^\circ\text{C}$ en oscuridad durante 5 (columna izquierda) o 10 días (columna derecha). **A, B:** agar patata dextrosa (APD); **C, D:** medio de Patterson estándar (MP); **E, F:** MP suplementado con 25% de glucosa (23,4 g/l final); **G, H:** MP suplementado con 37,5% de glucosa (25,9 g/l final); **I, J:** MP suplementado con 50% de glucosa (28,4 g/l final). Estos medios de cultivo se suplementaron con 0, 90 o 180 µl/l de colorante alimenticio rojo. La intensidad del antagonismo se determinó en el reverso de la placa de Petri de acuerdo a una escala de 0-3, donde: 0= no antagonismo; 1= aversión leve (zona de antagonismo <1 mm de amplitud); 2= aversión moderada (1-2 mm de amplitud); 3= aversión intensa (>2 mm de amplitud). Cada barra representa la frecuencia de enfrentamientos en cada uno de los tres niveles de la escala de intensidad de antagonismo.

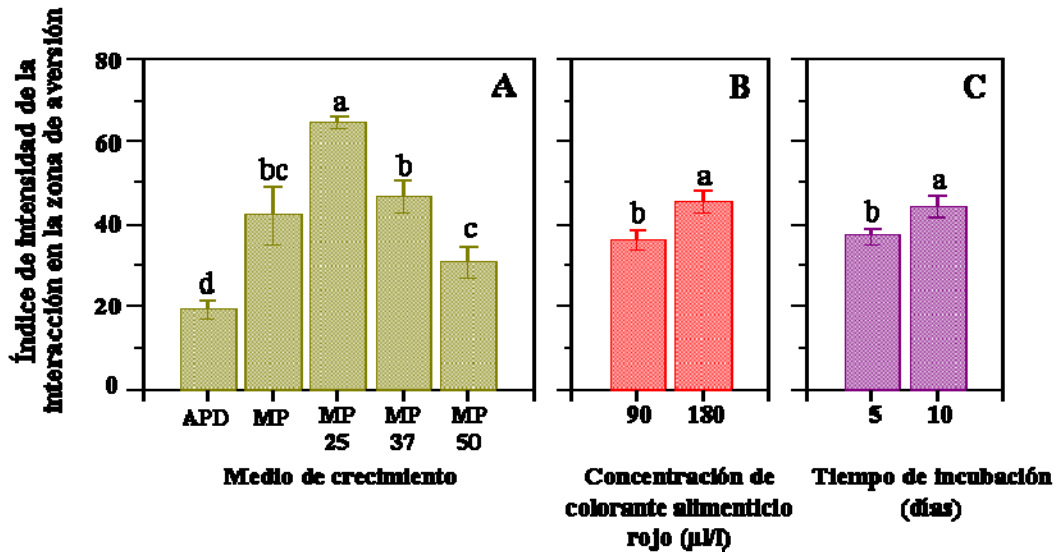


Figura II.4. Índices medios de intensidad de la zona de aversión para las reacciones miceliales entre los aislados de *Sclerotium rolfsii* Sr-167, Sr-401 and Sr-431 sobre diferentes medios de cultivo (A), concentraciones de colorante alimenticio rojo (B) y tiempo de incubación a $25 \pm 1^\circ\text{C}$ en oscuridad (C). Las líneas verticales representan los intervalos de confianza del 95% para los índices medios. En cada panel, barras con diferentes letras indican la existencia de diferencias significativas entre los valores medios de los diferentes tratamientos experimentales ($P < 0.05$, ajuste: Tukey). Medios de cultivo: APD, agar patata dextrosa; MP, medio de Patterson estándar; MP-25, MP suplementado con 25% de glucosa (23,4 g/l final); MP-37, MP suplementado con 37,5% de glucosa (25,9 g/l final); MP-50, MP suplementado con 50% de glucosa (28,4 g/l final).

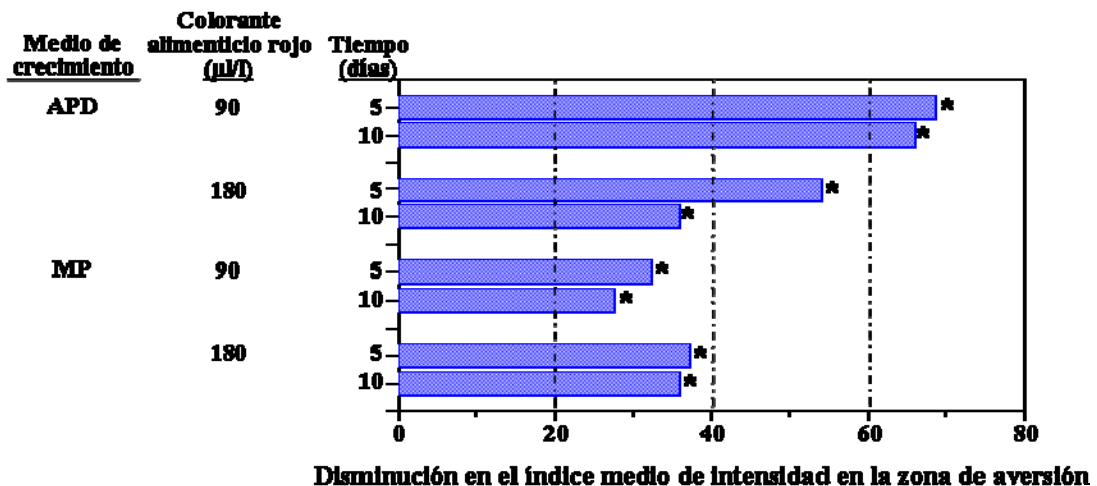


Figura II.5. Disminución en el valor medio de intensidad de la reacción en la zona de aversión con respecto al medio de cultivo MP-25. Los asteriscos indican una reducción significativa ($P < 0.05$, ajuste: Tukey) en los valores medios de índice de intensidad en la zona de aversión de cada uno de los tratamientos respecto a los estimados para el medio MP-25. Medios de cultivo: APD, agar patata dextrosa; MP, medio de Patterson estándar; MP-25, MP suplementado con un 25% de glucosa (23,4 g/l final); MP-37, MP suplementado con un 37,5% de glucosa (25,9 g/l final); MP-50, MP suplementado con un 50% de glucosa (28,4 g/l final).

El medio optimizado para la determinación de GCMs en *S. rolfsii* (MPM), fue validado en un nuevo experimento en el que se incluyeron dos nuevos aislados de *S. rolfsii* al conjunto de tres empleados anteriormente, siendo enfrentados todos entre sí, en todas las combinaciones posibles, sobre dicho medio de cultivo conteniendo colorante o sin él. Los resultados indicaron que en el medio de cultivo MPM sin colorante no se distingue la zona de aversión característica de la reacción entre aislados incompatibles (Fig. II.6). Sin embargo, cuando éste es suplementado con 180 μ l/l de colorante rojo, esta zona de interacción se estimó como moderada o intensa tras 5 días de incubación en el 23,3 y el 73,3% de los enfrentamientos, respectivamente (Fig. II.6). A los 10 días de incubación, la frecuencias de las interacciones estimadas como intensas, aumentó hasta el 94,7% de los casos (Fig. II.6).

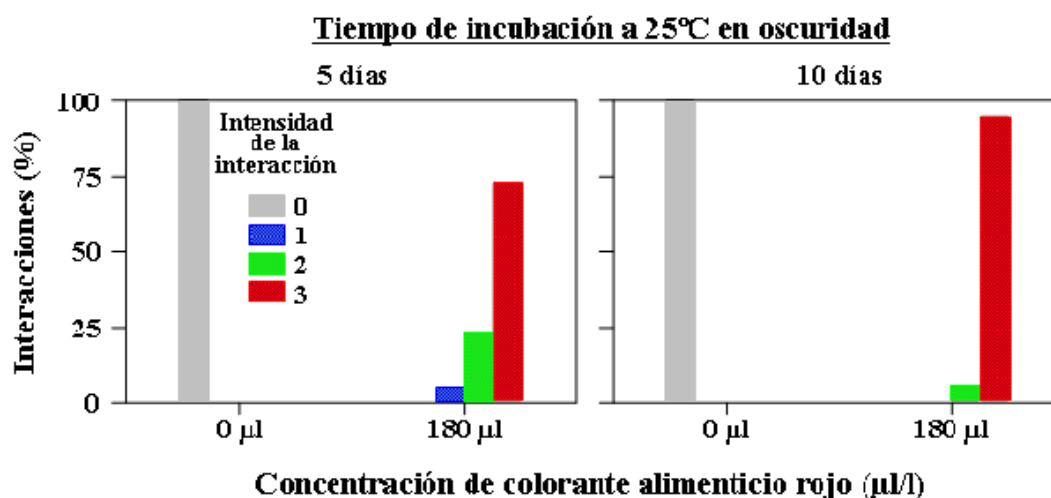


Figura II.6. Intensidad del antagonismo en las reacciones miceliares entre los aislados de *Sclerotium rolfsii* Sr-167, Sr-395, Sr-401, Sr-419 y Sr-431 en el medio de cultivo de Patterson modificado con un 25% de glucosa (23,4 g/l final) y enmendado con 180 μ l/l de colorante alimenticio rojo incubados a $25\pm 1^\circ\text{C}$ durante 5 a 10 días en oscuridad. La intensidad del antagonismo se determinó en el reverso de la colonia siguiendo la escala de 0-3, donde: 0= no antagonismo; 1= aversión leve (zona de antagonismo <1 mm de amplitud); 2= aversión moderada (1-2 mm de amplitud); 3= aversión intensa (>2 mm de amplitud). Cada barra representa la frecuencia de enfrentamientos en cada uno de los tres niveles de la escala de intensidad de antagonismo.

Las observaciones microscópicas del área de interacción entre las hifas de los diferentes aislados de *S. rolfsii* cuyas colonias fueron enfrentadas en portaobjetos, corroboraron la consistencia de las reacciones miceliales entre estos mismos aislados identificadas macroscópicamente sobre el medio de cultivo MPM como compatibles o incompatibles en función de los aislados enfrentados. En los enfrentamientos entre colonias de un mismo aislado o en aquellos en los que no se desarrolló una zona de antagonismo (reacciones compatibles), la fusión hifal resultó en la formación de puentes de anastomosis con continuidad citoplásmica entre las hifas de las dos colonias enfrentadas (Fig. II.7A, B). Por el contrario, en aquellos en los que aparecieron zonas de aversión entre los aislados (reacciones incompatibles), las hifas se repelieron, se evitaron entrelazándose, o si se produjo la fusión hifal, se indujo el colapso de las células en contacto en la zona de unión entre ellas (Fig. II.7C). Este hecho, se manifestó macroscópicamente como un menor desarrollo micelial en la zona de interacción entre las colonias enfrentadas (Fig. II.2).

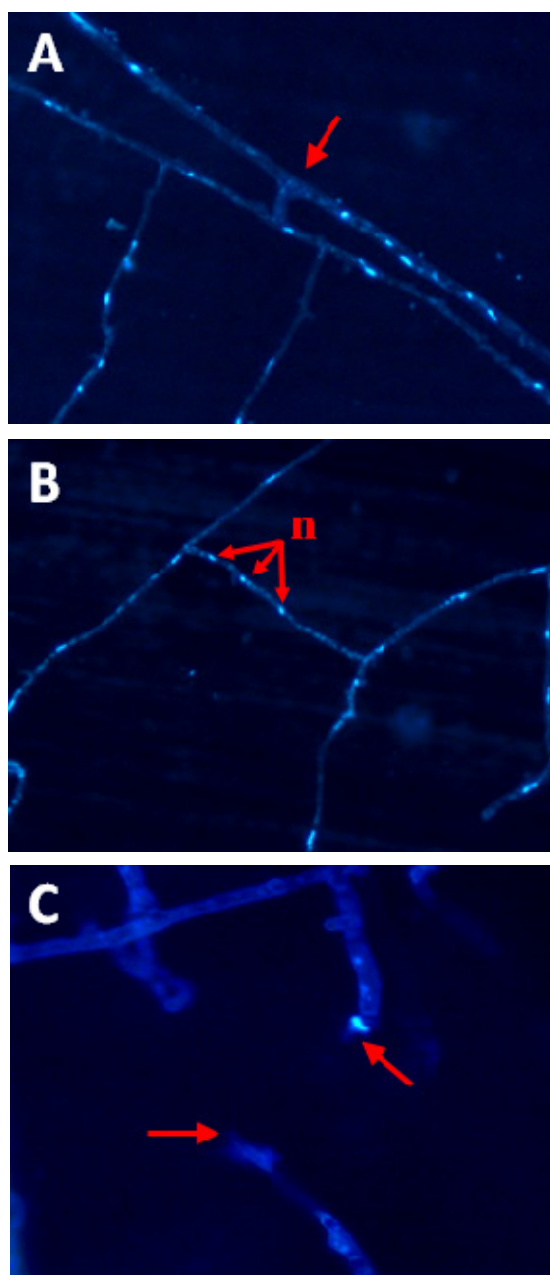


Figura II.7. Reacciones miceliales entre aislados de *Sclerotium rolfsii*. **A, B:** anastomosis hifal entre los aislados compatibles Sr-167 y Sr-407. Las flechas señalan los puentes de anastomosis en la imagen **A** y los núcleos (n) durante su migración a lo largo de ellos durante la fusión en la imagen **B** (x400). **C:** Muerte de células hifales de los aislados incompatibles Sr-167 y Sr-431. Las flechas señalan los extremos de las hifas mostrando degeneración celular. Los aislados de *S. rolfsii* se cultivaron sobre portaobjetos incubados a $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ en oscuridad durante 2-4 días y teñidos con el fluorocromo de unión a ADN DAPI (4', 6-Diamidino-2-fenilindol diclorhidrato) (x1000). Las imágenes se tomaron usando un microscopio de epifluorescencia Nikon Microphot-FXA equipado con el filtro UV-2A.

II.5. DISCUSIÓN

La mayor limitación asociada a las evidencias macroscópicas que se derivan de la incompatibilidad miceliar, se debe a la variabilidad en las características morfológicas de las reacciones de antagonismo que se producen y que a menudo provoca que no sea posible distinguir con claridad la reacción de incompatibilidad entre aislados. El medio de cultivo desarrollado en esta investigación permite, sin embargo, la inequívoca caracterización de las reacciones compatibles o incompatibles entre los aislados de *S. rolfsii*. En este medio de cultivo, en las interacciones incompatibles se puede distinguir con claridad la formación de una zona de interacción entre las colonias en crecimiento, caracterizada por la formación de una línea roja claramente visible en el reverso de las colonias enfrentadas (Fig. II.2F).

El efecto del medio de cultivo para el estudio de interacciones miceliales entre aislados de *S. rolfsii*, solo había sido referido, hasta la fecha, en el trabajo llevado a cabo por Punja y Grogan (1983). Estos autores indicaron variaciones en la intensidad del antagonismo mostrado entre los aislados incompatibles de *S. rolfsii* cuando los enfrentamientos se hacían sobre diferentes medios. La intensidad de las zonas de aversión encontrada en reacciones de incompatibilidad, fue mayor en el medio completo de migración de Snider y Raper (MC), APD y en APD conteniendo 0,1% de extracto de levadura, mientras que las reacciones fueron menos discernibles en otros medios estudiados tras 5-7 días de incubación. Curiosamente, el medio MC que señalan Punja y Grogan (1983) como uno de los más efectivos en la detección de reacciones incompatibles, es un medio de cultivo mínimo que comparte varios de los componentes con el medio de cultivo modificado de Patterson MPM, que se ha señalado en el presente estudio como el más adecuado para tal efecto. No obstante, el medio de cultivo MPM incrementó significativamente la intensidad de las zonas de aversión alcanzadas en APD, utilizado rutinariamente para la determinación de GCMs en *S. rolfsii* por numerosos autores (Adandonon et al., 2005; Almeida et al., 2001; Cilliers et al., 2002; Harlton et al., 1995; Nalim et al., 1995; Punja & Sun,

2001; Sarma et al., 2002). Este mismo medio de cultivo APD, enmendado con colorante alimenticio rojo, es asimismo utilizado para el estudio de GCMs en otras especies de hongos fitopatógenos como *S. cepivorum* (Earnshaw & Boland, 1997), *Sclerotinia homeocarpa* (Mitkowski & Colucci, 2006), o *Sclerotinia minor* y *S. sclerotiorum* (Wu & Subbarao, 2006). Del mismo modo, el medio de cultivo MPM mejora de forma significativa la intensidad de antagonismo observada con el medio de cultivo MP estándar utilizado para el estudio de GCMs en especies como *S. cepivorum* (Couch & Kohn, 2000) y *S. sclerotiorum* (Kohn et al., 1990, 1991; Kull et al., 2004). De esta forma, el medio de cultivo MPM proporciona una forma más fácil y fiable para la determinación de GCMs que los medios de cultivo utilizados en la actualidad para este fin.

El colorante alimenticio rojo no afectó al crecimiento de los aislados en ninguna de las concentraciones en las que se empleó. En este punto, los resultados presentados difieren de aquellos obtenidos por Schafer y Kohn (2006) que mostraron una inhibición en el desarrollo de los aislados de *S. sclerotiorum* creciendo sobre el medio de Patterson enmendado con concentraciones de 150 y 275 $\mu\text{l/l}$ de colorante alimenticio rojo. En contraste a nuestros resultados, estos investigadores determinaron, además, que el medio APD suplementado con 75 $\mu\text{l/l}$ de colorante era el óptimo para la identificación de GCMs en *S. sclerotiorum* (Schafer & Kohn, 2006).

La fiabilidad en la determinación a nivel macroscópico de las reacciones miceliares entre los aislados de *S. rolfsii*, se corroboró con observaciones microscópicas de los enfrentamientos entre las colonias fúngicas sobre portaobjetos. Así, la presencia de áreas donde las células hifales aparecían disgregadas y/o lisadas, coincidió con aquellos enfrentamientos en los que macroscópicamente se observó el desarrollo de una zona de aversión entre los aislados (reacciones incompatibles), mientras que la formación de puentes de anastomosis estables entre las células, ocurrió en aquellos donde se formó, macroscópicamente, una sola colonia entre los aislados enfrentados (reacciones compatibles); observaciones similares han sido asimismo descritas por Punja y Grogan

(1983). La evidencia microscópica encontrada en esta investigación que indica que el deterioro o lisis de las células hifales es el resultado de un proceso de incompatibilidad entre aislados de *S. rolfsii*, ha sido también referida en otros hongos fitopatógenos del mismo género como *S. cepivorum* (Earnshaw & Boland, 1997), en otros basidiomicetos como *Rhizoctonia solani* (Kulik & Dery, 1995) o en diferentes ascomicetos como *S. sclerotiorum* (Kohn et al., 1990), *S. homoeocarpa* (Jo et al., 2008), o *Fusarium graminearum* y *F. pseudograminearum* (Akinsanmi et al., 2008).

En conclusión, el medio de cultivo seleccionado y el protocolo desarrollado para optimizar y favorecer la formación de la zona de aversión característica de las interacciones miceliarias incompatibles en *S. rolfsii*, ofrece un método rápido y fiable para la identificación de GCMs en poblaciones de *S. rolfsii*.

II.6. LITERATURA CITADA

- Adandonon, A., Aveling, T. A. S., Merwe, N. A., Sanders, G. 2005. Genetic variation among *Sclerotium* isolates from Benin and South Africa, determined using mycelia compatibility and ITS rDNA sequence data. *Australasian Plant Pathology* 34: 19-25.
- Akinsanmi, O. A., Backhouse, D., Simpfendorfer, S., Chakraborty, S. 2008. Mycelial compatibility reactions of Australian *Fusarium graminearum* and *F. pseudograminearum* isolates compared with AFLP groupings. *Plant Pathology* 57: 251-261.
- Almeida, A. M. R., Abdelnoor, R. V., Calvo, E. S., Tessnman, D., Yorinori, J. T. 2001. Genotypic diversity among Brazilian isolates of *Sclerotium rolfsii*. *Journal of Phytopathology* 149: 493-502.

- Begueret, J., Turcq, B., Clave, C. 1994. Vegetative incompatibility in filamentous fungi: het genes begin to talk. *Trends in Genetics* 10: 441-446.
- Cilliers, A. J., Pretorius, Z. A., van Wyk, P. S. 2002. Mycelial compatibility groups of *Sclerotium rolfsii* in South Africa. *South African Journal of Botany* 68: 389-392.
- Couch, B. C., Kohn, L. M. 2000. Clonal spread of *Sclerotium cepivorum* in onion production with evidence of past recombination events. *Phytopathology* 90: 514-521.
- Earnshaw, D., Boland, G. J. 1997. Mycelial compatibility groups in *Sclerotium cepivorum*. *Plant Pathology* 46: 229-238.
- Harlton, C. E., Uvesque, C. A., Punja, Z. K. 1995. Genetic diversity in *Sclerotium (Athelia) rolfsii* and related species. *Phytopathology* 85: 1269-1281.
- Jo, Y. -K., Chang, S. W., Rees, J., Jung, G. 2008. Reassessment of vegetative compatibility of *Sclerotinia homoeocarpa* using nitrate-nonutilizing mutants. *Phytopathology* 98: 108-114.
- Kohn, L. M., Carbone, I., Anderson, J. B. 1990. Mycelial interactions in *Sclerotinia sclerotiorum*. *Experimental Mycology* 14: 255-267.
- Kohn, L. M., Stasovski, E., Carbone, I., Royer, J., Anderson, J. B. 1991. Mycelial incompatibility and molecular markers identify genetic variability in field populations of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Phytopathology* 81: 480-485.
- Kulik, M. M., Dery, P. D. 1995. Use of DAPI for anastomosis group typing of strains of the fungus *Rhizoctonia solani*. *Biotechnic & Histochemistry* 70: 95-98.
- Kull, L. S., Pedersen, W. L., Palmquist, D., Hartman, G. L. 2004. Mycelial compatibility grouping and aggressiveness of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Plant Disease* 88: 325-332.

- Leslie, J. F. 1993. Fungal vegetative compatibility. Annual Review of Phytopathology 31: 127-150.
- Martin, B. 1987. Rapid tentative identification of *Rhizoctonia* spp., associated with diseased turf grasses. Plant Disease 71: 47-49.
- Mitkowski, N. A., Colucci, S. 2006. The Identification of a limited number of vegetative compatibility groups within isolates of *Sclerotinia homoeocarpa* infecting *Poa* spp. and *Agrostis palustris* from temperate climates. Journal of Phytopathology 154: 500-503.
- Nalim, F. A., Starr, J. L., Woodard, K. E., Segner, S., Keller, N. P. 1995. Mycelial compatibility groups in Texas peanut field populations of *Sclerotium rolfsii*. Phytopathology 85: 1507-1512.
- Patterson, C. L. 1986. The comparative biology, epidemiology, and control of lettuce drop caused by *Sclerotinia minor* and *S. sclerotiorum*, and the genetic analysis of vegetative and sexual compatibility in *S. minor*. Ph.D. Thesis, University of California Davis, CA, EE.UU. 69 pp.
- Punja, Z. K., Grogan, R. G. 1983. Hyphal interactions and antagonism among field isolates and single-basidiospore strains of *Athelia (Sclerotium) rolfsii*. Phytopathology 73: 1279-1284.
- Punja, Z. K., Sun, L. J. 2001. Genetic diversity among mycelial compatibility groups of *Sclerotium rolfsii* (teleomorph *Athelia rolfsii*) and *Sclerotium delphinii*. Mycological Research 105: 537-546.
- Sarma, B. K., Singh, U. P., Singh, K. P. 2002. Variability in Indian isolates of *Sclerotium rolfsii*. Mycologia 94: 1051-1058.
- Schafer, M. R., Kohn L. M. 2006. An optimized method for mycelial compatibility testing in *Sclerotinia sclerotiorum*. Mycologia 98: 593-597.
- Shah, D. A., Madden, L. V. 2004. Nonparametric analysis of ordinal data in designed factorial experiments. Phytopathology 94: 33-43.

- Snider, P. J., Raper, J. R. 1958. Nuclear migration in the basidiomycete *Schizophyllum commune*. American Journal of Botany 45: 538-546.
- Vogel, H. J. 1964. Distribution of lysine pathways among fungi: evolutionary implications. American Naturalist 98: 435-446.
- Worrall, J. J. 1997. Somatic incompatibility in basidiomycetes. Mycologia 89: 24-36.
- Wu, B. M., Subbarao, K. V. 2006. Analyses of lettuce drop incidence and population structure of *Sclerotinia sclerotiorum* and *S. minor*. Phytopathology 96: 1322-1329.

CAPÍTULO III

**IDENTIFICACIÓN DE GRUPOS DE
COMPATIBILIDAD MICELIAR EN
POBLACIONES DE *Sclerotium rolfsii*
INFECTANDO CULTIVOS DE REMOLACHA
AZUCARERA DE SIEMBRA OTOÑAL EN
REGIONES DE CLIMA MEDITERRÁNEO**

III.1. RESUMEN

El estudio de los grupos de compatibilidad miceliar (GCMs) como un método válido y fiable para el análisis de la diversidad genética intraespecífica entre los componentes de distintas poblaciones fúngicas, es especialmente relevante en hongos fitopatógenos de reproducción estrictamente asexual así como en aquellos en los que la fase sexual no juega un papel relevante en condiciones naturales. En este escenario se enmarca el hongo de suelo *Sclerotium rolfsii*, en el que su estado sexual, *Athelia rolfsii*, que raramente ha sido descrito en condiciones naturales, juega un papel aún desconocido. Este hecho, determina que la única vía posible de intercambio de material genético y, por tanto, de generar variabilidad entre los individuos de una población de *S. rolfsii*, sea la fusión directa entre las hifas de los aislados y formación de un heterocarionte estable que comparta el material celular en un citoplasma común. Debido a esto, los aislados compatibles, agrupados en el mismo GCM, estarán aislados genéticamente del resto de individuos con los que no sea posible llevar a cabo dicha fusión hifal, los cuales, formarán diferentes GCMs. Los eventos genéticos que ocurran en cada uno de los grupos de compatibilidad serán, por tanto, independientes entre sí, generando variabilidad entre las poblaciones.

S. rolfsii se considera un hongo cosmopolita que, sin embargo, causa enfermedades de mayor relevancia en regiones templadas y subtropicales. La remolacha azucarera de siembra otoñal es uno de los cultivos más afectados por este patógeno en áreas de clima Mediterráneo donde se suele practicar este sistema de cultivo. En estas zonas, sin embargo, se desconoce por completo la estructura de las poblaciones, conocimiento que sería de gran utilidad para un manejo más eficiente de las epidemias que ocasiona, objetivo final por el que se plantea esta investigación.

Para ello, a partir de una colección de 459 aislados de *S. rolfsii* infectando remolacha azucarera de siembra otoñal afectados por Podredumbre blanca en ocho localidades en Andalucía, cuatro en Chile,

cinco en Portugal y una en Italia, se identificaron 12 GCMs atendiendo a la compatibilidad miceliar entre los aislados. Los GCMs i y iii fueron los que presentaron una mayor prevalencia, representando el 64,71 y 18,95% de los aislados, respectivamente. El CGM i fue identificado, no obstante, únicamente en la Península Ibérica, mientras que el MCG iii estuvo presente en 10 de las 18 localidades estudiadas de la Península Ibérica y Chile. Los diez GCMs restantes estuvieron más localmente distribuidos, estando presentes en varias regiones de un mismo país (GCM ii, vi y ix) o de diferentes países (GCM v), o bien restringidos a localidades específicas (GCMs iv, vii, viii, x, xi, xii). Los GCMs iv, vii, y x estuvieron formados por un único aislado. En las parcelas muestreadas de forma intensa en el sur de España, el número máximo de GCMs presentes en un campo fue de tres, aunque en la mayoría de las parcelas aparecieron dos o uno.

La información generada en este Capítulo de la Tesis Doctoral, constituye la primera referencia hasta la fecha de la estructura de las poblaciones de *S. rolfsii* en los suelos agrícolas infestados donde se desarrolla el cultivo de la remolacha azucarera de siembra otoñal en el mundo. Esta información contribuirá al diseño de medidas de control en el manejo integrado de la Podredumbre blanca en particular y, además, de las podredumbres de raíces causadas por este patógeno en otros cultivos de interés agrícola.

III.2. INTRODUCCIÓN

Sclerotium rolfsii Sacc. es un hongo de suelo necrotrofo facultativo, agente causal de enfermedades de gran significación para la producción agrícola por la magnitud de las pérdidas que ocasionan. Como patógeno de plantas, se caracteriza por poseer (i) un amplio rango de huéspedes susceptibles y (ii) una amplia distribución geográfica, así como por (iii) su capacidad para persistir en el suelo durante largo periodo de tiempo por la formación de esclerocios (Aycocock, 1966; Punja, 1985).

La distribución geográfica de *S. rolfsii* incluye prácticamente todas las zonas mundiales de producción agrícola ya que ha sido descrito en zonas comprendidas entre los 45° de latitud Norte y Sur, sin embargo, las epidemias causadas por este patógeno son más severas en regiones subtropicales y templadas donde la germinación de los esclerocios, y la infección y posterior desarrollo de la enfermedad son favorecidas por las condiciones de elevada temperatura prevalentes en estas zonas (Punja, 1985). Entre estas áreas se incluyen las regiones con clima de tipo Mediterráneo donde los ataques de *S. rolfsii* son particularmente relevantes en cultivos de remolacha azucarera (*Beta vulgaris* L.) de siembra otoñal, al coincidir durante la última fase de desarrollo del cultivo previa a la recolección, altas temperaturas y elevada humedad que favorecen el desarrollo del patógeno. Se han descrito, por tanto, severas epidemias de Podredumbre blanca en cultivos de remolacha azucarera en todos los países de la cuenca Mediterránea donde se practica este sistema de cultivo, incluyendo España (AIMCRA, 2004), Italia (Gabellini & Cerato, 2004), Marruecos (Ezzahiri, 2004; Fidah, 1995) o Portugal (Paim, 2004), así como en regiones con condiciones de clima Mediterráneo de otras partes del mundo como el sur de California en EE.UU. (Schneider & Whitney, 1996) y Chile (Paillalef-Monnrad, 2004). En Andalucía, *S. rolfsii* está ampliamente distribuido a lo largo de los suelos agrícolas del Valle del Guadalquivir y puede causar entre el 5 y 80% de pérdidas en los cultivos de remolacha azucarera de siembra otoñal (AIMCRA, 2004).

Sclerotium rolfsii es el estado miceliar anamórfico de *Athelia rolfsii* (Curzi) Tu & Kimbrough, en el que destaca la formación de abundante micelio aéreo blanco, la carencia de estado conidial y la producción de esclerocios como estructura de supervivencia y dispersión tanto en condiciones naturales como de laboratorio, cuando la falta de nutrientes, condiciones ambientales adversas o la presencia de barreras físicas impiden su desarrollo (Aycock, 1966). El estado sexual de este hongo, *A. rolfsii*, rara vez ha sido descrito en condiciones naturales, por lo que su papel en el ciclo vital del patógeno es desconocido haciendo que *S. rolfsii* sea considerado como un organismo de reproducción exclusivamente asexual (Nalim et al., 1995).

En este escenario, el conocimiento de la diversidad genética de las poblaciones de *S. rolfsii* en áreas infestadas por este patógeno, proporcionaría valiosa información sobre la estructura de éstas, así como de la dispersión y distribución de sus componentes, para un manejo adecuado de las podredumbres de raíces causadas por este patógeno. Una de las herramientas más utilizadas para este propósito es la caracterización de poblaciones fúngicas mediante la ocurrencia de grupos de compatibilidad miceliar (GCMs) (Leslie, 1993). Este método indirecto de evaluación de la variabilidad genética entre los componentes de dichas poblaciones, ha sido extensamente utilizado en los últimos años y es particularmente relevante en hongos en los que la reproducción sexual tiene un mínimo impacto en su ciclo vital (Kohn et al., 1991; Leslie, 1993). En este sentido, el papel de los GCMs sería el de preservar la identidad de los aislados genéticamente diferentes, impidiendo el intercambio de material genético entre ellos, dando lugar así a reservorios de información genética estancos y pudiendo diferir en muchas de sus características incluyendo las morfológicas, fisiológicas, patogénicas o de virulencia (Caten, 1972; Milgroom, 1996).

El fenómeno de la incompatibilidad miceliar entre aislados de *S. rolfsii* fue demostrado por vez primera por Punja y Grogan en 1983. Desde entonces, son diversas las investigaciones que han abordado la ocurrencia de GCMs, así como el estudio de la variabilidad genética entre las

poblaciones de *S. rolfsii* (Adandonon et al., 2005; Almeida et al., 2001; Cilliers et al., 2000, 2002; Harlton et al., 1995; Nalim et al., 1995; Okabe & Matsumoto, 2000; Punja & Sun, 2001; Sarma et al., 2002). Dicha variabilidad basada en la compatibilidad miceliar, ha sido demostrada entre poblaciones de *S. rolfsii* procedentes tanto de diferentes regiones geográficas como de plantas huésped, si bien, diversas investigaciones sugieren que ciertos GCMs en *S. rolfsii* podrían estar asociados a un huésped específico o al área geográfica de origen. Así, los estudios realizados en Brasil (Almeida et al., 2001) o India (Sarma et al., 2002), indicaron que existe una considerable variabilidad genética entre los aislados analizados sin una clara correlación entre el GCM al que pertenecen y el huésped o la zona de origen. No obstante, Cilliers et al. (2002), en un estudio similar llevado a cabo con aislados del patógeno obtenidos en Sudáfrica, sí encontraron cierta relación de los GCMs identificados y el huésped del que se obtuvieron los aislados. La diversidad entre los GCMs también ha sido demostrada a menor en escala, en particular en campos de cultivo de cacahuete en Texas, EEUU (Nalim et al., 1995), y en Japón (Okabe & Matsumoto, 2000). En ambos casos, los autores constataron la existencia de una alta variación en los GCMs identificados entre aislados procedentes de un mismo campo, con un máximo de tres (Nalim et al., 1995) o cinco (Okabe & Matsumoto, 2000) GCMs identificados en cada uno de ellos.

En este contexto, el objetivo particular de esta investigación es el de generar información sobre la estructura genética estimada por la ocurrencia de GCMs en las poblaciones de *S. rolfsii*, la cual no está disponible en áreas de clima de tipo Mediterráneo. Para ello, se utilizó una colección de aislados de diferentes poblaciones de *S. rolfsii* infectando cultivos de remolacha azucarera de siembra otoñal en cuatro países de clima Mediterráneo y ocho campos de cultivo intensamente muestreados en el sur de España, con el objeto de: (i) evaluar la diversidad y distribución geográfica de los GCMs identificados entre las poblaciones de *S. rolfsii* y (ii) determinar la diversidad y prevalencia de los GCMs de *S. rolfsii* dentro de los campos de cultivo del sur de España.

III.3. MATERIALES Y MÉTODOS

III.3.1. Muestreo y Aislamiento de *Sclerotium rolfsii*

La variabilidad de las poblaciones de *S. rolfsii* fue estudiada en diferentes escalas espaciales, para lo cual, se llevaron a cabo dos procedimientos de muestreo. En el primero, se muestrearon intensamente parcelas de cultivo de remolacha azucarera localizadas en el sur de España con objeto de determinar la variabilidad a nivel de campo dentro de cada una de las parcelas. Para ello, en cada parcela de estudio se seleccionaron áreas de 640 m² de extensión que fueron divididas en un total de 80 cuadrículas de 4x2 m donde se seleccionó al azar una raíz de remolacha azucarera con síntomas de Podredumbre blanca en cada uno de estos cuadrantes (Fig. III.1). Dichos muestreos se llevaron a cabo en 8 parcelas situadas en diversas localidades de las provincias de Cádiz (tres localidades), Córdoba (dos localidades), Sevilla (dos localidades) y Huelva (una localidad).

