



TESIS DOCTORAL

“Estudio de la interacción de *Fusarium* spp. con cultivares de garbanzo (*Cicer arietinum* L.) asociados a la Fusariosis Vascular mediante técnicas biotecnológicas”

DANIEL JIMÉNEZ FERNÁNDEZ

**DIRECTORES: Dra. BLANCA B. LANDA DEL CASTILLO
Dr. JUAN A. NAVAS CORTÉS**

Córdoba, Enero de 2011

TITULO: *Estudio de la interacción de Fusarium spp. con cultivares de garbanzo (Cicer arietinum L.) asociados a la Fusariosis Vascular mediante técnicas biotecnológicas*

AUTOR: *Daniel Jiménez Fernández*

© Edita: Servicio de Publicaciones de la Universidad de Córdoba. 2011
Campus de Rabanales
Ctra. Nacional IV, Km. 396
14071 Córdoba

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

ISBN-13: 978-84-694-1654-9



“Estudio de la interacción de *Fusarium spp.* con cultivares de garbanzo (*Cicer arietinum* L.) asociados a la Fusariosis Vascular mediante técnicas biotecnológicas”

Memoria redactada para optar al grado de Doctor por la Universidad de Córdoba, por el Licenciado en Bioquímica:

Daniel Jiménez Fernández

Visto Bueno:

Los Directores de la Tesis

Dra. Blanca B. Landa del Castillo
Investigadora Científica
Instituto de Agricultura Sostenible, CSIC

El Tutor de la Tesis

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

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

Córdoba, Enero de 2011

Dña. **BLANCA B. LANDA DEL CASTILLO**, Investigadora Científica del Departamento de Protección de Cultivos, Instituto de Agricultura Sostenible, CSIC y D. **JUAN A. NAVAS CORTÉS**, Investigador Científico del Departamento de Protección de Cultivos, Instituto de Agricultura Sostenible, CSIC, directores de la presente Tesis Doctoral

INFORMAN: Que el trabajo **“Estudio de la interacción de *Fusarium* spp. con cultivares de garbanzo (*Cicer arietinum* L.) asociados a la Fusariosis Vascular mediante técnicas biotecnológicas”**, que ha llevado a cabo el Licenciado en Bioquímica por la Facultad de Ciencias de Granada D. Daniel Jiménez Fernández bajo nuestra dirección, lo consideramos ya finalizado y puede ser presentado para su exposición y defensa como Tesis Doctoral en la Universidad de Córdoba.

Córdoba, Enero de 2011



Dra. Blanca B. Landa del Castillo
Investigadora Científica
Instituto de Agricultura Sostenible, CSIC



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

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

INFORMA: Que el trabajo **“Estudio de la interacción de *Fusarium* spp. con cultivares de garbanzo (*Cicer arietinum* L.) asociados a la Fusariosis Vascular mediante técnicas biotecnológicas”**, que ha llevado a cabo el Licenciado en Bioquímica D. Daniel Jiménez Fernández bajo la dirección de la Dra. Blanca B. Landa del Castillo, Investigadora Científica del Departamento de Protección de Cultivos del Instituto de Agricultura Sostenible, CSIC, y el Dr. Juan A. Navas Cortés, Investigador Científico del Departamento de Protección de Cultivos, Instituto de Agricultura Sostenible, CSIC, y que ha sido realizada bajo mi tutoría puede ser presentada para su exposición y defensa como Tesis Doctoral en el Departamento de Agronomía de la Universidad de Córdoba.

Córdoba, Enero de 2011



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



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 una beca predoctoral en el marco del Proyecto de Excelencia AGR00580 de la Consejería de Innovación, Ciencia y Empresa de la Junta de Andalucía. Los Proyectos de Investigación AGR00580 **“Mecanismos moleculares en las Interacciones planta-patógeno de la Fusariosis vascular del garbanzo, como sistema modelo de las Marchiteces vasculares de cultivos Agrícolas”** concedido por la Consejería de Innovación, Ciencia y Empresa de la Junta de Andalucía y el Proyecto Intramural PI2007-40I012 **“Cambios en la diversidad genética y patogénica de poblaciones de hongos fitopatógenos causantes de Marchiteces Vasculares y de la microflora rizosférica asociados al uso de genotipos de la planta huésped que difieren en resistencia a la enfermedad”** concedido por el Consejo Superior de Investigaciones Científicas, han financiado la realización del mismo.

Córdoba, Enero de 2011

A mis padres

“Sólo viven aquellos que luchan”

Victor Hugo

AGRADECIMIENTOS

Si bien la presente Tesis Doctoral ha requerido un gran esfuerzo y una intensa dedicación no hubiese sido posible su elaboración y finalización sin la cooperación de todas y cada una de las personas que a continuación citaré y muchas de las cuales han sido un soporte muy fuerte en los momentos más duros y difíciles.

En primer lugar agradecer a mis directores de Tesis Doctoral, Dra. Blanca B. Landa del Castillo y Dr. Juan A. Navas Cortés, por brindarme su colaboración, paciencia, apoyo, por contagiarme la apología por el buen trabajo y su constante aliento por la investigación; sin su implicación, orientación y supervisión en el día a día, así como en la redacción del presente manuscrito, esta investigación no hubiese tenido lugar.

Al tutor de la presente Tesis Doctoral, Prof. D. Rafael M. Jiménez Díaz, por sus sabios consejos, orientaciones y participación en la elaboración de los trabajos publicados y del manuscrito de Tesis Doctoral, por ser una fuente de conocimiento ilimitado y permanente de la que siempre se desea aprender.

Al Dr. Enrique Quesada Moraga, el responsable de que se iniciase este camino en el fascinante mundo de la Fitopatología, por haberme facilitado el contacto con el grupo AGR-136, por su amistad, consejos y buen hacer, por su apoyo desinteresado para que todo fuese un poco más fácil.

Al Dr. Pablo Castillo, por su aliento, por tener siempre una bella palabra y un oportuno consejo, por transmitir e inculcar su afición por el trabajo, su perseverancia y determinación.

A Gema, Conchi, Efrén y Sergio, por su incalculable ayuda dentro y fuera del trabajo, por su amistad, por tener siempre una palabra de consuelo y un soplo de aliento, por los gratos momentos compartidos durante estos años. Gracias por aguantar mis malos momentos y revertirlos en ganas de aprender y trabajar.

A José Luís, Carlos Lucena, Fran, Guille, Juan Emilio, Miguel, Carolina, Rocío, Carlos Guti, Jorge, Vitillos, Esther, Toñi y Cristina por su incalculable ayuda y apoyo, por su participación y colaboración directa o indirecta en el presente trabajo, por compartir esta etapa de mi vida.

A toda mi familia en general, destacando a mis hermanos por su paciencia y comprensión ante la difícil situación que hemos tenido que afrontar, y en particular a mi madre, por todo su amor, fuerza de voluntad y ganas de superación que me han servido para sustentar los malos momentos, por ser la persona que ha apostado con más ahínco por mi formación académica, sin su perseverancia este trabajo no habría tenido lugar. Gracias mamá por todo.

En especial a mi padre, por ser mi guía, mi inspiración, mis ganas de superación, por tu cariño incondicional, por tu autenticidad, de ti aprendí que no vale todo en esta vida y que la dignidad es un cimiento firme sobre el que sentirse seguro y al que no todos aspiran. Gracias por todo lo que has representado y representarás en mi vida. Siempre te tendré presente, siempre...

BIOGRAFÍA

Daniel Jiménez Fernández nació el 13 de mayo de 1975 en Granada. Cursó sus estudios de E.G.B en el Colegio Público “Gran Capitán” en Íllora (Granada). Posteriormente continuó con su formación académica realizando B.U.P. y C.O.U. en el Instituto “Diego de Siloé” en Illora.

En Septiembre de 1994-1995 inició sus estudios universitarios de Bioquímica en la Facultad de Ciencias de Granada, finalizando los mismos en junio del 1999-2000.

En abril de 2006 inició la realización de la beca predoctoral en el Grupo de Sanidad Vegetal AGR136 del Dpto. de Agronomía de la Universidad de Córdoba y el Departamento de Protección de Cultivos del Instituto de Agricultura Sostenible de Córdoba gracias al Proyecto de Excelencia AGR00580 de la Consejería de Innovación, Ciencia y Empresa de la Junta de Andalucía. Durante este periodo ha participado en diferentes congresos nacionales e internacionales mediante la exposición de distintas comunicaciones orales y paneles, así como en la publicación de varios trabajos en revistas incluidas en el SCI y en la elaboración de una patente. Asimismo durante estos años le fueron concedidas dos estancias en centros de investigación en el extranjero (EEUU e Italia)

RESUMEN

Fusarium constituye un género amplio y complejo de hongos causante de una gran variedad de enfermedades de plantas, produce numerosas micotoxinas y se está convirtiendo en un importante patógeno humano. En el caso concreto de la Fitopatología, la identificación errónea de ciertas especies patogénicas morfológicamente similares englobadas en este género está ocurriendo en distintos laboratorios del mundo debido a la falta de micólogos con suficiente formación en taxonomía de este género. Este hecho ha ocurrido históricamente entre *Fusarium oxysporum* y *Fusarium redolens*, de ahí la necesidad de la utilización de nuevas tecnologías que nos permitan diferenciar inequívocamente a estas dos especies patogénicas, sobre todo cuando pueden coexistir en una misma región geográfica e inducir síntomas similares en un mismo cultivo. A su vez, *F. oxysporum* representa un complejo muy diverso de hongos anamórficos morfológicamente similares con múltiples orígenes filogenéticos. Este complejo de especies se encuentra bien representado entre las comunidades fúngicas en diferentes tipos de suelo en el mundo y se consideran miembros comunes de las comunidades fúngicas en la rizosfera de plantas, pudiendo además algunos aislados de este complejo de especies causar enfermedades devastadoras incluyendo Marchiteces y Podredumbres Radicales en gran número de cultivos de gran importancia económica. En el caso concreto del cultivo del garbanzo, la Fusariosis Vascular causada por *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* es la enfermedad más importante de las originadas por patógenos habitantes del suelo, la cual limita la producción de esta leguminosa en el mundo entero. *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* muestra una gran variabilidad patogénica con ocho razas patogénicas descritas hasta la fecha (razas 0, 1A, 1B/C, 2, 3, 4, 5 y 6) englobadas dentro de los patotipos de Amarillez (0 y 1B/C) y Marchitez (1A, 2, 3, 4, 5 y 6), variabilidad que puede limitar la efectividad y el empleo extensivo de la medida de control más práctica y económicamente eficiente para el manejo de la enfermedad, como es la utilización de cultivares resistentes a la misma.

Por todo lo anteriormente expuesto, el objetivo general de esta Tesis Doctoral se centra en **adquirir nuevos conocimientos en la Ecología Microbiana y Fitopatología de poblaciones de *Fusarium* spp. patogénicas y no patogénicas asociadas al cultivo de garbanzo que contribuyan al manejo eficiente de la Fusariosis Vascular en este cultivo.**

En primer lugar, en el Capítulo II de esta Tesis Doctoral se cita por primera vez en la literatura científica la asociación de *F. redolens* como patógeno de garbanzo mostrando síntomas similares a los de Fusariosis Vascular en Líbano, Pakistán, Marruecos y España, y se caracterizan molecular y patogénicamente diferentes aislados del patógeno obtenidos de plantas de garbanzo de distintos orígenes geográficos. Todos los aislados de *F. redolens* mostraron patrones de Polimorfismo en la Longitud de los Fragmentos de Restricción (RFLP) de la región del Espaciador Intergénico Ribosomal (IGS) idénticos cuando se llevó a cabo la digestión con siete enzimas de restricción diferentes. En un análisis de Máxima Parsimonia utilizando el gen del Factor de Elongación y Traducción 1 α (TEF-1 α) todos los aislados de *F. redolens* de garbanzo se agruparon en el mismo clado, dentro del cual se pudieron identificar diferentes subclados. Estos subclados no estuvieron asociados con las distintas *formae speciales* descritas dentro de *F. redolens*, huésped ni origen geográfico de los aislados. Los ensayos de patogenicidad utilizando tres cultivares de garbanzo y siete aislados de *F. redolens* de diferente origen geográfico indicó que este patógeno es moderadamente virulento en garbanzo. Además la infección por el patógeno induce síntomas similares a aquéllos originados por el patotipo de Amarillez de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris*, incluyendo el amarillamiento y necrosis foliar desarrollado en progresión acrópeta desde la base del tallo y senescencia prematura de la planta, y, como característica diferencial, la ausencia de decoloración vascular. Asimismo, se observaron lesiones necróticas en la raíz principal, necrosis en las raíces laterales y, ocasionalmente, necrosis cortical del cuello de plantas infectadas. Por otro lado, ya que *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* y *F. redolens* no son fácilmente distinguibles utilizando métodos de diagnóstico basados en su morfología y además pueden inducir síntomas similares en plantas de garbanzo infectadas, nuestros resultados enfatizan la necesidad de ser especialmente cuidadoso para evitar el diagnóstico erróneo de la Amarillez causada por *Fusarium* spp. en garbanzo y en otros cultivos, como ha sucedido en el pasado, mediante el empleo de protocolos

moleculares disponibles en la actualidad que permiten la diferenciación inequívoca de estos dos patógenos.

Como se ha mencionado anteriormente, las poblaciones de *F. oxysporum* habitan el suelo y la rizosfera de las plantas, y son de gran importancia para estudios de Ecología Microbiana y Fitopatología, de ahí que en el Capítulo III de esta Tesis Doctoral nos planteamos identificar y cuantificar con exactitud la ocurrencia y densidad de población de aislados de *F. oxysporum* mediante el desarrollo de un protocolo de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)-específica mejorado para la identificación del complejo de especies de *F. oxysporum* y su conversión en un protocolo de PCR Cuantitativa en Tiempo Real (qPCR) que permitió la cuantificación de hasta 1 pg de ADN del hongo en suelo y diferentes tejidos de la planta. La eficiencia de amplificación, sensibilidad y reproducibilidad de los ensayos de qPCR no se vieron influenciados por la presencia de ADN no diana tanto de distintas plantas y tejidos como de suelo. La aplicabilidad del nuevo protocolo recién desarrollado para estudios de biología de poblaciones de *F. oxysporum* se demostró utilizando el mismo para la cuantificación de este hongo en diferentes muestras medioambientales complejas. El empleo del protocolo de qPCR permitió cuantificar con exactitud hasta 25 pg de ADN de *F. oxysporum*/g de suelo naturalmente infestado, así como identificar diferencias significativas en la cantidad de ADN de *F. oxysporum* en raíces de diferentes cultivares de garbanzo que crecieron en una parcela infestada con diversas poblaciones de *F. oxysporum* patogénicas y no patogénicas. Este protocolo de qPCR puede ser especialmente útil para estudios de Ecología Microbiana y Fitopatología ya que proporciona una nueva oportunidad para analizar poblaciones de *F. oxysporum* y sus interacciones con la microflora del suelo, medioambiente y genotipos de planta huésped.

Asimismo, como se ha referido anteriormente, la Fusariosis Vascular del garbanzo causada por *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* constituye una enfermedad devastadora de este cultivo cuyo manejo se basa fundamentalmente en la evaluación del riesgo de enfermedad y la utilización de cultivares resistentes. Un método fiable para la detección y cuantificación de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* en suelo y tejidos de garbanzo contribuiría en gran medida a la aplicación de estas estrategias de manejo de la enfermedad. En el Capítulo IV de la Tesis Doctoral, se desarrolló un protocolo de qPCR que permite cuantificar hasta 1 pg de ADN de *F.*

oxysporum f. sp. *ciceris* en suelo, así como en la raíz y en el tallo de la planta. El protocolo de qPCR permitió cuantificar niveles de inóculo de hasta 45 unidades formadoras de colonia de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris*/g de suelo procedente de una parcela experimental infestada con diversas razas del patógeno. Además, el protocolo permitió distinguir claramente reacciones del huésped susceptibles y resistentes al patógeno a los 15 días después de la siembra en un suelo artificialmente infestado, así como diferencias en la virulencia entre dos razas de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris*. Asimismo, el protocolo detectó infecciones radicales asintomáticas tempranas e identificó diferencias significativas en el nivel de resistencia de 12 cultivares de garbanzo que crecieron en la parcela experimental referida. La utilización de este protocolo para la cuantificación rápida, precisa y económica de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* en tejidos de garbanzo asintomáticos en las fases iniciales del proceso de infección puede ser de gran valor para los programas de mejora de germoplasma de garbanzo y para estudios epidemiológicos de la enfermedad en cámaras de crecimiento, invernaderos y parcelas experimentales.