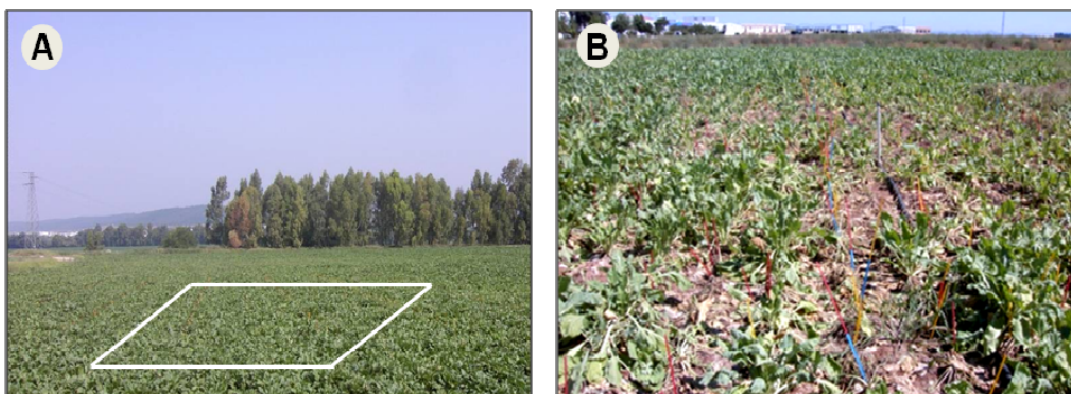


Figura III.1: Parcelas de remolacha azucarera intensamente muestreadas en Andalucía: **A**, esquema del área de muestreo, 640 m² ha, dividida en 80 cuadrantes de 4x2 m; **B**, plantas sintomáticas marcadas en cada cuadrante para el seguimiento de las epidemias de Podredumbre blanca y la posterior toma de muestras de plantas afectadas.

En el segundo tipo de muestreo, dirigido al estudio de la variabilidad entre localidades en una escala espacial más amplia, se seleccionaron arbitrariamente parcelas de cultivo afectadas por la enfermedad en diversas localidades de Chile (cuatro localidades), Italia (una localidad) y Portugal (cinco localidades) y donde se tomaron al menos cuatro raíces de remolacha sintomáticas. En todos los casos, el área muestreada en cada país fue representativa de cultivos de remolacha azucarera de siembra otoñal afectados por Podredumbre blanca.

Para el aislamiento de *S. rolfsii* y la obtención de cultivos puros mono-esclerociales, los tejidos sintomáticos de las raíces afectadas se lavaron con agua bajo el grifo, se desinfectaron durante 1 min en hipoclorito sódico (NaOCl) al 0,5% y se dejaron secar entre dos capas de papel de filtro estéril. Fragmentos de 2 a 4 mm² de los tejidos desinfectados se colocaron en placas de Petri sobre el medio de cultivo Agar Patata Dextrosa (APD, Difco Laboratories, Detroit, EE.UU.) enmendado con 0,25 ml de ácido láctico al 85%. Las placas se incubaron a 25±1°C en oscuridad durante 2 a 5 días. A partir de las colonias de *S. rolfsii* desarrolladas, se obtuvieron cultivos puros masales del hongo de cada una de las raíces de remolacha muestreadas. A continuación, de cada uno de estos cultivos puros masales se seleccionó un único esclerocio que se transfirió a una nueva placa de APD que se incubó en las mismas condiciones a las descritas para los aislamientos y que permitió la obtención de esclerocios de cada uno de los aislados. Una vez maduros, los esclerocios se retiraron de la placa de Petri, se dejaron secar a temperatura ambiente en condiciones asépticas en cabina de flujo laminar y una vez secos se dispusieron en bolsas de papel que se almacenaron en recipientes estancos a temperatura ambiente y condiciones secas hasta su uso. Los aislados se conservan en la Micoteca del Instituto de Agricultura Sostenible, CSIC.

III.3.2. Colección de aislados

Se obtuvieron un total de 459 aislados de *S. rolfsii* a partir de plantas de remolacha azucarera de siembra otoñal afectadas por la Podredumbre blanca de cultivos afectados en 18 localidades de Chile (cuatro localidades, 22 aislados), Italia (una localidad, un aislado), Portugal (cinco localidades, 63 aislados) y España (ocho localidades, 373 aislados) entre los años 2004 y 2007 (Tabla III.1).

III.3.3. Determinación de grupos de compatibilidad micelial

Para la obtención de micelio de cada uno de los aislados de *S. rolfsii* se colocó un esclerocio de cada uno de ellos en una placa de Petri con APD y se incubó en oscuridad a $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 5 días. Tras la germinación y desarrollo micelial del mismo, se tomaron del extremo de la colonia fúngica en crecimiento activo fragmentos de micelio que se transfirieron a nuevas placas de Petri conteniendo el medio modificado de Patterson y se incubaron en las mismas condiciones durante 5 días. Dicho medio de cultivo se desarrolló *ad hoc* en el Capítulo II de esta Tesis Doctoral y permite la identificación inequívoca de las reacciones miceliales entre aislados de *S. rolfsii*. Para los enfrentamientos, en cada placa (90 mm de diámetro), se colocaron discos de micelio de tres aislados distintos, separados entre sí a 50 mm de distancia, y con cuatro repeticiones. Además, se dispusieron placas Petri en las que los tres discos de micelio procedían del mismo aislado (auto-enfrentamientos). Todas las series de los enfrentamientos se repitieron dos veces.

La evaluación de las reacciones miceliales se realizó macroscópicamente a los 5 y 10 de incubación, en base a la formación de una zona de antagonismo (Punja & Grogan, 1983) y la presencia de una marcada línea roja visible en el reverso de las placas de Petri en el área de contacto micelial entre las colonias enfrentadas de acuerdo a los criterios establecidos en el Capítulo II de esta Tesis Doctoral (Fig. III.2A, B). Por el contrario, las reacciones de compatibilidad se distinguieron por la

continuidad miceliar mostrada entre las colonias además de no detectarse ninguna línea roja entre ellas (Fig. III.2C, D). Los aislados de *S. rolfsii* fueron de esta manera clasificados en GCMs en función de las reacciones de compatibilidad entre ellos.

Debido al elevado número de aislados de *S. rolfsii* empleados en el estudio y la dificultad de enfrentarlos a todos entre sí en todas las combinaciones posibles, los GCMs fueron identificados, en primer lugar, a nivel de parcela. A continuación, se seleccionó un aislado representativo de cada GCM previamente identificados para, finalmente, enfrentar a todos los aislados representativos de los GCMs de cada una de las parcelas en todas las combinaciones posibles (Nalim et al., 1995).

La diversidad de GCMs en cada país y/o localidad fue estimada por el Índice de diversidad de Shannon-Weaver: $H' = -\sum p_i \times \ln p_i$, donde p_i es la frecuencia de cada uno de los GCMs (Shannon & Weaver, 1963).

III.4. RESULTADOS

Se han identificado un total de 12 GCMs de entre los 459 aislados de *S. rolfsii* evaluados, que se designaron por números romanos del i al xii. En la Tabla III.1 se indica el GCM al que pertenece cada aislado, así como el origen geográfico de los mismos.

La reacción de compatibilidad entre los aislados de un mismo GCM se caracterizó por la mezcla de los micelios en la zona de interacción de las distintas colonias (Fig. III.2C, D), mientras que los aislados asignados a GCMs diferentes mostraron aversión entre las colonias junto con la formación de una marcada línea roja en la zona de unión de las mismas (Fig. III.2A, B). Los 459 aislados fueron auto-compatibles, mostrando una reacción similar a la descrita para los aislados compatibles. Todas las repeticiones de los diferentes enfrentamientos mostraron idénticos resultados.

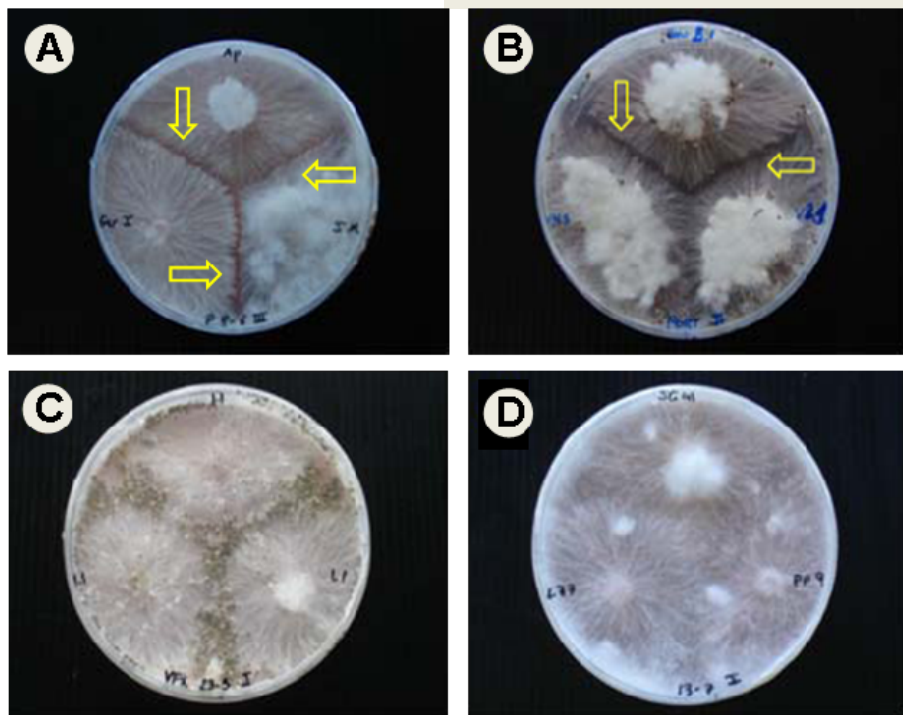


Figura III.2: Interacción micelial entre aislados de *Sclerotium rolfsii* en el medio modificado de Patterson (Capítulo II de esta Tesis Doctoral): **A** y **B**, reacciones incompatibles (diferentes GCMs); **C** y **D**, reacciones compatibles (mismo GCM). Las flechas indican las zonas de antagonismo.

Tabla III.1: Origen geográfico y grupo de compatibilidad miceliar (GCM) de los 459 aislados de *Sclerotium rolfsii* infectando plantas de remolacha azucarera utilizados en este estudio.

Origen geográfico						
País	Provincia	Localidad	Nº. de aislados	GCM ^a	Referencia de los aislados	
Chile	VI	Colchagua	1	vii	Sr1	
	VII	Curicó	2	iii	Sr2, Sr3	
		Linares	8	viii, ix, xii	viii:Sr4-Sr6; ix:Sr7; xii:Sr8-Sr11	
	VIII	Chillán	11	iii, ix, x	iii:Sr12; ix:Sr13-21; x:Sr22	
España	Cádiz	Arcos Fra.	48	i	Sr23-Sr-70	
		Jerez Fra.	50	i, iii	i:Sr71-Sr113; iii:Sr114-Sr120	
		Vejer Fra.	35	i, v	i:Sr121-Sr139; v:Sr140-Sr155	
	Córdoba	Fuente Palmera	37	i	Sr156-Sr192	
		Posadas	31	i, ii, iii	i:Sr193-Sr196; ii:Sr197-Sr213; iii:Sr214-Sr223	
	Huelva	Paterna Campo	64	i, xi	i:Sr224-Sr285; xi:Sr286, Sr287	
	Sevilla	Lebrija	28	i, iii	i:Sr288-Sr290; iii:Sr291-Sr315	
		Los Palacios	80	i, ii	i:Sr316-Sr394; ii:Sr395	
Italia	Bari	Bari	1	iv	iv:Sr396	
Portugal	Lisboa	Vila Franca Xira	26	i, iii, v, vi	i:Sr406, Sr407; iii:Sr408-Sr413; v:Sr414-Sr423; vi:Sr424-Sr431	
		Portalegre	Avis	12	iii	Sr432-Sr443
			Benavila	8	iii	Sr444-Sr451
	Santarém	Coruche	Elvas	10	iii	Sr452-Sr461
				7	iii, vi	iii:Sr462-Sr467; vi:468

^a El GCM se determinó en este estudio.

La distribución y frecuencia de los 12 GCMs identificados varió entre los países y las provincias muestreadas. Así, los GCMs i y iii fueron los más prevalentes, e incluyeron el 64,71 y el 18,95% de los aislados, respectivamente. El GCM i fue identificado solo en la Península Ibérica, estando presente en las ocho localidades muestreadas en Andalucía y en una localidad en el centro de Portugal (Tabla III.1; Fig. III.3). El GCM iii, aunque menos prevalente que el GCM i, fue identificado, sin embargo, en 10 de las 18 parcelas y en todos los países excepto en Italia [Chile (dos localidades), Portugal (cinco) y sur de España (tres)] (Tabla III.1; Fig. III.3). El GCM v que estuvo constituido por el 5,66% de los aislados, se identificó en dos parcelas distantes geográficamente de la Península Ibérica localizadas en Vejer de la Fra. (Provincia de Cádiz) y en Vila Franca de Xira (provincia de Lisboa), en el sur de España y Centro de Portugal, respectivamente. El GCM ii, compuesto por el 3,92% de los aislados, se identificó en dos localidades en Andalucía en las provincias de Córdoba y Sevilla (Tabla III.1; Fig. III.3). Los ocho GCMs restantes, que supusieron el 6,75% del total de aislados, estuvieron distribuidos muy localmente y, asimismo, representados por un número reducido de aislados que osciló entre uno y 10: GCM ix: 10 aislados, vi: nueve aislados, xii: cuatro aislados, viii: tres aislados, y xi: dos aislados. Los GCMs iv, vii y x estuvieron formados por un solo aislado los cuales fueron incompatibles con el resto e identificados en Bari (sur de Italia), Colchagua y Chillán (Chile), respectivamente. De entre estos cinco grupos con más de un aislado, los GCMs viii, ix y xii se identificaron en dos localidades de Chile (Linares y Chillán), el GCM vi en dos localidades de Portugal (Coruche y Vila Franca de Xira) y el GCM xi en una sola localidad en Andalucía (Paterna del Campo, Huelva) (Tabla III.1; Fig. III.3).

Considerando cada uno de los países muestreados, en Chile se describieron seis GCMs (GCMs iii, vii, viii, ix, x y xii), en España cinco (GCMs i, ii, iii, v y xi), en Portugal cuatro (GCMs i, iii, v y vi) y en Italia uno (MCG iv), respectivamente. En consecuencia, el mayor índice de diversidad de Shannon (H') correspondió a Chile con $H'= 1,49$, decreciendo hasta 0,95 y 0,74 para Portugal y España, respectivamente.

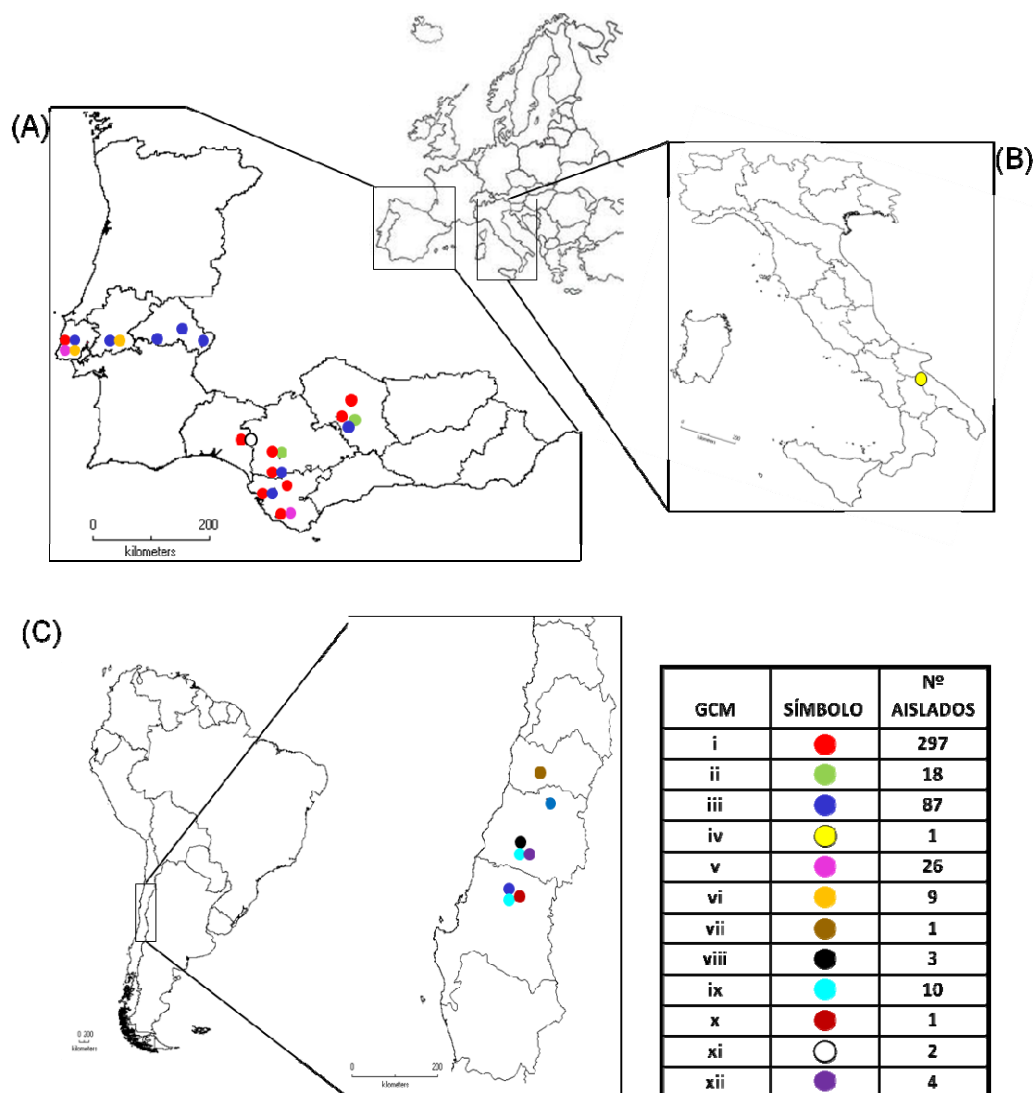


Figura III.3: Distribución geográfica de los grupos de compatibilidad miceliar (GCM) identificados a partir de aislados de *Sclerotium rolfsii* infectando remolacha azucarera en (A) la Península Ibérica (España y Portugal), (B) Italia y (C) Chile.

A nivel de parcela individual, las ocho parcelas muestreadas intensamente en Andalucía mostraron, por lo general, un alto grado de homogeneidad entre los GCMs presentes en cada una de ellas (Fig. III.4). El número de GCMs identificados en una parcela individual osciló entre uno y tres, apareciendo siempre en todas ellas, al menos, el GCM i. El número máximo de GCMs por parcela solo se dio en la localidad de

Posadas (Córdoba), formada por los GCMs i, ii y iii, que representaron el 12,9, 54,8 y 32,3% de los aislados, respectivamente, y un índice de diversidad de Shannon (H') de 0,96. Por el contrario, el GCM i fue el único presente en dos de las localidades evaluadas, Arcos de la Frontera (Cádiz) y Fuente Palmera (Córdoba). En las cinco parcelas restantes, se identificaron dos GCMs en cada una de ellas y que incluyeron el GCM i y otro adicional, que fue: el GCM ii (1,3% de aislados, H' = 0,07) en Los Palacios (Sevilla), el GCM iii en Jerez de la Frontera (Cádiz) (14,0% de aislados, H' = 0,40) y en Lebrija (Sevilla) (89,3% de aislados, H' = 0,34), el GCM v (45,7% de aislados, H' = 0,69) en Vejer de la Frontera (Cádiz) y el GCM xi (3,1% de aislados, H' = 0,14) en Paterna del Campo (Huelva), respectivamente (Tabla III.1; Fig. III.4). En estas parcelas, los aislados de *S. rolfsii* de un mismo GCM tendieron a agruparse en rodales discretos de tamaño variable distribuidos aleatoriamente, sin dar lugar, en ningún caso, a patrones espaciales de distribución apreciables (Fig. III.4).

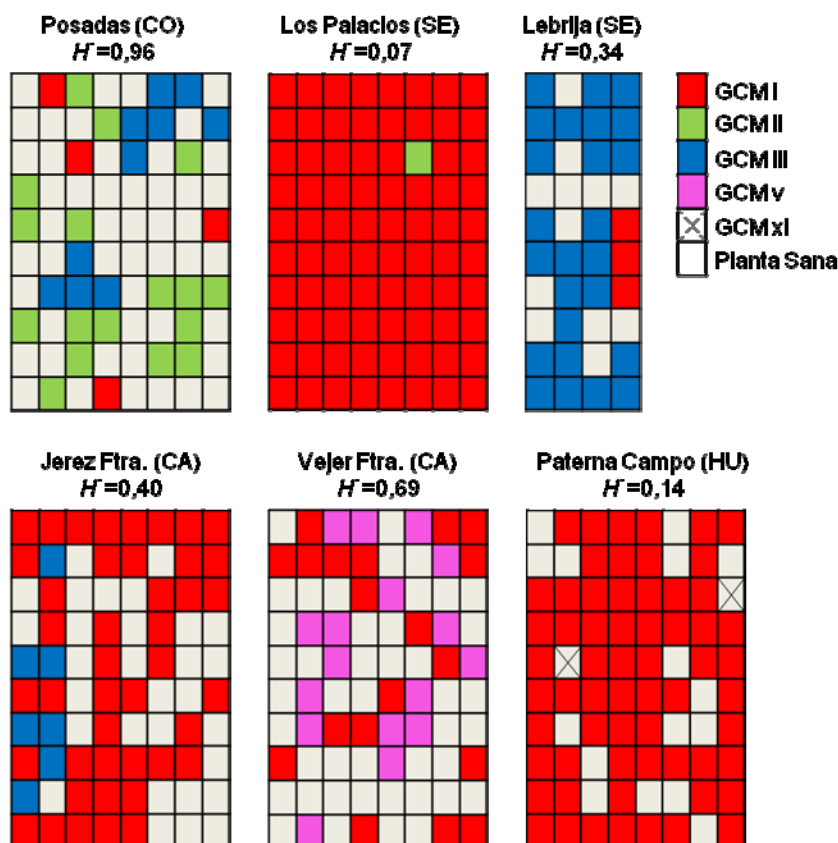


Figura III.4: Distribución esquemática de los grupos de compatibilidad micelial (GCM) de *Sclerotium rolfsii* en las seis parcelas intensamente muestreadas en Andalucía con más de un GCM y los índices de diversidad de Shannon-Weaver (H') para cada una de ellas. El área muestreada (640 m^2) fue dividida en 80 cuadrantes de $4 \times 2 \text{ m}$, excepto en Lebríja donde el área muestreada fue de 320 m^2 y se subdividió en 40 cuadrantes de $4 \times 2 \text{ m}$.

III.5. DISCUSIÓN

La caracterización genética de aislados de *S. rolfsii* de diferentes regiones agrícolas proporciona información útil para estudios epidemiológicos y el desarrollo de estrategias para un manejo integrado eficiente de las enfermedades que causan. En este estudio, la estructura de poblaciones de *S. rolfsii* obtenidas a partir de un solo huésped, remolacha azucarera de siembra otoñal, y de regiones que comparten el clima de tipo Mediterráneo en Chile, Italia, Portugal y España, fue caracterizada por la ocurrencia y análisis de GCMs. Además, dicha estructura poblacional se evaluó a nivel local determinado el patrón de

distribución espacial de GCMs en parcelas de cultivo en diversas localidades del sur de España.

El fenómeno de la incompatibilidad miceliar entre aislados de *S. rolfsii*, fue demostrado por Punja y Grogan en 1983, y desde entonces, ha sido utilizado para designar GCMs en las poblaciones de este patógeno. En esta investigación, se identificaron hasta 12 GCMs a partir de una colección de 459 aislados de *S. rolfsii* de rango geográfico amplio y procedente de un solo huésped. De acuerdo a nuestro conocimiento, esta es una aproximación única en este patógeno ya que los estudios previos partieron colecciones de aislados de: (i) áreas geográficas muy distantes y diferente huésped (Harlton et al., 1995; Punja & Grogan, 1983; Punja & Sun, 2001); (ii) áreas restringidas con diversos huéspedes (Almeida et al., 2001; Cilliers et al., 2000, 2002; Sarma et al., 2002); y (iii) una sola región y un solo huésped (Adandonon et al., 2005; Nalim et al., 1995; Okabe & Matsumoto, 2000).

Los resultados de este estudio, muestran que dos GCMs fueron los más prevalentes, GCMs i y iii, mientras que otros aparecieron como: (i) menos prevalentes pero presentes en varias regiones de diferentes países (GCM v) o dentro de un país (GCMs ii, vi, y ix); o (ii) restringidos a localidades específicas compuestos por un solo aislado (GCMs iv, vii y x) o por pocos aislados (GCMs viii, ix y xii). Estos resultados, concuerdan con la mayoría de trabajos previos en *S. rolfsii* que indican que un solo GCM puede estar formado por aislados procedentes de áreas geográficas distantes, véase en Brasil (Almeida et al., 2001), India (Sarma et al., 2002), Sudáfrica (Cilliers et al., 2000) y EE.UU. (Harlton et al., 1995; Punja & Sun, 2001). En este contexto, la existencia de GCMs muy frecuentes y de distribución geográfica amplia, fue descrita para *Sclerotinia sclerotiorum* infectando colza (*Brassica napus* L.) en Canadá, donde un solo GCM representando el 18% de los aislados, fue identificado en las tres provincias muestreadas y distantes entre sí (Kohli et al., 1992). La presencia de GCMs en *S. rolfsii* compuestos por un solo aislado incompatible con el resto de los individuos testados (GCMs iv, vii y x), también ha sido descrito en diferentes áreas geográficas y/o huéspedes en

proporciones variables (Almeida et al., 2001; Cilliers et al., 2000; Harlton et al., 1995; Nalim et al., 1995; Okabe & Matsumoto, 2000; Punja & Grogan, 1983; Punja & Sun, 2001; Sarma et al., 2002).

En Andalucía, *S. rolfsii* se ha descrito infectando cultivos de remolacha azucarera en las provincias de Córdoba y Sevilla desde principios de los años 1940 (Benlloch, 1943). Por este tiempo (1944), el patógeno fue también localizado en la provincia de Cáceres muy próximo a la frontera con Portugal (Domínguez García-Tejero, 1951). Curiosamente, estas referencias coinciden en el tiempo con el adelanto en la fecha de siembra del cultivo desde primavera hasta final de otoño-principio de invierno (Morillo-Velarde et al., 2003), dándose durante este nuevo ciclo del cultivo condiciones climáticas más favorables para el desarrollo de la enfermedad (Aycock, 1966; Punja, 1985). Este hecho podría sugerir que la población original del patógeno estaría representada por el GCM i, el cual, es el más prevalente y está presente en las ocho parcelas de las localidades muestreadas en Andalucía, así como en una de las localidades estudiadas en Portugal. Posteriormente, a final de los años 1970, el cultivo de la remolacha azucarera de siembra otoñal sufrió graves epidemias de Podredumbre blanca causadas por *S. rolfsii* en la provincia de Cádiz, donde la enfermedad no había sido descrita con anterioridad aunque el cultivo se diera en la zona desde principio de los años 1940 (AIMCRA, 1987). En ese momento el cultivo de la remolacha azucarera en el sur de España sufrió importantes cambios tecnológicos asociados a la siembra otoñal, como fueron el control exhaustivo de malas hierbas mediante herbicidas, riego de nascencia para facilitar el implante y desarrollo del cultivo en sus estadios iniciales, o ajuste de la fertilización y riego a las necesidades del cultivo, unidos a la recolección completamente mecanizada empleando maquinaria pesada. El desplazamiento de esta maquinaria a través de los campos de cultivo, junto con el transporte de las raíces recolectadas a las fábricas de procesado, pudo facilitar la dispersión del patógeno adherido a partículas de suelo y ser, por tanto, responsable de la rápida propagación de los GCMs i y iii en Andalucía (Fig. III.3). Por otro lado, la remolacha azucarera ha sido extensamente cultivada en

Portugal desde finales de los años 1990 (FAOSTAT, 2010), describiéndose importantes pérdidas en 2003 en las principales áreas de cultivo en el centro y sur del país, donde el 21% de los campos y un total del 16,6% del área de cultivo estuvieron afectados por Podredumbre blanca (Paim, 2004). En Chile, el cultivo de la remolacha azucarera data de principios de los años 1950, aunque no fue hasta 1981 cuando se describieron los primeros campos afectados por *S. rolfsii* en las regiones centrales del país (Esterio & Auger, 1982) o de las regiones Metropolitana y V en 1983 (Acuña, 1985). Desde entonces, el patógeno se propagó a regiones situadas más al sur, alcanzando la Región VIII en 1999 (Paillalef-Monnard, 2004). En este contexto, en nuestro estudio, el GCM iii fue el que presentó una distribución geográfica más extensa, estando presente en dos de las cuatro localidades estudiadas en Chile, tres de las ocho localidades de España y en todas las localidades muestreadas en Portugal. Esto podría indicar que el GCM iii pudo haber sido distribuido extensamente dentro y entre áreas de cultivo, tanto por prácticas culturales como por el transporte de vehículos y/o material vegetal entre dichas áreas. La presencia de aislados de *S. rolfsii* del mismo GCM en diferentes países distantes entre sí, fue también descrito por Harlton et al. (1995) al identificar el mismo GCM en diversos estados de EE.UU. como California, Georgia y Carolina del Norte, y en México. Del mismo modo, Kull et al. (2004) identificaron el mismo GCM en aislados de *S. sclerotiorum* procedentes de cultivos de soja (*Glycine max* L.) de varios estados de EE.UU. y Suiza, o de colza en Canadá.

Los resultados de este estudio, son también consistentes con aquellos que sugieren que existe una correlación entre el GCM y el origen geográfico de los aislados (Harlton et al., 1995; Cilliers et al., 2000, 2002; Punja & Grogan, 1983; Punja & Sun, 2001; Sarma et al., 2002). De hecho, tres de los 12 GCMs descritos (GCMs ii, vi y ix) aparecieron en dos localidades próximas, mientras que seis estuvieron presentes exclusivamente en una localidad. Este fue el caso del GCM iv identificado en Bari (Italia), los GCMs vii, viii, x y xii en cuatro localidades diferentes de Chile o del GCM xi en Huelva (Fig. III.2). En un estudio de la misma

naturaleza, Nalim et al. (1995) encontraron, además, que en parcelas de cultivo de cacahuate individuales, se daba un número pequeño de GCMs. La presencia de un solo GCM en un área determinada también se observó en *S. sclerotiorum* en regiones agrícolas de Nueva Zelanda (Carpenter et al., 1999) y en cultivos de colza en Ontario, Canadá (Kohn et al., 1991).

La población de *S. rolfsii* en Chile fue particularmente diversa. El área de estudio en este país fue similar en tamaño a la muestreada en el sur de España, sin embargo, se identificaron la mitad de los GCMs, seis, presentes entre los aislados empleados en la investigación, de los cuales, cinco fueron identificados exclusivamente en Chile. Además, varias localidades presentaron hasta tres GCMs diferentes; este fue el caso de Linares (GCMs viii, ix y xii) y Chillán (GCMs iii, ix y x). Teniendo en cuenta el corto periodo de tiempo transcurrido desde la primera observación de *S. rolfsii* en Chile en 1981, la ocurrencia de introducciones múltiples del patógeno de diferente naturaleza han podido ser los responsables de esta alta variabilidad. La existencia de una considerable variabilidad genética entre aislados de *S. rolfsii* también se ha descrito en Brasil, donde se identificaron 13 GCMs a partir de 30 aislados procedentes de 14 estados aunque en este caso obtenidos de 11 plantas huésped diferentes (Almeida et al., 2001).

A nivel local, en las parcelas muestreadas de forma intensa, se encontró un número relativamente bajo de GCMs en cada uno de los ocho campos de cultivo de remolacha azucarera estudiados a lo largo del Valle del Guadalquivir en Andalucía. En estas parcelas, se identificaron tan solo tres, dos y un solo GCM en una, cinco y dos de las localidades, respectivamente. El GCM i estuvo siempre presente en todas ellas (Figs. III.3 y III.4). Es importante destacar que el número de GCMs en una parcela no estuvo relacionado con el número de aislados de *S. rolfsii* obtenidos de ella. Así, para áreas de muestreo de extensión similar, el número de aislados osciló entre 28 y 80, sin embargo, en la única parcela en la que se identificaron una mayor diversidad con tres GCMs se hizo a partir de únicamente 31 aislados. Estos resultados coinciden sólo parcialmente con los obtenidos por Nalim et al. (1995), ya que aun

encontrando en cuatros campos de cultivo de cacahuete en Texas (EE.UU.), uno, tres y cinco GCMs en uno, dos y un campo, respectivamente, ninguno de los GCMs se mostró como el más prevalente o dominante; por el contrario solo un GCM estuvo presente en dos parcelas mientras que el resto fueron específicos de cada parcela. Sin embargo, nuestros resultados sí son más similares a los obtenidos por Okabe y Matsumoto (2000) en cultivos de cacahuete en Japón. Estos investigadores analizaron siete campos de diferentes localidades, identificando cuatro GCMs en total, con un máximo de tres grupos por parcela individual y apareciendo un GCM como dominante en la mayoría de las parcelas muestreadas. En estudios similares en *S. sclerotiorum*, (Khon et al., 1991) se ha descrito, no obstante, mucha mayor variabilidad ya que en dos campos de colza en Ontario, Canadá, se identificaron 26 y seis GCMs a partir de tan solo 30 y 33 aislados, respectivamente, con dos GCMs predominando en una de las parcelas y un solo GCM en común entre las dos.

Los resultados de la presente investigación, así como los de Nalim et al. (1995) y Okabe y Matsumoto (2000), son consistentes con un “efecto fundador” en las poblaciones de *S. rolfsii* que reflejaría el modo de reproducción de este patógeno, el cual, no produce conidias y su propagación se debe al crecimiento miceliar o por esclerocios dispersados de forma pasiva. De este modo, en las seis parcelas muestreadas de remolacha azucarera en Andalucía con más de un GCM, éstos aparecieron dispersos dentro de los distintos focos de plantas afectadas por la enfermedad sin un patrón espacial claro de distribución, corroborando las citas en *S. rolfsii* en campos de cacahuete en Texas (Nalim et al., 1995). El fenómeno de la baja frecuencia de GCMs en un área determinada puede atribuirse a la reciente introducción de un GCM en la parcela o debida a la ocurrencia de mutaciones aleatorias, o bien, que la emergencia de nuevos genotipos del patógeno sea indicativa de la mejor adaptación de un GCM a las condiciones microclimáticas y/o al huésped específico presentes en la parcela, siendo menos probable que el intercambio genético o la

recombinación den como resultados dicho fenómeno (Ben-Yephet & Bitton, 1985; Hambleton et al., 2002).

La información generada mediante la identificación de los GCMs presentes entre los aislados de las poblaciones de *S. rolfsii* estudiadas, constituye la primera referencia hasta la fecha de la estructura de las mismas en los suelos agrícolas infestados donde se desarrolla el cultivo de la remolacha azucarera de siembra otoñal. Esta información ayudará, además, al diseño de medidas de control en el manejo integrado de la Podredumbre blanca.

III.6 LITERATURA CITADA

- Acuña, R. 1985. Pudrición radicular causada por *Sclerotium rolfsii* Sacc., en cultivos de remolacha en la región central del país. *Simiente* 55: 34-35.
- Adandonon, A., Aveling T. A. S., Merwe, N. A., Sanders, G. 2005. Genetic variation among *Sclerotium* isolates from Benin and South Africa, determined using mycelia compatibility and ITS rDNA sequence data. *Australasian Plant Pathology* 34: 19-25.
- AIMCRA, 1987. Memoria de los trabajos efectuados en la campaña 1987/88. Siembra de otoño de 1986 Zona Sur. Valladolid, España: AIMCRA.
- AIMCRA, 2004. Memoria de los trabajos efectuados en la campaña 2003/04. Siembra otoño 2002 Zona Sur. Valladolid, España: AIMCRA.
- Almeida, A. M. R., Abdelnoor, R. V., Calvo, E. S., Tessnman, D., Yorinori, J. T. 2001. Genotypic diversity among Brazilian isolates of *Sclerotium rolfsii*. *Journal of Phytopathology* 149: 493-502.

- Aycock, R. 1966. Stem rot and other diseases caused by *Sclerotium rolfsii* or the status of Rolf's fungus after 70 years. North Carolina Agricultural Experiment Station Technical Bulletin No. 174.
- Benlloch, M. 1943. El "mal del esclerocio" en los remolachares de algunas vegas andaluzas. Boletín de Patología Vegetal y Entomología Agrícola 12: 221-228.
- Ben-Yephet, Y., Bitton, S. 1985. Use of a selective medium to study the dispersal of ascospores of *Sclerotinia sclerotiorum*. Phytoparasitica 13: 33-40.
- Carpenter, M. A., Frampton, C., Stewart, A. 1999. Genetic variation in New Zealand populations of the plant pathogen *Sclerotinia sclerotiorum*. New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science 27: 13-21.
- Caten, C. E. 1972. Vegetative compatibility and cytoplasmic infection in fungi. Journal of General Microbiology 72: 221-9.
- Cilliers, A. J., Herselman, L., Pretorius, Z. A. 2000. Genetic variability within and among mycelia compatibility groups of *Sclerotium rolfsii* in South Africa. Phytopathology 90: 1026-31.
- Domínguez García-Tejero, F. 1951. Distribución en España de las plagas y enfermedades de la remolacha. Boletín de Patología Vegetal y Entomología Agrícola 18: 181-204.
- Esterio, M., Auger, J. 1982. Presencia de *Pellicularia rolfsii* (Curzi) West. (*Sclerotium rolfsii* Sacc.) en la zona central del país. Simiente 52: 32.
- Ezzahiri, B. 2004. Situation de la pourriture à *Sclerotium* de la betterave à sucre au Maroc and Bilan des travaux de recherche. International Workshop on *Sclerotium rolfsii* in sugar beet crops. Córdoba, España.
- FAOSTAT, 2010. FAOSTAT production statistics of crops. Available online at <http://faostat.fao.org/site/567/default.aspx#ancor>.

- Fidah, A. 1995. La pourriture de la betterave à sucre due à *Sclerotium rolfsii* dans le doukkala: épideémiologie et essais de lutte. Thèse de troisième cycle. Marrakech: Faculté des Science Semlelia 122 pp.
- Gabellini, E., Cerato, C. 2004. *Sclerotium rolfsii* in sugarbeet crop. A general overview on Italy. International Workshop on *Sclerotium rolfsii* in sugar beet crops. Córdoba, España.
- Hambleton, S., Walker, C., Kohn, L. M. 2002. Clonal lineages of *Sclerotinia sclerotiorum* previously known from other crops predominate in 1999–2000 samples from Ontario and Quebec soybean. Canadian Journal of Plant Pathology 24: 309-315.
- Harlton, C. E., Uvesque, C. A., Punja, Z. K. 1995. Genetic diversity in *Sclerotium (Athelia) rolfsii* and related species. Phytopathology 85: 1269-1281.
- Kohli, Y., Morrall, R. A. A., Anderson, J. B., Kohn, L. M. 1992. Local and trans-Canadian clonal distribution of *Sclerotinia sclerotiorum* on Canola. Phytopathology 82: 875-880.
- Kohn, L. M., Stasovski, E., Carbone, I., Royer, J., Anderson, J. B. 1991. Mycelial incompatibility and molecular markers identify genetic variability in field populations of *Sclerotinia sclerotiorum*. Phytopathology 81: 480-485.
- Kull, L. S., Pedersen, W. L., Palmquist, D., Hartman, G. L. 2004. Mycelial compatibility grouping and aggressiveness of *Sclerotinia sclerotiorum*. Plant Disease 88: 325-332.
- Leslie, J. F. 1993. Fungal vegetative compatibility. Annual Review of Phytopathology 31: 127-150.
- Milgroom, M. G. 1996. Recombination and the multilocus structure of fungal populations. Annual Review of Phytopathology 34: 457-477.
- Morillo-Velarde, R., Bermejo, J. L., Ayala, J., Moreno, A., Gutiérrez, M., Márquez, L. 2003. Remolacha Azucarera de Siembra Otoñal. Normas

Técnicas de Cultivo. Junta de Andalucía. Consejería de Agricultura y Pesca. Sevilla. 143 pp.

- Nalim, F. A., Starr, J. L., Woodard, K. E., Segner, S., Keller, N. P. 1995. Mycelial compatibility groups in Texas peanut field populations of *Sclerotium rolfsii*. *Phytopathology* 85: 1507-1512.
- Okabe, I., Matsumoto, N. 2000. Population structure of *Sclerotium rolfsii* in peanut fields. *Mycoscience* 41: 145-148.
- Paillalef-Monrad, R. 2004. *Sclerotium rolfsii* in sugar beet crops: Situation and studies in Chile. International Workshop on *Sclerotium rolfsii* in sugar beet crops. Córdoba, España.
- Paim, M. 2004. *Sclerotium rolfsii* in sugar beet crops in Portugal. International Workshop on *Sclerotium rolfsii* in sugar beet crops. Córdoba, España.
- Punja, Z. K. 1985. The biology, ecology and control of *Sclerotium rolfsii*. *Annual Review of Phytopathology* 23: 97-127.
- Punja, Z. K., Grogan, R. G. 1983. Hyphal interactions and antagonism among field isolates and single-basidiospore strains of *Athelia* (*Sclerotium*) *rolfsii*. *Phytopathology* 73: 1279-1284.
- Punja, Z. K., Sun, L. J. 2001. Genetic diversity among mycelial compatibility groups of *Sclerotium rolfsii* (teleomorph *Athelia rolfsii*) and *Sclerotium delphinii*. *Mycological Research* 105: 537-546.
- Sarma, B. K., Singh, U. P., Singh, K. P. 2002. Variability in Indian isolates of *Sclerotium rolfsii*. *Mycologia* 94: 1051-1058.
- Schneider, C. L., Whitney, E. D. 1996. *Sclerotium* root rot, pp. 22-23. En *Compendium of Beet Diseases and Insects*. E. D. Whitney, J. E. Duffus, eds. APS Press, St. Paul, MN, E.E.U.U.
- Shannon, C. E., Weaver, W. 1963. *The Mathematical Theory of Communication*. University of Illinois Press, Urbana, IL, E.E.U.U.

CAPÍTULO IV

**DIVERSIDAD MOLECULAR EN POBLACIONES
DE *Sclerotium rolfsii* PROCEDENTES DE
REMOLACHA AZUCARERA DE SIEMBRA
OTOÑAL EN REGIONES DE CLIMA
MEDITERRÁNEO Y USO DE SECUENCIAS
GÉNICAS PARA LA CARACTERIZACIÓN DE
GCMs**

IV.1. RESUMEN

Para una adecuada implementación de medidas de manejo integrado de la Podredumbre blanca causada por *Sclerotium rolfsii*, se requiere de un método que permita la correcta caracterización de las poblaciones del patógeno, que además sería de gran utilidad para un mejor conocimiento y comprensión de la biología, diversidad genética y epidemiología de dicho agente. En este contexto, la presente investigación explora diferentes metodologías moleculares, como son los polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLPs) y el estudio de las secuencias de regiones específicas de genes conservados, con el objetivo de caracterizar los distintos grupos de compatibilidad micelar (GCMs) identificados en la colección de aislados de *S. rolfsii* evaluada en esta Tesis Doctoral (Capítulo III).

Se determinaron un total de tres grupos RFLPs-ITS para los 34 aislados de *S. rolfsii* representativos de los 12 GCMs y zonas geográficas evaluadas en base a los perfiles de restricción generados con las enzimas endonucleasas *AluI*, *RsaI*, *HpaII* y *MboI*, mostrando que todos los aislados de un mismo GCM comparten el mismo patrón de bandas y que existe una baja variabilidad entre los mismos. Esta variabilidad, se explicó en base a la que presentaron los GCMs frente a la enzima de restricción *MboI*, ya que con el resto de enzimas de restricción apareció un solo perfil de bandas en cada caso para todos los aislados evaluados.

El análisis de las secuencias nucleotídicas de las regiones parciales de los genes que codifican para el factor de elongación de la transcripción 1-alfa (*EF1 α*) y la segunda subunidad mayor de la ARN polimerasa II (*RPB2*), permitió identificar la mayoría de GCMs con cada uno de las dos secuencias por separado, mientras que la combinación de ambas secuencias para los aislados de los diferentes grupos resolvió de forma inequívoca y reproducible los 12 GCMs de *S. rolfsii* al presentar cada uno de ellos una secuencia única. Este resultado se corroboró en “test ciegos” en los que se analizaron aislados de *S. rolfsii* no incluidos en la colección

inicial y de origen geográfico diferente y que permitieron demostrar la utilidad de dicho método de identificación de GCMs.

Los resultados obtenidos permitieron establecer un set de aislados de referencia para la identificación de GCMs en *S. rolfsii* en base a las secuencias específicas de los genes *EF1 α* y *RPB2*. Esto supone, además, una herramienta molecular accesible y relativamente barata para un mejor conocimiento de la epidemiología de las enfermedades causadas por *S. rolfsii* y la dinámica espacial y temporal de sus poblaciones.

IV.2. INTRODUCCIÓN

En hongos fitopatógenos en los que el estado sexual tiene un mínimo impacto en su ciclo vital, la determinación de grupos de compatibilidad micelial (GCMs) representa una medida indirecta de la variabilidad genética entre sus aislados. En estas especies, se considera que el intercambio genético está altamente limitado a la compatibilidad somática entre los componentes de sus poblaciones a través de la anastomosis hifal (Khon et al., 1991; Leslie, 1993). En la práctica, la incompatibilidad micelial da lugar a reservorios génicos aislados que pueden diferir en muchas de sus características debido a la falta de intercambio genético entre los aislados de diferentes GCMs. De este modo, la incompatibilidad micelial y el aislamiento genético y citoplásmico están generalmente asociados (Worral, 1997).

En *Sclerotium rolfsii*, hongo de suelo que ha sido diagnosticado en prácticamente todas las áreas de cultivo agrícola del mundo y que es capaz de causar enfermedad en unas 500 especies de plantas, se ha descrito su estado basidial, *Athelia rolfsii* (Curzi) Tu & Kimbrough, el cual, aunque ha sido inducido en condiciones de laboratorio (Punja & Grogan, 1983a), no parece que ocurra comúnmente en la naturaleza. Punja y Grogan (1983b) describieron la ocurrencia de GCMs entre los componentes de las poblaciones de este patógeno y, desde entonces,

varios estudios han evaluado el grado de variabilidad genético dentro y entre dichos GCMs mediante el uso de diferentes herramientas moleculares similares a aquellas utilizadas en otras especies de hongos fitopatógenos (Atallah et al., 2004; Carling et al., 2002). Sin embargo, en *S. rolfsii* ninguno de los métodos aplicados hasta la fecha ha permitido resolver molecularmente los GCMs a pesar de que varios autores hayan mostrado que los aislados de un mismo GCM son genéticamente más similares entre sí que a aquellos que pertenecen a diferentes GCMs (Almeida et al., 2001; Cilliers et al., 2000; Nalim et al., 1995). En este contexto, un método válido y reproducible que resuelva cada uno de los GCMs de *S. rolfsii* sería de interés y proporcionaría información útil para la caracterización de sus poblaciones y dilucidar la estructura de las mismas.

Han sido varias las técnicas moleculares utilizadas hasta la fecha para revelar la variación inter- e intraespecífica en poblaciones de *S. rolfsii* obteniéndose resultados contradictorios. Así, el análisis del polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLPs) de la región transcrita espaciadora interna (ITS) del ADN ribosómico nuclear (ADNr), indicó que los aislados de un mismo GCM podían presentar distintos perfiles RFLP-ITS a la vez que dichos perfiles podían también ser comunes para diferentes GCMs (Harlton et al., 1995; Okabe et al., 1998). Sin embargo, Nalim et al. (1995) mostró que los aislados pertenecientes a un GCM tenían idénticos perfiles RFLP-ITS para la enzima *Mbol*, sugiriendo que dichos GCMs eran de origen clonal. Además, observaron que varios GCMs compartían mismos perfiles RFLP-ITS. Contradicciones similares en cuanto a la posible correlación entre los GCMs y las líneas clonales delimitadas mediante marcadores moleculares han sido observadas mediante análisis del polimorfismo en la longitud de los fragmentos amplificados (AFLPs) o de los polimorfismos de ADN amplificados por iniciadores simples aleatorios (RAPD) (Almeida et al., 2001; Cilliers et al., 2000; Okabe & Matsumoto, 2000; Punja & Sun, 2001).

A pesar de los abordajes utilizados para la caracterización molecular de las poblaciones de *S. rolfsii*, ninguno de ellos ha contemplado el uso de genes codificantes de proteínas ricos en intrones a lo largo de su

secuencia que poseen tasas de evolución más elevadas y que podrían, por tanto, ser de utilidad para el estudio de la variabilidad genética en *S. rolfssii*. El análisis de éste grupo de genes está siendo considerado en la actualidad como un método prometedor en estudios de relaciones entre grupos de hongos debido a su alto contenido en información funcional para el desarrollo de las células (Liu et al., 1999). En este contexto, los hongos son en la actualidad un grupo de organismos objeto de estudio en lo referente a su clasificación taxonómica, inferencias filogenéticas y la delimitación e identificación de especies. La región ITS del ADNr es el marcador molecular más empleado entre los hongos debido a su menor grado de conservación comparado con otros genes codificantes, siendo empleado rutinariamente para responder a cuestiones relacionadas con la sistemática, filogenia e identificación de aislados y especímenes en niveles taxonómicos subespecíficos (Begerow et al., 2010). El análisis de la región ITS en *S. rolfssii* no ha ofrecido, sin embargo, información útil para resolver la diversidad genética en sus poblaciones naturales. Más recientemente, las regiones codificantes de dos genes de copia única en el genoma, el factor de elongación de la transcripción 1-alfa (*EF1 α*) y la segunda subunidad mayor de la ARN polimerasa II (*RPB2*), han mostrado su utilidad como marcadores moleculares para estudios filogenéticos intraespecíficos en diversas especies de hongos (Binder et al., 2010; Liu et al., 1999; Matheny et al., 2006b; O'Donnell et al., 1998; Roger et al., 1999; Rodríguez-Estrada et al., 2010; Tanabe et al., 2004). El *EF1 α* es una proteína de unión requerida en la síntesis proteica en eucariotas siendo la más abundante en las células biológicamente activas constituyendo hasta el 2% del total de las proteínas (Roger et al., 1999), mientras que el *RPB2* codifica una subunidad de la ARN polimerasa II que es la enzima encargada de transcribir el pre-ARN mensajero (Liu et al. 1999; Matheny et al., 2007). Dicha subunidad posee 12 dominios altamente conservados a través de los diferentes reinos de seres vivos (Liu et al., 1999).

El objetivo del presente capítulo de esta Tesis Doctoral fue el estudio de la variabilidad genética inter- e intraespecífica entre los 12 GCMs de *S. rolfssii* identificados en el capítulo III en base a diferentes

marcadores moleculares incluyendo el análisis RFLP-ITS y el análisis de secuencias de la región ITS y de los genes *EF1 α* y *RPB2*. En una segunda aproximación, inferir las relaciones filogenéticas entre dichos GCMs y, finalmente, explorar la posibilidad de establecer una colección de referencia de aislados representativos de GCMs que pueda ser de utilidad para la comunidad científica en estudios posteriores sobre las poblaciones de *S. rolfsii*.

IV.3. MATERIALES Y MÉTODOS

IV.3.1. Aislados fúngicos y Grupos de compatibilidad miceliar

En este estudio se utilizaron un total de 238 aislados mono-esclerociales de *S. rolfsii* (Tabla IV.1). Estos aislados pertenecen a los 12 GCMs identificados en el Capítulo III de esta Tesis Doctoral y son representativos de la totalidad de localidades muestreadas y GCMs identificados a partir de una colección de aislados de *S. rolfsii* obtenida de cultivos de remolacha azucarera de siembra otoñal afectadas por Podredumbre blanca entre 2004 y 2007 en diferentes países de clima Mediterráneo descrita en el Capítulo III. Además, nueve aislados de *S. delphinii* pertenecientes a un único GCM procedentes de cultivos de remolacha azucarera del sur de Italia, se incluyeron en el estudio como grupo externo al ser una especie muy cercana taxonómicamente a *S. rolfsii*.

IV.3.2. Extracción de ADN

Para cada uno de los 238 aislados de *S. rolfssii*, se obtuvo micelio a partir de colonias del hongo creciendo sobre láminas de celofán estéril en Agar Patata Dextrosa (APD, Laboratorios Difco, Detroit, EE.UU.) e incubadas a $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ en oscuridad durante 3 días. La masa miceliar en crecimiento activo sobre el celofán fue entonces recogida y liofilizada durante 48-72 h. De cada aislado se seleccionaron entre 20 y 50 mg de micelio liofilizado para la extracción de ADN usando en primer lugar el sistema “Fast Prep FP-120” (MP Biomedicals, Illkirch, Francia) para triturar el material y, a continuación, el kit de extracción “G-Spin™ IIP Plant Genomic DNA” (Intron Biotechnology, Korea) siguiendo las instrucciones del fabricante. La calidad de la extracción se comprobó en geles de agarosa al 1% en tampón TAE 1X (Tris-Acetato-EDTA) teñidos con bromuro de etidio mediante electroforesis cargando 4 μl del total extraído, y se cuantificó usando el kit de ensayo fluorométrico “Quant-iT DNA Broad Range” (Molecular Probes, Inc., Leiden, Países Bajos) en un fluoroespectrómetro Tecan Safire (Tecan España, Barcelona, España) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Finalmente, el ADN se diluyó en agua estéril hasta alcanzar una concentración final de 20 ng/ μl para los posteriores ensayos PCR.

Tabla IV.1: Origen geográfico, grupo de compatibilidad miceliar (GCM), perfil de polimorfismo en la longitud del fragmento de restricción (RFLP) y código de los aislados representativos de todas las combinaciones posibles de GCM x localidad y número de acceso en GenBank para las regiones génicas del factor de elongación de la transcripción 1-alfa (*EF1α*) y la segunda subunidad mayor de la ARN polimerasa II (*RPB2*) para los aislados de *Sclerotium rolfisii* y *S. delphinii* utilizados en este estudio.

Origen Geográfico			Aislados Representativos (GCM x localidad) Número de acceso en GenBank							
País	Provincia ó Región	Localidad	GCM ^a	Nº de Aislados	Perfil RFLP-ITS ^b	Código Aislado	<i>EF1α</i>	<i>RPB2</i>		
<i>Sclerotium rolfisii</i>										
Chile	VI	Colchagua	vii	1	III	Sr-1	JF267805	JF267840		
		Curicó	iii	2	I	Sr-2	JF267806	JF267841		
		Linares	viii	3	I	Sr-5	JF267809	JF267844		
		Linares	ix	1	I	Sr-7	JF267795	JF267830		
		Linares	xii	4	II	Sr-10	JF267808	JF267843		
	VIII	Ñuble	iii	1	I	Sr-12	JF267794	JF267829		
		Ñuble	ix	9	I	Sr-21	JF267810	JF267845		
		Ñuble	x	1	I	Sr-22	JF267807	JF267842		
		España	Cádiz	Arcos Fra.	I	20	I	Sr-24	JF267823	JF267859
				Jerez Fra.	I	16	I	Sr-112	JF267818	JF267856
Jerez Fra.	lii			4	I	Sr-119	JF267819	JF267855		
Vejer Fra.	I			12	I	Sr-136	JF267824	JF267860		
Vejer Fra.	V			10	II	Sr-155	JF267825	JF267861		
Córdoba	Fuente Palmera		i	15	I	Sr-182	JF267812	JF267847		
	Posadas		i	4	I	Sr-194	JF267803	JF267838		
	Posadas		ii	15	II	Sr-203	JF267802	JF267837		
	Posadas		iii	7	I	Sr-222	JF267809	JF267839		
	Paterna Campo		i	17	I	Sr-243	JF267816	JF267851		
Sevilla	Paterna Campo	xi	2	I	Sr-286	JF267815	JF267850			
	Lebrija	i	2	I	Sr-289	JF267822	JF267858			
	Lebrija	iii	17	I	Sr-296	JF267821	JF267857			
	Los Palacios	i	19	I	Sr-324	JF267820	JF267854			
	Los Palacios	ii	1	II	Sr-395	JF267798	JF267833			
Italia	Bari	Bari	iv	1	I	Sr-396	JF267817	JF267852		
Portugal	Lisboa	Vila Franca Xira	i	1	I	Sr-407	JF267797	JF267832		
		Vila Franca Xira	iii	6	I	Sr-413	JF267814	JF267848		
		Vila Franca Xira	v	2	II	Sr-414	JF267813	JF267849		
		Vila Franca Xira	v	6	II	Sr-416	JF267826	JF267862		
		Vila Franca Xira	vi	6	I	Sr-427	JF267827	JF267863		
		Avis	iii	12	I	Sr-441	JF267801	JF267836		
		Benavila	iii	7	I	Sr-444	JF267800	JF267835		
		Elvas	iii	8	I	Sr-457	JF267811	JF267846		
		Coruche	iii	6	I	Sr-465	JF267799	JF267834		
		Coruche	vi	1	I	Sr-468	JF267796	JF267831		
<i>Sclerotium delphinii</i>										
Italia	Bari	Bari	-	9	IV	Sd-405	JF267828	JF267853		
<i>Sclerotium rolfisii</i>^c										
Marruecos	-	-	i	10	-	Sr-469	JN790643	JN790640		
Chile	-	-	ix	5	-	Sr-470	JN790644	JN790641		
India	-	-	xiii	10	-	Sr-471	JN790645	JN790642		

a: Grupos de compatibilidad miceliar determinados en el Capítulo III de esta Tesis Doctoral.

b: Perfiles RFLP-ITS generados con las enzimas de restricción *AluI*, *HpaII*, *MboI* y *RsaI*.

c: Aislados de *Sclerotium rolfisii* evaluados en los test ciegos.

IV.3.3. Amplificaciones por PCR

Se amplificó la región ITS1-5.8S-ITS2 del ADNr utilizando los cebadores universales ITS1/ITS4 (White et al., 1990) (Fig. IV.1A; Tabla IV.2) en un volumen de reacción final de 50 μ l compuesto por 5 μ l de tampón de reacción 10X buffer (166 mM $[\text{NH}_4]_2\text{SO}_4$, 670 mM Tris-HCl [pH 8,0, 25°C], 0,1% de estabilizador), 1,5 mM de MgCl_2 , 200 μ M de cada dNTP, 1 μ M de cada cebador, 2 unidades de ADN polimerasa BIOTAQ™ (BIOLINE, Madrid, España), y 2 μ l de DNA de cada muestra (40 ng de ADN). El programa de amplificación constó de un paso inicial de desnaturalización de 94°C/2 min, seguido de 34 ciclos de desnaturalización a 95°C/1 min, annealing a 54°C/1 min y elongación a 72°C/1 min, y un paso final de elongación a 72°C/5 min.

Los cebadores EF595F y EF1160R (Fig. IV.1B; Tabla IV.2) amplificaron una porción del gen *EF1 α* uniéndose a las regiones exónicas 4 y 6, respectivamente (Kausarud & Schumacher, 2001; Wendland & Kothe, 1997). Así, la secuencia amplificada incluyó la región exónica 5 y las parciales 4 y 6, además de los intrones 4 y 5 (Fig. IV.1B). El ciclo de la PCR constó de un paso inicial de desnaturalización de 94°C/2 min, seguido de 34 ciclos de desnaturalización a 94°C/1 min, annealing a 53°C/1 min y elongación a 72°C/1 min, y un paso final de elongación a 72°C/5 min.

De forma análoga, se utilizó la pareja de iniciadores b6.9F y b11R1 (Fig. IV.1C; Tabla IV.2) para amplificar la región del gen *RPB2* comprendida entre sus sitios de unión localizados en los exones 4 y 5, respectivamente (dominios 7-11) (Liu et al., 1999; Matheny, 2006a) (Fig. IV.1C). Este producto de amplificación se obtuvo mediante un programa que constó de un paso inicial de desnaturalización de 94°C/2 min, seguido de 34 ciclos de desnaturalización a 94°C/1 min, annealing a 62°C/1 min y elongación a 72°C/1 min, y un paso final de elongación a 72°C/5 min.

Para ambas regiones parciales de los genes *EF1 α* y *RPB2*, las amplificaciones se llevaron a cabo en un volumen final de reacción de 25 μ l conteniendo 2,5 μ l de tampón de reacción 10X, 2 mM de MgCl_2 , 200 μ M de

cada dNTP, 1 μ M de cada iniciador, una unidad de ADN polimerasa BIOTAQ™ (BIOLINE), y 1 μ l de ADN de la muestra (20 ng de ADN).

Todas las reacciones se llevaron a cabo en un termociclador C1000™ (Bio-Rad, Madrid, España) y el resultado se visualizó mediante electroforesis en geles de agarosa al 1% en tampón TAE 1X (Bio-Rad) teñidos con bromuro de etidio y usando como referencia de peso molecular el marcador “Generuler™ DNA” (MBI Fermentas, Alemania).

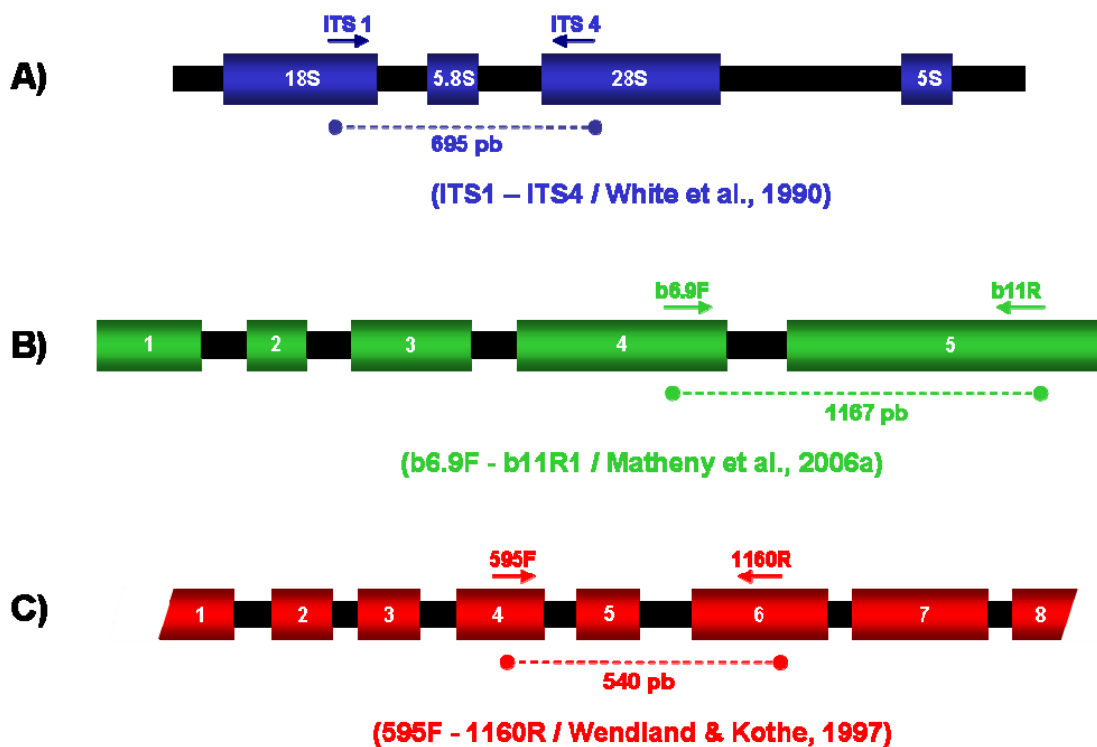


Figura IV.1: Esquema de las regiones amplificadas para: **A**, el ADN ribosómico (ITS1-5.8S-ITS2) con los cebadores ITS1/ITS4 (White et al., 1990); **B**, el gen *RPB2* que codifica para la segunda subunidad mayor de ARN polimerasa II con los iniciadores b6.9F/b11R1 (Matheny et al., 2006a); y **C**, el gen *EF1 α* codificante del factor de elongación de la transcripción 1-alfa con los cebadores 595F/1160R (Wendland & Kothe, 1997). Los números indican las secuencias exónicas de cada gen, las flechas bajo los cebadores el sentido de la amplificación de cada uno de ellos y en pares de bases (pb) aparece la longitud total de los amplicones obtenidos.

Tabla IV.2: Secuencias nucleotídicas de los cebadores utilizados para la amplificación en aislados de *Sclerotium rolfsii* de las regiones correspondientes al ADN ribosómico (ADNr) y a los genes *RPB2*, que codifica para la segunda subunidad mayor de ARN polimerasa II, y *EF1 α* , codificante del factor de elongación de la transcripción 1-alfa.

Región	Iniciadores (Secuencias de nucleótidos)		Fuente
ADNr	<i>ITS1</i>	(5' TCCGTAGGTGAACCTGCGG 3')	White et al., 1990
	<i>ITS4</i>	(5' TCCTCCGCTTATTGATATGC 3')	White et al., 1990
RPB2	<i>b6.9F</i>	(5' TGGACNCAYTGYGARATYCA YCC 3')	Matheny et al., 2006a
	<i>b11R1</i>	(5' TGGATYTTGTCRTCCACCAT 3')	Matheny et al., 2006a
	<i>bSr_1F*</i>	(5'-CGCCATGGGTAAACAAGCTA-3')	Remesal et al., 2011
EF1 α	<i>595F</i>	(5' CGTGACTTCATCAAGAACATG 3')	Wendland & Kothe, 1997
	<i>1160R</i>	(5' CCGATCTTGTAGACGTCTG 3')	Wendland & Kothe, 1997

*: Cebador diseñado en esta investigación para la secuenciación de los productos amplificados de la región estudiada para el gen *RPB2*.

IV.3.4. Análisis de los perfiles RFLPs-ITS

Los productos de PCR amplificados de la región ITS1-5.8S-ITS2 del ADNr se digirieron con las enzimas *AluI*, *RsaI*, *HpaII* y *MboI* (MBI Fermentas) en reacciones independientes, llevadas a cabo en un volumen final de 10 μ l con 5 μ l de producto de PCR, 1 μ l de tampón 10X y 0,5 μ l de cada enzima, durante 3 h a 37°C. El resultado de las reacciones enzimáticas se comprobó en geles "ReadyAgarose™ Wide-Mini Gels" al 3% teñidos con bromuro de etidio en tampón TAE 1X (Bio-Rad) durante 3 h a 80V. Para normalizar el patrón de bandas de los perfiles RFLP-ITS se usó el marcador de peso molecular Amplisize DNA (Bio-Rad). Así, las imágenes de cada uno de los geles fueron editadas, normalizadas y combinadas mediante el paquete informático Bionumerics v.6.1 (Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Bélgica).

IV.3.5. Secuenciación de ADN

Los productos de PCR tanto de la región ITS-5.8S-ITS2 como de las regiones parciales de los genes *EF1 α* y *RPB2*, se purificaron usando el kit “ULTRAPrep[®] PCR” (AHN Biotechnologie, Nordhausen, Alemania) siguiendo las instrucciones del fabricante, se cuantificaron en un espectrofotómetro “NanoDrop ND-1000” (NanoDrop Technologies, Wilmington, EE.UU.) y se usaron para la secuenciación directa de ADN con los cebadores correspondientes mediante el kit “terminator cycle sequencing ready reaction” (BigDye, Perkin-Elmer, Applied Biosystems, Reino Unido) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Los productos resultantes se procesaron en un secuenciador multicapilar de ADN (Model 3100 genetic analyzer; Applied Biosystems) en el Servicio de Secuenciación de los laboratorios STABVIDA (Monte da Caparica, Portugal). Las secuenciaciones se llevaron a cabo en ambas direcciones usando los mismos cebadores empleados para las reacciones de amplificación, sin embargo, en la secuenciación directa del producto de PCR para *RPB2* con el cebador b6.9F no se pudieron obtener lecturas de secuencias adecuadas para ser analizadas. Por consiguiente, se diseñó un nuevo iniciador en dirección “forward”, bSr_1F (5'-CGCCATGGGTAAACAAGCTA-3') (Tabla IV.2), a partir de secuencias “reverse” mediante el paquete informático PRIMER3 v.0.4.0 (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>), que fue utilizado en lugar del cebador b6.9F.

IV.3.6. Análisis de datos

Los patrones de bandas RFLP-ITS fueron analizados con el paquete informático Bionumerics v.6.1. La normalización de las imágenes de los geles y la búsqueda de las bandas se llevaron a cabo creando un sistema de referencia a partir del carril del marcador de peso molecular “Amplisize ADN” (50-2000pb) (Bio-Rad) que permitió estimar el tamaño de las bandas resultantes tras la digestión enzimática. Aquellas con tamaños menores a 50 pb no se utilizaron en los análisis. A partir de aislados representativos

de cada localidad con idénticos patrones RFLP-ITS se construyeron matrices de similitud utilizando el coeficiente de Dice seleccionando en el algoritmo para la detección de las bandas un nivel de optimización del 0,9% y un límite de tolerancia del 1,1%. El análisis de agregación (cluster) de las matrices de similitud se llevó a cabo por el método UPGMA (“Unweighted Paired Group Method with Arithmetic Averages”). Los árboles obtenidos fueron el resultado de 1,000 repeticiones para evaluar el grado de consistencia de los agrupamientos obtenidos.

Las secuencias de la región ITS1-5.8s-ITS2 y de las regiones parciales de los genes *EF1 α* y *RPB2* se visualizaron y editaron inicialmente con Bionumerics v.6.1 y a continuación, para cada aislado se ensamblaron las secuencias “forward” y “reverse” para obtener las respectivas secuencias consenso. Inicialmente, con el número total de aislados para cada una de las regiones, se realizaron alineamientos múltiples seleccionando como coeficiente de similitud “fast algorithm” y manteniendo el resto de parámetros por defecto, obteniéndose la correspondiente matriz de similitud entre secuencias. A continuación, se seleccionaron aislados representativos de cada una de las combinaciones GCM x localidad con idéntica secuencia de nucleótidos para cada región génica estudiada para llevar a cabo un nuevo análisis de similitud considerando únicamente las posiciones nucleotídicas que mostraron diferencias entre ellas. En este caso, el coeficiente de similitud fue categórico y el agrupamiento se realizó en base al método “complete linkage”. Además, se analizó la similitud entre los aislados representativos de cada una de las combinaciones GCM x localidad considerando las variaciones nucleotídicas tanto de la región del gen *EF1 α* como del *RPB2*, en base a los mismos parámetros de coeficiente de similitud y método de agrupamiento ya mencionados. Finalmente, se generó un árbol filogenético basado en dicha combinación de variaciones nucleotídicas tanto de la región del gen *EF1 α* como del *RPB2* mediante el método de Máxima Parsimonia. El grado de consistencia de los grupos originados fue evaluado mediante análisis “bootstrap” (1,000 repeticiones) e indicado por el árbol más probable. El árbol generado se enraizó con las secuencias de *S. delphinii* obtenidas en

esta Tesis Doctoral y depositadas en GenBank para la región del gen *EF1 α* y del *RPB2*. Todos los análisis se realizaron con BioNumerics v.6.1. Todas las secuencias determinadas en este estudio para los aislados representativos de todas las combinaciones GCM x localidad fueron depositadas en el GenBank, cuyos números de acceso se muestran en la Tabla IV.1.

Para determinar la fiabilidad de la metodología basada en el alineamiento de secuencias para la caracterización de GCMs en *S. rolfsii*, se realizaron “test ciegos” usando 20 aislados de *S. rolfsii* no incluidos en los ensayos iniciales de dos nuevos países, India y Marruecos, y cinco de Chile, todos ellos procedentes de diferentes campos de cultivo donde se diagnosticaron plantas de remolacha azucarera afectadas por la Podredumbre blanca causada por este patógeno. En estos ensayos, cada uno de los aislados se asignó a un GCM en base tanto al análisis de secuencias como a los test de compatibilidad micelar siguiendo la metodología descrita en el capítulo II la Tesis Doctoral. Las secuencias determinadas en este estudio para los aislados representativos de los nuevos campos de cultivo fueron depositadas en el GenBank, cuyos números de acceso se muestran en la Tabla IV.1.

IV.4. RESULTADOS

IV.4.1. Análisis RFLP-ITS

La amplificación de la región ITS1-5.8S-ITS2 para el total de los 238 aislados de *S. rolfsii* y los nueve de *S. delphinii* produjo una única banda de aproximadamente 695 pb. Estos productos de PCR fueron posteriormente digeridos con las enzimas *AluI*, *HpaII*, *RsaI* y *MboI* obteniéndose diferentes patrones de restricción que se presentan en la Figura IV.2.