Finalmente, el conocimiento de los procesos de infección y colonización de hongos fitopatógenos causantes de Marchitez Vasculares puede ser de gran valor para el diseño de medidas de control eficientes. En particular en el Capítulo V de esta Tesis Doctoral se aborda la caracterización del proceso de patogénesis por razas de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* de la planta de garbanzo, para las que la información disponible es incompleta y fragmentaria. Para ello, se ha estudiado el proceso de infección y colonización de las razas 0 y 5 de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris*, representativas de los patotipos de Amarillez y Marchitez, respectivamente, en tres cultivares de garbanzo (P-2245, JG-62 y WR-315), con resistencia diferencial a dichas razas. Para ello, se seleccionaron aislados de cada raza transformados genéticamente con la proteína autofluorescente ZsGreen, estables en cuanto a sus características de crecimiento, patogenicidad y virulencia en comparación a los aislados silvestres. Inicialmente, y para la diferentes combinaciones experimentales de cultivar/raza de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris*, el hongo coloniza la superficie de la raíz formando grupos de hifas en el ápice y zona de elongación que actúan como sitio preferente de penetración. Posteriormente, en combinaciones compatibles (cv. P-2245/*F. oxysporum* f. sp. *ciceris* razas 0 y 5, y cv. JG-62/*F. oxysporum* f. sp. *ciceris* raza 5) el patógeno coloniza extensamente los espacios intercelulares del córtex de la zonas de elongación e inferior de la raíz

alcanzando los haces vasculares del xilema a los 6 días después de la inoculación (ddi) en la combinación cv. P-2245/*F. oxysporum* f. sp. *ciceris* raza 5, y 2 días más tarde en el resto de combinaciones. Una vez en el xilema, el patógeno progresa en el eje vertical de la planta a través del mismo hasta alcanzar los tejidos vasculares del tallo de los cvs. P-2245 y JG-62 a los 8 ddi para la raza 5 y 2 días más tarde para la raza 0 coincidiendo con la expresión de síntomas de la enfermedad. En combinaciones incompatibles (cv. JG-62/*F. oxysporum* f. sp. *ciceris* raza 0, cv. WR-315/*F. oxysporum* f. sp. *ciceris* razas 0 y 5) las plantas permanecieron libres de síntomas a pesar de que *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* raza 0 invadió y colonizó extensamente los haces del xilema de raíz y tallo, aunque únicamente en el cv. JG-62, y más lentamente y con menor intensidad a la alcanzada en interacciones compatibles. Por el contrario, para el cv. WR-315, el patógeno quedó restringido a los espacios intercelulares del córtex de la raíz sin invasión del xilema para *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* raza 0, aunque la raza 5 si alcanzó éste progresando verticalmente, aunque sólo hasta el hipocotilo. La información generada en la presente Tesis Doctoral será de gran interés para la adecuada caracterización de cultivares y líneas de garbanzo resistentes en programas de Mejora genética, así como para determinar el modo de acción y nivel de eficacia de medidas de control de naturaleza química o biológica.

SUMMARY

Fusarium is a large, complex genus that causes a wide variety of plant diseases, produces several mycotoxins and is becoming increasingly recognized as a significant human pathogen. In Plant Pathology, the misidentification of several morphologically-similar pathogenic species belonging to this genus has increased recently due to the lack of micologists with adequate experience in *Fusarium* taxonomy in different laboratories worldwide. This missidentification has occurred in the past between *Fusarium oxysporum* and *Fusarium redolens*. Therefore is necessary the use of new technologies that can assist in the unambiguously identification of these two *Fusarium* pathogenic species, mainly when they can coexist in the same geographical region and induce similar symptoms in the same crop. *Fusarium oxysporum* is a large, highly diverse complex of morphologically similar anamorphic fungi with multiple phylogenetic origins. This species complex is well represented among fungal communities in different soil types worldwide, and a common member of the fungal communities in the plant rhizosphere, causing devastating wilts and root rots diseases on a large number of crop plants of high economical importance. In chickpeas, Fusarium wilt caused by *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* is the most important soil-borne disease limiting chickpea production worldwide. *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* exhibits significant pathogenic variability. Eight races of the pathogen (namely races 0, 1A, 1B/C, 2, 3, 4, 5, and 6) have been described to date, which can be grouped into the wilting (races 1A, 2, 3, 4, 5, and 6) and yellowing (races 0 and 1 B/C) pathotypes, which can limit the effectiveness and extensive use of the most practical and economically efficient control measure for management of Fusarium wilt, i.e., the use of resistant cultivars.

In consequence, the main aim of this PhD Thesis was **to achieve new knowledge in Microbial Ecology and Phytopathology of pathogenic and non-pathogenic *Fusarium* spp. populations associated to chickpea crop that can contribute to the efficient management of Fusarium wilt of chickpea.**

Firstly, in Chapter II of this PhD Thesis we reported for the first time the association of *Fusarium redolens* with Fusarium wilt-like symptoms in chickpeas in Lebanon, Morocco, Pakistan, and Spain, together with the molecular and pathogenic characterization of isolates of the pathogen from chickpeas of diverse

geographic origin. All *F. redolens* isolates showed identical Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) of the Ribosomal Intergenic Spacer Region (IGS) pattern when digested with seven restriction enzymes. Maximum Parsimony analysis of sequences of the Translation Elongation Factor 1 α (TEF-1 α) gene grouped all *F. redolens* isolates from chickpea in same main clade, within which several subclades were identified. These subclades were related neither with the different *formae speciales* described in *F. redolens*, nor host source or geographical origin of isolates. Pathogenicity assays using three chickpea cultivars and seven isolates from different geographic origin indicated that *F. redolens* is mildly virulent on chickpea. Moreover, infection of chickpeas by *F. redolens* induces a disease syndrome similar to that caused by the yellowing pathotype of *F. oxysporum* f. sp. *ciceris*, including leaf yellowing and necrosis that develop upward from the stem base, and premature senescence of the plant. As a difference, *F. redolens* does not cause discoloration of the vascular tissues in chickpeas, rather, brown necrotic lesions in the tap root, necrosis of lateral roots, and occasionally collar stem necrosis develop on infected plants. On the other hand, since *F. redolens* is not easily differentiated from *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* using morphology-based diagnoses, and the two species cause similar symptoms on chickpeas, we reported for the need to take specially care to avoid misdiagnoses of Fusarium yellows in chickpeas as well as in other crops, as it has happened in the past, by the use of currently available molecular protocols for differentiating between these two pathogens that may help in the accurate diagnoses of Fusarium yellows in chickpeas and in other crops.

As we mentioned above, *F. oxysporum* populations inhabit soil and plant rhizosphere niches, and are of importance for soil Microbial Ecology and Plant Pathology; consequently, in Chapter III of this PhD Thesis we aimed to identify and quantify accurately the occurrence and population density of *F. oxysporum* isolates by the development of an improved Polymerase Chain Reaction (PCR) protocol for the specific identification of the *F. oxysporum* species complex and its conversion into a quantitative real-time PCR (qPCR) assay, that allowed the quantification up to 1 pg of the fungus DNA in soil and different plant tissues. The amplification efficiency, sensibility and reproducibility of qPCR assays were not influenced by presence of non-target DNA from either different plant sources or soil. The applicability of the newly developed qPCR protocol for *F. oxysporum* population studies was demonstrated using the technique for quantifying the

fungus in different complex environmental samples. The use of the qPCR protocol allowed to accurately quantify up to 25 pg of *F. oxysporum*/g of naturally infested field soil, as well as to identify significant differences in the amount of *F. oxysporum* DNA in roots of different chickpea cultivars grown in a field soil infested with diverse pathogenic and nonpathogenic *F. oxysporum* populations. This qPCR protocol may be especially important for studies on soil Microbial Ecology and Plant Pathology since it provides a new opportunity for analyzing *F. oxysporum* populations and their interactions with the soil microflora, environment and plant host genotypes.

In the same way, as was previously mentioned, Fusarium wilt of chickpea caused by *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* is a devastating disease of the crop, which can be managed by risk assessment and the use of resistant cultivars. Thus, a reliable method for the detection and quantification of *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* in soil and chickpea tissues would contribute much to implementation of those disease management strategies. Thus, in Chapter IV of this PhD Thesis we developed a qPCR protocol that allows quantifying *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* DNA down to 1 pg in soil, as well as in the plant root and stem. Use of the qPCR protocol allowed quantifying as low as 45 colony forming units of *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* per gram of soil from a field plot infested with several races of the pathogen. Moreover, the qPCR protocol clearly differentiated susceptible from resistant chickpea reactions to the pathogen at 15 days after sowing in artificially infested soil, as well as the degree of virulence between two *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* races. Also, the protocol detected early asymptomatic root infections and distinguished significant differences in the level of resistance of 12 chickpea cultivars that grew in a field plot infested with several races of the pathogen. Use of this protocol for fast, reliable, and cost-effective quantification of *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* in asymptomatic chickpea tissues at early stages of the infection process can be of great value for chickpea breeders and for epidemiological studies in growth chambers, greenhouses and field-scale plots.

Finally, knowledge of the infection process of soil-borne vascular fungal pathogens would be of great value for the proper design of management measures. In the Fusarium wilt of chickpea pathosystem, although previously reported, the information available is scarce and fragmentary. Therefore Chapter V of this PhD Thesis was focused in the qualitative and quantitative

characterization of the infection and colonization process of *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* in susceptible and resistant chickpea cultivars using confocal laser microscopy. Two ZsGreen fluorescent protein-expressing isolates of the fungus representative of the yellowing (race 0) and wilting (race 5) pathotypes were inoculated in three chickpea cultivars (P-2245, JG-62 and WR-315) selected based on their differential disease reaction to *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* races 0 and 5. Selected ZsGreen-tagged *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* isolates showed no differences on growth rate, pathogenicity and virulence compared to wild-type isolates. Initially, and for the different experimental combinations of chickpea cultivar/*F. oxysporum* f. sp. *ciceris* race, the fungus colonize the root surface assembling hyphal groups at the apex and elongation zone, which act as a preferential infection site. Later on, in compatible interactions (cv. P-2245/*F. oxysporum* f. sp. *ciceris* races 0 and 5, and cv. JG-62/*F. oxysporum* f. sp. *ciceris* race 5) the pathogen extensively colonized the intercellular spaces of root cortex tissue at the elongation and lower zone reaching the vascular elements of xylem by 6 days after inoculation (dai) for the interaction P-2245/*F. oxysporum* f. sp. *ciceris* race 5 and 2 days later in the remaining combinations. Once into xylem tissues, the pathogen progressed through the vertical axis of the plant reaching the stem xylem vessels of chickpea cv. P-2245 by 8 dai for *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* race 5, and 2 days later for race 0 at time of first disease symptoms appearance on infected plants. In incompatible interactions (cv. JG-62/*F. oxysporum* f. sp. *ciceris* race 0, cv. WR-315/*F. oxysporum* f. sp. *ciceris* races 0 and 5), chickpea plants remained free of disease symptoms, in spite of *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* race 0 extensively invaded and colonized xylem vessels of the root and lower stem, although less faster and at lower intensity than that of compatible interactions. On the contrary, for the cv. WR-315, the pathogen was restricted to the intercellular spaces of radical cortex tissues without xylem invasion for *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* race 0, but reaching and progressing through the vascular system up to the hypocotyl for *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* race 5. Information obtained in this PhD Thesis will be of great interest for the proper characterization of resistant cultivars and chickpea lines in breeding programs and to determine the mode of action and level of efficiency of disease management measures, of either chemical or biological nature.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

CAPITULO I. INTRODUCCIÓN GENERAL Y OBJETIVOS.....	1
I.1. INTRODUCCIÓN GENERAL	3
I.1.1. EL CULTIVO DEL GARBANZO	3
I.1.1.1. Introducción	3
I.1.1.2. Origen y distribución geográfica	4
I.1.1.3. Superficie, producción y rendimientos	5
I.1.1.4. Ecología del cultivo	5
I.1.1.5. Enfermedades del cultivo	6
I.1.2. LA FUSARIOSIS VASCULAR DEL GARBANZO	7
I.1.2.1. El complejo de enfermedades Marchitez y Podredumbre de raíz	7
I.1.2.2. Importancia y distribución geográfica de la Fusariosis Vascular del garbanzo	7
I.1.2.3. Sintomatología	8
I.1.2.4. Biología del agente y patogénesis	10
I.1.2.5. Variabilidad patogénica de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>ciceris</i> ...	11
I.1.2.6. Identificación de razas patogénicas de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>ciceris</i> : Pruebas de patogenicidad	14
I.1.2.7. Control de la Fusariosis Vascular del garbanzo mediante cultivares resistentes	16
I.1.3. UTILIZACIÓN DE HERRAMIENTAS BIOTECNOLÓGICAS EN EL ESTUDIO DE POBLACIONES DE <i>Fusarium</i> spp. y <i>F. oxysporum</i>	18
I.1.3.1. Técnicas basadas en la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).....	18
I.1.3.1.1. Introducción.....	18
I.1.3.1.2. Aplicación de técnicas basadas en la PCR a la identificación y caracterización de la diversidad genética en el género <i>Fusarium</i> y la especie <i>Fusarium oxysporum</i>	25
I.1.3.1.3. Aplicación de técnicas basadas en la PCR a la identificación y caracterización de la diversidad genética de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>ciceris</i>	33
I.1.3.1.4. Aplicación de técnicas basadas en la qPCR a la identificación y cuantificación de ADN de <i>Fusarium</i> spp. y de <i>formae speciales</i> dentro de la especie <i>Fusarium oxysporum</i>	37
I.1.3.2. Técnicas basadas en microscopía convencional y confocal	40
I.1.3.2.1. Introducción	40
I.1.3.2.2. La microscopía “ <i>sensu lato</i> ” en el estudio de la interacción <i>Fusarium</i> spp./garbanzo	42

I.1.3.2.3. La microscopía confocal en el estudio de la interacción <i>Fusarium oxysporum</i> /planta huésped	45
I.1.3.3. Otras técnicas aplicadas al estudio de procesos relacionados con los mecanismos defensa y patogénesis en la interacción <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>ciceris</i> /garbanzo	48
I.2. NATURALEZA DE LA INVESTIGACIÓN PLANTEADA Y OBJETIVOS	53
CAPITULO II. CARACTERIZACIÓN MOLECULAR Y PATOGENICA DE <i>Fusarium redolens</i>, UN NUEVO AGENTE CAUSANTE DE “Fusarium yellows” EN GARBANZO	57
II.1. RESUMEN	59
II.2. INTRODUCCIÓN	60
II.3. MATERIALES Y MÉTODOS	63
II.3.1. Aislados de <i>Fusarium</i> spp. de cultivos de garbanzo	63
II.3.2. Crecimiento fúngico y extracción de ADN	65
II.3.3. Caracterización molecular de aislados de <i>Fusarium</i> spp	65
II.3.4. Ensayo de patogenicidad	69
II.3.5. Evaluación de la enfermedad y análisis de datos	70
II.4. RESULTADOS	71
II.4.1. Caracterización molecular de los aislados <i>Fusarium</i> spp	71
II.4.2. Caracterización patogénica de los aislados de <i>Fusarium redolens</i> ...	78
II.5. DISCUSIÓN	86
II.6. LITERATURA CITADA	92
CAPITULO III. IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE <i>Fusarium oxysporum</i> EN PLANTA Y SUELO MEDIANTE PROTOCOLOS DE PCR ESPECÍFICA MEJORADO Y CUANTITATIVA EN TIEMPO REAL (qPCR).....	97
III.1. RESUMEN	99
III.2. INTRODUCCIÓN	100
III.3. MATERIALES Y MÉTODOS	104
III.3.1. Aislados del hongo	104
III.3.2. Muestras de tejido vegetal	106
III.3.3. Extracción de ADN y cuantificación	106
III.3.4. Secuenciación del ADN	107
III.3.5. Optimización del protocolo PCR-específica de <i>Fusarium oxysporum</i>	107
III.3.6. Curvas estándar de ADN para qPCR	108

III.3.7. Optimización, reproducibilidad y sensibilidad del protocolo de PCR recién desarrollado.....	108
III.3.8. Aplicación del protocolo de qPCR a estudios de Ecología Microbiana del suelo	109
III.3.9. Análisis de datos.....	112
III.4. RESULTADOS	113
III.4.1. Optimización del ensayo de PCR específica de <i>F. oxysporum</i>	113
III.4.2. Desarrollo del ensayo de qPCR	116
III.4.3. Aplicación del protocolo de qPCR para estudios de Ecología Microbiana del suelo	122
III.5. DISCUSIÓN	126
III.6. LITERATURA CITADA	131
CAPITULO IV. CUANTIFICACIÓN DE <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>ciceris</i> EN PLANTA Y SUELO, Y EVALUACIÓN DE RESISTENCIA EN GERMOPLASMA DE GARBANZO A LA FUSARIOSIS VASCULAR MEDIANTE UN NUEVO PROTOCOLO DE PCR CUANTITATIVA EN TIEMPO REAL (qPCR)	137
IV.1. RESUMEN	139
IV.2. INTRODUCCIÓN	140
IV.3. MATERIALES Y MÉTODOS	144
IV.3.1. Aislados del patógeno y condiciones de cultivo	144
IV.3.2. Material vegetal de garbanzo	146
IV.3.3. Extracción y cuantificación de ADN, y desarrollo de curvas estándar de ADN	147
IV.3.4. Diseño de iniciadores y desarrollo del protocolo de PCR específica de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>ciceris</i>	148
IV.3.5. Optimización, reproducibilidad y sensibilidad del protocolo de qPCR recién desarrollado	149
IV.3.6. Evaluación de la resistencia de la planta de garbanzo y de la virulencia de los aislados de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>ciceris</i> utilizando el protocolo de qPCR	150
IV.3.7. Cuantificación de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>ciceris</i> en suelo mediante el protocolo de qPCR	153
IV.3.8. Análisis de datos.....	154
IV.4. RESULTADOS.....	155
IV.4.1. Diseño de un nuevo protocolo de PCR específico para <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>ciceris</i>	155
IV.4.2. Optimización del protocolo de qPCR específico para <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>ciceris</i>	157
IV.4.3. Utilización del protocolo de qPCR desarrollado para la evaluación de resistencia de cultivares de garbanzo y estudios de biología de poblaciones de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>ciceris</i>	160

IV.4.4. Cuantificación de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>ciceris</i> en suelo mediante qPCR	165
IV.5. DISCUSIÓN	168
IV.6. LITERATURA CITADA	173
CAPITULO V. CARACTERIZACIÓN CUALITATIVA Y CUANTITATIVA DEL PROCESO DE INFECCIÓN EN EL PATOSISTEMA <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>ciceris</i>/GARBANZO EN INTERACCIONES COMPATIBLES E INCOMPATIBLES MEDIANTE LA APLICACIÓN DE MICROSCOPIA LÁSER CONFOCAL	179
V.1. RESUMEN	181
V.2. INTRODUCCIÓN	182
V.3. MATERIALES Y MÉTODOS	186
V.3.1. Crecimiento, conservación y transformación genética de aislados de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>ciceris</i>	186
V.3.2. Caracterización de aislados de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>ciceris</i> transformados	187
V.3.3. Estudio del proceso de patogénesis en combinaciones compatibles e incompatibles mediante microscopía láser confocal	188
V.3.4. Microscopía láser confocal	190
V.3.5. Análisis de datos	191
V.4. RESULTADOS	192
V.4.1. Caracterización de aislados de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>ciceris</i> transformados	192
V.4.2. Proceso de infección y colonización de cultivares con resistencia diferencial a las razas 0 y 5 de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>ciceris</i> .	194
V.4.3. Cuantificación de la colonización de cultivares de garbanzo con resistencia diferencial a las razas 0 y 5 de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>ciceris</i>	199
V.5. DISCUSIÓN	204
V.6. LITERATURA CITADA	211
CAPITULO VI. DISCUSIÓN GENERAL Y CONCLUSIONES	217
VI.1. DISCUSIÓN GENERAL	219
VI.2. CONCLUSIONES	229
CAPITULO VII. BIBLIOGRAFÍA GENERAL	231

INDICE DE FIGURAS

CAPITULO I. INTRODUCCIÓN GENERAL Y OBJETIVOS	1
Fig. I.1 Distribución mundial de la Fusariosis Vascular del garbanzo causada por <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>ciceris</i>	8
Fig. I.2 Síndromes desarrollados por <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>ciceris</i> sobre cultivares de garbanzo susceptibles. (A) Control, (B) Síndrome de Amarillez Vascular, (C) Síndrome de Marchitez Vascular.....	9
Fig. I.3 Variabilidad de razas patogénicas de las poblaciones de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>ciceris</i> y su distribución mundial.....	14
Fig. I.4 Esquema de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).....	19
Fig. I.5 A. Curvas de amplificación de una dilución seriada de ADN conteniendo 10 ng – 0,1 pg de ADN diana. B. Recta patrón obtenida a partir de las concentraciones de los controles externos de la curva patrón y sus correspondientes valores de C_T	21
Fig. I.6 Análisis de la curva de melting	22
Fig. I.7 Mecanismos de acción de los principales agentes químicos empleados en la detección de fluorescencia en la qPCR	23
CAPITULO II. CARACTERIZACIÓN MOLECULAR Y PATOGENICA DE <i>Fusarium redolens</i>, UN NUEVO AGENTE CAUSANTE DE “Fusarium yellows” EN GARBANZO	57
Fig. II.1 Electroforesis en gel de los amplicones de ADN de los ensayos de PCR utilizando: (A) iniciadores LR3 y CS33; (B) iniciadores específicos de <i>Fusarium oxysporum</i> ; (C) iniciadores específicos de <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>ciceris</i> Foc0-12f y Foc0-12r.....	72
Fig. II.2 Electroforesis en gel resultante de los amplicones de la región Espaciadora Intergénica (IGS) tras la digestión con enzimas de restricción .	74
Fig. II.3 Filograma de máxima parsimonia inferido de las secuencias del gen TEF-1 α de <i>Fusarium redolens</i> , <i>F. oxysporum</i> , <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>ciceris</i> y otros aislados de <i>Fusarium</i> spp. de garbanzo derivados de este estudio	77
Fig. II.4 Curvas de progreso de enfermedad de los tres cultivares de garbanzo creciendo en suelo artificialmente infestado con diferentes aislados de <i>Fusarium redolens</i>	79
Fig. II.5 Reacción de los cultivares de garbanzo creciendo en suelo artificialmente infestado con diferentes aislados <i>Fusarium redolens</i> . (A) Incidencia de enfermedad. (B) PI, estimado como el número de días en que IIE>0. (C) Índice de intensidad de enfermedad, calculado en la última fecha de evaluación. (D) ABCPIIEE= área bajo la curva de progreso de IIE estandarizada por la duración en días de la epidemia	83
Fig. II.6 Extensión de colonización de raíz (panel inferior) y tallo (panel superior) de los tres cultivares de garbanzo creciendo en suelo infestado con diferentes aislados de <i>Fusarium redolens</i>	84
Fig. II.7 Proyección de los autovectores sobre el plano de los componentes principales 1 y 2 obtenidos en el análisis de componentes principales para las epidemias desarrolladas en los tres cultivares de garbanzo creciendo en suelo infestado con diferentes aislados de <i>Fusarium redolens</i>	86

CAPITULO III. IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE *Fusarium oxysporum* EN PLANTA Y SUELO MEDIANTE PROTOCOLOS DE PCR ESPECÍFICA MEJORADO Y CUANTITATIVA EN TIEMPO REAL (qPCR) 97

Fig. III.1 Gel de agarosa mostrando los productos de amplificación (340-pb) de las reacciones en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando la pareja de iniciadores FOF1 y FOF2 y las condiciones descritas por Mishra et al. (2003) 114

Fig. III.2 Gel de agarosa mostrando los productos de amplificación (340-pb) de reacciones en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando la pareja de iniciadores FOF1 y FOF2 y las condiciones optimizadas de este estudio 116

Fig. III.3 Rectas de regresión estándar de diluciones seriadas 10x de ADN (10 ng/μl) de *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* (Foc-9605) (A), *F. oxysporum* f. sp. *melonis* (Fom-9016) (B), y *F. oxysporum* f. sp. *pisi* (Fop-4A) (C) diluido en agua estéril ultrapura (Series agua) o en ADN de planta (10 ng/μl) extraído de raíces de garbanzo, melón o guisante, respectivamente (Series raíz) 121

Fig. III.4 Densidades de población de *Fusarium* spp. (A) y *F.oxysporum* (B), y cantidad de ADN de *F. oxysporum* (C) en raíces de seis cultivares de garbanzo determinadas por la técnica de dilución en placa utilizando un medio semiselectivo de *Fusarium* spp. (A y B) o el ensayo de qPCR específica de *F. oxysporum* 123

Fig. III.5 Concentraciones de ADN de *Fusarium oxysporum* estimadas mediante el ensayo de qPCR específica de *F. oxysporum* comparadas con el número de unidades formadoras de colonias (ufc) por gramo de suelo estimadas mediante la técnica de dilución en placa en medio semiselectivo de *Fusarium* spp. en un suelo infestado artificialmente (Suelo A) 125

Fig. III.6 Concentraciones de ADN de *Fusarium oxysporum* estimadas mediante el ensayo de qPCR específica de *F. oxysporum* comparadas con el número de unidades formadoras de colonias (ufc) por gramo de suelo estimadas mediante la técnica de dilución en placa en medio semiselectivo de *Fusarium* en dos suelos infestados artificialmente (Suelo B y C) o naturalmente ("Campus de Rabanales") por el patógeno 125

CAPITULO IV. CUANTIFICACIÓN DE *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* EN PLANTA Y SUELO, Y EVALUACIÓN DE RESISTENCIA EN GERMOPLASMA DE GARBANZO A LA FUSARIOSIS VASCULAR MEDIANTE UN NUEVO PROTOCOLO DE PCR CUANTITATIVA EN TIEMPO REAL (qPCR) 137

Fig. IV.1 Geles de agarosa mostrando los productos de amplificación de reacciones en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando las parejas de iniciadores (A) FOCP1 o (B) FOCP2 y ADN genómico de aislados de *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* 156

Fig. IV.2 Gel de agarosa representativo mostrando los productos de amplificación de reacciones en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando la pareja de iniciadores FOCP1 157

Fig. IV.3 Rectas de regresión estándar de una dilución en serie 10X de ADN de *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* (Foc-9605) (10 ng/μl) diluido en agua

	ultrapura estéril (Series “Agua”) o en ADN (10 ng) extraído a partir de fragmentos de tallo o raíz de garbanzo o de suelo (10 ng)	160
Fig. IV.4	Cantidad de ADN de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>ciceris</i> y reacción de enfermedad (valores medios \pm desviación estándar) de los cultivares de garbanzo JG-62 y P-2245 presentando resistencia diferencial a las razas 0 y 5 de <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>ciceris</i> (R: Resistente; S: Susceptible)	161
Fig. IV.5	Cantidad de ADN de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>ciceris</i> (valores medios \pm desviación estándar) en la raíz de 12 cultivares de garbanzo estimada mediante un protocolo de PCR cuantitativa específica de <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>ciceris</i> a los 35 días después de la siembra (dds) en una parcela infestada con las razas 0, 5 y 6 de <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>ciceris</i>	164
Fig. IV.6	Concentraciones de ADN de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>ciceris</i> estimadas mediante el protocolo de PCR cuantitativa específica de <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>ciceris</i> comparadas con el número de unidades formadoras de colonia (ufc) de <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>ciceris</i> /g de suelo presentes en un suelo artificialmente infestado (AIS) o en un suelo naturalmente infestado “Campus de Rabanales”	166

CAPITULO V. CARACTERIZACIÓN CUALITATIVA Y CUANTITATIVA DEL PROCESO DE INFECCIÓN EN EL PATOSISTEMA *F. oxysporum* f. sp. *ciceris*/GARBANZO EN INTERACCIONES COMPATIBLES E INCOMPATIBLES MEDIANTE LA APLICACIÓN DE MICROSCOPIA LÁSER CONFOCAL

	179
Fig. V.1	Morfología de las colonias de distintos aislados de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>ciceris</i> transformados con la proteína autofluorescente ZsGreen en comparación con los respectivos aislados silvestres	194
Fig. V.2	Dinámica temporal y espacial de infección y colonización del aislado F11 de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>ciceris</i> raza 0, transformado con la proteína autofluorescente ZsGreen, en los cultivares de garbanzo P-2245 (susceptible, S), JG-62 (resistente, R) y WR-315 (R) utilizando microscopia láser confocal	196
Fig. V.3	Dinámica temporal y espacial de infección y colonización del aislado F93 de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>ciceris</i> raza 5, transformado con la proteína autofluorescente ZsGreen, en los cultivares de garbanzo P-2245 (susceptible, S), JG-62 (S) y WR-315 (resistente, R) utilizando microscopia láser confocal	198
Fig. V.4	Intensidad de Colonización vascular en cultivares de garbanzo infectados por las razas 0 y 5 de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>ciceris</i> transformados con la proteína autofluorescente ZsGreen en diferentes fechas de muestreo y zonas de la planta	200

INDICE DE TABLAS

CAPITULO I. INTRODUCCIÓN GENERAL Y OBJETIVOS	1
Tabla I.1 Reacción diferencial de las líneas de garbanzo diferenciadores raciales a la inoculación con las distintas razas de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>ciceris</i>	16
CAPITULO II. CARACTERIZACIÓN MOLECULAR Y PATOGENICA DE <i>Fusarium redolens</i>, UN NUEVO AGENTE CAUSANTE DE “Fusarium yellows” EN GARBANZO.....	59
Tabla II.1 Aislados de <i>Fusarium</i> spp. caracterizados molecularmente mediante polimorfismos de longitud de los fragmentos de restricción (RFLP) del Espaciador Intergénico (IGS) del ADNr, con origen geográfico, año de aislamiento y fuente	64
Tabla II.2 Aislados de <i>Fusarium</i> spp. procedentes de garbanzo de diferente origen geográfico originalmente erróneamente identificados como <i>F. oxysporum</i> con su asignación de especie	68
Tabla II.3 Efectos del aislado de <i>Fusarium redolens</i> , el cultivar de garbanzo y sus interacciones en los elementos de la curva de progreso de la enfermedad y en la extensión de la infección de la planta	81
CAPITULO III. IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE <i>Fusarium oxysporum</i> EN PLANTA Y SUELO MEDIANTE PROTOCOLOS DE PCR ESPECÍFICA MEJORADO Y CUANTITATIVA EN TIEMPO REAL (qPCR)	99
Tabla III.1 Especies y aislados de <i>Fusarium</i> spp. utilizados en este estudio, resultados del ensayo de PCR específica de <i>F. oxysporum</i> utilizando los iniciadores FOF1/FOR1 con las condiciones de amplificación originales (Mishra et al., 2003) y las optimizadas en el presente Capítulo, números de acceso de las secuencias ITS y su homología con la secuencia de los aislados de <i>Fusarium</i> spp. que presentaron amplificación cruzada con estos iniciadores	105
Tabla III.2 Sensibilidad de los iniciadores específicos de <i>Fusarium oxysporum</i> utilizados en los ensayos de PCR simple, anidada y cuantitativa (qPCR) utilizando ADN purificado de <i>F. oxysporum</i> sólo o mezclado con ADN extraído de planta o de suelo	118
Tabla III.3 Ecuaciones de regresión lineal de diluciones seriadas 10x de ADN (10 ng/μl) de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>ciceris</i> (Foc-9605), <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>melonis</i> (Fom-9016) y <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>pisi</i> (Fop-4A) diluido en agua estéril ultrapura (Series agua) o en ADN de la planta (10 ng) extraído de raíces de garbanzo, melón o guisante, respectivamente (Series raíz) y estadísticos para valorar la igualdad de pendientes y ordenada en el origen	120
CAPITULO IV. CUANTIFICACIÓN DE <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>ciceris</i> EN PLANTA Y SUELO, Y EVALUACIÓN DE RESISTENCIA EN GERMOPLASMA DE GARBANZO A LA FUSARIOSIS VASCULAR MEDIANTE UN NUEVO PROTOCOLO DE PCR CUANTITATIVA EN TIEMPO REAL (qPCR)	137

Tabla IV.1	Aislados de <i>Fusarium</i> spp. evaluados mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con las parejas de iniciadores FOCP1 y FOCP2, número de referencia, origen geográfico y clasificación racial	145
Tabla IV.2	Cultivares y líneas de garbanzo diferenciadores y su reacción a la Fusariosis Vascular causada por las diferentes razas de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>ciceris</i> .	147
Tabla IV.3	Iniciadores para PCR diseñados en este estudio para la identificación y cuantificación de todas las razas patogénicas de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>ciceris</i> , sus secuencias y características	149
Tabla IV.4	Ecuaciones de regresión lineal de las curvas de ADN de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>ciceris</i> diluido en diferentes fondos de ADN, estadísticos asociados a la comparación de de pendientes y ordenadas en el origen y sensibilidad de los iniciadores específicos de <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>ciceris</i> utilizados en ensayos de PCR convencional o cuantitativa (qPCR)	159

CAPITULO V. CARACTERIZACIÓN CUALITATIVA Y CUANTITATIVA DEL PROCESO DE INFECCIÓN EN EL PATOSISTEMA *F. oxysporum* f. sp. *ciceris*/GARBANZO EN INTERACCIONES COMPATIBLES E INCOMPATIBLES MEDIANTE LA APLICACIÓN DE MICROSCOPIA LÁSER CONFOCAL

Tabla V.1	Caracterización de aislados de las razas 0 y 5 de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>ciceris</i> transformados con la proteína fluorescente ZsGreen	193
Tabla V.2	Efecto de la fecha y zona de muestreo de la planta en la intensidad de colonización vascular de razas 0 y 5 de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>ciceris</i> en cultivares de garbanzo con resistencia diferencial	203

CAPITULO I

INTRODUCCIÓN GENERAL Y OBJETIVOS

I.1. INTRODUCCIÓN GENERAL

I.1.1. EL CULTIVO DEL GARBANZO

I.1.1.1 Introducción

El cultivo de leguminosas de grano es, junto con el de cereales, uno de los más antiguos de la historia de la agricultura; a los cuales se les atribuye desde fechas remotas un importante papel en la fertilidad del suelo. La Cuenca Mediterránea es uno de los principales centros de diversidad de las leguminosas de grano, donde se practica su cultivo desde casi los comienzos de la agricultura, asociado y en rotación con cereales, tanto para la alimentación humana como para la alimentación animal (López Bellido, 1998).

Las leguminosas de grano representan una fuente de proteínas baratas de gran potencial, que además pueden tener un aprovechamiento integral, incluso a nivel de subproductos. La composición de dichas proteínas en aminoácidos esenciales, ricas en lisina y pobres en los de tipo azufrados (cisteína y metionina), hace que las leguminosas de grano sean muy útiles tanto en la alimentación animal como en la humana porque sus proteínas complementan a las de los cereales en dietas pobres o en dietas sin proteína animal (Gatel y Champ, 1998; Huïsmán y van der Poel, 1994).