Para los aislados de *S. rolfsii*, se identificó un único patrón de bandas para cada una de las enzimas *AluI* (A1), *HpaII* (H1) y *RsaI* (R1), y tres para *MboI* (M1, M2, M3) (Fig. IV.2). Los tamaños estimados para cada una de las bandas en los distintos patrones fueron: para *AluI*, tres fragmentos de 470, 125 y 96 pb; para *HpaII*, dos fragmentos de 549 y 142 pb; y para *RsaI*, dos fragmentos de 575 y 116 pb. En el caso de la enzima *MboI*, el patrón M1 mostró tres fragmentos de 434, 164 y 68 pb, el M2 cuatros bandas de 434, 164, 124 y 68 pb, y el M3 cuatro fragmentos de 434, 240, 164 y 68 pb, respectivamente (Fig. IV.2). Combinando los patrones de restricción de las cuatro enzimas, los 12 GCMs pudieron ser agrupados en tres grupos RFLP-ITS basados en aquellos generados para la enzima *MboI*, y que estuvieron altamente apoyados en el análisis UPGMA con valores de remuestreo (“bootstrap”) del 100% (Fig. IV.3). Así, el grupo RFLP-ITS I estuvo definido por los perfiles A1, H1, R1 y M1, el grupo RFLP-ITS II por A1, H1, R1 y M2, y el grupo RFLP-ITS III por A1, H1, R1 y M3 (Tabla IV.1; Fig. IV.3). Todos los aislados pertenecientes a un GCM presentaron perfiles idénticos para la enzima *MboI*, sin embargo, el mismo perfil pudo observarse en varios GCMs poniendo de manifiesto que no existió una relación directa entre el patrón de restricción que presentaron los aislados de *S. rolfsii* y el GCM al cual pertenecen. De este modo, los aislados pertenecientes a los GCMs i, iii, iv, vi, viii, ix, x y xi compartieron el patrón M1, los aislados de los GCMs ii, v y xii tuvieron idéntico perfil M2, y el único aislado del GCM vii presentó el patrón M3 (Fig. IV.3).

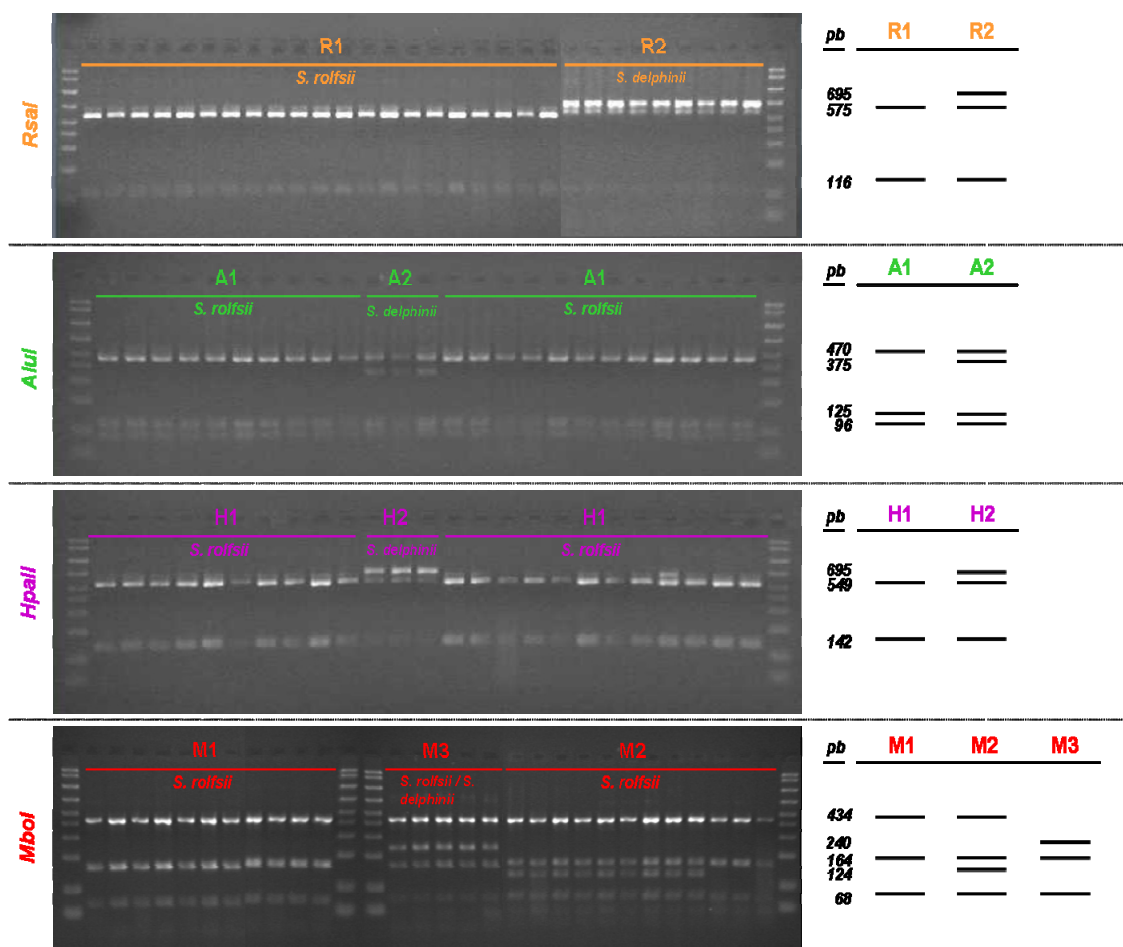


Figura IV.2: Patrones de bandas RFLP-ITS obtenidos para las enzimas *AluI* (A1 y A2), *HpaII* (H1 y H2), *RsaI* (R1 y R2) y *MboI* (M1, M2 y M3) en aislados de *Sclerotium rolfsii* y *S. delphinii*, en geles “ReadyAgarose™ Wide-Mini” al 3% teñidos con bromuro de etidio en tampón TAE 1X. A la derecha de cada imagen, se indica de forma esquemática el tamaño en pares de bases (pb) de cada una de las bandas generadas para cada una de las enzimas.

Entre los aislados de *S. delphinii* se identificaron tres patrones de bandas correspondientes a las enzimas *AluI* (A2), *HpaII* (H2) y *RsaI* (R2) que los diferenció claramente de aquellos obtenidos para los aislados de *S. rolfsii*, mientras que para *MboI* presentaron el perfil M3 que fue común con los aislados de *S. rolfsii*. Esto permitió establecer un nuevo grupo RFLP-ITS (IV) característico del GCM al que pertenecieron los nueve aislados de *S. delphinii*, formado por los patrones de restricción A2, H2, R2 y M3 (Tabla IV.1; Fig. IV.2). Los tamaños estimados para cada una de las bandas en los distintos patrones fueron: A2, cuatro fragmentos de 470, 375, 125 y 96 pb; H2, tres fragmentos de 695, 549 y 142 pb; R2, tres fragmentos de 695, 575 y 116 pb, respectivamente (Fig. IV.2).

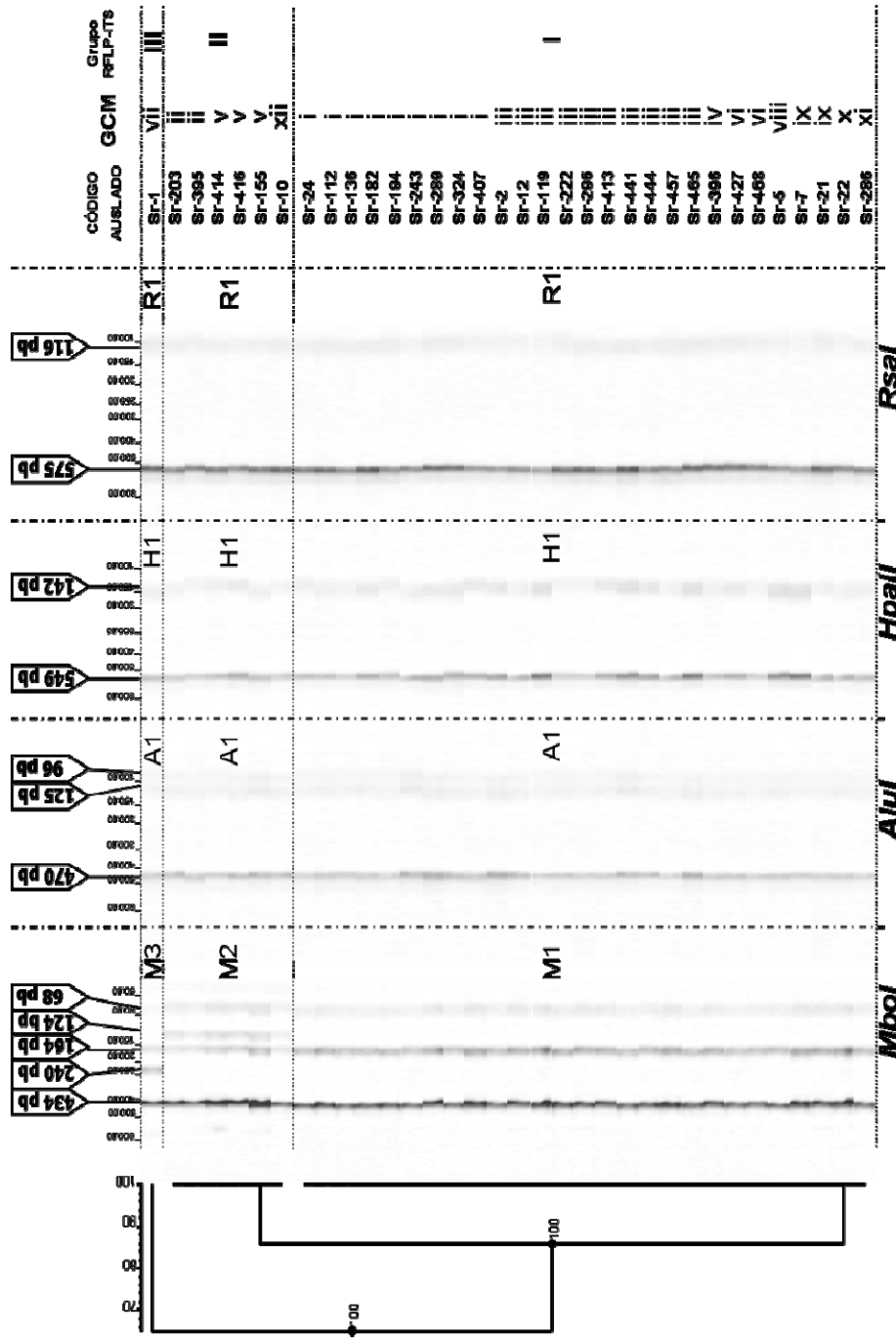


Figura IV.3. Dendrograma inferido mediante análisis UPGMA ("unweighted pair group method using arithmetic averages") usando el coeficiente de Dice (tolerancia = 1,1%; optimización = 0,9%) basado en la combinación de los perfiles de polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLPs) generados con las enzimas de restricción *Mbol* (M1, M2, M3), *AclI* (A1), *HpaII* (H1) y *RsaI* (R1) para los 34 aislados de *Sclerotium rolfsii* representativos de todas las combinaciones posibles de grupo de compatibilidad micelial (GCM) x localidad. Se indica el GCM, el grupo RFLP-ITS de cada aislado y el tamaño de las bandas generadas. En cada nodo se indican los valores de remuestreo.

IV.4.2. Análisis de las secuencias nucleotídicas de las regiones parciales de los genes *EF1 α* y *RPB2* de *S. rolfsii*

A partir de la región específica del gen *EF1 α* se obtuvo un amplicón de 540 pb. Tras editar y ensamblar todas las secuencias correspondientes a cada uno de los aislados, se seleccionó un fragmento de 536 pb para el posterior alineamiento y análisis de similitud de las mismas. A continuación, 34 aislados representativos de cada combinación GCM x localidad con idéntica secuencia nucleotídica, fueron seleccionados para los análisis de agregación en base únicamente a las posiciones nucleotídicas que mostraron variación entre las secuencias (Fig. IV.4A). La variabilidad encontrada entre las secuencias correspondientes al gen *EF1 α* se debió a variaciones localizadas en siete posiciones nucleotídicas: 117, 154, 244, 359, 413, 419 y 457 (Fig. IV.4A). El análisis de agregación basado en estas siete sustituciones, agrupó a los aislados de *S. rolfsii* de acuerdo al GCM al que pertenecen independientemente del origen geográfico de los mismos (Fig. IV.4A). Este agrupamiento puso de manifiesto que los GCMs ii, iv, v, viii, x, xi y xii podían definirse en base a sus secuencias, mientras que los GCMs i y vii, y los GCMs iii, vi y ix, respectivamente, compartieron una secuencia idéntica (Fig. IV.4A). Los porcentajes generados en la matriz de similaridad entre las secuencias de cada uno de los GCMs oscilaron entre el 94 y el 100% (Tabla IV.3), mientras que el grado de similitud entre la secuencia de los aislados de *S. delphinii* y las correspondientes a los GCMs de *S. rolfsii* fue menor, con valores comprendidos entre el 98,1 y el 98,3% (Tabla IV.3).

El producto amplificado para la región parcial del gen *RPB2* fue de 1167 pb. De forma análoga a las secuencias obtenidas para el gen *EF1 α* , se editaron y ensamblaron todas aquellas correspondientes al gen *RPB2* para cada uno de los aislados, seleccionándose un fragmento de, en este caso, 1047 pb, y se procedió al posterior alineamiento y análisis de similitud de las mismas. Las secuencias para el gen *RPB2* de los 34 aislados seleccionados previamente para el gen *EF1 α* , se utilizaron para llevar a cabo los análisis de agregación ya que representaron, igualmente, a todas las posibles combinaciones de GCM x localidad con idénticas

secuencias nucleotídicas (Fig. IV.4B). Las diferencias entre ellas, se debieron a 29 substituciones en las posiciones 190, 283, 346, 418, 425, 430, 436, 448, 460, 472, 544, 577, 580, 586, 592, 610, 622, 637, 640, 646, 712, 718, 721, 742, 751, 757, 919, 922 y 940 (Fig. IV.4B). Los análisis de agregación basados en la variabilidad en estas posiciones nucleotídicas, no mostraron relación alguna entre las diferentes secuencias y el origen de los aislados. Por el contrario, éstos se agruparon de acuerdo al GCM al que pertenecen. Así, los GCMs iii y viii mostraron la misma secuencia de nucleótidos para la región específica amplificada del gen *RPB2*, mientras que cada uno de los GCMs restantes (GCMs i, ii, iv, v, vi, vii, ix, x, xi y xii), presentaron secuencias únicas que permitió diferenciarlos del resto (Fig. IV.4B). A pesar de este hecho, la variabilidad entre las secuencias de los diferentes GCMs fue baja ya que los valores de similitud oscilaron entre el 97,9 y 99,8%. Con respecto a la secuencia característica de los aislados de *S. delphinii* agrupados todos ellos en un mismo GCM, los valores de similitud fueron de entre un 96,6 y un 97,6% (Tabla IV.3).

Tabla IV.3: Matriz de similitud calculada mediante el coeficiente de similitud “fast algorithm” entre las secuencias “tipo” de los aislados representativos de los grupos de compatibilidad miceliar (GCMs) de *Sclerotium rolfsii* y *S. delphinii* para las regiones específicas amplificadas de los genes del factor de elongación de la transcripción 1-alpha (*EF1α*) y la segunda subunidad mayor de la ARN polimerasa II (*RPB2*).

Gen	GCM	<i>RPB2</i>												<i>S. delphinii</i>
		i	ii	iii	iv	v	vi	vii	viii	ix	x	xi	xii	
<i>EF1α</i>	i	100	98,0	98,0	98,9	98,1	97,9	99,0	98,0	98,1	98,0	99,0	97,9	96,6
	ii	99,8	100	99,5	98,8	99,6	99,6	98,9	99,5	99,6	99,6	98,8	99,6	97,5
	iii	99,9	99,9	100	98,8	99,5	99,6	99,0	99,7	99,7	99,7	98,9	99,4	97,3
	iv	99,7	99,9	99,8	100	98,8	98,9	98,9	98,8	98,9	98,9	98,9	98,8	96,9
	v	99,8	99,7	99,8	99,6	100	99,4	99,0	99,5	99,8	99,6	99,0	99,6	97,6
	vi	99,9	99,9	100	99,8	99,8	100	98,8	99,6	99,6	99,7	98,8	99,6	97,2
	vii	99,9	99,8	99,9	99,7	99,8	99,9	100	99,0	99,1	99,0	99,1	98,8	97,1
	viii	99,8	99,8	99,9	99,7	99,7	99,9	99,8	100	99,7	99,7	98,9	99,4	97,3
	ix	99,9	99,9	100	99,8	99,8	100	99,9	99,9	100	99,8	99,1	99,5	97,5
	x	99,4	99,4	99,5	99,4	99,4	99,5	99,4	99,4	99,5	100	99,0	99,5	97,4
	xi	99,9	99,7	99,8	99,6	99,8	99,8	99,9	99,7	99,8	99,4	100	98,8	97,1
	xii	99,7	99,8	99,8	99,8	99,6	99,8	99,7	99,8	99,8	99,4	99,6	100	97,5
<i>S. delphinii</i>		98,2	98,2	98,3	98,1	98,1	98,3	98,2	98,2	98,3	98,2	98,1	98,1	100

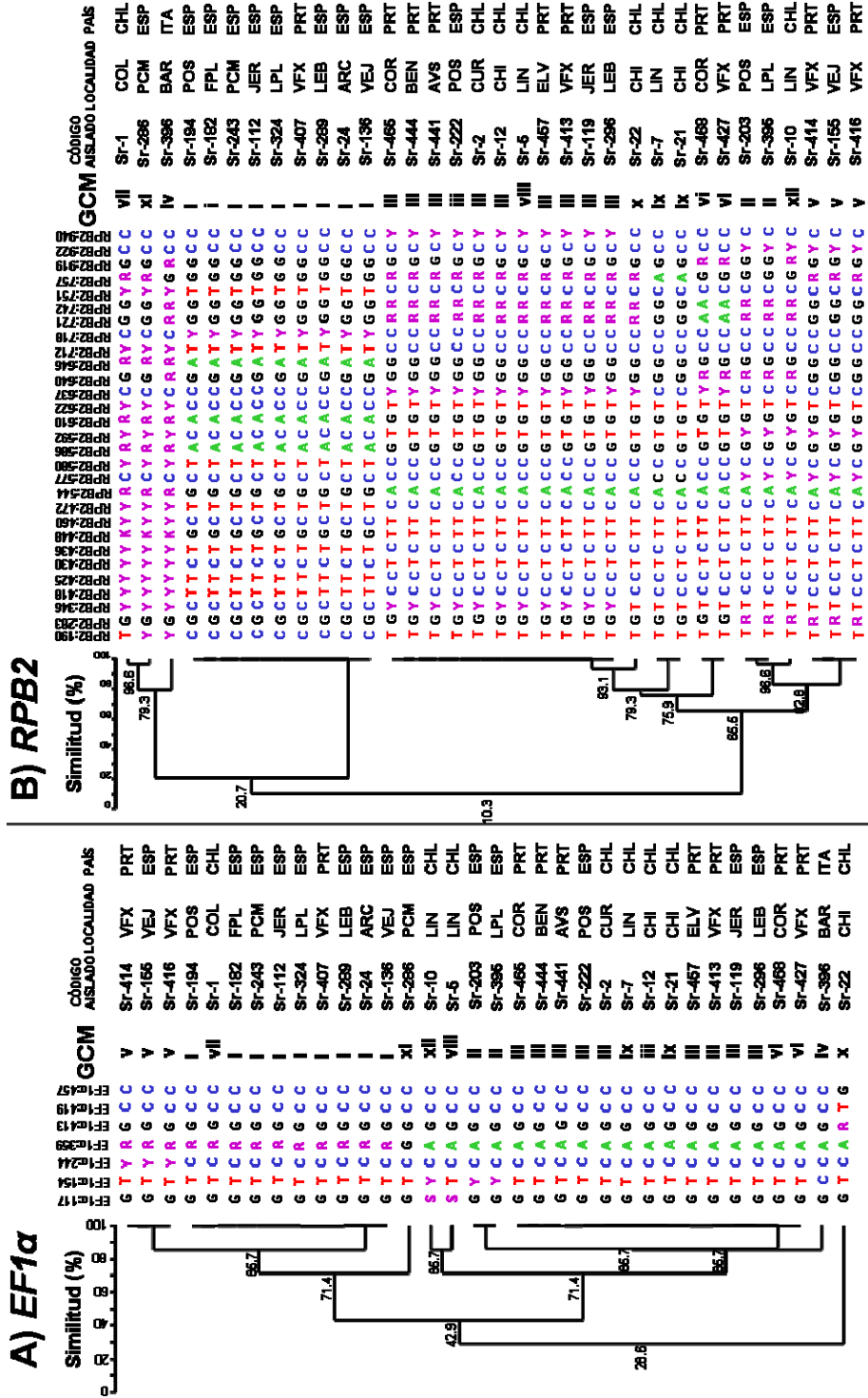


Figura IV.4. Dendrogramas inferidos mediante el método "complete linkage" para las secuencias de las regiones parciales del gen *EF1α* (A) que codifica para el factor de elongación de la transcripción 1- α y del gen *RPB2* (B) codificante de la segunda subunidad mayor de la ARN polimerasa II, de los 34 aislados de *Sclerotium rolfsii* representativos de todas las combinaciones posibles de grupo de compatibilidad micelar (GCM) x localidad con idéntica secuencia de nucleótidos. En la figura se muestra el árbol óptimo generado tras 1,000 repeticiones indicando en cada nodo la distancia entre las secuencias. Las etiquetas para cada aislado indican: GCM / código de referencia / Localidad / País.

Las secuencias de la región ITS1-5.8S-ITS2 amplificadas para los 238 aislados de *S. rolf sii* generaron fragmentos de 695 pb, sin embargo, tras la secuenciación de las mismas, no se pudieron incluir en los análisis ya que en la mayoría de los casos presentaron dobles lecturas a lo largo de toda la secuencia.

Finalmente, las secuencias de los 34 aislados representativos de cada combinación GCM x localidad con idéntica secuencia nucleotídica para las regiones amplificadas de los genes *EF1 α* y *RPB2*, se analizaron de forma combinada en análisis de agregación basados en aquellos nucleótidos que presentaron variación para ambas regiones (Fig. IV.5). En este análisis combinado, los GCMs que compartieron alguna de las secuencias, tanto para la región del gen *EF1 α* como para la del *RPB2*, quedaron resueltos claramente ya que cada GCM presentó una combinación de secuencias única y característica. Además, dichas secuencias para cada uno de los 12 GCMs de *S. rolf sii*, no mostraron asociación con la procedencia geográfica de los aislados (Fig. IV.5). Así, se pudieron diferenciar dos grupos hermanos principales entre los 12 GCMs de *S. rolf sii* formados por los GCMs i, iv, vii y ix, y GCMs ii, iii, v, vi, viii, ix, x y xii, respectivamente (Fig. IV.5). Es de destacar, que una única sustitución nucleotídica fue suficiente para diferenciar a los GCMs iii y viii (*EF1 α* : 117; Fig. IV.5), dos cambios para diferenciar entre los GCMs ii y xii (*RPB2*: 919 y *EF1 α* : 117; Fig. IV.5), o entre los GCMs vii y xi (*RPB2*: 190 y *EF1 α* : 359; Fig. IV.5), y se requieren al menos cinco cambios nucleotídicos para discriminar entre el resto de GCMs, consiguiendo la completa caracterización de los 12 GCMs de *S. rolf sii*.

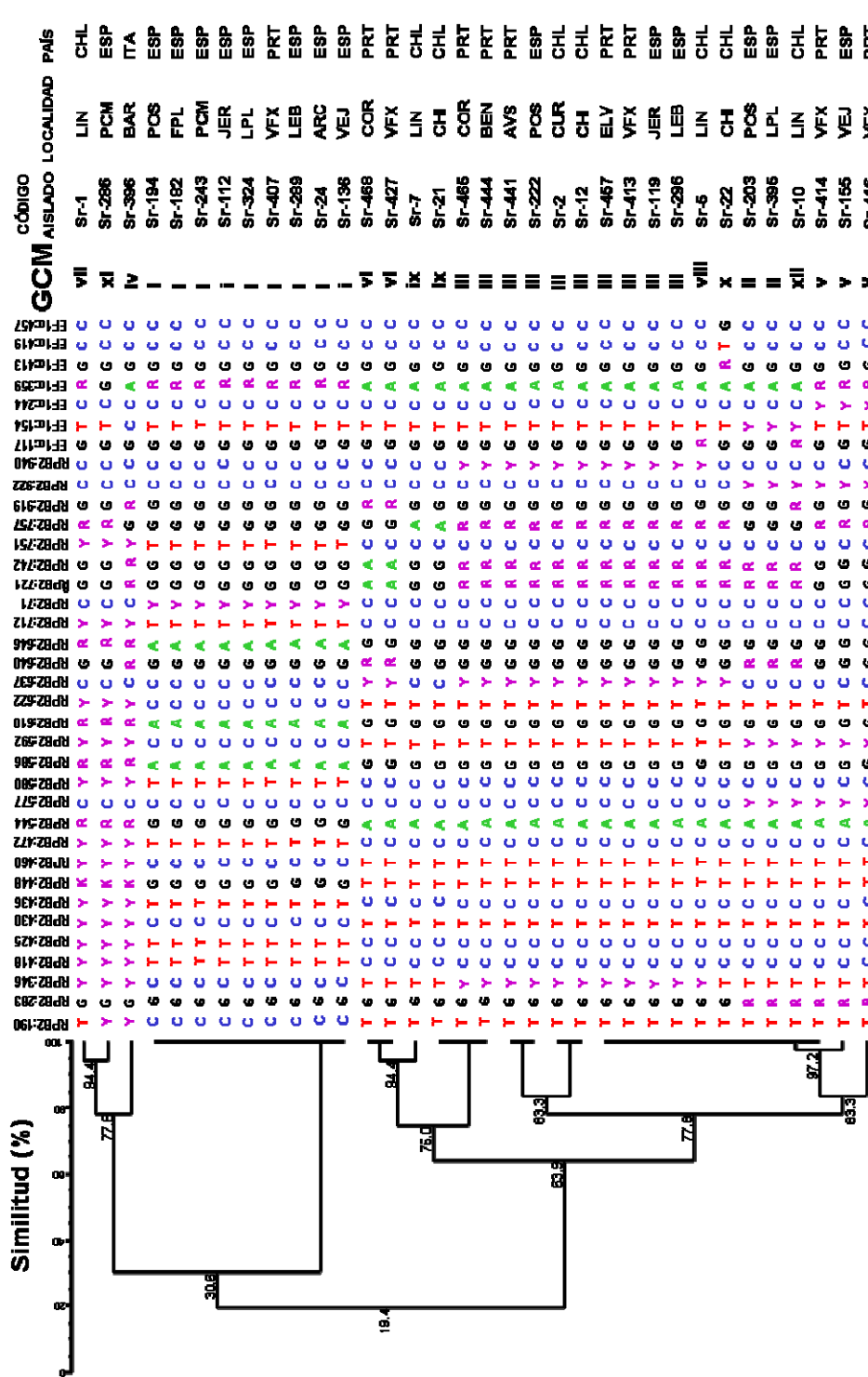


Figura IV.5. Dendrograma inferido mediante el método "complete linkage" para las secuencias de las regiones parciales del gen *EF1 α* que codifica para el factor de elongación de la transcripción 1-alpha y del gen *RPB2* codificante de la segunda subunidad mayor de la ARN polimerasa II, de los 34 aislados de *Sclerotium rolfisii* representando a todas las combinaciones posibles de grupo de compatibilidad micelar (GCM) x localidad. En la figura se muestra el árbol óptimo generado tras 1,000 repeticiones indicando en cada nodo la distancia entre las secuencias. Las etiquetas para cada aislado indican: GCM / código de referencia / Localidad / País.

La consistencia del análisis combinado de las secuencias de los genes *EF1 α* y *RPB2* para asignar los aislados de *S. rolfsii* a un GCM determinado, se analizó y demostró en “test ciegos” en los que utilizando nuevos aislados de distinta procedencia al set de aislados utilizados para la obtención de secuencias específicas para cada uno de los 12 GCM identificados, se pudieron asignar a GCMs mediante el análisis tanto de dichas secuencias génicas como de enfrentamientos de compatibilidad miceliar entre ellos. En estos ensayos, se usaron cinco aislados de *S. rolfsii* procedentes de plantas de remolacha enfermas de Chile no incluidos previamente, y 20 procedentes de dos nuevos países, India (10 aislados) y Marruecos (10 aislados). Los resultados permitieron asignar todos los aislados de Chile y Marruecos a los GCMs ix y i, respectivamente, en base tanto a la similitud del 100% de sus secuencias para los genes *EF1 α* y *RPB2*, como a la reacción de compatibilidad miceliar con los aislados tipo de dichos GCMs. Por otro lado, los aislados procedentes de India no pudieron ser asignados a ninguno de los 12 GCMs previamente identificados ya que sus secuencias nucleotídicas no coincidieron con ninguna de las obtenidas para los GCMs y las reacciones miceliares resultaron ser incompatibles con cualesquiera de los 12 aislados representativos de los GCMs por lo que constituirían un nuevo GCM (xiii).

IV.4.3. Análisis filogenético de las secuencias nucleotídicas de las regiones parciales de los genes *EF1 α* y *RPB2* en *S. rolfsii*

En base a las posiciones nucleotídicas variables en las secuencias tanto del gen *EF1 α* como del *RPB2*, se construyó un árbol filogenético para los 34 aislados de *S. rolfsii* referidos en el apartado anterior (Tabla 1) mediante análisis de Máxima-Parsimonia (MP) (Fig. IV.6). Los GCMs iv, vii y xi se agruparon formando el “Clado A” que fue independiente del resto de GCMs y estuvo soportado por el 100% del valor de remuestreo. Estos tres GCMs representan cuatro aislados del total de la colección de aislados estudiada, distribuidos en uno, dos y un aislado, respectivamente, con una distribución geográfica muy variable ya que se localizaron en una única

localidad en Bari (Italia), Colchagua (Chile) y Huelva, respectivamente (Tabla IV.1). Los aislados de los GCMs i y v se agruparon en un mismo clado, "Clado B" (80% valor de remuestreo), resuelto como grupo hermano del resto de GCMs. Los GCMs i y v solo estuvieron presentes en varias localidades del sur de España y Portugal, y en dos de ellas, Vejer de la Fra. y Vila Franca Xira, aparecieron en una misma parcela muestreada. El "Clado C" fue el más diverso ya que estuvo constituido por la mayoría de GCMs de *S. rolfsii* y con aislados procedentes de diferentes localidades de Chile, España y Portugal. En este clado se pudieron identificar dos subgrupos (61% valor de remuestreo), el subgrupo C1 incluyendo solo a aislados del GCM ix presente en dos localidades de Chile, y el subgrupo C2 que reunió a los seis GCMs restantes. En este subgrupo C2, los GCMs xii y ii, identificados solo en Chile y España, respectivamente, estuvieron muy relacionados filogenéticamente entre sí y separados del resto de los GCMs, viii, iii y x, y vi (85% bootstrap) (Tabla IV.1; Fig. IV.6). Los GCMs de *S. rolfsii* que aparecieron más relacionados fueron los GCMs xii y ii, y los GCMs viii y iii, respectivamente (Fig. IV.6).

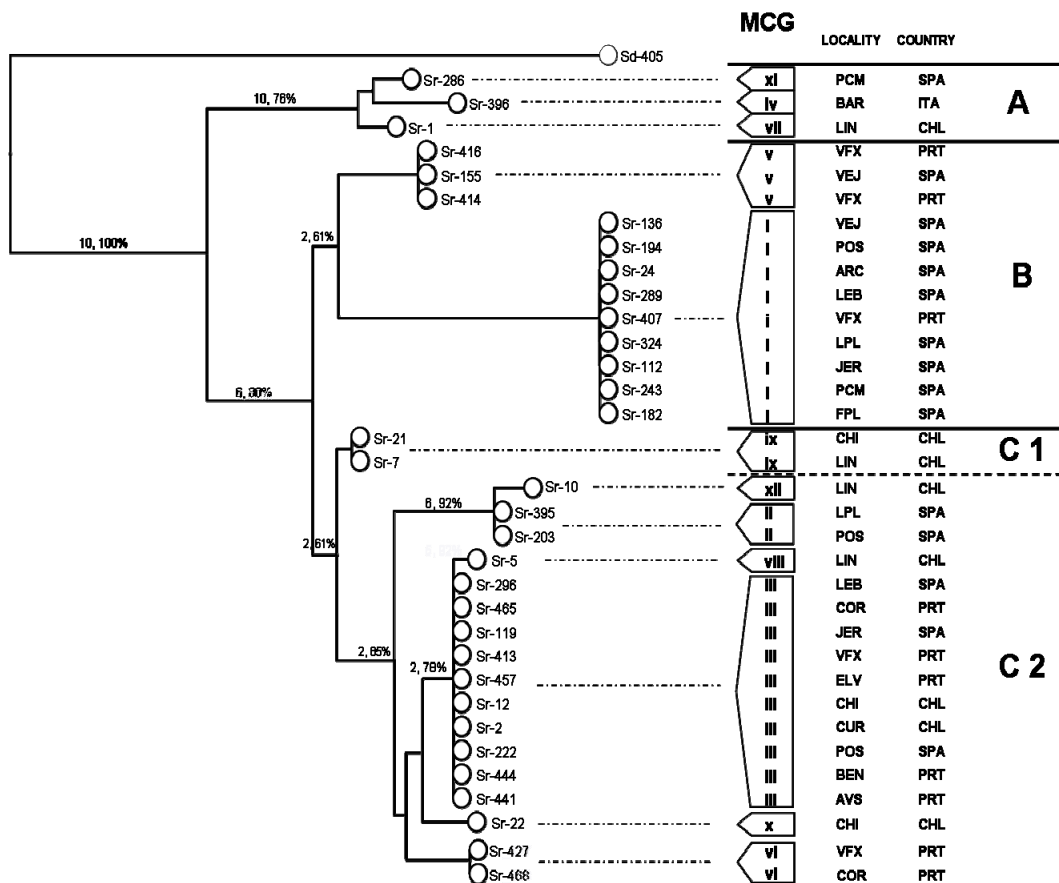


Figura IV.6. Árbol más probable obtenido mediante análisis de Máxima-Parsimonia basado en las posiciones nucleotídicas variables de las secuencias de las regiones parciales del gen *EF1α* que codifica para el factor de elongación de la transcripción 1-alpha y del gen *RPB2* codificante de la segunda subunidad mayor de la ARN polimerasa II para los 34 aislados de *Sclerotium rolfsii* representando a todas las combinaciones posibles de grupo de compatibilidad micelial GCM x localidad con idénticas secuencias de nucleótidos. En las ramas del árbol se indica la longitud de las mismas y el valor re muestreo “bootstrap” >50% para un total de 1,000 repeticiones obtenidos en Bionumerics v.6.1.

IV.5. DISCUSIÓN

La variabilidad genética entre los aislados de *S. rolfsii* se ha estudiado fundamentalmente con objeto de obtener una mejor comprensión de la estructura de sus poblaciones en condiciones naturales ya que es un importante patógeno de suelo en numerosas plantas cultivadas de valor económico. Este conocimiento puede, además, ofrecer información útil sobre la distribución y dispersión del hongo, así como contribuir a la mejora en el diseño de estrategias de manejo de las

enfermedades que causa. Teniendo en cuenta que la información disponible indica que el estado sexual de *S. rolfsii* tiene un mínimo impacto en el ciclo vital del patógeno, se considera que la variabilidad entre los aislados se debe a reacciones incompatibles entre los miembros de diferentes GCMs, tal y como ocurre en otros patógenos de plantas con ciclos de vida similares (Khon et al., 1991; Leslie, 1993). De este modo, en base a la determinación de GCMs entre los aislados de *S. rolfsii*, varios autores (Almeida et al., 2001; Cilliers et al., 2000; Nalim et al., 1995;) han indicado que aquellos pertenecientes a un mismo GCM son, en general, genéticamente más similares entre sí que a aquellos aislados pertenecientes a GCMs diferentes mediante el uso de diversas herramientas moleculares. En este contexto, la presente investigación explora el uso de varias aproximaciones moleculares incluyendo el análisis de secuencias nucleotídicas de genes de copia única y de los RFLP-ITS para resolver la diversidad genética entre los GCMs de poblaciones de *S. rolfsii* infectando cultivos de remolacha azucarera y, finalmente, sugiere el uso de las secuencias combinadas de los genes *EF1 α* y *RPB2* como marcadores discriminatorios de dichos GCMs.