El modelo mediterráneo tradicional de cultivo se basó en la alternancia de cereales y leguminosas en áreas extensivas de secano. Este sistema, que permite el equilibrio entre el autoconsumo y la oferta de cereales y legumbres para el mercado, funcionó correctamente hasta hace algunos años (Rodríguez et al., 1998). Con los notables avances tecnológicos registrados en la agricultura en las últimas décadas, muchas de las leguminosas cultivadas desde muy antiguo han sufrido un retroceso debido a los bajos rendimientos y precios, y a las dificultades de mecanización. Esta reducción ha supuesto que muchas tierras hayan dejado de ser cultivadas, especialmente en zonas de climas áridos y semiáridos, o bien han sido ocupadas por cereal en monocultivo, con todos los inconvenientes que ello representa desde el punto de vista agronómico y energético.

En España, a partir de la segunda mitad de la década de 1960 se registró una reducción continuada de la superficie de leguminosas de grano, pasándose de más de 1×10^6 ha cosechadas entre 1960-65, a aproximadamente 25.000 ha en la

actualidad (FAOSTAT, 2009). Varios factores han contribuido a la drástica disminución del área de cultivo de leguminosas de grano en España. El aumento del nivel de vida permitió la sustitución paulatina del consumo de legumbres por productos cárnicos y lácteos, disminuyendo la demanda de aquéllas. Esta menor demanda, junto al éxodo de la autoconsumista población rural, provocó la pérdida de interés por el cultivo (Rodríguez et al., 1998). Las causas de esta reducción de la superficie hay que buscarlas, además, en los bajos rendimientos de las leguminosas, las dificultades de mecanización y tecnificación, y la falta de una política adecuada de fomento, precios y comercialización (López Bellido, 1998).

I.1.1.2 Origen y distribución geográfica

El centro de origen del garbanzo (*Cicer arietinum* L.) se sitúa según varios investigadores en el sudeste de Turquía, basándose en la presencia de diferentes especies anuales silvestres fuertemente relacionadas con el garbanzo: *C. reticulatum* Ladizinsky y *C. echinospermun* P. H. Davis. Morfológicamente, *C. reticulatum* es muy semejante a *C. arietinum* lo cual hace que se proponga como el antecesor silvestre de *C. arietinum* (Ladizinsky, 1975). Evidencias de carácter botánico y arqueológico sugieren que el garbanzo fue domesticado en Oriente Medio y ampliamente cultivado en la India, Cuenca Mediterránea y en Etiopía desde la antigüedad, extendiéndose posteriormente a América y Australia. Por otra parte, las especies silvestres de *Cicer* se encuentran fundamentalmente en Turquía, Irán, Afganistán y Asia Central (Duke, 1981).

En la actualidad, el garbanzo se cultiva en más de 33 países del sur y oeste de Asia, norte y este de África, sur de Europa, América y Australia (Singh y Saxena, 1996; Singh et al., 2008). Se pueden distinguir cuatro grandes zonas de producción: sur y oeste de Asia, Australia, África Oriental y México, que representan el 84,0; 4,5; 4,0 y 1,7 % de la producción mundial, respectivamente, mientras que la producción europea constituye sólo el 0,7% (FAOSTAT, 2009).

El germoplasma de garbanzo se compone de genotipos de tipo “desi” y de tipo “kabuli”. El germoplasma “desi” es de semilla pequeña, angulosa y de color oscuro, se cultiva principalmente entre los 20°N y 30°N y se consume fundamentalmente en el Subcontinente Indio. El germoplasma “kabuli” es de semilla grande, redondeada y color crema, se cultiva por encima de los 30°N y es consumido preferentemente en la Cuenca Mediterránea y América (Singh y

Saxena, 1996; Singh y Virmani, 1996). La mayoría de los países productores de garbanzo cultivan el tipo “kabuli”, aunque el 85% de la producción mundial es del tipo “desi”, por ser éste el cultivado en la India (Guerrero, 1999).

I.1.1.3. Superficie, producción y rendimientos

El garbanzo es una de las principales fuentes de alimentación humana y animal y constituye uno de los cultivos de leguminosas más importantes del mundo junto con la judía (*Phaseolus vulgaris* L.) y el guisante (*Pisum sativum* L.) (FAOSTAT, 2009). Su semilla es un alimento altamente energético con un contenido en proteína bruta del 23%, siendo entre 21-26% proteína rica en lisina, y por tanto de un excelente valor biológico (Gatel y Champ, 1998; Huisman y Van der Poel, 1994).

A nivel mundial, en los diez años comprendidos entre 1998-2007 el cultivo de garbanzo alcanzó una superficie media de $10,42 \times 10^6$ ha, una producción media de $8,36 \times 10^6$ t y un rendimiento medio de 8.005 hg/ha. En España, y durante este mismo período, la superficie media fue de 60.000 ha que alcanzaron una producción media de 40.512 t y un rendimiento medio de 7.539 hg/ha. En el año 2009 la superficie dedicada al cultivo de garbanzo en el mundo fue de 11.082×10^6 ha, con una producción media de 9.775×10^6 t y un rendimiento de 8.819 hg/ha, de las cuales 24.400 ha, 20.800 t y 8524 hg/ha respectivamente corresponden a España. El principal productor mundial lo representa la India con 76,7% de la producción mundial en el año 2009, mientras que España ocupa el decimosexto lugar (FAOSTAT, 2009). En Andalucía, en el año 2008 la superficie cultivada de garbanzo fue de 12.440 ha con una producción de 13.850 t, siendo el rendimiento de 10.085 hg/ha en secano y 15.520 hg/ha en regadío (MAPA, 2008).

I.1.1.4. Ecología del cultivo

El garbanzo se cultiva en regiones tropicales, subtropicales y templadas. En estas áreas puede crecer tanto en zonas de secano como en zonas áridas y semi-áridas. En la Cuenca Mediterránea, el garbanzo se desarrolla durante la primavera utilizando el agua residual en el suelo procedente de las lluvias del invierno. Los índices de germinación, emergencia y crecimiento de la planta dependen en gran medida de la temperatura. Así, la germinación se puede producir en el intervalo de temperaturas comprendido entre 10 y 45°C, aunque la máxima rapidez se alcanza

a una temperatura constante de 20°C o en régimen de fluctuación 15-25°C. Una vez alcanzado el estado de plántula, las temperaturas más favorables para el desarrollo del cultivo son 18 a 26°C durante el día, 21 a 29°C durante la noche y una precipitación anual de 600 a 1.000 mm (Duke, 1981; Smithson et al., 1985). Las heladas, el granizo y la lluvia intensa, tienen efectos perjudiciales sobre el cultivo, ocasionando reducciones de cosecha. El garbanzo es sensible al frío, aunque se han citado cultivares tolerantes a temperaturas de hasta -9,5°C en sus primeros estadios de desarrollo (Duke, 1981; Smithson et al., 1985).

También existen otros factores relacionados con el suelo que pueden determinar la producción del cultivo de garbanzo. Entre ellos se incluyen la profundidad, la capacidad de almacenamiento de agua y los niveles de nutrientes y sales solubles existentes en aquél. El garbanzo es capaz de crecer en una amplia diversidad de suelos, desde los muy arenosos hasta muy pesados. Sin embargo, el garbanzo prefiere suelos silíceo-arcillosos o limo-arcillosos con pH de 6 a 9 (Guerrero, 1999).

I.1.1.5. Enfermedades del cultivo

La extensión del cultivo de garbanzo en España y la Cuenca Mediterránea se ve frenada por los bajos rendimientos originados por la incidencia de diversos estreses abióticos en las siembras de primavera, y los ataques de enfermedades. Se han descrito alrededor de 50 enfermedades de diferente origen etiológico, que pueden afectar al cultivo en distintas partes del mundo (Nene et al., 1984). Aunque no hay información que precise las pérdidas causadas por esas enfermedades, sólo algunas de estas enfermedades se consideran económicamente restrictivas a nivel mundial (Allen, 1983; Nene et. al., 1996; Nene y Reddy, 1987). Entre estas últimas, destacan la Fusariosis Vascular causada por *Fusarium oxysporum* Schlechtend.: Fr. f. sp. *ciceris* (Padwik) Matuo & K. Sato y la Rabia causada por *Didymella rabiei* (Kovashevski) von Arx [Anamorfo *Ascochyta rabiei* (Pass.) Labrousse] (Jiménez-Díaz et al., 1989c; Nene y Reddy, 1987; Nene y Sheila, 1989).

I.1.2. LA FUSARIOSIS VASCULAR DEL GARBANZO

I.1.2.1. El complejo de enfermedades Marchitez y Podredumbre de Raíz

El complejo de enfermedades Marchitez y Podredumbre de Raíz (MPR) en garbanzo es referido en la literatura fitopatológica como “wilt”, “wilt and root rot” o “wilt like disorders”, e incluye un número de enfermedades generalmente reconocidas por la severidad de los síntomas que ocasionan. Como agentes causantes de las enfermedades incluidas en el complejo MPR han sido citados principalmente especies de hongos fitopatógenos, aunque también se mencionan virus, bacterias, nematodos, fanerógamas parásitas y agentes abióticos. No obstante, las enfermedades más citadas en la literatura y los agentes causales son, Fusariosis Vascular originada por *F. oxysporum* f. sp. *ciceris*, Podredumbre negra de raíz inducida por *Fusarium solani* (Mart.) Appl. & Wr. f. sp. *pisi* (Jones) Snyd & Hans., Podredumbre seca de raíz causada por *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid y enanismo originado por el Virus del enrollado de la hoja del guisante (PLRV) (Trapero-Casas y Jiménez-Díaz, 1985a). Este complejo de enfermedades ocurre en la mayoría de países de los cinco continentes cultivadores de garbanzo, donde es responsable de importantes pérdidas de cosecha (Allen, 1983; Bhatti et al., 1992; Hawtin y Chancellor, 1978; Kraft et al., 1994), incluyendo a Andalucía (Trapero-Casas, 1983; Trapero-Casas y Jiménez-Díaz, 1985a).

I.1.2.2. Importancia y distribución geográfica de la Fusariosis Vascular del garbanzo

La Fusariosis Vascular del garbanzo es la enfermedad más ampliamente distribuida y severa de las que comprenden el complejo MPR en garbanzo. Esta enfermedad ha sido diagnosticada en la mayoría de países cultivadores de garbanzo en el mundo, entre los que se encuentran Argelia, Argentina, Bangladesh, Chile, China, Colombia, Egipto, España, Estados Unidos, Etiopía, Hungría, India, Irán, Irak, Italia, Kenia, Malawi, México, Marruecos, Myanmar, Nepal, Pakistán, Perú, Rusia, Siria, Sri Lanka, Sudán, Túnez, Turquía, y Uganda (Nene et al., 1996) (Fig. I.1).



Figura I.1. Distribución mundial de la Fusariosis Vascular del garbanzo causada por *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*

La Fusariosis Vascular del garbanzo es reconocida como uno de los principales factores limitantes del cultivo del garbanzo en la Cuenca Mediterránea, el Subcontinente Indio y California (Haware, 1990; Jiménez-Díaz et al., 1989c; Nene y Reddy, 1987), originando pérdidas de hasta un 10% de la cosecha anual en la India (Singh y Dahiya, 1973), 10-15% en España (Trapero-Casas y Jiménez-Díaz, 1985b) y hasta del 40% en Túnez (Bousslama, 1980), pudiendo llegar a devastar el cultivo por completo en condiciones favorables para el desarrollo de la enfermedad (Halila y Strange, 1996; Landa et al., 2004; Navas-Cortés et al., 1998).

I.1.2.3. Sintomatología

La Fusariosis Vascular del garbanzo se caracteriza por dos síndromes, denominados Marchitez Vascular y Amarillez Vascular, distinguibles entre sí tanto por los síntomas que los componen como por la cronología con que éstos se desarrollan (Trapero-Casas, 1983). Ambos síndromes son consecuencia de infecciones vasculares en la planta, que llevan asociada una coloración castaño-oscura del xilema y ocasionalmente de la médula de la raíz, cuello y tallo de las plantas infectadas (Trapero-Casas y Jiménez-Díaz, 1985a).

El síndrome de Amarillez Vascular se expresa con más lentitud que el de Marchitez Vascular y se caracteriza por el desarrollo de clorosis, amarillez y

necrosis de los foliolos de las hojas inferiores, que progresan acrópetamente en la planta y dan lugar a la defoliación de ésta (Fig. I.1.2.3B). En experimentos en ambiente controlado, las plantas susceptibles generalmente no mueren antes de transcurridos 40 días desde la siembra en un suelo infestado artificialmente (Trapero-Casas, 1983).

El síndrome de Marchitez Vascular se caracteriza por el desarrollo rápido de flacidez de las hojas en cualquier nivel de la planta y la posterior desecación de foliolos que adquieren una coloración verde-grisácea que se extiende a la planta completa. La flacidez es seguida por la desecación de hojas y tallos, que adquieren un color castaño claro y finalmente se produce la muerte de la planta. Los foliolos necrosados suelen quedar adheridos al raquis (Trapero-Casas y Jiménez Díaz, 1986) (Fig. I.2). En inoculaciones artificiales, la muerte de plantas susceptibles ocurre generalmente antes de transcurridos 20 días tras la siembra en suelo infestado (Trapero-Casas, 1983).

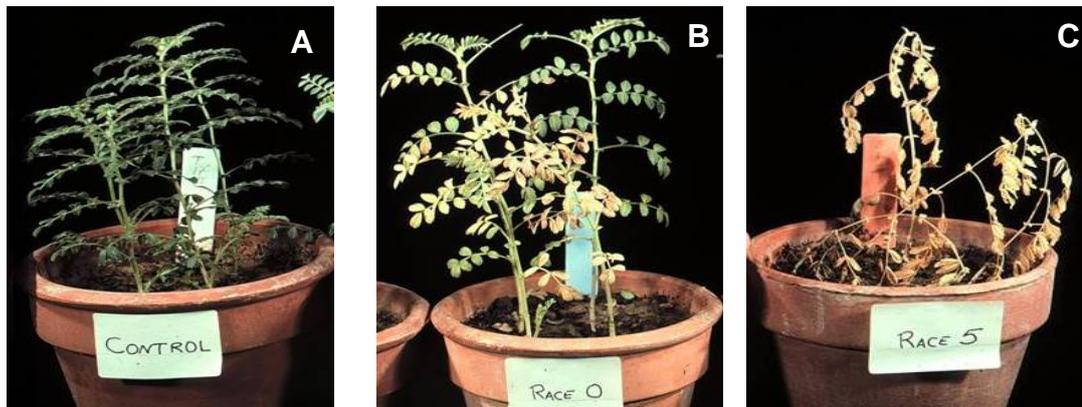


Figura I.2. Síndromes desarrollados por *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* sobre cultivares de garbanzo susceptibles. A- Control , B- Síndrome de Amarillez Vascular, C- Síndrome de Marchitez Vascular

Aunque ambos síndromes han sido descritos en la literatura fitopatológica asociados con la Fusariosis Vascular del garbanzo, el más común y tradicionalmente reconocido en diversos países ha sido el de Marchitez Vascular (Narasimhan, 1929; Nene, 1980; Raheja y Das, 1957; Van der Maesen, 1972). Por el contrario, el síndrome predominante en Andalucía, Castilla-León, Extremadura y

Túnez es el de Amarillez Vascular (Alcalá Jiménez, 1995; Halila y Strange, 1996; Trapero-Casas y Jiménez Díaz, 1986).

I.1.2.4. Biología del agente y patogénesis

Fusarium oxysporum f. sp. *ciceris* es un hongo de suelo, necrotrofo obligado, patogénicamente especializado en especies de *Cicer*, a las que infecta vascularmente, y transmisible en semillas infectadas de *C. arietinum*, su huésped cultivado (Haware et al., 1986a, 1978; Nene y Haware, 1980). No obstante, *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* puede invadir asintóticamente raíces de otras plantas, tanto leguminosas como no leguminosas, tales como: guisante, lenteja (*Lens esculenta* Moench), *Cajanus cajan* (L.) Millsp. (Haware y Nene, 1982a), altramuz blanco (*Lupinus albus* L.), haba (*Vicia faba* L.), judía, melón (*Cucumis melo* L.), patata (*Solanum tuberosum* L.), remolacha azucarera (*Beta vulgaris* L.), *Chenopodium album* L., y veza (*Vicia sativa* L.) (Cabrera de la Colina et al., 1987; Trapero-Casas y Jiménez Díaz, 1985b), que proporcionan al patógeno un medio de sobrevivir parasíticamente durante periodos de tiempo en que el suelo permanece libre de su huésped cultivado. Además, *F. oxysporum* f. sp. *ciceris*, al igual que los agentes causantes de otras Fusariosis Vasculares, posee la capacidad de sobrevivir inactivo en el suelo en forma de clamidosporas durante varios años en ausencia de plantas huésped (Allen, 1983); hasta 6 años, según indican investigaciones realizadas en la India (Haware et al., 1986b).

Fusarium oxysporum f. sp. *ciceris* puede invadir las plántulas de garbanzo de cultivares tanto susceptibles como resistentes durante la germinación y emergencia, en los primeros días después de la siembra, sin necesidad de heridas en los tejidos subterráneos de la joven planta. La penetración de la planta por el patógeno tiene lugar principalmente a través de los cotiledones, y en las zonas del hipocotilo y epicotilo próximas a los cotiledones; y en menor proporción por zonas de la raíz principal, a excepción del ápice radical (Jiménez Díaz et al., 1989a). Posteriormente, tras el crecimiento del hongo a través del córtex radical alcanza los vasos del xilema, donde tiene lugar la colonización vascular de la planta debido al crecimiento de las hifas a lo largo del eje vegetal y al transporte de microconidias en los vasos xilemáticos, seguido de la colonización de los vasos adyacentes por el crecimiento lateral del micelio a través de los poros laterales de aquéllos. Inicialmente, la colonización vascular se produce mediante el

crecimiento de hifas delgadas en la raíz y base del tallo de la plántula. Posteriormente, se desarrollan hifas gruesas irregulares y ramificadas cuyo crecimiento profuso da lugar a la oclusión del lumen de los vasos infectados (Jiménez-Díaz, 1994; Jiménez-Díaz et al., 1989a).

La colonización vascular de la planta ocurre de forma similar por los aislados del patógeno que causan el síndrome de Amarillez Vascular y el de Marchitez Vascular. Sin embargo, los aislados causantes de Amarillez Vascular, menos virulentos que los de Marchitez Vascular, invaden la planta más lentamente y en menor extensión. Para ambos tipos de aislados, los síntomas severos característicos se desarrollan después de la colonización intensa y extensa de los haces xilemáticos de la raíz y base del tallo por el hongo, y la distribución de éste a lo largo del eje de la planta (Jiménez-Díaz, 1994; Jiménez-Díaz et al., 1989a).

I.1.2.5. Variabilidad patogénica de *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*

Las poblaciones de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* presentan gran variabilidad en lo concerniente a la capacidad patogénica de los aislados que las componen (Alcalá Jiménez, 1995; Haware y Nene, 1982b; Jiménez-Díaz et al., 1989a, 1989b). Por una parte, como ya se ha indicado con anterioridad, los aislados de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* pueden ser caracterizados en dos patotipos por el síndrome de Amarillez Vascular (patotipo de Amarillez) o de Marchitez Vascular (patotipo de Marchitez) que inducen en cultivares de garbanzo susceptibles. Además, superimpuesto sobre la caracterización patotípica, los aislados pertenecientes a un patotipo pueden ser clasificados en razas patogénicas en base al patrón de reacciones que originan en un conjunto de cultivares o líneas de garbanzo denominados diferenciadores raciales. La primera descripción de razas patogénicas en *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* es debida a Haware y Nene (1982b), quienes identificaron las razas 1, 2, 3 y 4, según la interacción diferencial que obtuvieron al inocular 10 cultivares de garbanzo ('Annigeri', 'BG-212', 'Chafa', 'C-104', 'CPS-1', 'JG-62', 'JG-74', 'K-850 3/27', 'L-550' y 'WR-315') con aislados del patógeno procedentes de la India.

La raza 1 se caracteriza por ser no patogénica sobre 'JG-74', 'CPS-1', 'BG-212' y 'WR-315'; mientras que la raza 2 es no patogénica únicamente sobre 'WR-315', la raza 3 es no patogénica únicamente sobre 'JG-74' y la raza 4 lo es sobre 'JG-74' y 'WR-315' (Haware y Nene, 1982b).

Trabajos posteriores pusieron de manifiesto que determinados aislados de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* procedentes de Andalucía son no patogénicos sobre el cv. JG-62 (Trapero-Casas y Jiménez-Díaz, 1985b). Estos aislados inducen el síndrome de Amarillez Vascular en cultivares tipo “kabuli” (semilla grande de color beige y forma de cabeza de carnero) locales; mientras que otros aislados procedentes de la misma región inducen el síndrome de Marchitez Vascular y resultaron ser altamente virulentos sobre la mayoría de los cultivares de garbanzo (Trapero-Casas y Jiménez-Díaz, 1985b).

La inoculación artificial de seis (‘BG-212’, ‘C-104’, ‘CPS-1’, ‘JG-62’, ‘JG-74’ y ‘WR-315’) de los 10 cultivares diferenciadores utilizados por Haware y Nene (1982b) y de ‘12-071/10054’ (‘PV-1’), ‘ICCV-2’, ‘ICCV-4’, ‘PV-24’ y ‘P-2245’, con 11 aislados de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* de Andalucía y con aislados representativos de las razas descritas en la India, dio lugar a asignar los aislados locales a tres nuevas razas, denominadas 0, 5 y 6 (Cabrera de la Colina et al., 1986; Jiménez-Díaz et al., 1989b).

La raza 0 es la menos virulenta de las razas descritas y se caracteriza por ser no patogénica sobre el cultivar “desi” (semilla pequeña, de color oscuro y perfil anguloso) JG-62, que es susceptible a todas las demás razas descritas. La raza 0 es patogénica sobre ‘C-104’ y ‘PV-1’. Hasta el momento, todos los aislados de la raza 0 estudiados inducen el síndrome de Amarillez Vascular, que se desarrolla a los 30-40 días después de la inoculación por el método de siembra en suelo infestado contenido en macetas (Nene y Haware, 1980; Trapero-Casas y Jiménez-Díaz, 1985b).

La raza 5 induce el síndrome de Marchitez Vascular en cultivares susceptibles, y se caracteriza por no ser patogénica en la línea “desi” PV-1, que es susceptible a la raza 0, pero patogénica en el resto de los cultivares diferenciadores inoculados excepto ‘BG-212’ y ‘WR-315’. Los cvs. CPS-1 y JG-74 son moderadamente susceptibles a la raza 5, por cuya infección desarrollan un amarillamiento foliar lento y progresivo que es distinguible de la Amarillez Vascular causada por la raza 0 en cultivares susceptibles (Jiménez-Díaz et al., 1989b).

La raza 6, que induce una Marchitez Vascular similar a la originada por la raza 5 y las razas descritas en la India, se caracteriza por ser patogénica sobre ‘C-104’, ‘ICCV-2’, ‘ICCV-4’, ‘P-24’, ‘P-2245’ y ‘JG-62’, y no patogénica sobre ‘PV-1’ (que

es susceptible a la raza 0), 'BG-212', 'CPS-1', 'JG-74' y 'WR-315' (Jiménez-Díaz et al., 1989b).

Estudios posteriores han indicado que ninguna de las razas 0, 5 y 6 son patogénicas sobre 'Annigeri', 'Chafa', y 'K-850 3/27', que son susceptibles a las razas 1-4 (Jiménez-Díaz, *no publicado*; Halila y Strange, 1996).

La estructura de virulencia en poblaciones de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* fue reevaluada con una muestra de aislados del patógeno más amplia que la estudiada en el periodo 1983-86 (Cabrera de la Colina et al., 1985; Jiménez-Díaz et al., 1989b), incluyendo aislados de Andalucía, Extremadura y Castilla-León en España, California, Marruecos y Túnez. Los resultados confirmaron que los aislados de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* pueden ser clasificados en uno de los patotipos de Amarillez o Marchitez de acuerdo con el síndrome que causan en cultivares susceptibles de garbanzo; y además indicaron que ambos patotipos existen en el sur y noroeste de España, así como en California y posiblemente Marruecos (Alcalá Jiménez, 1995; Jiménez-Díaz et al., 1993a). Por el contrario, los aislados procedentes de Túnez pertenecen al patotipo de Amarillez, característica que ha sido recientemente confirmada por Halila y Strange (1996).

Los estudios referidos permitieron identificar las razas 0, 1, 5 y 6 entre los aislados investigados, y a su vez constatar que existen diferencias entre los patotipos que inducen aislados de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* de una misma raza. Así, en dichos estudios se distinguieron aislados procedentes de California y caracterizados patogénicamente como raza 1, pero que inducen el síndrome de Amarillez Vascular (raza 1B/C), en contraposición con el resto de aislados de esta raza procedentes de California, España, India y Marruecos, los cuales inducen el síndrome de Marchitez Vascular (raza 1A) (Jiménez-Díaz et al., 1993a).

En consecuencia, en cultivares susceptibles de garbanzo los aislados pertenecientes a las razas 0 y 1B/C inducen el síndrome de Amarillez Vascular descrito anteriormente, mientras que los aislados pertenecientes a las razas 1A, 2, 3, 4, 5 y 6 causan el síndrome de Marchitez Vascular. Además, la información más reciente indica que las razas 0, 1, (1A y 1B/C), 5 y 6 de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* existen en España y California (Halila y Strange, 1996; Jiménez-Díaz et al., 1993a; Jiménez-Gasco y Jiménez Díaz, 2003; Jiménez-Gasco et al., 2001), mientras que las razas 0 y 1B/C existen en Siria, Túnez y Turquía; las razas 0, 1A y 6 en Israel; las razas 1A y 6 en Marruecos, la raza 0 en el Líbano (Halila y Strange, 1996; Jiménez-

Díaz et al., 1993a; Jiménez-Díaz, *no publicado*) y en Turquía (Dolar, 1997), y la raza 1A en la India (Jiménez-Díaz, 1994). Las razas 2 y 3 se han descrito en Etiopía, India y Turquía (Dólar, 1997; Haware y Nene, 1982b; Jalila y Chand, 1992; Shehabu et al., 2008), mientras que la raza 4 sólo ha sido descrita en Etiopía e India (Haware y Nene, 1982b; Jalila y Chand, 1992; Shehabu et al., 2008) (Fig. I.3)

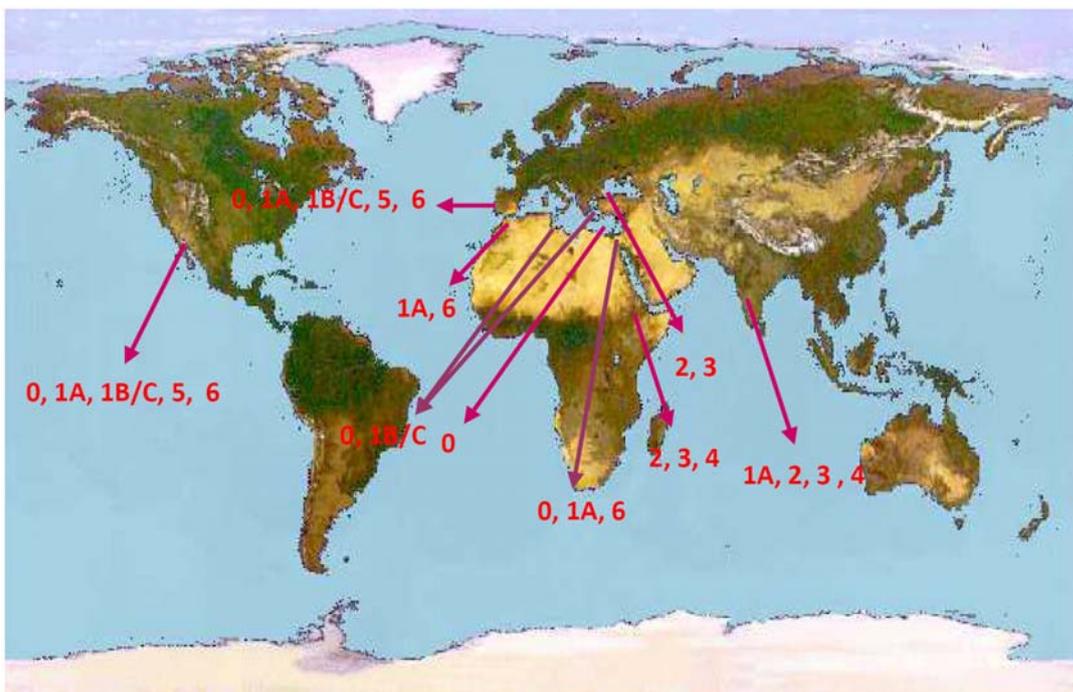


Figura I.3. Variabilidad de razas patogénicas de las poblaciones de *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* y su distribución mundial

I.1.2.6. Identificación de razas patogénicas de *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*:

Pruebas de patogenicidad

La correcta identificación de las variantes patogénicas de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* presentes en una determinada zona de cultivo es un aspecto crucial con vistas a la utilización y desarrollo mediante mejora genética de cultivares con resistencia estable. De forma tradicional, la identificación de razas patogénicas en hongos fitopatógenos se ha llevado a cabo por el fenotipo de las interacciones planta-patógeno en pruebas de patogenicidad basadas en la inoculación de líneas diferenciadoras de la planta huésped con aislados del patógeno.

Para la identificación de razas de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris*, en nuestro laboratorio se ha venido utilizando una modificación del método descrito por Haware y Nene (1982b), utilizando 10 líneas de garbanzo, que incluyen las empleadas por dichos autores a excepción de 'Annigeri', 'Chafa', 'K-850 3/27' y 'L-550'; y añadiendo 'P-2245', 'PV-1', 'ICCV-2' e 'ICCV-4' (Jiménez-Díaz et al., 1989b) (Tabla I.1).

Para la realización de las pruebas de patogenicidad, la inoculación de las líneas diferenciadoras de garbanzo se lleva a cabo mediante la siembra de semillas pregerminadas en suelo infestado artificialmente contenido en macetas. Con este propósito, los aislados de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* no deben ser mantenidos repetidamente en medios de crecimiento sintéticos debido a mutaciones que ocurren con frecuencia y que están asociadas con pérdida de virulencia. Por ello, los aislados son conservados en suelo estéril. El inóculo se incrementa en una mezcla de arena, harina de maíz y agua (AMA) durante 15 días a 25°C (Trapero-Casas y Jiménez Díaz, 1985b; Nene y Haware, 1980). Posteriormente el AMA infestado se mezcla con suelo esterilizado en una proporción de 1:12 (p/p). Una vez que el hongo está establecido en esta mezcla de suelo infestado, se siembran las semillas pregerminadas de garbanzo en macetas que contienen dicha mezcla. Este nivel de inóculo es suficiente para causar el 100% de mortalidad en 'P-2245', una línea de garbanzo altamente susceptible. La reacción de la planta a la infección se determina mediante la severidad de los síntomas en una escala de 0 a 4 según el porcentaje de área foliar afectada (0=0%, 1=1-33%, 2=24-66, 3=67-100, 4=planta muerta) a los 40 días después de la siembra. Las reacciones con severidad media <1 y >3 se consideran resistentes (R) y susceptibles (S), respectivamente. Las reacciones de severidad intermedia entre dichos valores se consideran moderadamente susceptibles (M) (Jiménez-Díaz et al., 1991; Landa et al., 2001, 2006) (Tabla I.1).

Tabla I.1. Reacción diferencial de las líneas de garbanzo diferenciadores raciales a la inoculación con las distintas razas de *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* (*Foc*)

Cultivar/Línea de garbanzo	Raza <i>Foc</i> y Reacción a FVG ^a							
	0	1A	1B/C	2	3	4	5	6
PV-1	S	M	S	R	R	R	R	R/M ^c
JG-62	R	S	S/M ^b	S	S	S	S	S
CPS-1	R	R	R	S	M	M	M	R
BG-212	R	R	R	S	M	M	R	R
WR-315	R	R	R	R	S	R	R	R
UC-15	R	R	R	— ^c	—	—	R	R
ICCV-2	R	R	R	S	S	S	S	M
ICC-14216K	R	R	R	R	—	—	R	R
CA-334.20.4	R	S	R	—	—	—	R	R
PV-60	R/M	S	S	—	—	—	S	S
PV-61	R/M	S	S	—	—	—	S/M	S
P-2245	S	S	S	S	S	S	S	S

^a Reacción a la Fusariosis Vascular del garbanzo (FVG) evaluada en una escala de severidad de 0-4 según el porcentaje de tejido foliar afectado (0=0%, 1=1-33%, 2=24-66, 3=67-100, 4=planta muerta) a los 40 días de la siembra en una mezcla de suelo infestado con AMA colonizado por *F. oxysporum* f. sp. *ciceris*.

^b R/M, S/M indica reacciones diferentes obtenidas en distintos estudios las cuales se pueden deber a diferentes condiciones medioambientales en cámara de crecimiento o ensayos en campo (Landa et al., 2006) o diferentes entradas de los cultivares o líneas de garbanzo (Sharma y Muehlbauer, 2007; Singh y Saxena, 1996)

^c Reacción desconocida

I.1.2.7. Control de la Fusariosis Vascular del garbanzo mediante cultivares resistentes

La Ecología del patógeno y la Epidemiología de la enfermedad indican que las epidemias de Fusariosis Vascular del garbanzo son de naturaleza monocíclica. En consecuencia, las estrategias más adecuadas para su control son aquéllas que contribuyen a reducir la cantidad del inóculo inicial en el suelo, a reducir su eficacia o a ambas.