El análisis de los perfiles RFLPs-ITS obtenidos con las cuatro enzimas de restricción (*AluI*, *HpaII*, *RsaI* y *MboI*) permitió establecer tres grupos entre los 238 aislados de *S. rolfsii* estudiados (Tabla IV.1; Fig. IV.3). Todos los aislados pertenecientes a un mismo GCM presentaron patrones RFLP-ITS idénticos mientras que un mismo patrón se observó entre varios GCMs. Basándonos en estos resultados podemos concluir que existe una baja variabilidad entre los GCMs, sin que exista asociación alguna entre éstos y el área geográfica donde se identificaron. Así, los GCMs más abundantes y prevalentes, GCM i y iii respectivamente, y otros grupos cuya distribución se restringió a varias localidades dentro de un país, GCMs vi y xi, o a áreas específicas, GCMs iv, viii, x y xi, se agruparon en el grupo RFLP-ITS I (Tabla IV.1; Fig. IV.3). Del mismo modo, el grupo RFLP-ITS II lo formaron GCMs localizados bien en varias áreas, tanto de diferentes países, GCM v identificado en España y Portugal, como dentro de un mismo país, GCM ii en España, o bien en una única parcela, GCM xii.

Finalmente el grupo RFLP-ITS III estuvo formado por un solo aislado correspondiente al GCM vii (Tabla IV.1; Fig. IV.3). Estos patrones RFLP-ITS identificados en la presente investigación, coinciden con los descritos por Harlton et al. (1995) como patrones característicos de los grupos I, IV y III, respectivamente, para una colección mundial de aislados de *S. rolf sii* procedente de diversos cultivos huésped. Sin embargo, estos grupos incluían a todos los aislados que estos autores obtuvieron de remolacha azucarera indicando cierto grado de especificidad con respecto al huésped.

Los grupos obtenidos en el análisis RFLP-ITS responden a la variabilidad encontrada con la enzima *Mbol* que mostró tres perfiles de bandas entre los GCMs, ya que el resto de enzimas no presentaron variación entre los aislados. Harlton et al. (1995) sin embargo, encontraron una mayor variabilidad entre sus aislados con estas mismas enzimas, describiendo tres patrones de bandas para *AluI* y *HpaII*, dos para *RsaI* y cinco para *Mbol* e identificando un total de 12 grupos de RFLP-ITS para los aislados de *S. rolf sii*. Esta mayor variabilidad podría estar relacionada con la mayor diversidad de origen geográfico y plantas huésped explorada por estos autores.

Como ya se ha indicado anteriormente, todos los aislados pertenecientes a un mismo GCM compartieron el mismo patrón RFLP-ITS. Este resultado concuerda con el presentado por Nalim et al. (1995), los cuales encontraron que todos los aislados de un mismo GCMs compartieron idéntico patrón RFLP-ITS para la enzima *Mbol*. En base a esto, concluyen que los GCMs eran clonales en origen. En estudios posteriores mediante análisis RAPD (Okabe & Matsumoto, 2000; Punja & Sun, 2001), dicha clonalidad se pudo detectar en algunos GCMs de *S. rolf sii*, sin embargo, los aislados de la mayoría de GCMs, mostraron pequeñas diferencias en el patrón de bandas manifestando cierta variabilidad intraespecífica dentro de cada uno de ellos. Resultados similares obtuvieron Cilliers et al. (2000) mediante análisis AFLP de aislados de *S. rolf sii* procedentes de Suráfrica, sugiriendo que los miembros de un GCM no serían necesariamente clonales en origen.

Por otro lado, los patrones RFLP-ITS obtenidos en este capítulo de la Tesis Doctoral con las enzimas *AluI*, *HpaII* y *RsaI* diferenciaron claramente a los aislados de *S. rolfsii* y *S. delphinii*, permitiendo la rápida y clara separación de estas dos especies, las cuales, están muy relacionadas taxonómicamente (Harlton et al., 1995; Punja & Sun, 2001). La enzima *MboI* no indicó, sin embargo, tal diferenciación entre las dos especies ya que el patrón M3 se pudo describir tanto para el aislado del grupo RFLP-ITS III de *S. rolfsii* como para el grupo específico de los aislados de *S. delphinii*. El estudio de las características morfológicas (Punja & Damiani, 1996) o de los patrones RAPD (Punja & Sun, 2001) han sido igualmente utilizadas para la diferenciación de estas dos especies.

Atendiendo a la suma total de los tamaños de las bandas resultantes de la digestión del amplicón ITS con las enzimas empleadas, los patrones M2 y M3 exceden el tamaño del producto de PCR no digerido. Este hecho fue también señalado por Harlton et al. (1995) y para resolverlo, analizaron dos aislados originados a partir de dos basidiosporas segregadas de un parental común. Estos aislados presentaron dos patrones de digestión distintos para la enzima *MboI* indicando la presencia de dos tipos de secuencias ITS del ADNr así como la condición heterocariótica de los aislados de *S. rolfsii*. Posteriormente, Okabe et al. (2001) apoyaron esta hipótesis a través del estudio de protoplastos para determinar los tipos de secuencias ITS en homocariontes procedentes de un único aislado heterocarionte. No obstante, no se ha podido demostrar que los diversos tipos de secuencias ITS del ADNr correspondan a diferentes núcleos en aislados heterocarióticos ya que múltiples copias de dicha región no idénticas entre sí, pueden aparecer en individuos monocarióticos tal y como ha sido descrito en otras especies fúngicas (Ko & Yung, 2002). En esta investigación no fue posible determinar las secuencias de nucleótidos para la región ITS en la mayoría de aislados de *S. rolfsii* ya que aparecían mezclas de secuencias, lo cual, podría apoyar ambas hipótesis, esto es, la existencia de variabilidad entre las múltiples copias de la secuencia ITS en un solo núcleo o la condición heterocarionte de las células. Sin embargo, la identificación de ciertas ambigüedades a lo largo de las secuencias para

los genes de copia única *EF1 α* y *RPB2* estudiados, podrían apoyar con más fuerza la naturaleza heterocariótica de los aislados de *S. rolfsii*.

Varios genes de copia única han sido propuestos recientemente como alternativa a los genes del ADN ribosomal o nuclear que desde hace 20 años han servido de plataforma para la sistemática en hongos (Blanz & Unseld, 1987; Bruns et al., 1991; Hibbett, 1992). En el caso del Phylum Basidiomycota, son las regiones correspondientes a los genes *EF1 α* y *RPB2* las que han aparecido con mayor fuerza como marcadores moleculares idóneos para determinar inferencias filogenéticas intraespecíficas en sus especies (Baldauf, 1999; Binder et al., 2010; Matheny, 2006a; Matheny et al., 2007; Rodríguez Estrada et al., 2010). No obstante, y hasta nuestro conocimiento, esta investigación es pionera en el estudio de la variabilidad intraespecífica entre aislados de *S. rolfsii* en base al análisis de dichas secuencias. De este modo, regiones específicas de los genes *EF1 α* y *RPB2* han sido analizadas con éxito, por separado o combinadas, para evaluar la variabilidad genética dentro y entre los GCMs de *S. rolfsii* identificados en la presente Tesis Doctoral, explorar su capacidad para detectar polimorfismos en posiciones nucleotídicas específicas e identificar a estos GCMs inequívocamente.

Los resultados obtenidos mostraron una clara relación entre las secuencias de nucleótidos de las regiones específicas de los genes *EF1 α* y *RPB2* de cada aislado de *S. rolfsii* y el GCM al cual pertenecen ya que todos los aislados de un mismo GCM compartieron una composición nucleotídica única (Fig. IV.4 y IV.5). Las secuencias para el gen *RPB2* fueron más variables que las correspondientes al *EF1 α* en base a las posiciones nucleotídicas variables y la matriz de similaridad generada (Tabla IV.3). Así, 10 de los 12 GCMs pudieron ser caracterizados atendiendo exclusivamente a la región *RPB2* (Fig. IV.4B) mientras que la región *EF1 α* solo resolvió por sí sola siete GCMs (Fig. IV.4A) encontrando que los GCMs iii y viii, GCMs i y vii, y GCMs iii, vi y ix, presentaban secuencias idénticas entre sí. Estos resultados están en concordancia con los de otros estudios que concluyen que la región *RPB2* está muy conservada entre organismos eucariotas (Denton et al., 1998; Liu et al.,

1999; Matheny et al., 2007; Walsh et al., 2004) pero son, a pesar de esto, más variables que la región *EF1 α* en hongos. Cuando en una segunda aproximación las secuencias de ambos genes se combinaron, cada uno de los GCMs de *S. rolfsii* pudo ser resuelto sin ambigüedad permitiendo la caracterización molecular de los mismos y la asignación de aislados de *S. rolfsii* a aquellos 12 GCMs previamente identificados en base a su información nucleotídica (Fig. IV.5). Estos marcadores no parecen estar unidos al origen geográfico de los aislados, sin embargo, su asociación con los GCMs ha sido demostrada consistentemente ya que ninguno de ellos, aún siendo localizados en áreas geográficas restringidas, GCMs iv, vii, vii xi, xi y xii, en varias regiones de diferentes países, GCM v, o de amplia distribución geográfica, GCM i y iii, compartieron la misma secuencia de nucleótidos para ambas regiones.

En otros patógenos, se han podido establecer criterios similares para la identificación de grupos de aislados en base a las reacciones de compatibilidad vegetativa. Así, en *Rhizoctonia solani* Kühn. han sido descritos 14 grupos de anastomosis (AGs) (Cubeta & Vilgalys, 1997). Kuninaga et al. (1997) propusieron, además, diversos subgrupos identificados mediante secuencias ITS-5.8s del ADNr. Del mismo modo, en *Verticillium dahliae* Kleb. se encontró asociación entre secuencias *seq* específicas de *V. dahliae* con diferentes grupos y subgrupos de compatibilidad vegetativa (VCGs). Así, el tipo de secuencia *seq1* fue encontrada en aislados de los VCGs 1B y 2B; *seq2* en los aislados de los VCGs 2A y 4B; *seq4* en aislados del VCG 1A y *seq7* en los del VCG 4A (Collado-Romero et al., 2008; Jiménez-Díaz et al., 2011).

El análisis filogenético de los aislados de *S. rolfsii* basado en las secuencias nucleotídicas específicas de los genes *EF1 α* and *RPB2*, los agrupó atendiendo al GCM al que pertenecen sin que exista relación con el origen geográfico de los mismos. No obstante, los GCM i y v, presentes en las mismas parcelas muestreadas en Vejer de la Fra. y Vila Franca Xira, y los GCMs iii, viii y x, identificados en localidades próximas de Chile (Tabla IV.1), aparecieron muy relacionados filogenéticamente y formando clados robustos. Curiosamente, en el capítulo III de esta Tesis Doctoral se

concluye que el GCM i representa a la población original del patógeno en el Sur de España y que el GCM iii es el más ampliamente dispersado entre España y Portugal por prácticas culturales así como en Chile mediante múltiples introducciones. Estos eventos indicarían que el GCM v y los GCMs viii y x, podrían haber sido originados a partir de aislados de los GCMs i y iii, respectivamente.

Finalmente, la aplicabilidad y reproducibilidad de esta herramienta molecular para asignar los aislados de *S. rolfssii* a un GCM, se confirmó con “test ciegos” que permitieron clasificar 15 nuevos aislados en dos de los GCMs previamente identificados. El hecho de que los aislados procedentes de India no pudieran ser asignados ni en base a los enfrentamientos miceliares ni a la similaridad de sus secuencias nucleotídicas, indica que nuevos GCMs podrán ser descritos en el futuro así como la consistencia de la información proporcionada por los genes *EF1 α* y *RPB2*.

Por todo esto, en esta investigación se propone un set inicial de aislados representativos de GCMs para la identificación de estos en *S. rolfssii* en base a la caracterización de un determinado GCM con secuencias génicas específicas para los genes *EF1 α* y *RPB2*. La excelente resolución que se consigue con estas regiones génicas y lo rápido y barato que resulta la secuenciación para la mayoría de laboratorios de investigación, determinan que esta herramienta molecular sea útil para el mejor entendimiento de la epidemiología de las enfermedades causadas por *S. rolfssii* y poder llevar a cabo un seguimiento exacto de la dispersión de los aislados del patógeno.

IV.6. LITERATURA CITADA

- Almeida, A. M. R., Abdelnoor, R. V., Calvo, E. S., Tessnman, D., Yorinori, J. T. 2001. Genotypic diversity among Brazilian isolates of *Sclerotium rolfsii*. *Journal of Phytopathology* 149: 493-502.
- Atallah, Z. K., Larget, B., Chen, X., Johnson, D. A. 2004. High genetic diversity, phenotypic uniformity, and evidence of outcrossing in *Sclerotinia sclerotiorum* in the Columbia basin of Washington state. *Phytopathology* 94: 737-742.
- Baldauf, S. L. 1999. A search for the origins of animals and fungi: Comparing and combining molecular data. *The American Naturalist* 154: S178-S188.
- Begerow, D., Nilsson, H., Unterseher, M., Maier, W. 2010. Current state and perspectives of fungal DNA barcoding and rapid identification procedures. *Applied Microbiology and Biotechnology* 87: 99-108.
- Binder, M., Larsson, K. H., Matheny, P. B., Hibbett, D. 2010. Amylocorticiales ord. nov. and Jaapiiales ord. nov.: Early diverging clades of Agaricomycetidae dominated by corticioid forms. *Mycologia* 102: 865-880.
- Blanz, P. A., Unsel, M. 1987. Ribosomal RNA as a taxonomic tool in mycology, pp. 247-258. En: *The Expanding Realm of Yeast-Like Fungi*. G. S. de Hoog, M. T. Smith, A. C. Weijman, eds. Elsevier, Amsterdam, Países Bajos.
- Bruns, T., White, T., Taylor, J. 1991. Fungal molecular systematics. *Annual Review of Ecology and Systematics* 22: 525-564.
- Carling, D. E., Kuninaga, S., Brainard, K. A. 2002. Hyphal anastomosis reactions, rDNA-internal transcribed spacer sequences, and virulence levels among subsets of *Rhizoctonia solani* anastomosis group-2 (AG-2) and AG-BI. *Phytopathology* 92: 43-50.

- Cilliers, A. J., Herselman, L., Pretorius, Z. A. 2000. Genetic variability within and among mycelial compatibility groups of *Sclerotium rolfsii* in South Africa. *Phytopathology* 90: 1026-1031.
- Collado-Romero, M., Mercado-Blanco, J., Olivares-García, C., Jiménez-Díaz, R. M. 2008. Phylogenetic analysis of *Verticillium dahliae* vegetative compatibility groups. *Phytopathology* 98: 1019-1028.
- Cubeta, M. A., Vilgalys, R. 1997. Population biology of the *Rhizoctonia solani* complex. *Phytopathology* 87: 480-484.
- Denton, A. L., McConaughy, B. L., Hall, B. D. 1998. Usefulness of RNA polymerase II coding sequences for estimation of green plant phylogeny. *Molecular Biology and Evolution* 15: 1082-1085.
- Harlton, C. E., Uvesque, C. A., Punja, Z. K. 1995. Genetic diversity in *Sclerotium (Athelia) rolfsii* and related species. *Phytopathology* 85: 1269-1281.
- Hibbett, D. S. 1992. Ribosomal RNA and fungal systematics. *Transactions of the Mycological Society of Japan* 33: 533-556.
- Jiménez-Díaz, R. M., Olivares-García, C., Landa, B. B., Jiménez-Gasco, M. M., Navas-Cortés, J. A. 2011. Region-wide analysis of genetic diversity in *Verticillium dahliae* populations infecting olive in southern Spain and agricultural factors influencing the distribution and prevalence of vegetative compatibility groups and pathotypes. *Phytopathology* 101: 304-315.
- Kausrud, H., Schumacher, T. 2001. Outcrossing or inbreeding: DNA markers provide evidence for type of reproductive mode in *Phellinus nigrolimitatus* (*Basidiomycota*). *Mycological Research* 105: 676-683.
- Ko, K. S., Jung, H. S. 2002. Three nonorthologous ITS1 types are present in a polypore fungus *Trichaptum abietinum*. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 23: 112-122.

- Kohn, L. M., Stasovski, E., Carbone, I., Royer, J., Anderson, J. B. 1991. Mycelial incompatibility and molecular markers identify genetic variability in field populations of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Phytopathology* 81: 480-485.
- Kuninaga, S., Natsuaki, T., Takeuchi, T., Yokosawa, R. 1997. Sequence variation of the rDNA ITS regions within and between anastomosis groups in *Rhizoctonia solani*. *Current Genetics* 32: 237-243.
- Leslie, J. F. 1993. Fungal vegetative compatibility. *Annual Review of Phytopathology* 31: 127-150.
- Liu, Y. J., Whelen, S., Hall, D. 1999. Phylogenetic relationships among Ascomycetes: evidence from an RNA polymerase II subunit. *Molecular Biology and Evolution* 16: 1799-1808.
- Matheny, P. B. 2006a. PCR Primers to Amplify and Sequence *rpb2* (RNA polymerase II second largest subunit) in the Basidiomycota (Fungi) Available from: <http://www.clarku.edu/faculty/dhibbett>.
- Matheny, P. B., Curtis, J. M., Hofstetter, V., Aime, M. C., Moncalvo, J. M., Ge, Z. W., Yang, Z. L., Slot, J. C., Ammirati, J. F., Baroni, T. J., Bougher, N. L., Hughes, K. W., Lodge, D. J., Kerrigan, R. W., Seidl, M. T., Aanen, D. K., Matthew, D., Daniele, G. M., Desjardin, D. E., Kropp, B. R., Norvell, L. L., Parker, A., Vellinga, E. C., Vilgalys, R., Hibbett, D. S. 2006b. Major clades of Agaricales: a multilocus phylogenetic overview. *Mycologia* 98: 982-995.
- Matheny, P. B., Wang, Z., Binder, M., Curtis, J. M., Lim, Y. W., Nilsson, H., Hughes, K. W., Hofstetter, V., Ammirati, J. F., Schoch, C. L., Langer, E., Langer, G., McLaughlin, D. J., Wilson, A. W., Froslev, T., Ge, Z. W., Kerrigan, R. W., Slot, J. C., Yang, Z. L., Baroni, T. J., Fischer, M., Hosaka, K., Matsuura, K., Seidl, M. T., Vauras, J., Hibbett, D. S. 2007. Contributions of *rpb2* and *tef1* to the phylogeny of mushrooms and allies (Basidiomycota, Fungi). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 43: 430-451.

- Nalim, F. A., Starr, J. L., Woodard, K. E., Segner, S., Keller, N. P. 1995. Mycelial compatibility groups in Texas peanut field populations of *Sclerotium rolfsii*. *Phytopathology* 85: 1507-1512.
- O'Donnell, K., Kistler, H. C., Cigelnik, E., 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 Science* 95: 2044-2049.
- Okabe, I., Matsumoto, N. 2000. Population structure of *Sclerotium rolfsii* in peanuts fields. *Mycoscience* 41: 145-148.
- Okabe, I., Arakawa, M., Matsumoto, N. 2001. ITS polymorphism within a single strain of *Sclerotium rolfsii*. *Mycoscience* 42: 107-113.
- Okabe, I., Morikawa, C., Matsumoto, N., Yokoyama, K. 1998. Variation in *Sclerotium rolfsii* isolates in Japan. *Mycoscience* 39: 399-407.
- Punja, Z. K. 1985. The biology, ecology and control of *Sclerotium rolfsii*. *Annual Review of Phytopathology* 23: 97-127.
- Punja, Z. K., Damiani, A. 1996. Comparative growth, morphology, and physiology of three *Sclerotium* species. *Mycologia* 88: 694-706.
- Punja, Z. K., Grogan, R. G. 1983a. Basidiocarp induction, nuclear condition, variability, and heterokaryon incompatibility in *Athelia* (*Sclerotium*) *rolfsii*. *Phytopathology* 73: 1273-1278.
- Punja, Z. K., Grogan, R. G. 1983b. Hyphal interactions and antagonism among field isolates and single-basidiospore strains of *Athelia* (*Sclerotium*) *rolfsii*. *Phytopathology* 73: 1279-1284.
- Punja, Z. K., Sun, L. J. 2001. Genetic diversity among mycelial compatibility groups of *Sclerotium rolfsii* and *Sclerotium delphinii*. *Mycological Research* 105: 537-546.

- Rodríguez-Estrada, A. E., Jiménez-Gasco, M. M., Royse, D. J. 2010. *Pleurotus eryngii* species complex: Sequences analysis and phylogeny on partial *EF1 α* and *RPB2* genes. *Fungal Biology* 114: 421-428.
- Roger, A. J., Sandblom, O., Doolittle, W. F., Philippe, H. 1999. An evaluation of elongation factor 1a as a phylogenetic marker for eukaryotes. *Molecular Biology and Evolution* 16: 218-233.
- Tanabe, Y., Saikawa, M., Watanabe, M. M., Sugiyama, J. 2004. Molecular phylogeny of Zygomycota based on EF-1a and RPB1 sequences: limitations and utility of alternative markers to rDNA. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 30: 438-449.
- Todd, N. K., Rayner, A. D. M. 1980. Fungal individualism. *Science progress* 66: 331-354.
- Wendland, J., Kothe, E. 1997. Isolation of *tef1* encoding translation elongation factor EF-1a from the homobasidiomycete *Schizophyllum commune*. *Mycological Research* 101: 798-802.
- White, T. J., Bruns, T., Lee, S. Taylor, J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics, pp. 315-322. En: *PCR protocols: a guide to methods and applications*. M. A. Innis, D. H. Getfand, J. J. Sninsky, T. J. White, eds. Academic Press, San Diego, CA, E.E.U.U.
- Worrall, J. J. 1997. Somatic incompatibility in basidiomycetes. *Mycologia* 89: 24-36.

CAPÍTULO V

**DIVERSIDAD PATOGENICA EN
POBLACIONES DE *Sclerotium rolfsii*
CAUSANTES DE PODREDUMBRE BLANCA EN
REMOLACHA AZUCARERA DE SIEMBRA
OTOÑAL EN REGIONES DE CLIMA DE TIPO
MEDITERRÁNEO**

V.1. RESUMEN

Sclerotium rolfsii causa severas epidemias en la remolacha azucarera de siembra otoñal en regiones de clima de tipo Mediterráneo, al coincidir en el espacio y en el tiempo el patógeno residente en el suelo, así como altas temperaturas y elevada humedad que favorecen su desarrollo en el último estadio del ciclo del cultivo. Este escenario lo encontramos principalmente en áreas de producción del centro de Chile y Portugal, y sur de España e Italia, donde el patógeno está ampliamente distribuido y donde no se han logrado implementar, hasta la hecha, medidas eficientes para combatir las epidemias causadas por *S. rolfsii* conocidas como Podredumbre blanca.

Una de las medidas de control utilizadas con cierto éxito para el manejo eficiente del cultivo de remolacha frente a la Podredumbre blanca es la rotación de cultivos. No obstante, para que dicha medida sea implantada de forma eficiente, se requiere un adecuado conocimiento de la estructura de las poblaciones locales del patógeno, incluyendo la variabilidad genética (Capítulos III y IV de esta Tesis Doctoral) y patogénica de las mismas. Desafortunadamente, esta información no está disponible en regiones de clima Mediterráneo por lo que el objetivo de esta investigación fue el de generar conocimiento acerca de la patogenicidad y virulencia de las poblaciones de *S. rolfsii* infectando remolacha azucarera de siembra otoñal en dichas regiones en un conjunto de 11 plantas huésped de interés agrícola para la zona.

Los resultados obtenidos demuestran que existe una elevada variabilidad patogénica entre los aislados representativos de los diferentes GCMs, así como en el grado de susceptibilidad entre las especies de plantas huésped evaluadas con una interacción significativa entre los grupos de GCMs x especies huésped. El análisis de agregación permitió seleccionar cinco grupos de GCMs y agrupar las especies huésped en el grupo-especies 1 (brócoli, garbanzo, girasol y tomate) y 2 (algodón, pimiento, remolacha azucarera y sandía). Los grupos-GCM 1 (GCMs i y ix), 2 (GCMs ii, iii, vi y viii) y 5 (x, xii) fueron moderadamente virulentos sobre el

grupo-especies 1 y ligeramente virulentos frente al grupo-especies 2. En cambio, los grupos-GCM 3 (GCMs iv, v y xi) y 4 (GCM vii) fueron ligeramente virulentos sobre ambos grupos de especies. De la misma forma, para el conjunto de los 12 GCMs, la reacción media de las diferentes especies de plantas huésped se estimó como: altamente susceptible (garbanzo y girasol), susceptible (algodón, pimiento, tomate y sandía), moderadamente resistente (brócoli, melón y remolacha azucarera) y resistente (maíz y trigo). Además, se ha constatado que entre los aislados de *S. rolfsii* pertenecientes a un mismo GCM, existe un bajo nivel de variabilidad patogénica, lo cual sugiere una correlación entre los componentes de un GCM y su capacidad patogénica y de virulencia.

El hecho de que los aislados de *S. rolfsii* de cualquiera de los GCMs identificados puedan causar diferentes niveles de mortalidad en las especies de plantas evaluadas, esto es, con perfiles diferentes de patogenicidad y virulencia, y que se haya descrito la ocurrencia de hasta tres GCMs en una misma parcela o localidad, determina que la rotación de cultivos no se pueda recomendar como única medida de control sin un estudio previo de la prevalencia de los GCMs del patógeno identificados en el área de cultivo.

V.2. INTRODUCCIÓN

Sclerotium rolfsii se encuentra ampliamente distribuido en los suelos agrícolas del Valle del Guadalquivir en Andalucía con clima de tipo Mediterráneo (AIMCRA, 2004). En Andalucía, las epidemias más severas causadas por el patógeno se dan en cultivos de remolacha azucarera de siembra otoñal ya que las condiciones climáticas en que se desarrolla el cultivo ofrecen un escenario óptimo para el desarrollo del hongo y de la enfermedad. Esto es debido a que en Andalucía, con el objetivo de evitar las altas temperaturas estivales y hacer coincidir los períodos de lluvia con las fases de desarrollo vegetativo del cultivo, la siembra de la remolacha

azucarera se adelanta a otoño, llevándose a cabo la recolección desde finales de mayo a julio, período este último, en el que coinciden altas temperaturas y elevada humedad como consecuencia de la aplicación de riegos al cultivo que favorecen la germinación de los esclerocios y el crecimiento micelial del hongo. Este mismo escenario ha sido descrito en países de la Cuenca Mediterránea como Italia (Gabellini & Cerato, 2004), Marruecos (Ezzahiri, 2004; Fidah, 1995) o Portugal (Paim, 2004), así como otras regiones del mundo que gozan de estas mismas condiciones climáticas como el sur de California (Schneider & Whitney, 1996) y Chile (Paillalef-Monnrاد, 2004). La relevancia de estas epidemias sobre la producción agrícola radica en que: (i) los rendimientos que se alcanzan en Andalucía para la remolacha azucarera de siembra otoñal suponen hasta el 40% de la producción total a nivel mundial; (ii) es la región donde el cultivo está más avanzado desde el punto de vista tecnológico y productivo; y (iii) no se han implementado, hasta la fecha, medidas eficientes para combatir las epidemias de Podredumbre blanca. Evaluaciones realizadas en Andalucía en 2004 determinaron que la Podredumbre blanca causaba pérdidas de rendimiento de entre el 5 y el 80% (AIMCRA, 2004). Del mismo modo, se han descrito pérdidas similares en cultivos del área central de Chile (Regiones VI y VII) (Paillalef-Monnrاد, 2004) y centro y sur de Portugal (Paim, 2004).

El establecimiento de medidas efectivas para el control de las enfermedades causadas por *S. rolfsii* presenta gran dificultad debido a su rápido y extenso desarrollo micelial, la persistencia en el suelo, la alta variabilidad genética de sus poblaciones y el amplio rango de especies huésped susceptibles que presenta. Tanto es así, que no se han podido desarrollar por el momento medidas eficientes para combatirlas. En remolacha azucarera no se conocen cultivares resistentes a *S. rolfsii* y el control de la enfermedad con fungicidas o agentes de biocontrol no ha tenido éxito (Lal et al., 1997). Se han descrito, no obstante, ciertos niveles de resistencia frente a *S. rolfsii* en otros cultivos como es el caso de caupí (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) (Fery & Dukes, 2002), alfalfa (Pratt & Rowe, 2002), cacahuete (Branch & Brenneman, 1999), pimiento y batata

(*Ipomoea batatas* L.) (Dukes et al., 1983), y garbanzo (Akram et al., 2008). Por otro lado, en ensayos llevados a cabo en California e India, se ha conseguido reducir eficientemente la densidad de inóculo del patógeno mediante la rotación de remolacha azucarera con cultivos moderadamente susceptibles a *S. rolfsii* tales como alfalfa, cebada (*Hordeum vulgare* L.), espárrago (*Asparagus officinalis* L.), maíz (*Zea mays* L.) o trigo (*Triticum aestivum* L.) (Schneider & Whitney, 1996). Esta misma estrategia ha sido efectiva en la rotación con otros cultivos susceptibles a *S. rolfsii* como la practicada en zanahoria con batata o trigo sarraceno (*Fagopyrum esculentum* Moench.) (Jenkins & Averre, 1986) o de cacahuete con hierba bahía (*Paspalum notatum* Flugge), algodón, maíz (Johnson et al., 1999) o trigo (Minton et al., 1991). En este sentido, un componente clave para el manejo de las enfermedades causadas por este patógeno mediante el uso de la resistencia del huésped y la rotación de cultivos en un área determinada, es el adecuado conocimiento de la diversidad genética y patogénica de las poblaciones locales de *S. rolfsii* asociadas a los diferentes cultivos.

En la actualidad, la rotación de cultivos es una de las medidas utilizadas para el control de la Podredumbre blanca en remolacha azucarera de siembra otoñal, siendo la rotación más recomendada la que incluye cereales, por ejemplo, maíz o trigo (AIMCRA, 2010). Sin embargo, no disponemos de información referente al rango de plantas huésped susceptibles que presentan las poblaciones de *S. rolfsii* de áreas de clima Mediterráneo y cuyo conocimiento, es esencial para recomendar cultivos alternativos adecuados y de interés económico que puedan entrar en rotación con la remolacha azucarera y que proporcionen un control efectivo de la enfermedad en el contexto de un manejo integrado del cultivo. Por otro lado, el área dedicada al cultivo de la remolacha azucarera está decreciendo a un ritmo constante durante los últimos años, principalmente en países de la Cuenca Mediterránea, Italia, Portugal y el sur de España. Dichas áreas, están siendo ocupadas por diferentes cultivos como alternativa para la producción agrícola, sin embargo, muchos de los suelos poseen historia del patógeno, el cual persiste en el suelo mediante la

formación de esclerocios, con lo que dichos cultivos pueden ser potencialmente afectados por *S. rolfsii* debido a su amplio rango de cultivos huésped.

Por todo ello, el objetivo de la presente investigación fue el estudio de la posible asociación entre los 12 grupos de compatibilidad micelial (GCMs) identificados entre las poblaciones de *S. rolfsii* infectando cultivos de remolacha azucarera de siembra otoñal determinados en el Capítulo III de esta Tesis Doctoral, y su patogenicidad y virulencia sobre un conjunto de plantas huésped de interés para la producción agrícola en regiones de clima Mediterráneo. Además, se evaluó el grado de variación patogénica entre aislados del patógeno pertenecientes a un mismo GCM sobre tres especies susceptibles seleccionadas.

V.3. MATERIAL Y MÉTODOS

V.3.1. Especies huésped

La patogenicidad y virulencia de aislados de *S. rolfsii* representativos de los 12 grupos de compatibilidad micelial (GCMs) identificados en el Capítulo III de esta Tesis Doctoral, se evaluó sobre 11 especies de plantas cultivadas correspondientes a ocho familias botánicas y que se detallan en la Tabla V.1. Las semillas de cada una de las especies se obtuvieron de diferentes casas comerciales. Estas especies vegetales fueron seleccionadas como representativas del amplio rango de especies huésped susceptibles que presenta *S. rolfsii* e incluyen especies mono- y dicotiledóneas que podrían ser alternativas a los cultivos de remolacha de siembra otoñal en las zonas de producción de regiones con clima de tipo Mediterráneo.

Tabla V.1: Relación de especies de plantas huésped evaluadas frente a la inoculación con aislados representativos de grupos de compatibilidad micelial de *Sclerotium rolfsii*.

Espece huésped	Nombre común	Variedad / Cultivar	Familia botánica
<i>Beta vulgaris</i> L.	Remolacha azucarera	subsp. vulgaris var. altissima cv. Markus	Amarantáceas
<i>Helianthus annuus</i> L.	Girasol	cv. SH-25	Asteráceas
<i>Brassica oleracea</i> L.	Brócoli	var. <i>italica</i> Plenck. cv. Romanesco	Brasicáceas
<i>Cucumis melo</i> L.	Melón	var. <i>cantalupensis</i> Naudin cv. Piel de sapo	Cucurbitáceas
<i>Citrullus lanatus</i> (Thunb.) Matsun. & Nakai.	Sandía	cv. Sugar baby	Cucurbitáceas
<i>Cicer arietinum</i> L.	Garbanzo	cv. P-2245	Fabáceas
<i>Gossypium hirsutum</i> L.	Algodón	cv. Theka	Malváceas
<i>Zea mays</i> L.	Maíz	cv. Girona	Poáceas
<i>Triticum aestivum</i> L.	Trigo	cv. Pinzón	Poáceas
<i>Capsicum annum</i> L.	Pimiento	cv. Cristal	Solanáceas
<i>Solanum lycopersicum</i> Mill.	Tomate	cv. Early-pack	Solanáceas

V.3.2. Diseño experimental

Se llevaron a cabo tres experimentos (I a III) en cámaras de crecimiento de ambiente parcialmente controlado. En los experimentos I y II se determinó la reacción de enfermedad de las 11 especies vegetales evaluadas frente a la inoculación con “aislados tipo” representativos de cada uno de los 12 GCMs identificados. Debido a la limitación de espacio en la cámara de crecimiento, en el experimento I se evaluaron seis especies frente a los 12 aislados tipo de los GCMs y en el experimento II las cinco especies restantes. Para corroborar la reproducibilidad de los resultados, girasol y tomate se seleccionaron como especies huésped comunes para ambos experimentos.

En el experimento III, se evaluaron un total de 23 aislados representativos de cinco de los GCMs más prevalentes identificados en la

presente Tesis Doctoral, representando al 5% del número total de aislados, con objeto de terminar la variabilidad entre aislados pertenecientes a un mismo GCM en patogenicidad y virulencia. Este grupo de aislados incluyó 12 aislados pertenecientes al GCM i, cuatro al GCM iii, tres al GCM v y dos aislados de cada uno de los GCMs vi y xii. En este experimento, girasol, tomate y sandía se seleccionaron como especies huésped en base a la consistencia de la reacción que mostraron frente a los “aislados tipo” de *S. rolfsii* en los experimentos previos I y II.

En los tres experimentos se dispusieron ocho repeticiones (ocho alveolos, una planta por alveolo) para cada combinación experimental de especie vegetal y aislado de *S. rolfsii* (Fig. V.1A). Cada experimento se repitió parcialmente. Los análisis preliminares indicaron que no existieron diferencias significativas ($P > 0,05$) entre los experimentos (ver apartado: “Homogeneidad de reacciones de patogenicidad entre experimentos”); de este modo, los análisis posteriores se llevaron a cabo usando el conjunto completo de datos.

Las semillas de cada una de las especies vegetales evaluadas se desinfectaron superficialmente en hipoclorito sódico (NaOCl) al 2% (v/v) durante 30 s y pre-germinaron en cámaras húmedas sobre capas de papel de filtro estéril incubadas a $25\pm 1^\circ\text{C}$ en oscuridad durante 2 días. Transcurrido este período, se seleccionaron semillas germinadas por su uniformidad en la longitud de la radícula (0,5-1 cm) y se trasplantaron a bandejas de plástico estériles de 24 alveolos de 230 cm^3 de capacidad conteniendo como sustrato una mezcla de suelo limo:turba (2:1) estéril tras dos ciclos de esterilización en autoclave en dos días consecutivos a 121°C durante 1 h.