La rotación de garbanzo con cultivos no huéspedes puede contribuir a reducir el inóculo de sus patógenos que residen en el suelo. Sin embargo, el control de la Fusariosis Vascular mediante la rotación de cultivos no es efectivo debido a la capacidad del patógeno de sobrevivir prolongadamente en el suelo mediante clamidosporas, así como de infectar asintóticamente otros cultivos de

plantas leguminosas y no leguminosas (Cabrera de la Colina, 1986; Trapero-Casas y Jiménez-Díaz, 1985b). De forma similar, investigaciones sobre la utilización combinada de tratamientos fungicidas de la semilla de cultivares de garbanzo con resistencia diferencial al patógeno, indicaron que algunos fungicidas incrementan significativamente la emergencia de las plántulas y retrasan el comienzo de las epidemias en cultivares moderadamente resistentes, pero no en cultivares altamente susceptibles como es el caso de 'P-2245'. Sin embargo, ningún tratamiento fungicida proporcionó un nivel de control satisfactorio de la enfermedad (Jiménez-Díaz y Trapero-Casas, 1985).

El método más práctico y económicamente eficiente para el control de la Fusariosis Vascular del garbanzo es la utilización de cultivares resistentes (Jiménez-Díaz et al., 1993a; Landa et al., 2004, 2006). Sin embargo, la efectividad y la utilización de este método de control puede ser limitada por la gran variabilidad patogénica de las poblaciones de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris*, así como por las características agronómicas indeseables de algunos de los cultivares desarrollados (Haware y Nene, 1982b; Jiménez-Díaz et al., 1993a, 1989b,). No obstante, se han conseguido importantes avances en el desarrollo de genotipos de garbanzo resistentes o tolerantes a enfermedades individuales (Singh, 1990). Sin embargo, en muchos casos, el germoplasma resistente a una enfermedad se ha mostrado altamente susceptible a otras enfermedades importantes del cultivo.

En colaboración con el Programa de Mejora Genética del garbanzo de ICARDA ("International Center for Agricultural Research in the Dry Areas") durante los años 1987-1990 se evaluó la resistencia a la Fusariosis Vascular del garbanzo de 2.702 líneas "kabuli" (el más frecuente en la Cuenca Mediterránea y Oriente Próximo) en una parcela naturalmente infestada por las razas 0, 1A y 5 de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* en Santaella (Córdoba). Las líneas consideradas más prometedoras un año fueron reevaluadas en años sucesivos, y las finalmente seleccionadas fueron inoculadas con las razas 0, 1A y 5 del patógeno en condiciones controladas para confirmar la naturaleza de la reacción. Un total de 14 líneas fueron seleccionadas por su resistencia en campo. Cuando dichas líneas y 35 líneas adicionales se inocularon artificialmente con cada una de las tres razas del patógeno, ocho de ellas fueron resistentes a las tres razas; 10 fueron resistentes a las razas 0 y 1A, y 16 líneas fueron resistentes sólo a la raza 0 (Jiménez-Díaz et al., 1993a, 1991).

Excepto en contados casos, las líneas de garbanzo “kabuli” con resistencia a la Fusariosis Vascular del garbanzo generalmente son susceptibles a la Rabia causada por *D. rabiei*, lo cual limita considerablemente su utilidad en áreas geográficas donde ambas enfermedades son prevalentes. Por ello, se desarrolló un programa de mejora genética en colaboración con el Departamento de Genética y Mejora Vegetal de la ETSIAM de la Universidad de Córdoba, el Departamento de Agronomía y Mejora del CIFA-Córdoba y Koipesol S. A., que incluyó entre sus principales objetivos desarrollar germoplasma de garbanzo “kabuli” con resistencia combinada a las dos enfermedades. De dicho programa ha resultado la identificación de cuatro líneas con semilla de interés comercial resistentes a la raza 5 de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* y moderadamente resistentes a un aislado altamente virulento de *D. rabiei*; cuatro líneas resistentes a *D. rabiei* y moderadamente resistentes a la raza 5; y una línea resistente tanto a la raza 5 de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* como a *D. rabiei* (Navas-Cortés et al., 1994).

Asimismo, en colaboración con la Estación de Introducción de Germoplasma Vegetal del USDA en Washington, se evaluaron 52 entradas de 11 especies silvestres de *Cicer* por su resistencia a las razas 0 y 5 de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* en condiciones controladas, 47 de las cuales fueron también evaluadas por su resistencia a la raza 5 del patógeno en condiciones de campo en microparcelas artificialmente infestadas con la misma. Mientras que frente a la raza 0, menos virulenta, se identificó resistencia en *C. bijugum* K. H. Rech, *C. canariense* Santos Guerra & G. P. Lewis, *C. chorassanicum* (Bge) M. Popov., *C. cuneatum* Hochst. ex Rich., *C. judaicum* Boiss, y *C. pinnatifidum* Juab. & Spach; sólo *C. bijugum*, *C. cuneatum* y *C. judaicum* contienen resistencia a la raza 5. Además, algunas entradas de *C. bijugum* (PI 458550, PI 458552) y *C. judaicum* (PI 458559), resistentes a las razas 0 y 5 de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris*, también son resistentes a *D. rabiei* (Kaiser et al., 1994).

I.1.3. UTILIZACIÓN DE HERRAMIENTAS BIOTECNOLÓGICAS EN EL ESTUDIO DE POBLACIONES DE *Fusarium* spp. y *F. oxysporum*

I.1.3.1. Técnicas basadas en la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

I.1.3.1.1. Introducción

La “Reacción en Cadena de la Polimerasa” (PCR) fue descrita en 1971 y 1974 por el grupo de Khorana aunque pasó sorprendentemente desapercibida durante años. Su reinención en 1983 por Kary B. Mullis ha representado una de las mayores revoluciones en las ciencias de la vida. Finalmente, la técnica fue automatizada y popularizada en 1988 mediante el empleo de una ADN polimerasa termoestable (Caballero et al., 2001). La PCR se basa en la amplificación selectiva y exponencial de una región del ADN molde. Esta reacción es catalizada por una enzima ADN polimerasa termoestable, en presencia de dos oligonucleótidos (18-30 nucleótidos) denominados iniciadores o cebadores diseñados para que se unan a los extremos de la región a amplificar. Los iniciadores hibridan con el ADN desnaturalizado en dos zonas del mismo, creando así dos fragmentos de ADN de doble cadena que ceban a la ADN polimerasa y delimitan la región que se amplifica. De esta manera la ADN polimerasa duplica un fragmento de ADN, y repitiendo el ciclo varias veces se consigue una multiplicación exponencial del fragmento, que permite obtener una cantidad de ADN visualizable a partir de una sola molécula del mismo (Ward, 1994) (Fig. I.4).

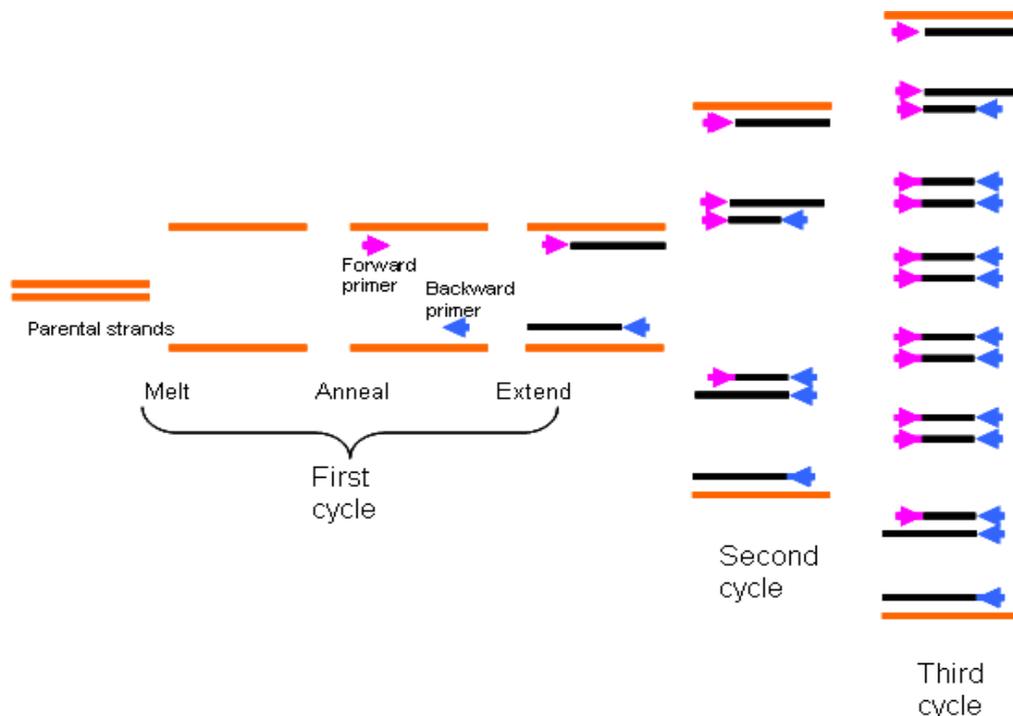


Figura I.4. Esquema de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). Fuente: <http://www.obgynacademy.com/basicsscience/fetology/genetics/>

En Fitopatología, la identificación de hongos fitopatógenos se ha basado tradicionalmente en la observación de caracteres morfológicos. Sin embargo, en cada uno de los niveles de especie, subespecie, variedad, *forma specialis* y raza, existen cada vez menos caracteres morfológicos que distingan entre aislados de un patógeno u otro. Subespecies y variedades suelen variar en algunos aspectos morfológicos, pero *formae speciales* y razas difieren generalmente sólo en el rango de huéspedes y cultivares de un mismo huésped, respectivamente, a los que atacan (Coddington y Gould, 1992). Para superar los problemas asociados al método convencional de clasificación racial, se ha comenzado a hacer uso de la variación natural presente en el ADN de cualquier especie. Así, la aparición de técnicas basadas en el análisis de polimorfismos en los ácidos nucleicos ha revolucionado los aspectos de detección e identificación de organismos fitopatógenos y sus variantes patogénicas, y por consiguiente, el control y prevención de los mismos, dado su gran poder resolutivo y su aplicabilidad a una gran variedad de éstos (Henson y French, 1993; Martin et al., 2000). Este tipo de técnicas también proporcionan información sobre las relaciones genéticas y la variabilidad entre, y dentro de, las diferentes razas de hongos fitopatógenos (Jiménez Gasco et al., 2001).

La “Reacción en Cadena de la Polimerasa Cuantitativa en Tiempo Real” (qPCR) fue desarrollada por Higuchi et al. (1993) y desde entonces se ha utilizado para diferentes propósitos, particularmente para cuantificar ácidos nucleicos y para genotipado (“genotyping”). Según la revisión elaborada por Wilhelm y Pingoud (2003) la particularidad de la qPCR consiste en que el proceso de amplificación se monitoriza en tiempo real mediante el empleo de técnicas de fluorescencia (Heid et al., 1996; Higuchi et al., 1993; Nazarenko et al., 1997). La información obtenida de las curvas de amplificación se utiliza para cuantificar la cantidad inicial de moléculas diana (ADN o ARNm) con alta precisión sobre un amplio rango de concentraciones de manera muy sencilla, añadiendo simplemente unos controles externos con concentraciones conocidas y crecientes de ese ADN diana (curva patrón) en la tanda de amplificación (Fig. 1.5A). En la qPCR el programa informático va registrando el incremento de fluorescencia (proporcional al aumento de ADN o ARNm) en cada ciclo, y esta información se refleja gráficamente en curvas de cinética de reacción para cada una de las muestras y controles. Por tanto, se puede controlar la amplificación en las fases iniciales, cuando la concentración de los reactivos todavía no es limitante y el efecto de la

variabilidad en la eficiencia de amplificación es menos importante. Para cada muestra el programa informático calcula el número de ciclo en el que el lector empieza a detectar un incremento de fluorescencia significativo, con respecto a la señal de base (línea umbral). El ciclo en el que se empieza a detectar el aumento de fluorescencia se denomina punto de corte (C_p , de *crossing point*) o ciclo umbral (C_T , de *threshold cycle*) y es inversamente proporcional a la concentración inicial de ADN diana presente en la muestra. Con las concentraciones previamente conocidas de los controles externos y sus C_T correspondientes se obtiene una recta patrón. Interpolando en ella los valores de los C_T de cada muestra problema se puede inferir su concentración de ADN inicial (Fig. I.5B).

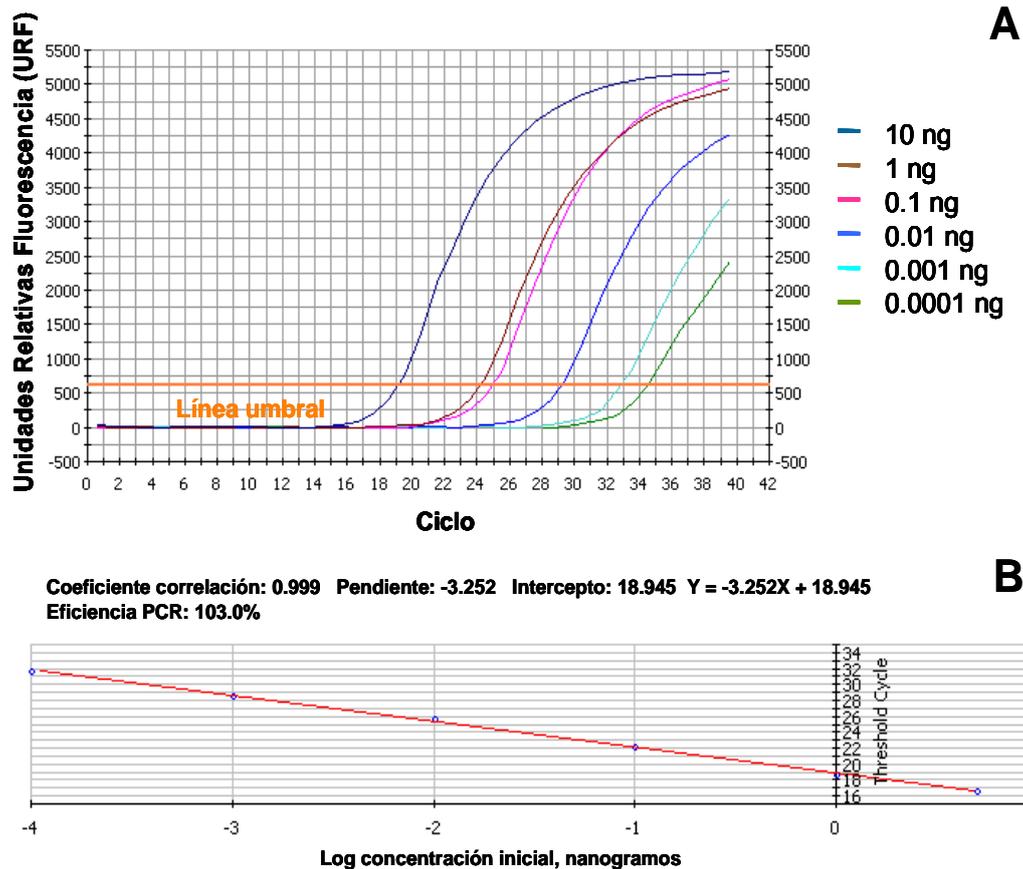


Figura I.5. A. Curvas de amplificación de una dilución seriada de ADN conteniendo 10 ng - 0.1 pg de ADN diana. Durante los primeros ciclos, no se detecta incremento de señal. Las fases exponenciales aparecen a ciclos más altos para muestras que contienen menor cantidad de moléculas diana. **B.** Recta patrón obtenida a partir de las concentraciones de los controles externos de la curva patrón y sus correspondientes valores de C_T

Los análisis de curvas de temperatura de fusión (curvas de melting) realizados posteriormente (Fig. I.6), basados en la aplicación de un gradiente de temperaturas creciente después de la PCR, posibilitan la caracterización de las secuencias amplificadas respecto a dicha temperatura de melting (T_m , definida como la temperatura a la cual el 50% de la molécula de ADN está desnaturalizada), permitiendo comprobar la especificidad de la reacción. La T_m es función de la longitud del producto y de su composición de bases (Bernard et al., 1999; Ririe et al., 1997).

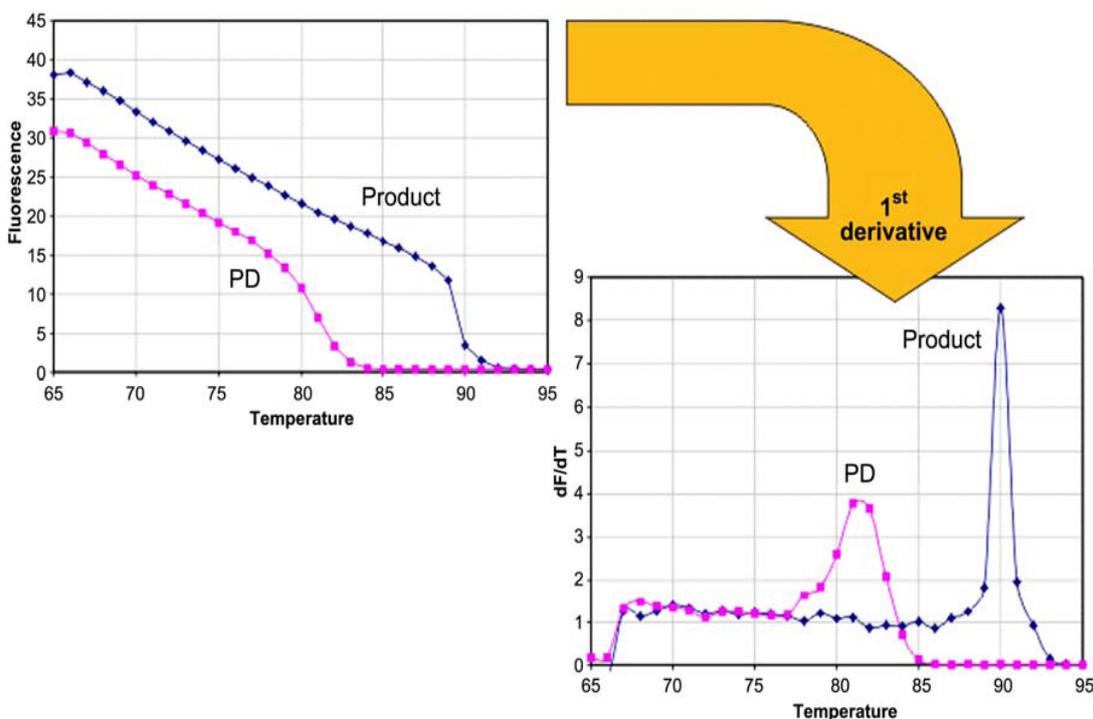


Figura I.6. Análisis de la curva de melting. La fluorescencia desciende rápidamente cuando el ADN se disocia. El amplicón producido (“product”) generalmente es de mayor longitud que los dímeros de iniciadores (“PD”) y se disocia a una temperatura más alta (Fuente: Kubista et al., 2006)

Los principales agentes químicos empleados en la detección de la fluorescencia en la qPCR son (Fig. I.7):

- Fluoróforos intercalantes. El más usado SYBR Green I (Fig. I.7A)
- Sondas de hibridación (Fig. I.7B)
- Sondas de hidrólisis. Las más conocidas son las sondas TaqMan (Fig. I.7C)

- Sondas hairpin. Dentro de las cuales tenemos varias alternativas: molecular beacons (Fig. 7 I.D), scorpions (Fig. 1.7E), sunrise primers (Fig. 1.7F) y LUX fluorogenic primers (Fig. 7 I.G).

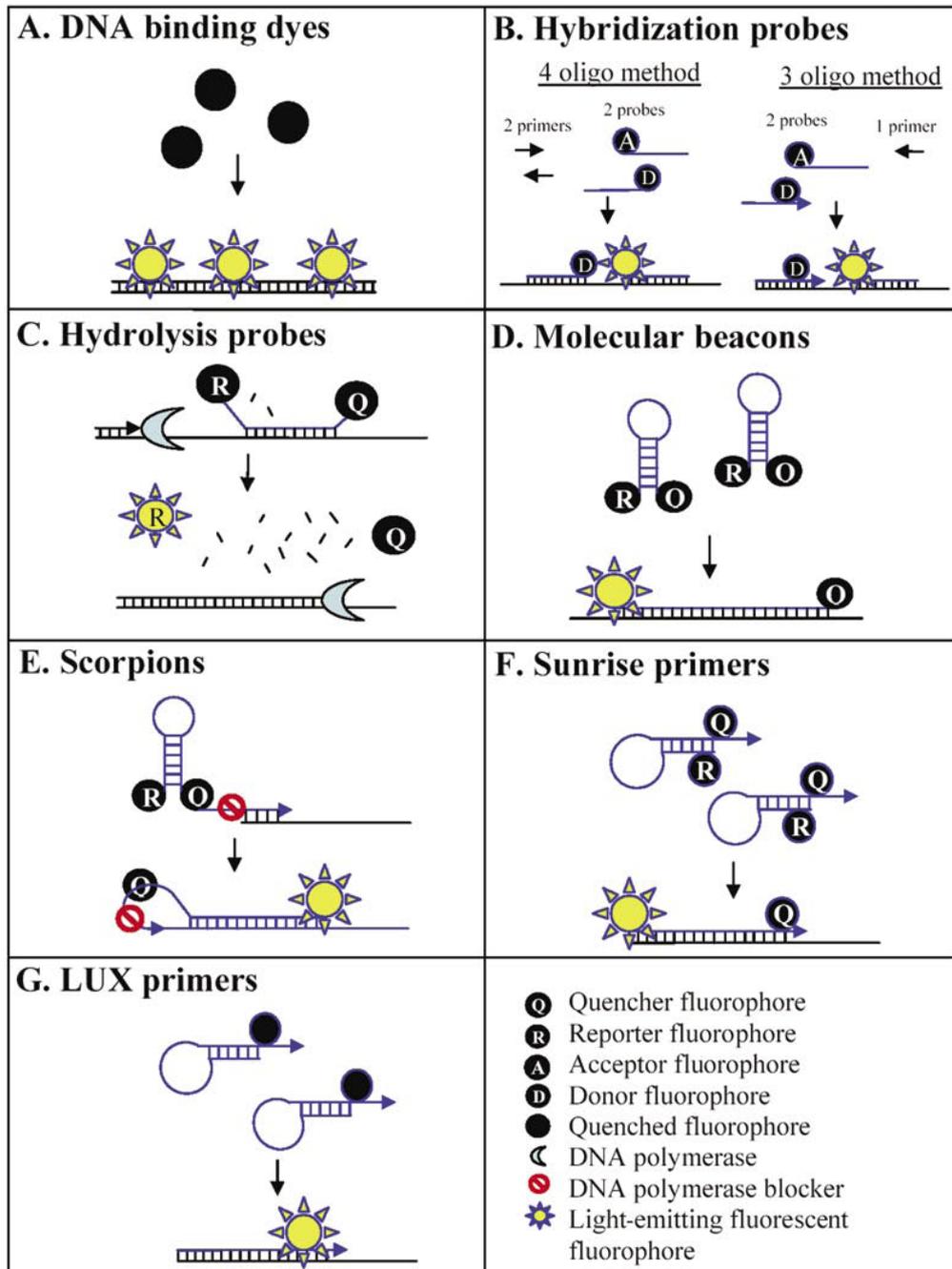


Figura 1.7. Mecanismos de acción de los principales agentes químicos empleados en la detección de fluorescencia en la qPCR (Fuente: Wong y Medrano, 2005)

Como se ha mencionado anteriormente, la PCR convencional ha surgido como una herramienta fundamental para la diagnosis y estudio de los hongos fitopatógenos y ha contribuido a mitigar algunos de los problemas asociados con la detección, control y prevención de los patógenos de plantas (Henson y French, 1993; Martin et al., 2000), pero es poco fiable a la hora de realizar análisis cuantitativos (Ginzinger, 2002).

La qPCR tiene un enorme potencial en el estudio de aspectos fundamentales en el campo de la Fitopatología a un nivel de precisión que era impensable hasta hace pocos años. La sensibilidad, rapidez y reproducibilidad de esta técnica, junto con la posibilidad de lograr análisis cuantitativos, son valores que posibilitan su rápida y amplia aceptación en el estudio de las interacciones planta-patógeno (Schena et al., 2004). Varias revisiones se han centrado en la bioseguridad de los cultivos (Schaad et al., 2003), así como en la detección de hongos patógenos transmitidos por semilla (Taylor et al., 2001) y bacterias fitopatógenas (Schaad y Frederick, 2002). Sin embargo, la qPCR se ha aplicado para identificar y cuantificar con exactitud ADN de microorganismos patógenos de plantas como oomicetos (Barrau y Romero, 1996; Montes-Borrego et al., 2011), hongos (Jiménez-Fernández et al., 2011, 2010; Shishido et al., 2010), bacterias (De Bellis et al., 2007; Zhang et al., 2010), virus (Olmos et al., 2006; Yokomi et al., 2010) y nematodos (Berry et al., 2008; Huang et al., 2010).

Por otra parte, la qPCR posibilita estudios de evaluación de resistencia de cultivares de plantas huésped al desarrollo de enfermedades causadas por agentes fitopatógenos (Brunner et al., 2009; Jiménez-Fernández et al., 2011; Markakis et al., 2009; Montes-Borrego et al., 2011; Vandemark et al., 2002), ya que permite la detección y cuantificación de ADN patógeno en las primeras fases del establecimiento de la infección cuando las plantas no presentan síntomas de enfermedad, permitiendo la caracterización de las reacciones de resistencia del germoplasma huésped con mayor rapidez y precisión que los métodos tradicionales como las pruebas de patogenicidad, las cuales son costosas en tiempo, recursos e instalaciones (Dubey et al., 2010; Jiménez-Díaz et al., 1993a; Landa et al., 2006). Asimismo permite la identificación de polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) en la misma secuencia nucleotídica de diferentes aislados del mismo patógeno, variabilidad que puede estar asociada con enfermedades específicas (Kianianmomeni et al., 2007; Wen et al., 2009). Además esta tecnología

de qPCR también tiene su aplicación en genómica funcional mediante la cuantificación de ARNm transcrito, posibilitando estudios de patrones de expresión génica en la interacción planta-patógeno (Deepak et al., 2007; Mehli et al., 2005).

I.1.3.1.2. Aplicación de técnicas basadas en la PCR a la identificación y caracterización de la diversidad genética en el género *Fusarium* y la especie *Fusarium oxysporum*

Una necesidad fundamental para los fitopatólogos concierne a la correcta identificación y caracterización de la diversidad genética de las diferentes especies patogénicas tanto con fines diagnósticos como para dilucidar su papel ecológico y epidemiológico. En las últimas décadas las técnicas moleculares basadas en la PCR han tenido un gran impacto en la identificación rápida y fiable de hongos fitopatógenos facilitando el diagnóstico de enfermedades fúngicas, así como en ámbitos filogenéticos y taxonómicos (Enya et al., 2008; Galván et al., 2008; Jiménez-Gasco et al., 2001, 2004; Konstantinova y Yli-Mattila, 2004; Leslie et al., 2001; Mirete et al., 2003; Pasquali et al., 2003; Sharma et al., 2009). Las dianas seleccionadas para la aplicación de estas técnicas moleculares son regiones universales del genoma que contienen regiones tanto conservadas como variables, permitiendo la discriminación a diferentes niveles taxonómicos (i.e.: regiones espaciadora interna (ITS) e intergénica (IGS) del ADN ribosómico nuclear (ADNr), gen del Factor de Elongación y Traducción 1 α (TEF-1 α), etc).

Las especies patogénicas pertenecientes al género *Fusarium* están entre los patógenos de plantas con mayor importancia económica debido a su persistencia en el suelo, materia orgánica y residuos de plantas (Burgess, 1981). Las pérdidas de cosecha que originan (Nelson et al., 1983) y la producción de micotoxinas fúngicas que afectan a la calidad del producto son características inherentes a plantas infectadas por especies pertenecientes al género *Fusarium* (Thrane, 1989).

El género *Fusarium*, también conocido por sus teleomorfos *Nectria* y *Gibberella*, contiene una gran variedad de especies con diversidad de caracteres morfológicos (Nitschke et al., 2009), englobando un número total de especies que varía desde nueve hasta 78 según autores (Nelson, 1991). La correcta identificación de las diferentes especies de *Fusarium* ha sido problemática desde su comienzo. Esto se debe a los contradictorios sistemas de clasificación

propuestos por diversos investigadores, basados fundamentalmente en caracteres morfológicos como la forma, tamaño y septación de las conidias y clamidosporas, así como en la evaluación de características adicionales como la tasa de crecimiento micelial y el color del micelio de aislados creciendo en medios de cultivo sólidos, las cuales pueden ser altamente variables dependiendo de las condiciones del medio de crecimiento y de incubación del cultivo (Leslie et al., 2001; Leslie y Summerell, 2006; Summerell et al., 2003). Además, a todo lo anterior se une la escasez de micólogos con la experiencia adecuada para llevar a cabo la correcta identificación de las distintas especies en un género en el que no abundan las características morfológicas suficientemente informativas (Leslie et al., 2001).

Actualmente existen gran cantidad de trabajos en la literatura fitopatológica en los que se describe la utilización de la PCR para la correcta y precisa identificación de *Fusarium* spp. Así, Yang et al. (2008) desarrollaron un protocolo de PCR específica para la identificación de *Fusarium* spp. causantes de “Fusarium head blight” (FHB) en cebada (*Hordeum vulgare* L.). Se basaron en polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) de las secuencias del gen del factor de elongación y traducción 1 α (TEF-1 α) y del gen de la amonio ligasa 2 (CTPS2) para diseñar iniciadores de PCR específica de distintas especies de este género. Estos iniciadores posibilitaron la identificación específica de las especies *Fusarium asiaticum* O’Donnell, *Fusarium meridionale* T. Aoki, *Fusarium graminearum* Schwabe y *Fusarium acaciae-mearnsii* O’Donnell, T. Aoki, Kistler et Geiser, sp. nov. Bogale et al. (2007) también seleccionaron como diana la secuencia del TEF-1 α para el diseño de iniciadores específicos para solventar la problemática de la correcta identificación de *Fusarium redolens* Wollenweb., ya que las características morfológicas de esta especie son muy parecidas a las de *F. oxysporum* Schlect. Emend. Snyd. & Hans., lo cual ha llevado a considerarla como una variedad (Booth, 1971) o sinónimo (Nelson et al., 1983) de *F. oxysporum* hasta que recientemente métodos moleculares basados en el ADN han permitido su distinción (Baayen et al., 2000; Waalwijk et al., 1996). Anteriormente, Demeke et al. (2005) diseñaron un protocolo de PCR múltiple para la detección simultánea de las tres especies más importantes de *Fusarium* productoras de tricotecenos (*Fusarium culmorum* (Wm. G. Sm.) Sacc., *F. graminearum* y *Fusarium sporotrichioides* Sherb.). Los resultados obtenidos mediante ensayos de PCR mejoraban a los logrados con los métodos tradicionales utilizados para la identificación de estas especies como la siembra de

semillas de los distintos cereales afectados en placas conteniendo medios de cultivo. El resultado obtenido ha validado la aplicación del protocolo de PCR descrito a la detección e identificación de estas especies del género *Fusarium* de forma rutinaria. Asimismo, Mishra et al. (2003) desarrollaron protocolos de PCR específica que permiten una rápida y efectiva identificación de cinco especies patogénicas y toxigénicas de *Fusarium*. Las especies incluidas son *Fusarium avenaceum* (Fr.:Fr.) Sacc., *F. culmorum*, *Fusarium equiseti* (Corda) Sacc., *F. oxysporum* y *F. sulphureum* (= *F. sambucinum* Fuckel.) Dicho método está basado en la amplificación de fragmentos de ADN especie-específicos utilizando iniciadores fluorescentes diseñados en base a la variabilidad existente en la región ITS del ADNr, y que, según los autores, proporciona un diagnóstico preciso, rápido y fiable de las cinco especies de *Fusarium* estudiadas.

La aplicación de PCR específicas de especie (Bogale et al., 2007; Demeke et al., 2005; Mishra et al., 2003; Yang et al., 2008) es útil para identificar aislados de una especie concreta, pero no cuando se pretende estudiar la variabilidad genética existente entre diversas especies de un género debido a lo laborioso de su abordaje. Para analizar la diversidad genética se emplean técnicas moleculares basadas en la amplificación de regiones universales del genoma que contienen regiones tanto conservadas como variables (ITS, IGS, TEF-1 α , etc) y su posterior secuenciación. De este modo, mediante la puesta en práctica de un ensayo PCR común, se puede obtener la información necesaria que nos permita identificar y discriminar la diversidad genética subyacente en los aislados analizados.

Entre las distintas metodologías aplicadas al estudio de la variabilidad genética de poblaciones de aislados de *Fusarium* spp., el análisis de Polimorfismos en la Longitud de los Fragmentos de Restricción (RFLP) de regiones variables del genoma constituye una de las más utilizadas. Así, en un estudio sobre variabilidad genética dentro del género *Fusarium*, Nitschke et al. (2009), analizaron la variación de la secuencia parcial de una región no codificante del gen TEF-1 α mediante el análisis RFLPs entre aislados pertenecientes a 11 especies de *Fusarium* obtenidos de plantas de remolacha azucarera, entre los que se encontraban aislados de especies como *F. oxysporum* y *F. redolens*, muy difíciles de distinguir morfológicamente. Los resultados obtenidos de la digestión de la secuencia del gen TEF-1 α mediante el empleo de dos enzimas de restricción resultaron suficientes para la identificación clara y fiable de los aislados pertenecientes a las

11 especies de *Fusarium* objeto de estudio, siendo incluso suficiente la utilización de una sola enzima para la correcta identificación a nivel de especie (aislados de las especies *Fusarium poae* (Peck) Wollenweb., *Fusarium solani* (Mart.) Sacc. y *F. graminearum*). Asimismo, esta aproximación metodológica se ha utilizado para estudiar la diversidad genética en las secuencias del ADNr ITS. Duggal et al. (1997) analizaron la variabilidad existente entre 18 aislados representantes de seis especies de *Fusarium* (*F. oxysporum*, *F. avenaceum*, *F. sulphureum* (= *F. sambucinum*), *F. solani*, *F. sporotrichioides* y *Fusarium subglutinans* (Wollenweb. & Reinking) P.E. Nelson, T.A. Toussoun & Marasas mediante el análisis de RFLPs existentes en las secuencias amplificadas de regiones del ADNr 28S y 18S, así como en la ITS, observando que esta última región era la que presentaba un mayor polimorfismo inter e intraespecífico. Posteriores estudios refrendaron la utilidad del análisis PCR-RFLP de la región ITS del ADNr (Dissanayake et al., 2009a; Latiffah et al., 2009; Lee et al., 2000). Llorens et al. (2006) se centraron en la secuencia espaciadora intergénica (IGS) del ADNr en la búsqueda de variabilidad genética entre aislados de *Fusarium* productores de micotoxinas. Estos autores caracterizaron fisiológica y genéticamente 75 aislados de *Fusarium* spp. (35 pertenecientes al complejo de especies de *Gibberella fujikuroi* (Sawada) Ito in Ito & K. Kimura, 26 a *F. oxysporum*, siete a *F. graminearum*, cinco a *F. culmorum*, uno a *Fusarium cerealis* (Cooke) Sacc. y uno a *F. poae*) procedentes de diferentes huéspedes. El resultado del análisis molecular mediante PCR-RFLP de la región IGS indicó que los diferentes aislados se pueden caracterizar en función de su capacidad productora de micotoxinas, pero no se encontró relación entre los patrones de restricción de la región IGS y el origen geográfico de los aislados. Por tanto, los marcadores IGS-RFLP constituyen un rápido y apropiado método para agrupar distintos aislados de especies de *Fusarium*, a la vez que permite estimar las relaciones genéticas entre los distintos grupos de aislados (Konstantinova y Yli-Mattila, 2004; Mirete et al., 2003).