V.3.3. Inóculo de *Sclerotium rolfii* y Condiciones para la inoculación y crecimiento de las plantas

El inóculo de *S. rolfii* utilizado para los experimentos consistió en semillas de avena (*Avena sativa* L.) colonizadas por micelio del hongo. Así, se dispusieron matraces Erlenmeyer de 1 l de capacidad conteniendo 100 g de semillas de avena humedecidas con 50 ml de agua desionizada que se esterilizaron en autoclave durante 60 min a 121°C (Fig. V.1B). Una vez estériles, las semillas se infestaron añadiendo 10 discos de micelio de 5 mm de diámetro tomados del extremo de colonias en crecimiento activo de cada uno de los aislados de *S. rolfii* desarrolladas en medio de cultivo Agar Patata Dextrosa (APD, Difco Laboratories, Detroit, EE.UU.), e incubadas durante 2 semanas a 25±1°C en oscuridad.

Las inoculaciones se llevaron a cabo seleccionando dos semillas de avena densamente colonizadas con micelio del aislado de *S. rolfii* correspondiente, que se colocaron a cada lado del tallo de cada plántula a 0,5 cm de distancia y 0,5 cm de profundidad en el momento en el que éstas presentaban el estadio de dos primeras hojas verdaderas. Se dispusieron plántulas manejadas en idénticas condiciones pero libres de inóculo, utilizando semillas esterilizadas no infestadas por el patógeno que sirvieron de control. Las plántulas se incubaron en cámaras de crecimiento de plantas ajustadas a 28±1°C, un fotoperiodo de 14 h de luz a 360 $\mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$ de intensidad y una humedad relativa del 60-90% durante 18 días. Las plantas se regaron según sus necesidades hídricas manteniendo el suelo próximo a su capacidad de campo en cada uno de los alveolos y se fertilizaron semanalmente con 100 ml de la solución “hydro-sol” al 0,1% (20-5-32 de N-P-K + micronutrientes, Haifa Chemicals, Ltd., Haifa, Israel).

V.3.4. Evaluación de la enfermedad y Análisis de datos

Las reacciones a la inoculación con los aislados de *S. rolfii* se caracterizaron por la incidencia de la enfermedad (IE), definida ésta por el número de plantas muertas al final de los experimentos trascurridos 18

días de la inoculación de las plántulas (Fig. V.1C). Para una mejor interpretación de los valores de IE, las reacciones inducidas por los aislados de *S. rolfsii* se clasificaron como: altamente virulentas ($IE \geq 66\%$), moderadamente virulentas ($66 > IE \geq 33\%$), poco virulentas ($33 > IE \geq 0\%$) y no patogénicas ($IE = 0\%$). De forma análoga, las reacciones mostradas por las diferentes especies huésped se clasificaron como: altamente susceptibles ($IE \geq 66\%$), susceptibles ($66 > IE \geq 33\%$), moderadamente resistentes ($33 > IE \geq 0\%$) y resistentes ($IE = 0\%$).

El número de plantas muertas para cada una de las combinaciones experimentales se analizó utilizando el módulo de modelos lineales generalizados (GENMOD) del paquete estadístico SAS (versión 9.1.3; SAS Institute, Cary, NC, EE.UU.) con una distribución binomial y función logit por el método de máxima verosimilitud (Agresti, 2002). Los valores medios de cada combinación experimental calculados mediante el método de mínimos cuadrados se utilizaron para la comparación de medias entre tratamientos utilizando el macro MULT de SAS (<https://www.uni-hohenheim.de/bioinformatik/beratung/toolsmacros/sasmacros/mult.sas>) (Piepho, 2004). Adicionalmente, se realizaron contrastes lineales de un grado de libertad para evaluar el efecto de las combinaciones de tratamientos experimentales de interés a $P < 0,05$. La homogeneidad de las reacciones de enfermedad para las diferentes combinaciones experimentales de aislados de *S. rolfsii* representativos de cada uno de los 12 GCMs y 11 especies huésped, se evaluó mediante análisis de agregación (cluster) para identificar las posibles asociaciones entre los componentes de cada uno de estos factores experimentales (i.e., GCMs y plantas huésped) en dos análisis independientes. Así, para la identificación de grupos de GCMs o especies huésped correlacionadas, se llevaron a cabo análisis de agregación basados en la matriz de correlación de Spearman entre GCMs y en el método de promedios de Ward entre especies de plantas huésped, respectivamente. El número óptimo de grupos funcionales de GCMs, se estimó en base al valor de silueta promedio (silhouette width) de acuerdo al estadístico de Mantel y que correspondió al número de agrupamientos (clusters) en el cual la

intensidad media dentro de los grupos para la agrupación de los objetos (GCMs) fuese mayor. Una vez determinado el número óptimo de grupos funcionales, se generó un nuevo dendrograma representando cada uno de los grupos de GCMs identificados (Borcard et al., 2011). Todos los cálculos para el análisis de agregación se realizaron utilizando el paquete estadístico R versión 2.13.0 (R Foundation for Statistical Computing, Viena, Austria, <http://www.R-project.org/>) con los módulos “cluster” (Maechler et al., 2005) y “vegan” (Oksanen et al., 2011).

El grado de variación en virulencia entre aislados de un mismo GCM de cada uno de los cinco GCMs evaluados en el experimento III se estimó asimismo utilizando el módulo GENMOD de SAS de acuerdo a lo descrito para los experimentos I y II, seguido de una comparación múltiple de los valores medios de incidencia de plantas muertas inducida por cada uno de los aislados de *S. rolfsii* evaluados en cada GCM. Además, el valor medio de IE inducida por el aislado tipo de cada GCM se comparó con la estimada para cada uno de los aislados evaluados en cada GCM mediante contrastes lineales de un grado de libertad a $P < 0,05$.

Homogeneidad de reacciones de patogenicidad entre experimentos

La consistencia de las reacciones obtenidas en los experimentos I y II se evaluó mediante análisis previos en los que el número de plantas muertas estimado para los tratamientos comunes en ambos experimentos (i.e., especies huésped girasol y tomate inoculadas con cada uno de los aislados representativos de los 12 GCMs) se analizaron utilizando el módulo GENMOD de SAS según lo descrito anteriormente. Dicho análisis indicó la ausencia de diferencias significativas entre los dos experimentos ($\chi^2 = 0,35$, $P = 0,5536$), así como de su interacción con los aislados representativos de GCMs ($\chi^2 = 9,22$, $P = 0,6017$), con las especies de planta huésped ($\chi^2 = 2,21$, $P = 0,1367$), o con ambos factores ($\chi^2 = 13,14$, $P = 0,2844$).

De forma similar, la homogeneidad de las reacciones obtenidas en los experimentos I, II y III se evaluaron en análisis previos en los que se siguió la misma metodología descrita utilizando el número de plantas muertas estimado para los tratamientos comunes en los tres experimentos (i.e., especies huésped girasol y tomate inoculadas con cada uno de los aislados representativos de los GCMs i, iii, v, vi y xii incluidos en el experimento III). Dicho análisis indicó la ausencia de diferencias significativas entre los tres experimentos ($\chi^2 = 0,27$, $P = 0,8740$), así como de su interacción con los aislados representativos de GCMs ($\chi^2 = 4,25$, $P = 0,8336$) ($\chi^2 = 4,25$, $P = 0,8336$), con las especies de planta huésped ($\chi^2 = 2,05$, $P = 0,3595$), o con ambos factores ($\chi^2 = 11,53$, $P = 0,1732$).

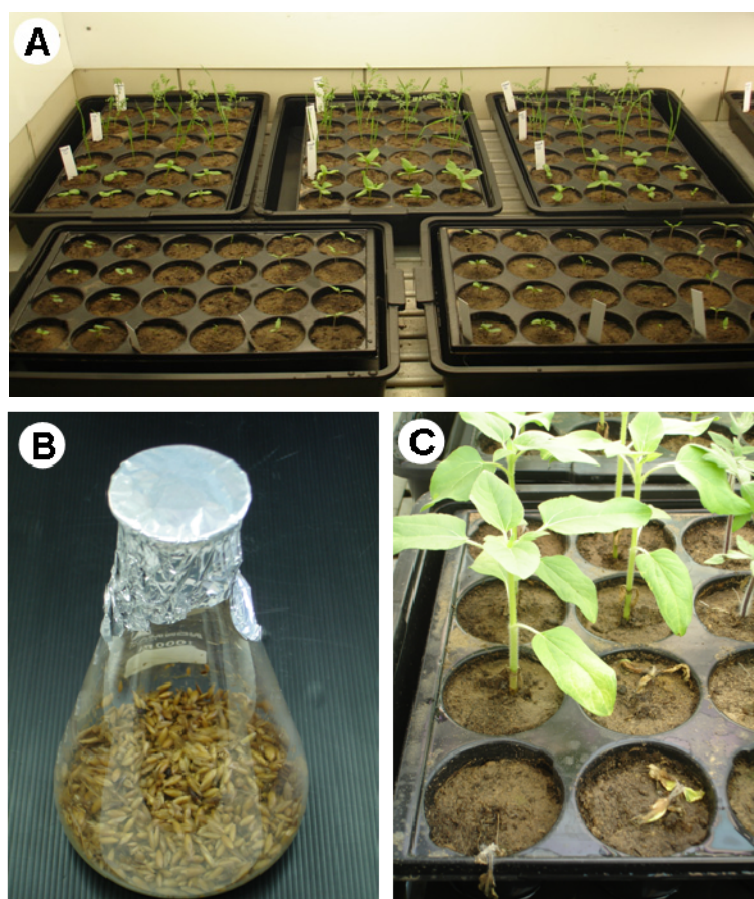


Figura V.1: Diseño experimental: **A**, plantas creciendo en cámaras de cultivo. Cada combinación experimental de aislado *Sclerotium rolfsii* y especie de planta huésped constó de 8 repeticiones (alveolos) con una planta por alveolo; **B**, matraz Erlenmeyer conteniendo 100 g de semillas de avena y 50 ml de agua desionizada tras ser esterilizado en autoclave a 121 °C durante 20 min.; y **C**, síntomas de Podredumbre blanca y muerte de plántulas en girasol causadas por *S. rolfsii*.

V.4. RESULTADOS

Los síntomas desarrollados en las plántulas inoculadas con aislados de *S. rolfsii* en las reacciones susceptibles consistieron en un amarilleamiento y flacidez de las hojas, seguido del colapso completo y posterior muerte de las plántulas. La mayor parte de la mortalidad ocurrió en los primeros 8 días tras la inoculación. Las plantas control no inoculadas con el patógeno no desarrollaron síntomas. En términos generales, los GCMs iii y vi presentaron el rango de plantas huésped más amplio ya que fueron patogénicos en todas las especies evaluadas excepto para las dos especies de monocotiledóneas (maíz y trigo) que fueron resistentes a los 12 GCMs. Los aislados correspondientes a los GCMs i, ii, vii, ix y x fueron patogénicos frente a ocho especies mientras que los aislados de los GCMs viii, xi y xii, y aquellos de los GCMs iv y v, causaron enfermedad en siete y seis especies, respectivamente (Fig. V.2A). Considerando las 11 especies huésped evaluadas, tres de ellas, garbanzo, sandía y pimiento, fueron susceptibles a los aislados representativos de los 12 GCMs, mientras que algodón y girasol lo fueron a 11 GCMs, tomate a 10, remolacha azucarera a nueve, brócoli a ocho y melón a seis GCMs (Fig. V.2B). Las plantas de melón, en particular, fueron resistentes a seis de los 12 GCMs y mostraron valores de IE bajos para el resto. Por esto, no se incluyeron en los análisis estadísticos. Estos valores de IE fueron del 12,5% frente a los aislados representativos de los GCMs iii, iv, v y vi, del 25% con los del GCM ii y 37,5% frente al aislado del GCM i.

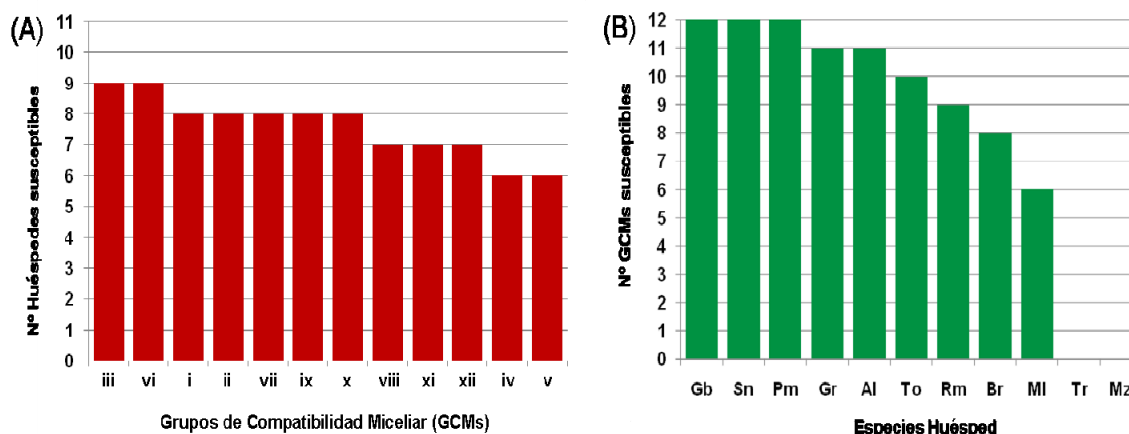


Figura V.2: Reacción de enfermedad de 11 especies huésped a la infección por 12 aislados representativos de grupos de compatibilidad miceliar (GCMs) de *Sclerotium rolfsii*: **A**, Número de especies huésped para las cuales cada GCMs es patogénico; y **B**, Número de GCMs que son patogénicos en cada una de las especies huésped. Especies huésped: Al=algodón, Br=brócoli, Gb=garbanzo, Gr=girasol, MI=melón, Mz=maíz, Pm=pimiento, Rm=remolacha azucarera, Sn=sandía, To=tomate y Tr=trigo.

Los análisis de varianza para datos binomiales de la IE, estimada como el número de plantas muertas por cada uno de los 12 aislados representativos de GCMs en las restantes ocho especies huésped, indicaron un efecto significativo del GCM ($\chi^2 = 33,37$, $P = 0,0005$), especies huésped ($\chi^2 = 68,04$, $P < 0,0001$) y la interacción GCM x especies huésped ($\chi^2 = 104,17$, $P < 0,0213$) (*datos no mostrados*). Para el análisis de la interacción GCMs x especies huésped, en primer lugar se identificaron los grupos funcionales entre los 12 GCMs mediante el análisis de gráficos de silueta que identificó cinco grupos y que incluyeron: grupo-GCMs 1: GCMs i y ix; grupo-GCMs 2: GCMs ii, iii, vi y viii; grupo-GCMs 3: GCMs iv, v y xi; grupo-GCMs 4: GCM vii; y grupo-GCMs 5: GCMs x y xii (Fig. V.3A).

Del mismo modo, el análisis de agregación permitió agrupar las ocho especies huésped en dos grupos de acuerdo a los clusters de primer orden identificados en el análisis, y que incluyeron: grupo-especies 1: brócoli, garbanzo, girasol y tomate; grupo-especies 2: algodón, pimiento, remolacha azucarera y sandía (Fig. V.3B). Una vez identificados los grupos funcionales de GCMs y especies huésped, se llevó a cabo un nuevo análisis de máxima verosimilitud utilizando los grupos de GCMs y de especies huésped como variables independientes. Dichos análisis

mostraron un efecto significativo de ambos factores en la IE ($P \leq 0,0495$) así como de su interacción ($P = 0,0012$) (Tabla V.2). Dicha interacción fue debida a la mayor IE ($P \leq 0,0319$) inducida por los aislados incluidos en los grupos-GCM 1, 2 y 5 en el grupo-especies 1 comparado con el inducido en el grupo-especies 2, mientras que los grupos-GMC 3 y 4 indujeron valores similares de IE ($P \geq 0,0902$) en ambos grupos (Tabla V.2).

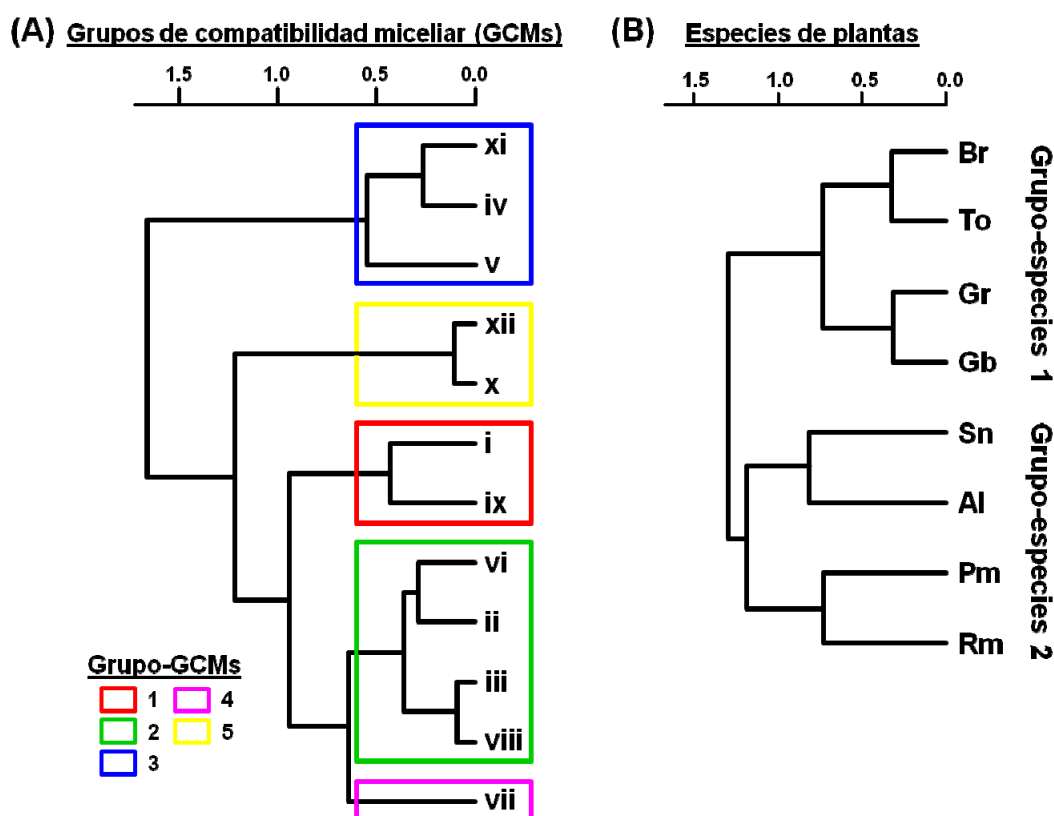


Figura V.3: Dendrograma mostrando los resultados del análisis de agregación para las reacciones de enfermedad tras la infección de los 12 aislados representativos de los grupos de compatibilidad micelial (GCMs) de *Sclerotium rolfsii* (A) sobre ocho especies huésped (B). Se llevó a cabo un análisis de agrupación jerárquica basado en la matriz de correlación de Spearman entre GCMs o entre especies huésped, respectivamente utilizando el método de Ward. Los grupos funcionales de GCMs se estimaron en base al valor gráfico de silueta de acuerdo al estadístico de Mantel. Especies huésped: Al=algodón, Br=brócoli, Gb=garbanzo, Gr=girasol, Pm=pimiento, Rm=remolacha azucarera, Sn=sandía, y To=tomate.

Tabla V.2. Estadísticos del análisis de máxima verosimilitud del efecto de grupos de grupos de compatibilidad miceliar (grupos-GCMs) de *Sclerotium rolfsii* en la incidencia de Podredumbre blanca en grupos de especies huésped (grupos-especies).

Fuente de variación ^a	g.l.	Chi-cuadrado	P > Chi-cuadrado
Grupos-GCMs	4	22,36	0,0002
Grupos-especies	1	3,86	0,0495
Grupos-GCMs*Grupos-especies	4	18,07	0,0012
<i>Contrastes</i>			
Grupo-GCMs 1: Grupo-especies 1 vs. 2	1	13,53	0,0002
Grupo-GCMs 2: Grupo-especies 1 vs. 2	1	4,60	0,0319
Grupo-GCMs 3: Grupo-especies 1 vs. 2	1	2,87	0,0902
Grupo-GCMs 4: Grupo-especies 1 vs. 2	1	0,24	0,6249
Grupo-GCMs 5: Grupo-especies 1 vs. 2	1	4,70	0,0301

^a Los grupos-GCMs incluyeron: grupo-GCM 1: GCMs i y ix; grupo-GCM 2: GCMs ii, iii, vi y viii; grupo-GCM 3: GCMs iv, v y xi; grupo-GCM 4: GCM vii; y grupo-GCM 5: GCMs x y xii. Los grupos-especies incluyeron: grupo-especies 1: brócoli, garbanzo, girasol y tomate; grupo-especies 2: algodón, pimienta, remolacha azucarera y sandía.

Posteriormente, se realizó un análisis para cada uno de los grupos de especies por separado, en los que se evaluó el efecto de los grupos-GCMs sobre las especies huésped incluidas en cada uno de los grupos-especies 1 y 2. Los resultados indicaron una interacción grupo-GCMs x especies huésped no significativa ($P \geq 0,05$) para cualesquiera de los dos grupos-especies (Tabla V.3). Globalmente, para el grupo-especies 1 la IE estuvo influida significativamente ($P < 0,0001$) tanto por los grupos-GCM como por las especies huésped, aunque no hubo interacción significativa entre ambos factores ($P = 0,2026$) (Tabla V.3). La IE fue mayor ($P < 0,05$) para los aislados de los grupos-GCMs 1, 2 y 5, que fueron moderadamente virulentos, y disminuyó significativamente ($P < 0,05$) para los grupos-GCMs 3 y 4 que fueron poco virulentos (Fig. V.4A). Entre las plantas huésped, la IE fue mayor ($P < 0,05$) en garbanzo, que mostró una reacción altamente

susceptible, y decreció significativamente ($P < 0,05$) en girasol, que mostró una reacción susceptible. Por otro lado, la menor IE ($P < 0,05$) se produjo en tomate y brócoli, que mostraron una reacción moderadamente resistente sin que existiesen diferencias significativas entre ambas especies ($P \geq 0,05$) (Fig. V.4A). No existieron diferencias significativas ($P = 0,0681$) entre los grupos-GCMs para el grupo-especies 2 (Tabla V.3; Fig. V.4B). Entre las cuatro especies del grupo-especies 2, la IE fue mayor ($P < 0,05$) en algodón y pimiento, que mostraron una reacción susceptible, y disminuyó significativamente ($P < 0,05$) a una reacción moderadamente susceptible en remolacha azucarera. La IE en plantas de sandía fue intermedia a la estimada en las tres especies restantes incluidas en el grupo-especies 2 y no mostró diferencias significativas ($P \geq 0,05$) respecto a ellas (Fig. V.4B). Finalmente, la reacción inducida por los aislados de los GCMs incluidos en cada uno de los cuatro grupos-GCM con más de un GCM (i.e., grupos-GCM 1, 2, 3 y 5) en los grupos-especies 1 y 2 fue bastante homogénea ($P \geq 0,0566$), lo que apoya la consistencia de los cinco grupos-GCM identificados en el análisis de agregación (Tabla V.3).

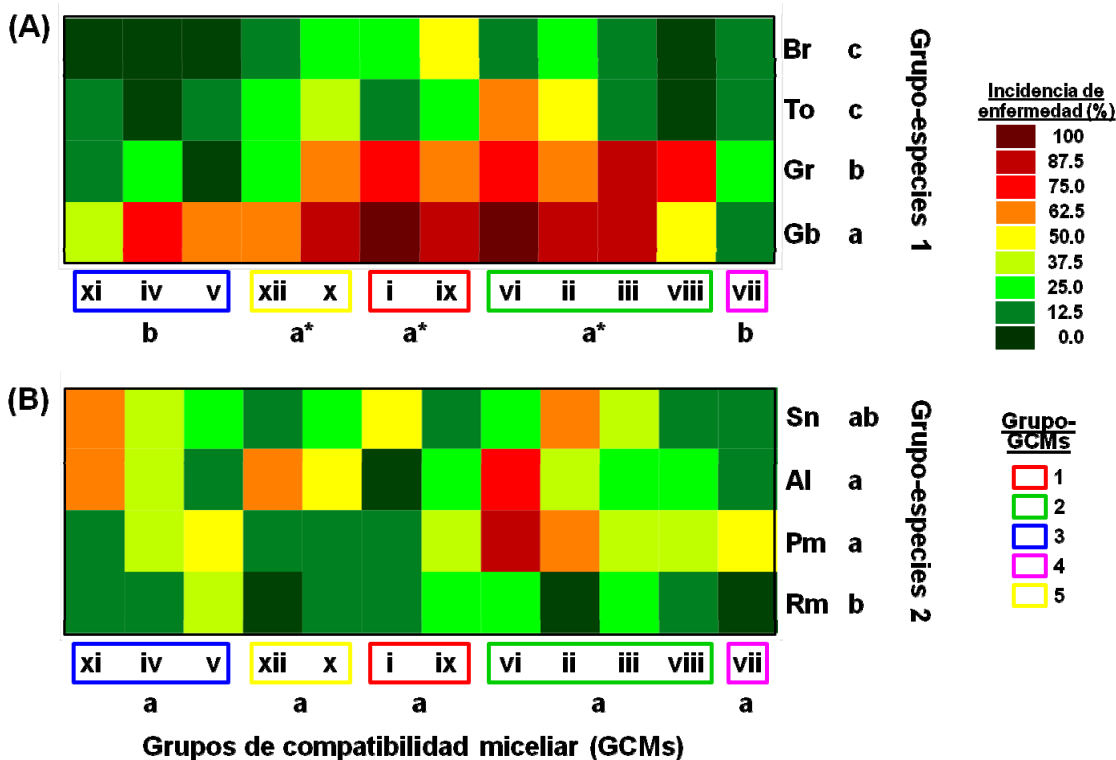


Figura V.4: Gráfico de doble entrada que muestra el resultado de los análisis de máxima verisimilitud para las reacciones de enfermedad tras la infección de los 12 aislados representativos de los grupos de compatibilidad miceliar (GCMs) de *Sclerotium rolfsii* agrupados en cinco grupos-GCM (eje-x) sobre ocho especies huésped (eje-y) agrupadas en los grupos-especie 1 (A) y 2 (B). Los grupos funcionales de GCMs se estimaron en base al valor gráficos de silueta de acuerdo al estadístico de Mantel. Especies huésped: Al=algodón, Br=brócoli, Gb=garbanzo, Gr=girasol, Pm=pimiento, Rm=remolacha azucarera, Sn=sandía, y To=tomate. Para cada grupo-especie, grupos-GCM o especies huésped seguidos de una letra diferente, se indica diferencias significativas ($P < 0,05$) en los valores medios de incidencia de enfermedad. Grupos-GCM con un asterisco indica una incidencia de enfermedad significativamente superior ($P < 0,05$) de dicho grupo-GCM en el grupo-especie 1 comparada con la alcanzada en el grupo-especie 2.

Tabla V.3. Estadísticos del análisis de máxima verosimilitud del efecto de grupos de grupos de compatibilidad miceliar (grupos-GCM) de *Sclerotium rolfsii* en la incidencia de Podredumbre blanca en dos grupos de especies huésped (grupos-especies).

Grupo-GCMs	Fuente de variación ^a	g.l.	Grupo-especies 1		Grupo-especies 2	
			Chi-cuadrado	P > Chi-cuadrado	Chi-cuadrado	P > Chi-cuadrado
Global	Grupo-GCMs (A)	4	33,30	<0,0001	8,73	0,0681
	Especies (B)	3	27,03	<0,0001	8,41	0,0382
	A*B	12	15,76	0,2026	17,91	0,1184
1	Grupo-GCMs (A)	1	0,05	0,8280	0,49	0,4818
	Especies (B)	3	22,28	<0,0001	0,93	0,8186
	A*B	3	1,77	0,6207	5,48	0,1398
2	Grupo-GCMs (A)	3	6,56	0,0874	6,88	0,0759
	Especies (B)	3	46,34	<0,0001	12,05	0,0072
	A*B	9	9,41	0,3999	9,93	0,3565
3	Grupo-GCMs (A)	2	0,29	0,8650	0,09	0,9571
	Especies (B)	3	21,41	<0,0001	2,69	0,4412
	A*B	6	2,36	0,8840	11,38	0,0773
4	Especies	3	0,66	0,8837	5,41	0,1439
5	Grupo-GCMs (A)	1	3,63	0,0566	0,15	0,7025
	Especies (B)	3	12,43	0,0060	11,56	0,0090
	A*B	3	0,54	0,9107	0,83	0,8417

^a Los grupos-GCM incluyeron: grupo-GCM 1: GCM i y ix; grupo-GCM 2: GCMs ii, iii, vi y viii; grupo-GCM 3: iv, v, xi; grupo-GCM 4: MCG vii; y grupo-GCM 5: GCMs x y xii. Los grupos-especies incluyeron: grupo-especies 1: brócoli, garbanzo, girasol y tomate; grupo-especies 2: algodón, pimiento, remolacha azucarera y sandía.

Variabilidad patogénica intra-GCM

Los aislados de *S. rolfsii* pertenecientes a un mismo GCM evaluados en el experimento III mostraron pequeñas diferencias en la reacción frente a las tres especies huésped evaluadas (i.e., girasol, sandía y tomate) (Fig. V.5). Así, el análisis máxima verosimilitud mostró diferencias no significativas ($P \geq 0,5350$) entre los aislados de *S. rolfsii* pertenecientes a cada uno de los GCM iii, v, vi o xii (Tabla V.4). Más aún, no existieron diferencias significativas ($P \geq 0,05$) entre la reacción inducida por los aislados incluidos en cada uno de estos cuatro GCMs y el aislado tipo de *S. rolfsii* de cada uno de dichos GCMs utilizados en los experimentos I y II. La única excepción la constituyeron los aislados incluidos en el GCM i que mostraron diferencias significativas entre ellos ($P < 0,0001$) (Tabla V.4, Fig. V.5). En cualquier caso, de los 12 aislados del GCM i evaluados solo la reacción del aislado Sr-033 difirió significativamente ($P = 0,0068$) de la inducida por el aislado tipo Sr-078 (Fig. V.5). La comparación de la reacción inducida por este aislado Sr-033 y aquella del resto de aislados evaluados en este GCM i indicó que dicho aislado mostró una reacción de mayor virulencia frente a cualesquiera de las tres especies huésped evaluadas (Fig. V.5). Finalmente, para los cinco GCMs evaluados, no existieron diferencias significativas ($P \geq 0,4638$) para la interacción aislado x especie huésped (Tabla V.4).

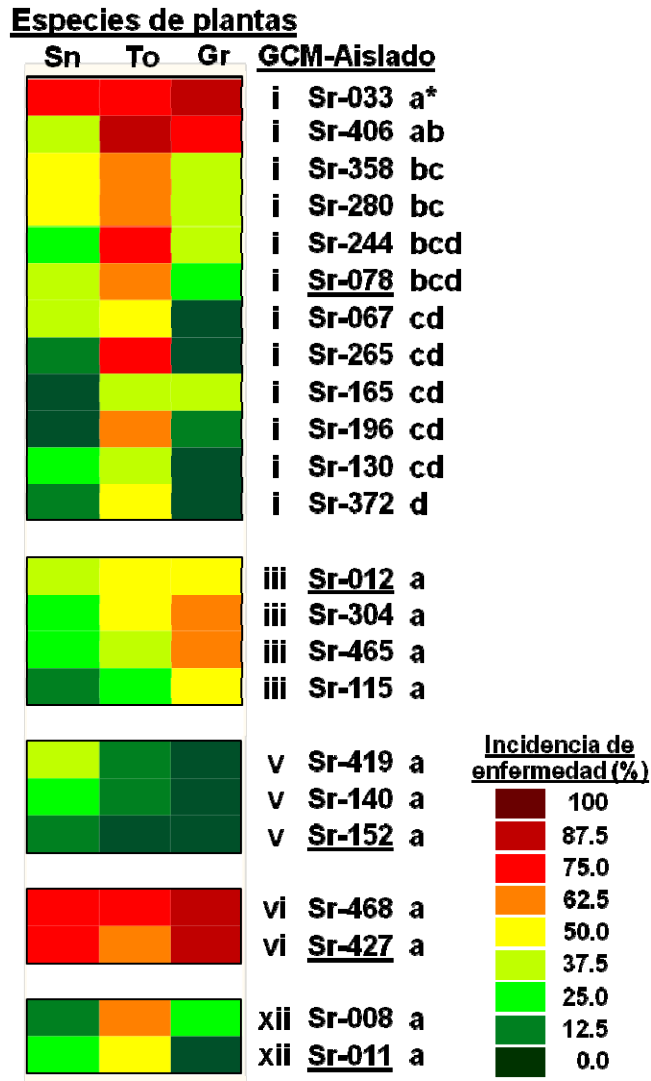


Figura V.5: Gráfico de doble entrada que muestra el resultado de los análisis de máxima verisimilitud para las reacciones de enfermedad de plantas de girasol (Gr), sandía (Sn) y tomate (To) (eje-x) a la infección de 23 aislados de *Sclerotium rolfsii* representativos de cinco de los grupos de compatibilidad micelial (GCMs) (eje-y) de *Sclerotium rolfsii* más prevalentes identificados en esta Tesis Doctoral. Los aislados evaluados incluyeron 12 pertenecientes al GCM i, cuatro al GCM iii, tres al GCM v y dos aislados de cada uno de los GCMs vi y xii. Los aislados subrayados corresponden al aislado tipo de cada GCM empleado en los experimentos I y II. Para cada GCM, los aislados seguidos por una letra diferente indican diferencias significativas entre ellos en los valores de incidencia de enfermedad ($P < 0,05$). Los aislados seguidos de un asterisco mostraron diferencias significativas con respecto al aislado tipo ($P < 0,05$).

Tabla V.4. Estadísticos del análisis de máxima verosimilitud del efecto de variabilidad patogénica entre aislados de *Sclerotium rolfii* pertenecientes a diferentes grupos de compatibilidad miceliar (GCMs).

GCM	Fuente de variación ^a	g.l.	Chi-cuadrado	P > Chi-cuadrado
GCM i	Aislado (A)	11	41,83	<0,0001
	Especies (B)	2	28,42	<0,0001
	A*B	22	20,64	0,5431
GCM iii	Aislado (A)	3	2,18	0,5350
	Especies (B)	2	6,93	0,0312
	A*B	6	1,32	0,9708
GCM v	Aislado (A)	2	0,57	0,7522
	Especies (B)	2	2,99	0,2246
	A*B	4	0,41	0,9819
GCM vi	Aislado (A)	1	0,07	0,7889
	Especies (B)	2	1,68	0,4307
	A*B	2	0,17	0,9185
GCM xii	Aislado (A)	1	0,30	0,5864
	Especies (B)	2	8,10	0,0174
	A*B	2	1,54	0,4638

^a Los aislados evaluados incluyeron 12 aislados pertenecientes al GCM i, cuatro aislados al GCM iii, tres aislados al CGM v, y dos aislados de cada uno de los GCM vi y GCM xii. Las especies huésped evaluadas incluyeron girasol, sandía y tomate.

V.5. DISCUSIÓN

La caracterización patogénica de aislados de *S. rolfsii* procedentes de diferentes regiones agrícolas, puede ofrecer importantes avances en el conocimiento de la epidemiología y el manejo de las enfermedades que causan. En esta investigación, la estructura de las poblaciones de *S. rolfsii* procedentes de un único huésped (remolacha azucarera de siembra otoñal) y áreas de la Península Ibérica (España y Portugal), Chile e Italia, que comparten las mismas condiciones climáticas de tipo Mediterráneo, fue caracterizada para completar el estudio de diversidad genética y molecular realizado en los Capítulos III y IV de esta Tesis Doctoral, mediante el análisis de su diversidad en patogenicidad y virulencia sobre 11 cultivos agrícolas de importancia económica en dichas áreas.

En líneas generales, los resultados obtenidos demuestran que existe una elevada variabilidad patogénica entre los aislados representativos de los diferentes GCMs, así como en el grado de susceptibilidad entre las especies huésped evaluadas. En conjunto, los GCMs ii y vi se mostraron altamente virulentos, los GCMs i, iii, ix y x moderadamente virulentos y los GCMs iv, v, vii, viii, xi y xii poco virulentos. No obstante, este grado de virulencia no estuvo relacionado de forma directa con el espectro patogénico de cada uno de los GCMs.

Los resultados también mostraron un bajo nivel de variabilidad patogénica entre aislados de *S. rolfsii* pertenecientes a un mismo GCM. En este sentido, para cinco de los 12 GCMs de *S. rolfsii* identificados en la presente Tesis Doctoral, se encontró un alto nivel de similitud entre los aislados pertenecientes a cada uno de dichos grupos en cuanto a las reacciones de enfermedad causadas sobre las tres especies huésped evaluadas. Únicamente, uno de los 12 aislados estudiados del GCM i mostró diferencias significativas respecto al aislado tipo, debido al mayor nivel de virulencia que mostró este aislado (Sr-033) para las tres especies huésped evaluadas comparada con la que indujeron el resto de aislados pertenecientes al GCM i (Fig. V.5). De este modo, se pudo concluir que existen claras diferencias en virulencia entre los diferentes aislados de *S.*

rolfsii, las cuales, pueden asociarse con la diversidad genética de los mismos determinada por los GCMs en los que se agrupan. Además, esta variabilidad se evaluó en parcelas intensamente muestreadas en Andalucía. De acuerdo a nuestro conocimiento, esta investigación supone el primer estudio que aúna la caracterización genética y patogénica en el estudio de poblaciones de *S. rolfisii*.

Entre las especies vegetales evaluadas y para el conjunto de aislados de *S. rolfisii* estudiados, garbanzo y girasol se mostraron altamente susceptibles, pimiento, algodón y tomate moderadamente susceptibles, brócoli y remolacha azucarera ligeramente resistentes, y maíz y trigo resistentes. En investigaciones similares, la variabilidad en la susceptibilidad mostrada por diferentes especies huésped se ha determinado frente a aislados de *S. rolfisii* que habían sido incluidos en GCMs. Así, Yaqub y Shahzad (2005) estudiaron la variabilidad en la respuesta de enfermedad de especies huésped inducida por aislados de *S. rolfisii* procedentes de cultivos de remolacha azucarera de Pakistán, encontrando que girasol, judía (*Phaseolus vulgaris* L.) y remolacha azucarera eran altamente susceptibles, calabaza (*Cucurbita pepo* L.), col (*Brassica oleraceae* L. var. *capitata*), lenteja (*Lens culinaris* Medik.) y tomate ligeramente susceptibles y coliflor (*Brassica oleraceae* L. var. *botrytis*) resistente. Del mismo modo, Flores-Moctezuma et al. (2006) evaluaron la reacción de 12 especies huésped frente a un conjunto de 20 aislados de *S. rolfisii* procedentes de diferentes áreas ecológicas y agrícolas de México que, sin embargo, no fueron caracterizados a nivel de GCM, encontrando que calabaza, lenteja, tomate, tomatillo verde (*Physalis ixocarpa* Brot.) y rábano (*Raphanus sativus* L.) eran susceptibles a todos los aislados, mientras que el nivel de susceptibilidad del resto de las siete especies varió ampliamente en función del aislado del patógeno. Considerando la variedad de remolacha azucarera evaluada en la presente investigación (cv. Markus), los resultados indican que fue susceptible, moderadamente susceptible y resistente a los aislados de uno, ocho y tres GCMs, respectivamente. Resultados similares encontraron Sharma et al. (1991), los cuales, a partir de cinco aislados de *S. rolfisii* obtenidos de

diferentes áreas de cultivo de remolacha azucarera del noroeste de India, identificaron un único aislado altamente virulento sobre este huésped en condiciones de inoculaciones artificiales.

Los resultados obtenidos en este Capítulo de la Tesis Doctoral tienen importantes implicaciones para el manejo de la Podredumbre blanca de la remolacha azucarera en regiones de clima de tipo Mediterráneo, en particular, para la utilización de la rotación de cultivos como medida eficiente para su control, al proporcionar una herramienta válida para la selección de aquellos cultivos más apropiados, en función de su espectro de susceptibilidad, a las poblaciones de *S. rolfsii* prevalentes en las áreas de cultivo en las que vayan a ser implantados. La rotación de cultivos es esencial para mantener la productividad de los suelos agrícolas ya que contribuye a la reducción en el desarrollo de los organismos fitopatógenos de suelo y, por tanto, a la reducción de la severidad y efectos perjudiciales de las enfermedades que causan, las cuales, pueden devastar extensas áreas de cultivo si se mantienen en monocultivo con especies susceptibles a éstos (Cook, 2000). En general, el nivel de eficacia de esta medida de control está condicionado por el nivel de susceptibilidad de los cultivos que se suceden en la rotación. En la presente investigación, las especies monocotiledóneas evaluadas, maíz y trigo, fueron resistentes a todos los GCMs estudiados, siendo, por tanto, las más apropiadas para la rotación con otros cultivos. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Boyle (1967), quien describió una reducción en la incidencia de la podredumbre causada por *S. rolfsii* en cultivos de cacahuete cuando entraban en rotación con monocotiledóneas, así como con los de Minton et al. (1991) quienes encontraron menor incidencia de enfermedad en la rotación trigo-cacahuete que en la que incluyó el barbecho. Del mismo modo, Johnson et al. (1999) observaron la menor incidencia de enfermedad en cacahuete tras dos años de rotación con hierba bahía, mientras que dicha incidencia fue intermedia con algodón o maíz. Por el contrario, los mayores valores de incidencia se produjeron con monocultivo de cacahuete. No obstante, los resultados de nuestra investigación también sugieren que los aislados de *S. rolfsii* de cualquiera de los GCMs

identificados serían capaces de causar diferentes niveles de mortalidad de plantas en al menos seis de las nueve especies huésped que fueron susceptibles. Esto, junto con el hecho ya descrito en el Capítulo III de esta Tesis Doctoral, de la ocurrencia de hasta tres GCMs en una misma parcela o localidad, con perfiles diferentes de patogenicidad y virulencia, determina que la rotación de cultivos no se pueda recomendar como única medida de control. Sería necesario, por tanto, evaluar el riesgo de que ocurran epidemias severas sobre un determinado cultivo en base a la prevalencia de los GCMs del patógeno identificados en el área de cultivo. En el sur de España y Portugal esta recomendación es esencial para el control eficiente de *S. rolfsii* ya que el área de producción de la remolacha azucarera está siendo drásticamente reducida o prácticamente eliminada, respectivamente, y en donde otros cultivos hortícolas tales como zanahoria, tomate, pimiento, etc., se están convirtiendo en cultivos alternativos. En consecuencia, las enfermedades causadas por *S. rolfsii* son un importante riesgo para la producción agrícola de cultivos hortícolas que se están mostrando como alternativos en las áreas mencionadas. Este hecho ha sido demostrado recientemente en el sur de España donde se ha descrito por primera vez la ocurrencia de epidemias severas causadas por *S. rolfsii* en pimiento (Remesal et al. 2010).

V.6. LITERATURA CITADA

Agresti, A. 2002. Categorical Data Analysis, 2ª ed. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, E.E.U.U. 710 pp.

AIMCRA, 2004. Memoria de los trabajos efectuados en la campaña 2003/04. Siembra otoño 2002 Zona Sur. Valladolid, España: AIMCRA.

- AIMCRA, 2010. Memoria de los trabajos efectuados en la campaña 2009/10. Siembra otoño 2009 Zona Sur. Valladolid, España: AIMCRA.
- Akram, A., Iqbal, S. M., Rauf, C. A., Aleem, R. 2008. Detection of resistant sources for collar rot disease in chickpea germoplasm. *Pakistan Journal of Botany* 40: 2211-2215.
- Borcard, D., Gillet, F., Legendre, P. 2011. *Numerical Ecology with R*. Springer-Verlag. Springer, New York, NY, E.E.U.U. 306 pp.
- Boyle, L. W. 1967. A factorial study of certain schemes of peanut culture. *University of Georgia Agriculture Experimental Station Research Bulletin* 18: 11-12.
- Branch, W. D., Brenneman, T. B. 1999. Stem rot disease evaluation of mass-selected peanut populations. *Crop Protection* 18: 127-130.
- Cook, R. J. 2000. Advances in plant health management in the twentieth century. *Annual Review of Phytopathology* 38: 95-116.
- Dukes, P. D., Ferry, R. L., Jones, A. 1983. Evaluating peppers, cowpeas, sweet potato, and tomatoes for resistance to southern blight incited by *Sclerotium rolfsii* Sacc. *Phytopathology* 73: 785-786.
- Ezzahiri, B. 2004. Situation de la pourriture à *Sclerotium* de la betterave à sucre au Maroc and Bilan des travaux de recherche. *International Workshop on Sclerotium rolfsii in sugar beet crops*. Córdoba, España.
- Ferry, R. L., Dukes, P. D. 2002. Southern blight (*Sclerotium rolfsii* Sacc.) of cowpea: yield-loss estimates and sources of resistance. *Crop Protection* 21: 403-408.
- Fidah, A. 1995. La pourriture de la betterave à sucre due à *Sclerotium rolfsii* dans le doukkala: épidémiologie et essais de lutte. Thèse de troisième cycle. Marrakech: Faculté des Science Semlelia. 122 pp.
- Flores-Moctezuma, H. E., Montes-Belmont, R., Jiménez-Pérez, A., Nava-Juárez R. 2006. Pathogenic diversity of *Sclerotium rolfsii* isolates

- from Mexico, and potential control of southern blight through solarization and organic amendments. *Crop Protection* 25: 195-201.
- Gabellini, E., Cerato, C. 2004. *Sclerotium rolfsii* in sugar beet crop. A general overview on Italy. International Workshop on *Sclerotium rolfsii* in sugar beet crops. Córdoba, España.
- Jenkins, S. F., Averre, C. W. 1986. Problems and progress in integrated control of southern blight of vegetables. *Plant Disease* 70: 614-619.
- Johnson, A. W., Minton, N. A., Brenneman, T. B., Burton, G. W., Culbreath, A. K., Gascho, G. J., Baker, S. H. 1999. Bahiagrass, corn, cotton rotations, and pesticides for managing nematodes, diseases, and insects on peanut. *Journal of Nematology* 31: 191-200.
- Lal, R. J., Srivastava, S. N., Agnihotri, V. P. 1997. Epidemiology and management of *Sclerotium* root rot of sugar beet: A threatening malady, pp. 161-178. En: Management of Threatening Plant Diseases of National Importance. V. P. Agnihotri, A. K. Sarbhoy, D. V. Singh. Malthora Publishing House, New Delhi, India.
- Maechler, M., Rousseeuw, P., Struyf, A., Hubert, M. 2005. Cluster analysis: basics and extensions: an R library (<http://cran.r-project.org/web/packages/cluster/>).
- Minton, N. A., Csinos, A. S., Lynch, R. E., Brenneman, T. B. 1991. Effects of two cropping and two tillage systems and pesticides on peanut pest management. *Peanut Science* 18: 41-46.
- Oksanen, J., Guillaume Blanchet, F., Kindt, R., Legendre, P., O'Hara, R. B., Simpson, G. L., Solymos, P., Stevens, H. H., Wagner, H. 2011. vegan: community ecology package. R package ver. 1.17-11. (<http://vegan.r-forge.r-project.org/>).
- Pailalef-Monnrad, R. 2004. *Sclerotium rolfsii* in sugar beet crops: Situation and studies in Chile. International Workshop on *Sclerotium rolfsii* in sugar beet crops. Córdoba, España.

- Paim, M. 2004. *Sclerotium rolfsii* in sugar beet crops in Portugal. International Workshop on *Sclerotium rolfsii* in sugar beet crops. Córdoba, España.
- Piepho, H. P. 2004. An algorithm for a letter-based representation of all-pairwise comparisons. *Journal of Computational and Graphical Statistics* 13: 456-466.
- Pratt, R. G., Rowe, D. E. 2002. Enhanced resistance to *Sclerotium rolfsii* in populations of alfalfa selected for quantitative resistance to *Sclerotinia trifoliorum*. *Phytopathology* 92: 204-209.
- Remesal, E., Lucena, C., Azpilicueta, A., Landa, B. B., Navas-Cortes, J. A. 2010. First report of Southern blight of pepper caused by *Sclerotium rolfsii* in Southern Spain. *Plant disease* 94: 280.
- Schneider, C. L., Whitney, E. D. 1996. *Sclerotium* root rot. En: *Compendium of Beet Diseases and Insects*, pp. 22-23. E. D. Whitney, J. E. Duffus. APS Press, St. Paul, MN, E.E.U.U.
- Sharma, B. S., Pathak, V. N., Bhatnagar, K. 1991. Morphological, cultural and pathogenic variations in *Sclerotium rolfsii* Sacc. causing root rot of sugarbeet. *Cryptogamie Mycologie* 12: 71-79.
- Yaqub, F., Shahzad, S. 2005. Pathogenicity of *Sclerotium rolfsii* on different crops and effect of inoculum density on colonization of mungbean and sunflower roots. *Pakistan Journal of Botany* 37: 175-180.

CAPÍTULO VI

DISCUSIÓN GENERAL Y CONCLUSIONES

VI.1. DISCUSIÓN GENERAL

Las enfermedades constituyen un importante factor reductor del rendimiento alcanzable de los cultivos agrícolas sobre los que inciden. Entre aquellas, las causadas por hongos de suelo son de las de más difícil manejo. La Fitopatología como ciencia, persigue reducir en lo posible las pérdidas económicas que ocasionan dichas enfermedades y, con este objetivo, establece que es necesario un adecuado conocimiento de la biología de los agentes fitopatógenos y de la epidemiología de las enfermedades que causan para poder diseñar medidas y estrategias de control adecuadas y eficientes (Jiménez-Díaz et al. 2003).

Las epidemias causadas por el hongo de suelo *Sclerotium rolfsii* ofrecen un escenario complejo para su manejo debido principalmente a la amplia distribución geográfica y la amplia gama de cultivos susceptibles que presenta el patógeno, así como a la elevada persistencia de éste en el suelo mediante estructuras especializadas para la supervivencia (esclerocios) (Aycock, 1966; Punja, 1985). Los estudios llevados a cabo en los últimos años en *S. rolfsii* han puesto de manifiesto que la manera de abordar las enfermedades que causa este patógeno sobre los cultivos agrícolas a los que afecta, ha sido insuficiente a la hora de establecer medidas eficientes para su manejo. En este sentido, es esencial un mayor conocimiento de cada escenario particular incidiendo en el huésped y la estructura de las poblaciones del hongo presentes.

En remolacha azucarera de siembra otoñal, *S. rolfsii* causa epidemias especialmente severas en áreas con clima de tipo Mediterráneo donde se practica este sistema de cultivo. En consecuencia, el objetivo general de esta Tesis Doctoral fue el de generar conocimiento sobre la estructura y diversidad genética y patogénica de las poblaciones de *S. rolfsii* que infectan dicho cultivo en Andalucía y otras zonas del mundo que comparten las mismas condiciones de clima Mediterráneo (Chile, Italia y Portugal), en la confianza de que ello permitirá establecer las bases científicas para el desarrollo de estrategias eficientes para el control

integrado de la enfermedad. Hasta la fecha no consta en la literatura científica que se hayan realizado investigaciones con esta aproximación en lo que se refiere a poblaciones de *S. rolfsii* que compartan un mismo huésped y las mismas condiciones climáticas.

La unidad fundamental de estudio en esta Tesis Doctoral han sido los grupos de compatibilidad micelias (GCMs) identificados entre la colección de aislados de *S. rolfsii* obtenida en la primera fase de la investigación. Estos GCMs juegan un papel determinante tanto por el potencial para el intercambio genético entre aislados compatibles somáticamente de un mismo GCM a través del ciclo parasexual, como a la hora de preservar la identidad genética de los mismos frente a aquellos de diferente GCM con los que son incompatibles (Caten, 1972; Leslie, 1993). Este hecho está determinado por la reproducción asexual prevalente en *S. rolfsii* ya que aunque la reproducción sexual en este hongo se ha descrito en condiciones naturales, en la práctica, la incidencia del estado teleomorfo en el ciclo vital del hongo se considera nula (Punja & Grogan, 1983a). De este modo, los GCMs constituyen reservorios génicos aislados que pueden diferir en muchas características, entre ellas las de tipo morfológico o de patogenicidad y virulencia, debido a la falta de intercambio genético entre los aislados de diferentes GCMs (Worral, 1997). Por todo ello, en esta Tesis Doctoral se determinó, en primer lugar, una metodología que permitiese la inequívoca determinación de los GCMs presentes entre la colección de aislados estudiada. En este sentido, el medio de cultivo “medio modificado de Patterson” (MPM) incrementó significativamente la intensidad de las zonas de aversión entre aislados incompatibles y redujo la variabilidad de las características morfológicas de las reacciones de antagonismo que se desarrollan sobre el medio de cultivo Agar Patata Dextrosa (APD), empleado hasta la fecha rutinariamente para la determinación de GCMs en *S. rolfsii* (Adandonon et al., 2005; Almeida et al., 2001; Cilliers et al., 2002; Harlton et al., 1995; Nalim et al., 1995; Punja & Sun, 2001; Sarma et al., 2002), que dificultaba distinguir con claridad la reacción de incompatibilidad entre ciertos aislados. La eficacia y fiabilidad de esta metodología se corroboró, además, con observaciones

microscópicas de los crecimientos enfrentados entre las colonias fúngicas sobre portaobjetos. Las evidencias microscópicas encontradas indicaron que el deterioro o lisis de las células hifales es el resultado de una reacción de incompatibilidad entre aislados de *S. rolfsii*, mientras que la formación de puentes de anastomosis estables entre las células obedece a una reacción de compatibilidad. Estos hechos han sido referidos de igual manera en otros hongos fitopatógenos del mismo género como *S. cepivorum* (Earnshaw & Boland, 1997), en otros basidiomicetos como *Rhizoctonia solani* (Kulik & Dery, 1995) o en diferentes ascomicetos como *S. sclerotiorum* (Kohn et al., 1990), *S. homoeocarpa* (Jo et al., 2008), o *Fusarium graminearum* y *F. pseudograminearum* (Akinsanmi et al., 2008).

La estructura de las poblaciones de *S. rolfsii* se determinó en primer lugar mediante la identificación y distribución de GCMs a partir de la colección de aislados de *S. rolfsii* de rango geográfico amplio caracterizado por la prevalencia de condiciones climáticas de tipo Mediterráneo y procedente de un huésped común como fue la remolacha azucarera. En esta investigación se han identificado un total de 12 GCMs, que muestran una amplia variabilidad en cuanto a su abundancia y distribución geográfica. Dos de ellos, GCMs i y iii, fueron los más prevalentes, mientras que el resto se encontró de forma más localizada en varias regiones de diferentes países (GCM v) o dentro de un país (GCMs ii, vi, y ix), o bien restringidos a localidades específicas, ya sea compuestos por un solo aislado (GCMs iv, vii y x) o por pocos aislados (GCMs viii, ix y xii). Este resultado es similar al de otras investigaciones en las que se identificaron GCMs de forma frecuente y de distribución geográfica amplia así como otros localizados en áreas geográficas más concretas (Almeida et al., 2001; Cilliers et al., 2000; Harlton et al., 1995; Punja & Sun, 2001; Sarma et al., 2002).

En Andalucía, el adelanto en la fecha de siembra de la remolacha azucarera desde primavera hasta final de otoño-principio de invierno (Morillo-Velarde et al., 2003), dio lugar a una nueva modalidad de cultivo en el que éste se desarrolla bajo unas condiciones climáticas que resultan muy favorables para el desarrollo de la Podredumbre blanca o Mal del

esclerocio causada por *S. rolfsii* (Aycok, 1966; Punja, 1985). Este hecho coincide en el tiempo con la descripción del patógeno infectando cultivos de remolacha azucarera en las provincias de Córdoba y Sevilla a principios de los años 1940 (Benlloch, 1943). Estas referencias, junto con la prevalencia del GCM i en la actualidad, presente en las principales áreas del cultivo, sugiere que dicho GCM representaría a la población original del patógeno en Andalucía. Posteriormente, el cultivo de remolacha azucarera de siembra otoñal sufrió graves epidemias de Podredumbre blanca en la provincia de Cádiz, donde la enfermedad no había sido descrita con anterioridad aunque el cultivo se diera en la zona desde principio de los años 1940 (AIMCRA, 1987). En ese momento el cultivo de la remolacha azucarera en el sur de España experimentó importantes avances tecnológicos, lo que supuso un mayor número de desplazamientos de la maquinaria agrícola a través de los campos de cultivo que pudieron facilitar la dispersión del patógeno adherido a partículas de suelo. La más que probable conexión con las áreas del cultivo en Portugal (misma fábrica de procesado, intercambio tanto de material vegetal infectado como de maquinaria infestada, etc.), donde el GCM iii fue el más prevalente al ser identificado en todas las localidades muestreadas, explicaría la introducción del GCM i en dicho país así como del GCM iii en áreas del bajo Guadalquivir.

A nivel local, en las parcelas de remolacha de siembra otoñal que se muestrearon de forma intensa en Andalucía, se identificaron un máximo de tres GCMs, estando presente el GCM i en todas ellas y siendo asimismo el más prevalente. Estos resultados son similares a los obtenidos por Nalim et al. (1995) y Okabe y Matsumoto (2000). La baja frecuencia de GCMs encontrada en un área determinada respondería a un “efecto fundador” en las poblaciones de *S. rolfsii*, reflejando su modo de reproducción, que al no producir esporas debe su lenta propagación al crecimiento miceliar o por esclerocios dispersados de forma pasiva, y prevaleciendo el GCM que se estableciese en primer lugar. En base a esto, la presencia de GCMs junto al GCM i representados por un menor número de aislados en áreas del Valle del Guadalquivir respondería a recientes introducciones en las

parcelas donde coinciden ya que la ocurrencia de mutaciones aleatorias que den lugar a la emergencia de nuevos genotipos se da en tasas muy bajas (Ben-Yephet & Bitton, 1985; Hambleton et al., 2002). Este efecto fundador explicaría, por otro lado, que la población de *S. rolfsii* en Chile fuera particularmente diversa, ya que en un área geográfica similar en tamaño a la muestreada en el sur de España se identificaron hasta seis del total de 12 GCMs identificados en las diferentes zonas de estudio, cinco de los cuales aparecieron exclusivamente en Chile. Debido al relativamente corto periodo de tiempo transcurrido desde la primera observación de *S. rolfsii* en Chile en 1981 (Acuña, 1985; Esterio & Auger, 1982), la ocurrencia de introducciones múltiples del patógeno de diferente naturaleza podría ser la responsable de esta alta variabilidad.

A nivel genético, estudios mediante el empleo de diversas herramientas moleculares han llevado a varios autores a concluir que los aislados pertenecientes a un mismo GCM son, en general, genéticamente más similares entre sí que los que pertenecen a GCMs diferentes (Almeida et al., 2001; Cilliers et al., 2000; Nalim et al., 1995). Estas aproximaciones han mostrado cierta variabilidad genética inter- e intra-grupo entre los distintos GCMs estudiados, sin embargo, la falta de marcadores específicos para cada uno de ellos no han permitido monitorizar la dinámica poblacional del hongo en cuanto a su distribución y dispersión, aspectos de la biología de *S. rolfsii* que contribuirían a la mejora en el diseño de estrategias de manejo de las enfermedades que causa. Por esto, en esta Tesis Doctoral se exploró el uso de diferentes herramientas moleculares que permitiesen resolver la diversidad genética de los 12 GCMs identificados en las poblaciones de *S. rolfsii* estudiadas.

Las técnicas moleculares empleadas hasta la fecha para el estudio de la diversidad genética en poblaciones de *S. rolfsii*, han dado lugar a conclusiones contradictorias en cuanto a la posible correlación entre los GCMs y las líneas clonales delimitadas mediante marcadores moleculares. En este sentido, los análisis de Polimorfismos en la Longitud de los Fragmentos de Restricción (RFLPs), Polimorfismos de ADN amplificados por Iniciadores Simples Aleatorios (RAPDs) o Polimorfismos en la Longitud

de los Fragmentos Amplificados (AFLPs) (Almeida et al., 2001; Cilliers et al., 2000; Harlton et al., 1995; Nalim et al., 1995; Okabe & Matsumoto, 2000; Okabe et al., 1998; Punja & Sun, 2001), mostraron perfiles genéticos comunes en diferentes GCMs mientras que en otros casos, entre los aislados de un mismo GCM, existió cierta variabilidad intraespecífica.

El estudio llevado a cabo en esta Tesis Doctoral utilizando genes codificantes de proteínas ricos en intrones a lo largo de su secuencia, constituye una aproximación pionera en la determinación de la estructura genética de las poblaciones de *S. rolfsii* y su aplicación para la monitorización de la dinámica poblacional del hongo en cuanto a su distribución y dispersión espacial y temporal. Estos genes presentan tasas de evolución a nivel de especie mayores que otras regiones más comúnmente empleadas en estudios similares, como es el caso de la región transcrita espaciadora interna (ITS) del ADN ribosómico nuclear (ADNr). Así, las secuencias obtenidas para regiones específicas de los genes que codifican para el factor de elongación de la transcripción 1-alfa (*EF1 α*) y la segunda subunidad mayor de la ARN polimerasa II (*RPB2*), y el análisis de ambas conjuntamente, permitió resolver cada uno de los 12 GCMs identificados. De este modo, cada GCM presentó una secuencia de nucleótidos específica y única con respecto al resto, lo cual, ha permitido establecer una colección de referencia de aislados para los GCMs identificados. Estos resultados, además, indican un origen clonal de las poblaciones de *S. rolfsii*, y concuerdan con los resultados obtenidos por otros autores que apoyan esta teoría (Nalim et al., 1995). Por otro lado, la excelente resolución que se consigue con estas regiones génicas, junto a la rapidez y lo económico que resulta la secuenciación para la mayoría de laboratorios de investigación, determina que esta aproximación molecular sea adecuada para una mejor comprensión de la epidemiología de las enfermedades causadas por *S. rolfsii* y poder llevar a cabo un seguimiento exacto de la dispersión espacial y temporal de los aislados del patógeno en áreas de interés.

El análisis de las regiones específicas de los genes *EF1 α* y *RPB2* identificó posiciones nucleotídicas ambiguas a lo largo de sus secuencias.

Este hecho es especialmente relevante teniendo en cuenta que son genes nucleares de copia única (Liu et al., 1999; Matheny et al., 2007; Roger et al., 1999), lo cual, sugiere que cada uno de los nucleótidos correspondientes a dichas posiciones proceden de distintos núcleos. El estudio de las secuencias génicas mencionadas indica, por tanto, un estado heterocarionte de las células de los aislados de *S. rolfsii* en la naturaleza. Otra evidencia acerca de este estado celular en *S. rolfsii* encontrada en esta Tesis Doctoral se basa en el análisis de los perfiles de bandas RFLP-ITS con la enzima de restricción *Mbol*. Así, la suma total de los tamaños de las bandas de los perfiles M2 y M3 resultantes de la digestión del amplicón ITS con dicha enzima, excedieron el tamaño del producto de PCR no digerido. Este hecho concuerda con el señalado por Harlton et al. (1995), los cuales, analizaron dos aislados originados a partir de dos basidiosporas segregadas de un parental común y resolvieron que ambos aislados presentaban patrones de digestión distintos para la enzima *Mbol* indicando la presencia de dos tipos de secuencias ITS. Además de este trabajo, el estado heterocarionte de los aislados de *S. rolfsii* ha sido ampliamente discutido por otros autores en base a estudios llevados a cabo sobre la región ITS del ADNr (Okabe & Matsumoto, 2000; Okabe et al., 1998; Okabe et al., 2001), sin embargo, este estado no ha podido ser demostrado debido a la presencia de múltiples copias de dicha región no idénticas entre sí en un mismo núcleo, hecho que ha sido descrito asimismo en otras especies fúngicas (Ko & Yung, 2002), y la variabilidad observada en el número de núcleos por célula.

La significación agronómica de la estructura genética determinada para las poblaciones de *S. rolfsii* estudiadas en esta Tesis Doctoral, fue explorada mediante el estudio de la patogenicidad y virulencia de aislados representativos de los 12 GCMs identificados sobre un conjunto de cultivos de interés para la producción agrícola en regiones de clima Mediterráneo. Los resultados obtenidos demostraron que existe una elevada variabilidad patogénica entre los aislados representativos de los diferentes GCMs, así como en el grado de susceptibilidad entre las especies de cultivo evaluadas. En este sentido, los GCMs ii y vi se mostraron globalmente

altamente virulentos, los GCMs i, iii, ix y x moderadamente virulentos y los GCMs iv, v, vii, viii, xi y xii poco virulentos, mientras que entre las especies vegetales, para el conjunto de aislados de *S. rolfsii* estudiados, garbanzo y girasol se mostraron altamente susceptibles, pimiento, algodón y tomate moderadamente susceptibles, brócoli y remolacha azucarera ligeramente resistentes, y maíz y trigo resistentes. Estudios similares evaluaron la reacción de distintas especies de plantas huésped frente a un conjunto de aislados de *S. rolfsii* que no fueron caracterizados a nivel de GCMs (Flores-Moctezuma et al., 2006; Sharma et al., 1991; Yaqub & Shahzad, 2005). No obstante, también señalan la elevada susceptibilidad de especies como girasol y tomate frente a aislados de *S. rolfsii*. La variedad de remolacha azucarera evaluada en esta Tesis Doctoral (cv. Markus) mostró para el conjunto de GCMs un bajo nivel de susceptibilidad. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Sharma et al. (1991) para la variedad Ramoskaya y difieren de los de Yaqub y Shahzad (2005) quienes encontraron que la remolacha azucarera es altamente susceptible a sus aislados aunque no indicaron la variedad evaluada. Desde un punto de vista práctico, cabe por tanto destacar, que el huésped que esté presente en las áreas infestadas por *S. rolfsii* tendrá un papel importante en el desarrollo y virulencia de las epidemias causadas por este patógeno, así como en la distribución y ocurrencia de los distintos GCMs como han señalado diversos autores (Harlton et al., 1995; Nalim et al., 1995; Okabe & Matsumoto, 2000).

En conclusión, los resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral demuestran la idoneidad de las tecnologías y herramientas desarrolladas para generar conocimientos sobre componentes claves para el manejo de las enfermedades causadas por *S. rolfsii* en áreas con clima de tipo Mediterráneo. De este modo, para asegurar la eficiencia de las distintas medidas control, así como para recomendar la implantación de cultivos alternativos en áreas infestadas por el patógeno, se requiere del conocimiento de los perfiles genéticos y patogénicos de las poblaciones de *S. rolfsii* presentes en el área de cultivo. En la remolacha azucarera dicha caracterización de las poblaciones de *S. rolfsii* mediante su estructura

genética, determinada por la prevalencia de los distintos GCMs en un área concreta, su estructura patogénica, determinada por el rango de huéspedes y los perfiles diferenciales de virulencia de los aislados pertenecientes a los GCMs, y la posibilidad de resolver molecularmente dichos GCMs para estudios de dinámica y distribución poblacional, tiene importantes implicaciones agronómicas para el manejo de la Podredumbre blanca.

VI.2. CONCLUSIONES / CONCLUSSIONS

Las conclusiones generales de esta Tesis Doctoral son:

The general conclusions of this PhD Thesis are:

- | | |
|--|---|
| <p>1. Se ha desarrollado un medio de cultivo optimiza la caracterización inequívoca de las reacciones de compatibilidad e incompatibilidad entre aislados de <i>Sclerotium rolfsii</i> y su clasificación en Grupos de Compatibilidad Miceliar (GCMs).</p> | <p>It has been developed a growth media that allow optimizing the unequivocally characterization of compatible and incompatible mycelial reactions between <i>Sclerotium rolfsii</i> isolates and their classification into Mycelial Compatibility Groups (MCGs).</p> |
| <p>2. La caracterización de GCMs entre las poblaciones de aislados de <i>S. rolfsii</i> ha demostrado ser eficaz para el estudio de la estructura y diversidad genética y patogénica de las mismas.</p> | <p>The characterization of MCGs occurring in <i>S. rolfsii</i> populations proved to be an effective tool for the study of the population structure of the pathogen allowing assessing the genetic and pathogenic variability among them.</p> |

3. La ocurrencia de GCMs no está directamente relacionada con el origen geográfico de los aislados de *S. rolfsii*. A nivel local existe un bajo nivel de variabilidad con la presencia de hasta tres GCMs en una misma parcela o localidad.

MCGs occurrence is not directly related with the geographic origin of *S. rolfsii* isolates. There is a low level of variability at local level with the existence of up to three MCGs per field plot or locality.
4. Cada uno de los GCMs identificados en el estudio pueden ser resueltos de forma inequívoca y reproducible mediante el análisis de las secuencias nucleotídicas de las regiones parciales de los genes que codifican para el factor de elongación de la transcripción 1-alfa y la segunda subunidad mayor de la ARN polimerasa II.

Each of the MCG identified in the study could be resolved without ambiguity by the analysis of combined nucleotide sequences corresponding to partial regions of the protein-coding genes translation elongation factor-1 alpha and RNA polymerase II subunit two.
5. El análisis RFLP-ITS reveló un escaso grado de variación entre los GCMs, no existiendo correlación con el GCM o con el origen geográfico de los aislados. Se ha identificado un nuevo perfil RFLP-ITS que permite diferenciar con claridad los aislados de *S. rolfsii* de aquellos de *S. delphinii*, dos especies muy relacionadas.

The ITS-RFLP analysis revealed a low degree of variability among MCGs, with no correlation occurring between ITS-RFLP patterns and MCGs or the geographic origin of isolates. A new ITS-RFLP profile pattern was identified that clearly differentiate isolates of *S. rolfsii* from that of *S. delphinii* allowing to readily separating these two closely-related species.

- | | |
|---|--|
| <p>6. Las poblaciones de <i>S. rolfsii</i> estudiadas poseen un origen clonal y su estado celular en la naturaleza es heterocarionte.</p> | <p>The <i>S. rolfsii</i> populations evaluated are of clonal origin, and they are heterokaryotic in nature.</p> |
| <p>7. Se ha propuesto un conjunto estándar de aislados representativos de GCMs de interés para posteriores estudios.</p> | <p>It has been proposed a reference collection of representative isolates of <i>S. rolfsii</i> MCGs of use for further studies.</p> |
| <p>8. La variabilidad genética de las poblaciones de <i>S. rolfsii</i> está relacionada con la variabilidad patogénica de las mismas. Las poblaciones de <i>S. rolfsii</i> presentan una elevada variabilidad patogénica en un conjunto de especies de interés agrícola para áreas de clima Mediterráneo.</p> | <p>The genetic variability of <i>S. rolfsii</i> populations (MCGs) is related with its pathogenic variability and show a high level of pathogenic variability on a set of plant species of agricultural importance for Mediterranean climate-type areas.</p> |
| <p>9. Las especies de cultivo estudiadas difieren ampliamente en su reacción a los aislados tipo de GCMs, con la existencia de una interacción GCM x especie huésped. Existe un bajo nivel de variabilidad patogénica entre aislados pertenecientes a un mismo GCM.</p> | <p>Plant species greatly differ on their disease reaction to MCG type isolates with a MCG x species interaction. There was a low level of pathogenic variability among <i>S. rolfsii</i> isolates belonging to the same MCG.</p> |
| <p>10. La información y herramientas experimentales generadas en esta Tesis Doctoral permitirán</p> | <p>The information and experimental tools developed in this PhD research will allow to</p> |

monitorizar la dinámica espacial y temporal de las poblaciones de *S. rolfsii*, que propiciará un mejor entendimiento de la epidemiología de las enfermedades causadas por el patógeno y el diseño de prácticas de manejo eficientes.

precisely monitoring the spatial-temporal dynamics of *S. rolfsii* populations, which eventually will facilitate better understanding of the epidemiology of Sclerotium root-rot diseases and the design of efficient management strategies.

BIBLIOGRAFÍA GENERAL

- Acuña, R. 1985. Pudrición radicular causada por *Sclerotium rolfsii* Sacc., en cultivos de remolacha en la región central del país. *Simiente* 55: 34-35.
- Adams, G. C. 1988. *Thanatephorus cucumeris* (*Rhizoctonia solani*), a species complex of wide host range. *Advances in Plant Pathology* 6: 535-552.
- Adandonon, A., Aveling, T. A. S., Merwe, N. A., Sanders, G. 2005. Genetic variation among *Sclerotium* isolates from Benin and South Africa, determined using mycelia compatibility and ITS rDNA sequence data. *Australasian Plant Pathology* 34: 19-25.
- AIMCRA, 1987. Memoria de los trabajos efectuados en la campaña 1987/88. Siembra de otoño de 1986 Zona Sur. Valladolid, España.
- AIMCRA, 1998. Memoria de los trabajos efectuados en la campaña 1997/98. Siembra de otoño de 1996 Zona Sur. Valladolid, España.
- AIMCRA, 1999. Memoria de los trabajos efectuados en la campaña 1998/99. Siembra de otoño de 1997 Zona Sur. Valladolid, España.
- AIMCRA, 2001. Memoria de los trabajos efectuados en la campaña 2000/01. Siembra de otoño de 1999 Zona Sur. Valladolid, España.
- AIMCRA, 2004. Memoria de los trabajos efectuados en la campaña 2003/04. Siembra de otoño 2002 Zona Sur. Valladolid, España.
- AIMCRA, 2006. Memoria de los trabajos efectuados en la campaña 2005/06. Siembra de otoño de 2004 Zona Sur. Valladolid, España.
- AIMCRA, 2010. Memoria de los trabajos efectuados en la campaña 2009/10. Siembra de Otoño 2008 – Primavera 2009. Valladolid, España.

- Akinsanmi, O. A., Backhouse, D., Simpfendorfer, S., Chakraborty, S. 2008. Mycelial compatibility reactions of Australian *Fusarium graminearum* and *F. pseudograminearum* isolates compared with AFLP groupings. *Plant Pathology* 57: 251-261.
- Almeida, A. M. R., Abdelnoor, R. V., Calvo, E. S., Tessnman, D., Yorinori, J. T. 2001. Genotypic diversity among Brazilian isolates of *Sclerotium rolfsii*. *Journal of Phytopathology* 149: 493-502.
- Aycock, R. 1966. Stem rot and other diseases caused by *Sclerotium rolfsii* or the status of Rolf's fungus after 70 years. North Carolina Agricultural Experiment Station Technical Bulletin No. 174. 202 pp.
- Backman, P. A., Hammond, J. M. 1981. Suppression of peanut stem rot with the insecticide chlorpyrifos. *Peanut Science* 8: 129-130.
- Backman, P. A., Rodriguez-Kabana, R., Williams, J. C. 1975. The effect of peanut leaf spot fungicides on the non-target pathogen *Sclerotium rolfsii*. *Phytopathology* 65: 773-776.
- Backman, P. A., Rodriguez-Kabana, R., Caulin, M. C., Beltramini, E., Ziliani, N. 1981. Using the soil-tray technique to predict the incidence of *Sclerotium* rot in sugar beets. *Plant Disease* 65: 419-421.
- Barnett, N. M. 1974. Release of peroxidase from soybean hypocotyl cell walls by *Sclerotium rolfsii* culture filtrates. *Canadian Journal of Botany* 52: 265-271.
- Bateman, D. F., Beer, S. V. 1965. Simultaneous production and synergistic action of oxalic acid and polygalacturonase during pathogenesis by *Sclerotium rolfsii*. *Phytopathology* 55: 204-211.
- Bayraktar, H., Turkkan, M., Dolar, F. S. 2010. Characterization of *Fusarium oxysporum* f.sp *cepae* from onion in Turkey based on vegetative compatibility and rDNA RFLP analysis. *Journal of phytopathology* 158: 691-697.

- Begerow, D., Nilsson, H., Unterseher, M., Maier, W. 2010. Current state and perspectives of fungal DNA barcoding and rapid identification procedures. *Applied Microbiology and Biotechnology* 87: 99-108.
- Benhamou, N., Chet, I. 1996. Parasitism of sclerotia of *Sclerotium rolfsii* by *Trichoderma harzianum*: Ultrastructural and cytochemical aspects of the interaction. *Phytopathology* 86: 405-416.
- Benlloch, M. 1943. El "mal del esclerocio" en los remolachares de algunas vegas andaluzas. *Boletín de Patología Vegetal y Entomología Agrícola* 12: 221-228.
- Ben-Yephet, Y., Bitton, S. 1985. Use of a selective medium to study the dispersal of ascospores of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Phytoparasitica* 13: 33-40.
- Beute, M. K., Rodríguez-Kábana, R. 1979a. Effect of volatile compounds from remoistened plant tissues on growth and germination of sclerotia of *Sclerotium rolfsii*. *Phytopathology* 69: 802-805.
- Beute, M. K., Rodríguez-Kábana, R. 1979b. Effect of wetting and the presence of peanut tissues on germination of sclerotia of *Sclerotium rolfsii* produced in soil. *Phytopathology* 69: 869-72.
- Bhagat, S., Pan, S. 2007. Mass multiplication of *Trichoderma harzianum* on agricultural byproducts and their evaluation against seedling blight (*Rhizoctonia solani*) of mungbean and collar rot (*Sclerotium rolfsii*) of groundnut. *Indian Journal of Agricultural Sciences* 77: 583-588.
- Binder, M., Larsson, K. H., Matheny, P. B., Hibbett, D. 2010. Amylocorticiales ord. nov. and Jaapiales ord. nov.: Early diverging clades of Agaricomycetidae dominated by corticioid forms. *Mycologia* 102: 865-880.
- Botstein, D., White, R. L., Skolnick, M., Davis, R. W. 1980. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *American Journal of Human Genetics* 32: 314-331.

- Brown, E. A., Hendrix, F. F. 1980. Distribution and control of *Sclerotium rolfsii* on apple. *Plant Disease* 64: 205-206.
- Canullo, G. H., Rodríguez-Kábana, R. 1992. Evaluation of host and pathogen responses for screening soil amendments to control *Sclerotium rolfsii*. *Plant and Soil* 147: 275-282.
- Carling, D. E., Kuninaga, S., Brainard, K. A. 2002. Hyphal anastomosis reaction, rDNA-internal transcribed spacer sequences, and virulence levels among subset of *Rhizoctonia solani* anastomosis groups-2 (AG-2) and AG-BI. *Phytopathology* 92: 43-50.
- Caten, C. E. 1972. Vegetative compatibility and cytoplasmic infection in fungi. *Journal of General Microbiology* 72: 221-229.
- Chulze, S. N., Ramirez, M. L., Torres, A., Leslie, J. F. 2000. Genetic variation in *Fusarium* section *Liseola* from no-till maize in Argentina. *Applied and Environmental Microbiology* 66: 5312-5315.
- Ciampi, M. B., Gale, L. R., Macedo-Lemos, E. G., Ceresini, P. C. 2009. Distinctively variable sequence-based nuclear DNA markers for multilocus phylogeography of the soybean- and rice-infecting fungal pathogen *Rhizoctonia solani* AG-1 IA. *Genetics and molecular biology* 32: 840-846.
- Cilliers, A. J., Herselman, L., Pretorius, Z. A. 2000. Genetic variability within and among mycelia compatibility groups of *Sclerotium rolfsii* in South Africa. *Phytopathology* 90: 1026-1031.
- Collado-Romero, M., Mercado-Blanco, J., Olivares-García, C., Valverde-Corredor, A., Jiménez-Díaz, R. M. 2006. Molecular variability within and among *Verticillium dahliae* vegetative compatibility groups determined by fluorescent AFLP and PCR markers. *Phytopathology* 96: 485-495.
- Cramer, H. H. 1967. Defensa y cosecha mundial. *Pflanzenschutz-Nachrichten Bayer* 20: 1-555.

- Curzi, M. 1932. Studi su lo *Sclerotium rolfsii*. Bolletino della Reale Stazione di Patologia Vegetale di Roma 11: 306-373.
- Dobinson, K. F., Patterson, N. A., White, G. J., Grant, S. 1998. DNA fingerprinting and vegetative compatibility analyses indicate multiple origins for *Verticillium dahliae* race 2 tomato isolates from Ontario, Canada. Mycological Research 102: 1089-1095.
- Domsch, K. H., Games, W., Anderson, T. H. 1980. Compendium of Soil Fungi. Academic Press, Londres, Reino Unido. 859 pp.
- Earnshaw, D., Boland, G. J. 1997. Mycelial compatibility groups in *Sclerotium cepivorum*. Plant Pathology 46: 229-238.
- Elad, Y., Katan, J., Chet, I. 1980. Physical, biological, and chemical control integrated for soilborne diseases in potatoes. Phytopathology 70: 418-422.
- Epps, W. M., Patterson, J. C., Freeman, I. E. 1951. Physiology and parasitism of *Sclerotium rolfsii*. Phytopathology 41: 245-255.
- Erincik, O., Ozdemir, Z., Durdu, O. F., Doken, M. T., Acikgoz, S. 2011. Diversity and spatial distribution of vegetative compatibility types and mating types of *Cryphonectria parasitica* in the Aydin Mountains, Turkey. European journal of plant pathology 129: 555-566.
- Errakhi, R., Bouteau, F., Lebrihi, A., Barakate, M. 2007. Evidences of biological control capacities of *Streptomyces* spp. against *Sclerotium rolfsii* responsible for damping-off disease in sugar beet (*Beta vulgaris* L.). World Journal of Microbiology and Biotechnology 23: 1503-1509.
- Esterio, M., Auger, J. 1982. Presencia de *Pellicularia rolfsii* (Curzi) West. (*Sclerotium rolfsii* Sacc.) en la zona central del país. Simiente 52: 32.
- Ezzahiri, B. 2004. Situation de la pourriture à *Sclerotium* de la betterave à sucre au Maroc and Bilan des travaux de recherche. International Workshop on *Sclerotium rolfsii* in sugar beet crops. Córdoba, España.

- FAOSTAT, 2010. FAOSTAT production statistics of crops. Disponible online en <http://faostat.fao.org/site/567/default.aspx#ancor>.
- Fidah, A. 1995. La pourriture de la betterave à sucre due à *Sclerotium rolfsii* dans le doukkala: épideémiologie et essais de lutte. Thèse de troisième cycle. Marrakech: Faculté des Science Semlelia. 122 pp.
- Flores-Moctezuma, H. E., Montes-Belmont, R., Jiménez-Pérez, A., Nava-Juárez, R. 2006. Pathogenic diversity of *Sclerotium rolfsii* isolates from Mexico, and potential control of southern blight through solarization and organic amendments. *Crop Protection* 25: 195-201.
- Fries, N. 1973. Effects of volatile organic compounds on the growth and development of fungi. *Transactions of the British Mycological Society* 60:1-21.
- Gabellini, E., Cerato, C. 2004. *Sclerotium rolfsii* in sugarbeet crop. A general overview on Italy. International Workshop on *Sclerotium rolfsii* in sugar beet crops. Córdoba, España.
- Ganesan, S., Kuppusamy, R. G., Sekar, R. 2007. Integrated management of stem rot disease (*Sclerotium rolfsii*) of groundnut (*Arachis hypogaea* L.) using rhizobium and *Trichoderma harzianum* (ITCC-4572). *Turkish Journal of Agriculture and Forestry* 31: 103-108.
- Garren, K. H. 1961. Control of *Sclerotium rolfsii* through cultural practices. *Phytopathology* 51: 120-124.
- Gilbert, R. G., Linderman, R. G. 1971. Increased activity of soil microorganisms near sclerotia of *Sclerotium rolfsii* in soil. *Canadian Journal of Microbiology* 17: 557-62.
- Gilligan, C. A. 1985. Probability models for host infection by soilborne fungi. *Phytopathology* 75: 61-67.
- Gilligan, C. A., Bailey, D. J. 1997. Components of pathozone behaviour. *New Phytologist* 135: 475-490.

- Goto, K. 1930. On the perfect stage of *Sclerotium rolfsii* Sacc. produced in culture media. Preliminary report. Japanese Journal Society of Tropical Agriculture 2: 165-175.
- Griffin, D. M., Nair, N. G. 1968. Growth of *Sclerotium rolfsii* at different concentrations of oxygen and carbon dioxide. Journal of Experimental Botany 19: 812-816.
- Grinstein, A., Katan, J., Razik, A. A., Zeydan, O., Elad, Y. 1979. Control of *Sclerotium rolfsii* and weeds in peanuts by solar heating of the soil. Plant Disease Reporter 63: 1056-1059.
- Gutiérrez-Sosa, M. 2006. Efecto de las plagas y enfermedades sobre el rendimiento y la calidad industrial de la remolacha azucarera de siembra otoñal: Bases para el establecimiento de un Protección Integrada. Tesis Doctoral. Universidad de Sevilla. 355 pp.
- Haas, H. V. 1976. Methyl bromide and PCNB for *Sclerotium* crown rot control in Iris. Phytoparasitica 4: 201-205.
- Hambleton, S., Walker, C., Kohn, L. M. 2002. Clonal lineages of *Sclerotinia sclerotiorum* previously known from other crops predominate in 1999–2000 samples from Ontario and Quebec soybean. Canadian Journal of Plant Pathology 24: 309-315.
- Hänssler, M., Maxwell, D. P., Maxwell, M. D. 1975. Demonstration of acid phosphatase-containing vacuoles in hyphal tip cells of *Sclerotium rolfsii*. Journal of Bacteriology 124: 997-1006.
- Harlton, C. E., Uvesque, C. A., Punja, Z. K. 1995. Genetic diversity in *Sclerotium (Athelia) rolfsii* and related species. Phytopathology 85: 1269-1281.
- Harverson, R. M., Hanson L. E., Hein G. L. 2009. Compendium of Beet Diseases and Pests, Second Edition. APS Press, St. Paul, MN, E.E.U.U. 140 pp.

- Hibbett, D. S., et al. (62 autores). 2007. A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. *Mycological Research* 111: 509-547.
- Higgins, B. B. 1927. Physiology and parasitism of *Sclerotium rolfsii* Sacc. *Phytopathology* 17: 417-448.
- Higuchi, R., Fockler, C., Dollinger, G., Watson, R. 1993. Kinetic PCR analysis: real - time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology* 11: 1026-1030.
- Icochea, I. 1966. A comparative study of isolates of *Sclerotium rolfsii* and *Sclerotium coffeicola*. Ph.D. Thesis. North Carolina State University, Raleigh, NC, E.E.U.U. 102 pp.
- Jauch, C. 1976. Patología Vegetal. El Ateneo, Buenos Aires, Argentina. 270 pp.
- Jiménez-Díaz, R. M. 1998. Concepto de sostenibilidad en agricultura, pp. 3-13. En: Agricultura Sostenible. R. M. Jiménez-Díaz, J. Lamo de Espinosa, eds. Agrofuturo, Life, Ediciones Mundi-Prensa, Madrid.
- Jiménez-Díaz, R. M., Castillo-Castillo, P., Jiménez-Gasco, M. M., Landa del Castillo, B. B., Mercado-Blanco, J., Navas-Cortés, J.A., Pérez-Artés, E., Rodríguez-Jurado, D., Bejarano-Alcazar, J. 2003. Sanidad vegetal y profesión fitopatológica en las formas de agricultura del Siglo XXI. *Phytoma España* 148: 16-27.
- Jo, Y. K., Chang, S. W., Rees, J., Jung, G. 2008. Reassessment of vegetative compatibility of *Sclerotinia homoeocarpa* using nitrate-nonutilizing mutants. *Phytopathology* 98: 108-114.
- Jordán-Ramírez, R, Jiménez-Díaz, R. M., Navas-Cortés, J. A. 2009. Spatial pattern and temporal dynamics of Sclerotium root rot (*Sclerotium rolfsii*) in fall sown sugar beet crops in southern Spain. *IOBC/WPRS Bulletin* 42: 101-103.
- Karp, A., Edwards, K. J. 1997. DNA markers: a global overview, pp. 1-13. En *DNA Markers: Protocols, Applications, and Overviews*. G.

- Caetano-Anollés, P. M. Gresshoff, eds. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, E.E.U.U.
- Katan, J. 1981. Solar heating (solarization) of soil for control of soilborne pests. *Annual Review of Phytopathology* 19: 311-336.
- Kaul, P. L., Pundhir, V. S., Singh, R. S. 1984. Some aspects of behaviour of *Sclerotium rolfsii* Sacc. in soil. *Indian Journal of Mycological Plant Pathology* 14: 24. (Abstr.).
- Khatri, D. V. S., Bhargava, S. N., Shukla, D. N. 1983. Some studies on the saprophytic survival of *Sclerotium rolfsii* in soil. *Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz-Journal of Plant Diseases and Protection* 90: 382-387.
- Kishore, G. K., Pande, S., Rao, J. N., Podile, A. R. 2005. *Pseudomonas aeruginosa* inhibits the plant cell wall degrading enzymes of *Sclerotium rolfsii* and reduces the severity of groundnut stem rot. *European Journal of Plant Pathology* 113: 315-320.
- Ko, K. S., Jung, H. S. 2002. Three nonorthologous ITS1 types are present in a polypore fungus *Trichaptum abietinum*. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 23: 112-122.
- Kohn, L. M., Carbone, I., Anderson, J. B. 1990. Mycelial interactions in *Sclerotinia sclerotiorum*. *Experimental Mycology* 14: 225-267.
- Kohn, L. M., Stasovski, E., Carbone, I., Royer, J., Anderson, J. B. 1991. Mycelial incompatibility and molecular markers identify genetic variability in field populations of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Phytopathology* 81: 480-485.
- Korolev, N., Katan, J., Katan, T. 2000. Vegetative compatibility groups of *Verticillium dahliae* in Israel: their distribution and association with pathogenicity. *Phytopathology* 90: 529-66.

- Kritzman, G., Chet, I., Henis, Y. 1977. The role of oxalic acid in the pathogenic behavior of *Sclerotium rolfsii* sacc. *Experimental Mycology* 1: 280-285.
- Kulik, M. M., Dery, P. D. 1995. Use of DAPI for anastomosis group typing of strains of the fungus *Rhizoctonia solani*. *Biotechnic & Histochemistry* 70: 95-98.
- Kuninaga, S., Natsuaki, T., Takeuchi, T., Yokosawa, R. 1997. Sequence variation of rDNA ITS regions within and between anastomosis groups in *Rhizoctonia solani*. *Current Genetics* 32: 237-243.
- Lal, R. J., Srivastava, S. N., Agnihotri, V. P. 1997. Epidemiology and management of Sclerotium root rot of sugar beet: A threatening malady, pp. 161-178. En: *Management of Threatening Plant Diseases of National Importance*. V. P. Agnihotri, A. K. Sarbhoy, D. V. Singh. Malthora Publishing House, New Delhi, India.
- Leach, L. D., Davey, A. E. 1938. Determining the sclerotial population of *Sclerotium rolfsii* by soil analyses and predicting losses of sugar beets on the basis of analysis. *Journal of Agricultural Research* 56: 619-631.
- Leach, L. D., Davey, A. E. 1942. Reducing southern sclerotium rot of sugar beets with nitrogenous fertilizers. *Journal of Agricultural Research* 64: 1-18.
- Leach, L. D., Mead, S. W. 1936. Viability of sclerotia of *Sclerotium rolfsii* after passage through the digestive tract of cattle and sheep. *Journal Agricultural Research* 53: 519-526.
- Leslie, J. F. 1993. Fungal vegetative compatibility. *Annual Review of Phytopathology* 31: 127-150.
- Linderman, R. G., Gilbert, R. G. 1969. Stimulation of *Sclerotium rolfsii* in soil by volatile components of alfalfa hay. *Phytopathology* 59: 1366-1372.

- Liu, Y. J., Whelen, S., Hall, D. 1999. Phylogenetic relationships among Ascomycetes: evidence from an RNA polymerase II subunit. *Molecular Biology and Evolution* 16: 1799-1808.
- López-Bellido, L. 2003. Remolacha azucarera, pp. 23-242. En: Cultivos industriales. Mundi-Prensa, Madrid.
- López-Rivera, S. 1996. Efecto de la solarización del suelo sobre la Podredumbre blanca de la remolacha (*Beta vulgaris* L.) causadas por *Sclerotium rolfsii* Sacc. Proyecto Profesional Fin de Carrera, ETSIAM. Universidad de Córdoba. 112 pp.
- Madi, L., Katan, T., Katan, J., Henis, Y. 1997. Biological control of *Sclerotium rolfsii* and *Verticillium dahliae* by *Talaromyces flavus* is mediated by different mechanisms. *Phytopathology* 87:1054-1060.
- Majer, D., Mithen, R., Lewis, B. G., Vos, P., Oliver, P. R. 1996. The use of AFLP fingerprinting for the detection of genetic variation in fungi. *Mycological Research* 100: 1107-1111.
- Malvarez, G., Carbone, I., Grunwald, N. J., Subbarao, K. V., Schafer, M., Kohn, L. M. 2007. New populations of *Sclerotinia sclerotiorum* from lettuce in California and peas and lentils in Washington. *Phytopathology* 97: 470-483.
- MARM, 2011. Avances de superficies y producciones. Disponible online en: <http://www.marm.es/es/estadistica/temas/avances-de-superficies-y-producciones-de-cultivos/>.
- Matheny, P. B., Wang, Z., Binder, M., Curtis, J. M., Lim, Y. W., Nilsson, H., Hughes, K. W., Hofstetter, V., Ammirati, J. F., Schoch, C. L., Langer, E., Langer, G., McLaughlin, D. J., Wilson, A. W., Froslev, T., Ge, Z. W., Kerrigan, R. W., Slot, J. C., Yang, Z. L., Baroni, T. J., Fischer, M., Hosaka, K., Matsuura, K., Seidl, M. T., Vauras, J., Hibbett, D. S. 2007. Contributions of rpb2 and tef1 to the phylogeny of mushrooms and allies (Basidiomycota, Fungi). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 43: 430-451.

- Mathur, S. B., Sarbhoy, A. K. 1976. Physiological studies on *Sclerotium rolfsii* causing root rot of sugar beet. *Indian Phytopathology* 29: 454-55.
- Mihail, J. D., Alcorn, S. M. 1984. Effects of soil solarization on *Macrophomina phaseolina* and *Sclerotium rolfsii*. *Plant Disease* 68: 156-159.
- Milgroom, M. G. 1996. Recombination and the multilocus structure of fungal populations. *Annual Review of Phytopathology* 34: 457-477.
- Milgroom, M. G., Fry, W. E. 1997. Contributions of population genetics to plant disease epidemiology and management. *Advances in Botanical Research* 24: 1-30.
- Milthorpe, F. L. 1941. Studies on *Corticium rolfsii* (Sacc.) Curzi (*Sclerotium rolfsii* Sacc.) I. Cultural characters and perfect stage. II. Mechanism of parasitism. *Proceedings of the Linnean Society of New South Wales* 66: 65-75.
- Morillo-Velarde, R., Bermejo, J. L., Ayala, J., Moreno, A., Gutiérrez, M., Márquez, L. 2003. Remolacha Azucarera de Siembra Otoñal. Normas Técnicas de Cultivo. Junta de Andalucía. Consejería de Agricultura y Pesca. Sevilla. 143 pp.
- Mueller, U. G., Wolfenbarger, L. L. 1999. AFLP genotyping and fingerprinting. *Trends in Ecology and Evolution* 14: 389-394.
- Mukhopadhyay, A. N., Upadhyay, J. P. 1983. Biological control of *Sclerotium rolfsii* by *Trichoderma harzianum* in sugar beet. Proc. 10th International Congress of Plant Protection, November, 20-24, Brighton, England.
- Nakata, K. 1925a. Studies on *Sclerotium rolfsii* Sacc. Part I. The phenomenon of aversion and its relation to the biologic form of the fungus. *Bull. Sci. Fak. Terkult. Kyushu Imp. Univ. Fukuoka, Japan*. [Japaneses with English Summary] 1: 177-190.

- Nakata, K. 1925b. Studies on *Sclerotium rolfsii* Sacc. Part I. The possible cause of the phenomenon of aversion in the fungus and morphological features of the phenomenon. Bull. Sci. Fak. Terkult. Kyushu Imp. Univ. Fukuoka, Japan. [Japanese with English Summary] 1: 310-318.
- Nalim, F. A., Starr, J. L., Woodard, K. E., Segner, S., Keller, N. P. 1995. Mycelial compatibility groups in Texas peanut field populations of *Sclerotium rolfsii*. *Phytopathology* 85: 1507-1512.
- Oerke, E.-C. 2006. Crop losses to pests. *Journal of Agricultural Science* 144: 31-43.
- Okabe, I., Matsumoto, N. 2000. Population structure of *Sclerotium rolfsii* in peanut fields. *Mycoscience* 41: 145-148.
- Okabe, I., Morikawa, C., Matsumoto, N., Yokoyama, K. 1998. Variation in *Sclerotium rolfsii* isolates in Japan. *Mycoscience* 39: 399-407.
- Okabe, I., Arakawa, M., Matsumoto, N. 2001. ITS polymorphism within a single strain of *Sclerotium rolfsii*. *Mycoscience* 42: 107-113.
- Paillalef-Monrad, R. 2004. *Sclerotium rolfsii* in sugar beet crops: Situation and studies in Chile. International Workshop on *Sclerotium rolfsii* in sugar beet crops. Córdoba, España.
- Paim, M. 2004. *Sclerotium rolfsii* in sugar beet crops in Portugal. International Workshop on *Sclerotium rolfsii* in sugar beet crops. Córdoba, España.
- Ploetz, R. C., Correll, J. C. 1988. Vegetative compatibility among races of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. *Plant Disease* 72: 325-328.
- Powell, W. A. 1995. Vegetative incompatibility and mycelial death of *Cryphonectria parasitica* detected with a pH indicator. *Mycologia* 87: 738-741.
- Punja, Z. K. 1985. The biology, ecology and control of *Sclerotium rolfsii*. *Annual Review of Phytopathology* 23: 97-127.

- Punja, Z. K. 1986a. Relationships among soil depth, soil texture, and inoculum placement in infection of carrot roots by eruptively germinating sclerotia of *Sclerotium rolfsii*. *Phytopathology* 76: 976-980.
- Punja, Z. K. 1986b. Effect of carbon and nitrogen step-down on *Sclerotium* biomass and cord development in *Sclerotium rolfsii* and *S. delphinii*. *Transactions of the British Mycological Society* 86: 537-544.
- Punja, Z. K. 1988. *Sclerotium (Athelia) rolfsii* a pathogen of many plant species. *Advances in Plant Pathology* 6: 523-534.
- Punja, Z. K., Grogan, R. G. 1981a. Eruptive germination of sclerotia of *Sclerotium rolfsii*. *Phytopathology* 71: 1092-1099.
- Punja, Z. K., Grogan, R. G. 1981b. Mycelial growth and infection without a food base by eruptive germinating sclerotia of *Sclerotium rolfsii*. *Phytopathology* 71: 1099-1103.
- Punja, Z. K., Grogan, R. G. 1983a. Basidiocarp induction, nuclear condition, variability, and heterokaryon incompatibility in *Athelia (Sclerotium) rolfsii*. *Phytopathology* 73: 1273-1278.
- Punja, Z. K., Grogan, R. G. 1983b. Hyphal interactions and antagonism among field isolates and single-basidiospore strains of *Athelia (Sclerotium) rolfsii*. *Phytopathology* 73: 1279-1284.
- Punja, Z. K., Jenkins, S. F. 1984. Influence of temperature, moisture, modified gaseous atmosphere, and depth in soil on eruptive sclerotial germination of *Sclerotium rolfsii*. *Phytopathology* 74: 749-754.
- Punja, Z. K., Rahe, J. E. 1992. *Sclerotium*, pp. 166-170. *Methods for Research on Soilborne Phytopathogenic Fungi*. L. L. Singelton, J. D. Mihail, C. M. Rush, eds. APS Press, St. Paul, MN, E.E.U.U.
- Punja, Z. K., Sun, L. J. 2001. Genetic diversity among mycelial compatibility groups of *Sclerotium rolfsii* (teleomorph *Athelia rolfsii*) and *Sclerotium delphinii*. *Mycological Research* 105: 537-546.

- Punja, Z. K., Grogan, R. G., Unruh, T. 1982. Chemical control of *Sclerotium rolfsii* on golf greens in northern California. *Plant Disease* 66: 108-111.
- Punja, Z. K., Jenkins, S. F., Grogan, R. G. 1984. Effect of volatile compounds, nutrients and source of sclerotia on eruptive sclerotium germination of *Sclerotium rolfsii*. *Phytopathology* 74: 1290-1295.
- Punja, Z. K., Smith, V. L., Campbell, C. L., Jenkins, S. F. 1985. Sampling and extraction procedures to estimate numbers, spatial pattern, and temporal distribution of sclerotia of *Sclerotium rolfsii* in soil. *Plant Disease* 69: 469-474.
- Rama, S. 1981. Studies on Seedling Diseases of Sugarbeet. Ph. D. Thesis, Govind Ballabh Pant University of Agriculture & Technology, Pantnagar, India.
- Ristaino, J. B., Lewis, J. A., Lumsden, R. D. 1994. Influence of isolates of *Gliocladium virens* and delivery systems on biological control of Southern Blight on carrot and tomato in the field. *Plant Disease* 78: 153-156.
- Rodríguez-Kábana, R., Backman, P. A., McLeod, C. 1975. A soil plate method for rapid screening of pesticides against *Sclerotium rolfsii*. *Plant Disease Reporter* 59: 439-442.
- Rodríguez-Kábana, R., Backman, P. A., Wiggins, E. A. 1974. Determination of sclerotial populations of *Sclerotium rolfsii* in soil by a rapid flotation-sieving technique. *Phytopathology* 64: 610-615.
- Roger, A. J., Sandblom, O., Doolittle, W. F., Philippe, H. 1999. An evaluation of elongation factor 1a as a phylogenetic marker for eukaryotes. *Molecular Biology and Evolution* 16: 218-233.
- Rolfs, P. H. 1892. Tomato blight-some hints. Florida Agricultural Experiment Station Technical, Bulletin 18.
- Rolfs, P. H. 1893. The tomato and some of its diseases. Florida Agricultural Experiment Station Technical, Bulletin 21: 1-38.

- Romero-Ávila, C. 1999. Control de la Podredumbre blanca de la remolacha mediante solarización e incorporación al suelo de residuos de cosecha. Proyecto Profesional Fin de Carrera, ETSIAM, Universidad de Córdoba.
- Saccardo, P. A. 1911. Notae mycologicae. Ann. Mycol. 9: 249-257.
- Sarma, B. K., Singh, U. P., Singh, K. P. 2002. Variability in Indian isolates of *Sclerotium rolfsii*. Mycologia 94: 1051-1058.
- Schafer, M. R., Kohn, L. M. 2006. An optimized method for mycelial compatibility testing in *Sclerotinia sclerotiorum*. Mycologia 98: 593-597.
- Sellam, M. A., Amein, A. M., E-Shabrawy, A. M. 1982. Possible role of phosphatidase in pathogenesis of *Sclerotium rolfsii*. Phytopathologische zeitschrift 105: 142-145.
- Serra, I. M. R. S., Silva, G. S. 2005. Caracterização biológica e fisiológica de isolados de *Sclerotium rolfsii* obtidos de pimentao no estado do Maranhao. Fitopatologia Brasileira 30: 61-66.
- Sharma, B. S., Pathak, V. N., Bhatnagar, K. 1991. Morphological, cultural and pathogenic variations in *Sclerotium rolfsii* Sacc. causing root rot of sugarbeet. Cryptogamie Mycologie 12: 71-79.
- Shew, B. B., Beute, M. K. 1984. Effects of crop management on the epidemiology of southern stem rot of peanut. Phytopathology 74: 530-535.
- Shew, B. B., Beute, M. K., Campbell, C. L. 1984. Spatial pattern of Southern Stem Rot caused by *Sclerotium rolfsii* in 6 North-Carolina peanut fields. Phytopathology 74: 730-735.
- Singh, R. K., Shukla, R. P., Dwivedi, R. S. 1990. Effects of solar treatment on germination of sclerotia (*Sclerotium rolfsii* Sacc.) and on other soil mycoflora. Biology and Fertility of Soils 10: 152-154.

- Singh, K., Srivastava, S. N., Misra, S. R. 1982. Management of sugarbeet seedling diseases caused by *Rhizoctonia solani* and *Sclerotium rolfsii*. Indian Phytopathology 35: 639-641.
- Singh, A., Mehta, S., Singh, H. B., Nautiyal, C. S. 2003. Biocontrol of collar rot disease of betelvine (*Piper betle* L.) caused by *Sclerotium rolfsii* by using rhizosphere-competent *Pseudomonas fluorescens* NBRI-N6 and *P. fluorescens* NBRI-N. Current Microbiology 47: 153-158.
- Singleton, L. L., Mihail, J. D., Rush, C. M. 1992. Methods for Research on Soilborne Phytopathogenic Fungi. APS Press, St. Paul, MN, E.E.U.U. 266 pp.
- Smith, A. M. 1972. Drying and wetting sclerotia promotes biological control of *Sclerotium rolfsii* Sacc. Soil Biology and Biochemistry 4: 119-123.
- Smith, V. L., Campbell, C. L., Jenkins, S. F., Benson, D. M. 1988. Effects of host density and number of disease foci on epidemics of southern blight of processing carrot. Phytopathology 78: 595-600.
- Smith, V. L., Punja, Z. K., Jenkins, S. F. 1986. A histological study of infection of host tissue by *Sclerotium rolfsii*. Phytopathology 76: 755-759.
- Srivastava, S. N., Tripathi, R. C., Srivastava, B. L. 1994. Response of sugarbeet genotypes of *Sclerotium rolfsii*. Indian Journal of Sugarcane Technology 9: 156-158.
- Sturgeon, R. V. 1986. Peanut disease loss estimates for major peanut producing states in the United States for 1984 and 1985. Proceedings of the American Peanut Research and Education Society 18: 24-26.
- Tewari, K. C. 1971. Studies on Sclerotium Root Rot and Estimation of Losses. M.Sc. Thesis, Govind Ballabh Pant University of Agriculture & Technology, Pantnagar, India.
- Tinsdale, W. H. 1921. Two Sclerotium diseases of rice. Journal of Agricultural Research 21: 649-658.

- Truscott, J. E., Gilligan, C. A. 2001. The effect of cultivation on the size, shape, and persistence of disease patches in fields. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98: 7128-7133.
- Tu, C. C., Kimbrough, J. W. 1975. Morphology, development and cytochemistry of the hyphae and sclerotia of species in *Rhizoctonia* complex. *Canadian Journal of Botany* 53: 2282-2296.
- Van Etten, H. D., Bateman, D. F. 1969. Enzymatic degradation of galactan, galactomannan, and xylan by *Sclerotium rolfsii*. *Phytopathology* 59: 968-972.
- Venkatarayan, S. V. 1950. Notes on some species of *Corticium* and *Pellicularia*. *Indian Phytopathology* 2: 186-189.
- Vos, P., Hogers M., Bleeker, M., Rijans, M., Van de Lee, T., Hornes, M., Frijters, A., Pot, J., Peleman, J., Kuiper, M., Zabeau, M. 1995. AFLP: A new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research* 23: 4407-4414.
- Welsh, J., McClelland, M. 1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Research* 18: 7213-7218.
- West, E. 1947. *Sclerotium rolfsii* Sacc. and its perfect stage on climbing fig. *Phytopathology* 37: 67-69.
- Williams, J. G., Kubelik, A. R., Livak, K. J., Rafalski, L. A., Tingey, S. D. 1990. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research* 18: 6531-6535.
- Worral, J. J. 1997. Somatic Incompatibility in Basidiomycetes. *Mycologia* 89: 24-36.
- Yaqub, F., Shahzad, S. 2005. Pathogenicity of *Sclerotium rolfsii* on different crops and effect of inoculum density on colonization of mungbean and sunflower roots. *Pakistan Journal of Botany* 37: 175-180.

Zeidan, O., Elad, Y., Hadar, Y., Chet, I. 1986. Integrating onion in crop rotation to control *Sclerotium rolfsii*. Plant Disease 70: 426-428.

Zeven, A. C., Wet, J. M. J. 1982. Dictionary of cultivated plants and their regions of diversity: Excluding Most Ornamentals, Forest Trees and Lower Plants. Centre for Agricultural Publishing and Documentation, Wageningen, Países Bajos. 263 pp.