El análisis de Polimorfismos en la Longitud de los Fragmentos Amplificados (AFLP) constituye otra poderosa herramienta en el estudio de diversidad genética. Galván et al. (2008) se basaron en esta técnica para estudiar el nivel de resistencia a la Podredumbre basal de cebolla de 43 aislados de *Fusarium* spp. pertenecientes a las especies *F. oxysporum* (29), *Fusarium proliferatum* (T. Matsushima) Nirenberg (10) y las cuatro restantes a *F. avenaceum* y *F. culmorum*. El resultado del análisis filogenético mostró que los aislados de cada especie se agrupan en un cluster

diferente, excepto para los aislados de *F. oxysporum*, los cuales se agrupaban en dos clusters diferentes, sugiriendo diferentes orígenes filogenéticos para los representantes de cada uno de estos clusters.

La amplificación de Repeticiones de Secuencia Simple (SSR) distribuidas al azar en el genoma, también denominadas microsatélites, representa una eficiente metodología para el estudio de diversidad genética. Saharan y Naef (2008) analizaron la variabilidad existente entre 27 aislados pertenecientes a tres especies de *Fusarium* (*F. graminearum*, *Fusarium verticillioides* (Sacc.) Nirenberg y *F. oxysporum*) causantes de “Fusarium Head Blight” (FHB) del trigo (*Triticum aestivum* L.) utilizando como marcadores microsatélites. Concretamente utilizaron una serie de 10 microsatélites, los cuales amplificaron fragmentos de ADN de longitud variable para los diferentes aislados de las tres especies del género *Fusarium*, demostrando que existe una considerable variabilidad genotípica inter e intraespecífica entre los mismos.

En la misma línea, el análisis de Polimorfismos Amplificados por Iniciadores Simples Aleatorios (RAPDs) se erige en un efectivo método para dilucidar diferencias en el genoma de poblaciones de aislados de *Fusarium* spp. sin previo conocimiento de su secuencia nucleotídica. Corpas-Hervias et al. (2006) determinaron la idoneidad de esta técnica en la identificación a nivel de especie de 15 de un total de 19 aislados obtenidos de la corona de plantas de espárrago (*Asparagus officinalis* L.), los cuales pertenecían a las especies *F. oxysporum* (ocho), *F. proliferatum* (cuatro) y *F. verticillioides* (tres).

El análisis comparativo de secuencias nucleotídicas de regiones conservadas constituye otra aproximación para estudiar la diversidad genética a nivel interespecífico dentro del complejo de especies del género *Fusarium*. Secuencias conservadas del gen TEF-1 α (Knutsen et al., 2004; Kristensen et al., 2005), tramos conservados de la subunidad grande del ARN ribosómico (ARNr 28S) (Guadet et al., 1989; Mulè et al., 1997), de las secuencias ITS del ADNr (Wong y Jeffries, 2006), e incluso el análisis conjunto de varias de estas secuencias conservadas (Balmas et al., 2010) representan regiones que permiten el estudio comparativo y, por tanto, la caracterización y diferenciación de especies con características morfológicas muy similares como p. ej. *F. oxysporum* y *F. redolens* en los dos últimos trabajos referidos; aunque este abordaje es más laborioso y requiere más tiempo que los métodos anteriormente mencionados.

Fusarium oxysporum constituye un complejo de especies fúngicas anamórficas capaces de vivir saprofiticamente sobre sustratos orgánicos que incluye tanto aislados patogénicos como no patogénicos sobre un gran número de especies de plantas, principalmente tomate (*Solanum lycopersicum* L.), melón, judía, plátano (*Musa sapientum* L.), algodón (*Gossypium hirsutum* L.), guisante y más recientemente *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh (Michielse y Rep, 2009). Los representantes patogénicos de plantas causan dos enfermedades principales: Fusariosis Vascular y Podredumbre de Raíz. Las variedades causando Fusariosis Vascular son específicas de una o unas pocas plantas huésped y se agrupan en *formae speciales* en base a su gama de plantas susceptibles, mientras que las que causan Podredumbre lo son menos y no suelen identificarse como *formae speciales*, excepto algunas de ellas como *F. oxysporum* Schlechtend.:Fr. f. sp. *radicis-lycopersici* W.R. Jarvis & Shoemaker, ó *F. oxysporum* Schlechtend.:Fr. f. sp. *radicis-cucumerinum* D.J. Vakalounakis. En el caso de podredumbre la raíz completa es colonizada, mientras que la Fusariosis Vascular implica un crecimiento dirigido del hongo hacia el cilindro vascular, donde tiene lugar la esporulación (Ramírez-Suero et al., 2010). Además, dentro de una *forma specialis* puede existir variación en la virulencia que sus miembros manifiestan sobre cultivares de su especie huésped, dando lugar a la designación de patotipos y razas patogénicas (Kistler, 1997). Actualmente se han identificado más de 150 *formae speciales* específicas de huésped (Baayen et al., 2000; O'Donnell y Cigelnik, 1999).

La identificación rápida y fiable de la variedad de aislados patogénicos englobados dentro de esta especie resulta una cuestión clave para el correcto manejo de las enfermedades originadas por los mismos. Edel et al. (2000) contribuyeron a la resolución de esta problemática diseñando una pareja de iniciadores (PFO2/PFO3) que amplificaban específicamente un fragmento de 70 pb de los dominios variables de la región 28S del ADNr de *F. oxysporum*, aún difiriendo dicha secuencia en sólo un nucleótido respecto a otras especies cercanas como *F. redolens*. Asimismo, Mishra et al. (2003) también lograron la rápida identificación de *F. oxysporum* mediante el diseño de una pareja de iniciadores (FOF1/FOR1) que amplificaban un fragmento de 340 pb de la región ITS, pero a diferencia del protocolo anterior, éste permitía el estudio de variabilidad genética dentro de aislados de la misma especie al amplificar un fragmento de mayor longitud. En la aplicación de estos iniciadores específicos se han basado estudios posteriores de esta Tesis Doctoral así como diversos trabajos

que abordan la identificación específica de aislados de *F. oxysporum* (Jiménez-Fernández et al., 2010; Nel et al., 2006; Thangavelu y Jayanthi, 2009).

La caracterización de la diversidad genética dentro de la especie *F. oxysporum* representa un aspecto de suma importancia para el control eficiente de las enfermedades ocasionadas por los representantes patogénicos de esta especie. Así, Hibar et al. (2007) probaron la viabilidad de la técnica IGS-RFLP para analizar la diversidad genética de 62 aislados obtenidos de plantas de tomate asintomáticas en Túnez. De ellos, 53 aislados representativos de *F. oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* se agruparon en cinco haplotipos, mientras que nueve aislados de *F. oxysporum* Schlechtend.:Fr. f. sp. *lycopersici* W.C. Snyder & H.N. Hans. se englobaron en seis haplotipos distintos. Esta diferencia en diversidad entre las dos *formae speciales* sugiere que los aislados de *F. oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* proceden del exterior y pueden haber sido introducidos accidentalmente en Túnez. Los resultados obtenidos de éste y otros estudios descritos en la literatura fitopatológica en los que se utiliza esta técnica corroboran la idoneidad de la misma para el estudio de diversidad genética dentro de este complejo de especies (Alves-Santos et al., 2007; Appel y Gordon, 1995; Edel et al., 2001; Kim et al., 2001).

El análisis de RAPD constituye otra herramienta molecular empleada para el estudio de la diversidad genética dentro de esta especie. Pasquali et al. (2003) analizaron 10 aislados de *F. oxysporum* obtenidos de *Argyranthemum frutencens* L. por primera vez, junto con 19 aislados representativos de 11 *formae speciales* y un representante no patogénico de *F. oxysporum*, obteniendo un perfil de amplificación característico para cada aislado. El resultado del análisis filogenético mostró que la mayoría de los aislados nuevos se disponían dentro del mismo grupo y compartían los mismos marcadores RAPD que los obtenidos para *F. oxysporum* Schlechtend.:Fr. f. sp. *chrysantemi* G.M. Armstrong, J.K. Armstrong & R.H. Littrell. Sólo un aislado se englobó en un grupo diferente junto a representantes de *F. oxysporum* Schlechtend.:Fr. f. sp. *tracheiphilum* (E.F. Sm) W.C. Snyder & H.N. Hans. Asimismo esta técnica también se ha empleado satisfactoriamente en el análisis de aislados patogénicos de *F. oxysporum* de tabaco (*Nicotiana tabacum* L.), judía y remolacha azucarera (Alves-Santos et al., 2007; Cramer et al., 2003) pertenecientes a las *formae speciales*, *F. oxysporum* Schlechtend.:Fr. f. sp. *nicotianae* (J. Jonson) W.C. Snyder & H.N. Hans., *F.*

oxysporum Schlechtend.:Fr. f. sp. *batatas* (Wollenweb.) W.C. Snyder & H.N. Hans.,
F. oxysporum Schlechtend.:Fr. f. sp. *phaseoli* Kendrick & W.C. Snyder y *F.*
oxysporum Schlechtend.:Fr. f. sp. *betae* (D. Stewart) W. C. Snyder & H. N. Hans.

La comparación de secuencias nucleotídicas de genes conservados posibilita tanto la confirmación de la identidad específica como el estudio de la diversidad genética existente en las poblaciones de aislados de *F. oxysporum*. Enya et al. (2008) se basaron en el análisis filogenético de las secuencias parciales de la región IGS del ADNr y del gen “mating-type” (MAT1-1-1 α -box) de aislados procedentes de varias subespecies de *Brassica rapa* L., col (*Brassica oleracea* L.) y rábano (*Raphanus sativus* L.), encontrando que tanto los aislados de *B. rapa* como los de rábano pertenecían a diferentes clados monofiléticos que se habían separado en etapas evolutivas tempranas. La región IGS también fue la elegida por Dissanayake et al. (2009b) para estudiar la diversidad genética inherente a aislados de *F. oxysporum* procedentes de cebolla (*Allium cepa* L.). Asimismo existen otros genes diana seleccionados en estudios de análisis comparativo de secuencias de ADN como son las secuencias conservadas del gen TEF-1 α y de la subunidad pequeña mitocondrial (mtSSU) del ARNr (Baayen et al., 2000) o secuencias de genes de la poligalacturonasa (PG) (Hirano y Arie, 2009).

Otras aproximaciones al estudio de diversidad genética de aislados de *F. oxysporum* son, por ejemplo, el análisis de grupos de compatibilidad vegetativa (VCGs) (Catti et al., 2007; Kistler et al., 1998) o marcadores SSR (Bogale et al., 2005).

Los aislados de *F. oxysporum* catalogados como no patogénicos sobre huéspedes susceptibles están jugando un papel muy importante en la ecología de las enfermedades causadas por *Fusarium* spp. (Alabouvette et al., 2007; Fravel et al., 2003) e incluso como agentes de biocontrol en enfermedades ocasionadas por patógenos englobados en otros géneros de hongos fitopatógenos (Pantelides et al., 2009). En la revisión realizada por Alabouvette et al. (2007) encontramos que estos aislados están asociados con supresividad natural del suelo a las enfermedades causadas por los representantes patogénicos de la especie y asimismo se hace referencia a su eficacia como colonizadores de la rizosfera y raíz del huésped sin inducir síntomas en el mismo, compitiendo con las poblaciones patogénicas y, por tanto, incidiendo negativamente en la colonización de la planta por aquéllas. Por otro lado, la inducción de resistencia sistémica en la planta

huésped frente al patógeno constituye otro aspecto importante de los aislados de *F. oxysporum* no patogénicos en su papel como agentes de biocontrol de enfermedades (Hervás et al., 1995; Olivain et al., 2006).

Lo anteriormente expuesto justifica la importancia de estudiar la diversidad genética dentro de las poblaciones de aislados no patogénicos y la relación filogenética que existe con los aislados patogénicos. Así, Nel et al. (2006) analizaron la diversidad existente entre más de 50 aislados no patogénicos procedentes de suelos supresivos a la marchitez del plátano (Mal de Panamá) utilizando la técnica RFLP-IGS. En el análisis se incluyeron dos aislados de *F. oxysporum* Schlechtend.:Fr. f. sp. *cubense* (E.F. Sm) W.C. Snyder & H.N. Hans. patogénicos sobre plátano. Se obtuvieron 12 haplotipos diferentes, de los cuales 11 correspondían a los aislados no patogénicos y uno contenía los aislados patogénicos. El estudio de la diversidad genética de aislados no patogénicos dentro de la especie *F. oxysporum* se puede abordar mediante otras metodologías, como por ejemplo, el análisis comparativo de la secuencia IGS (Appel y Gordon, 1996) o mediante RFLPs de la región ITS del ADNr (Thangavelu y Jayanthi, 2009).

I.1.3.1.3. Aplicación de técnicas basadas en la PCR a la identificación y caracterización de la diversidad genética de *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*

Como se ha comentado anteriormente, la correcta identificación de aislados patogénicos constituye un objetivo de gran importancia para los fitopatólogos tanto desde un punto de vista taxonómico como epidemiológico, ya que contribuiría al eficaz desarrollo de cultivares resistentes a la enfermedad que posibilitarían el adecuado manejo y control de la misma. Así, Jiménez-Gasco y Jiménez-Díaz (2003) diseñaron un ensayo de PCR específica que permite discriminar aislados de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* patogénicos sobre garbanzo de aislados no patogénicos de *F. oxysporum*, así como de otras *formae speciales* de *F. oxysporum* y de otras especies de *Fusarium* spp. Para ello se basaron en el diseño de iniciadores de PCR específicos que amplificaban una secuencia SCAR ("Sequence Characterized Amplified Region") de 1,5 kb obtenida a partir de marcadores RAPDs (Jiménez-Gasco et al., 2001). Otros protocolos sólo detectan e identifican el ADN de aislados del patotipo de Marchitez de *F. oxysporum* f. sp.

ciceris, ya sea en tejido vegetal infectado (Kelly et al., 1998) o en suelo artificial y naturalmente infestado (García-Pedrajas et al., 1999).

Por lo que respecta a la variabilidad genética dentro de esta *forma specialis*, como se ha reflejado en el apartado I.1.2.5, los aislados patogénicos se engloban en dos patotipos, los que ocasionan el síndrome de Amarillez Vascular y los que provocan el de Marchitez Vascular. El síndrome de Amarillez Vascular lo originan las razas 0 y 1B/C, mientras que el síndrome de Marchitez Vascular las razas 1A, 2, 3, 4, 5 y 6. Por tanto, se hace necesario el diseño de ensayos de PCR específicos capaces de discriminar entre los aislados representativos de ambos patotipos. Así, a partir de una secuencia SCAR de 1,6 kb derivada de RAPD, se diseñaron iniciadores que posibilitaron la amplificación específica de ADN de aislados del patotipo de Marchitez, tanto con ADN de aislados procedentes de plantas infectadas asintomáticas (Kelly et al., 1998) como con ADN de aislados procedentes de suelos naturales y artificiales (García-Pedrajas et al., 1999). En ambos casos el resultado de la amplificación resultó negativo para los aislados causantes del síndrome de Amarillez Vascular.

Pérez-Artés et al. (1995) abordaron el análisis de la diversidad genética en el ADN mitocondrial (ADNmt) de aislados de las razas 0, 1A, 2, 3, 4, 5 y 6 mediante análisis RFLP utilizando siete aislados representativos de cada raza y de distinto origen geográfico. No encontraron polimorfismos tras la digestión enzimática del ADNmt entre los distintos aislados mostrando todos un patrón de restricción idéntico. Este resultado concuerda con el obtenido en los análisis de VCG por Nogales Moncada et al. (2009) en el que los 47 aislados representativos de las razas patogénicas 0, 1A, 1B/C, 2, 3, 4, 5 y 6 procedentes de distinto origen geográfico formaron un único VCG, y apoya la hipótesis de que *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* es un grupo natural de clones de *F. oxysporum* que derivan de un ancestro común (Leslie, 1993), teniendo por tanto un origen monofilético (Jiménez-Gasco et al., 2002, 2004)

Kelly et al. (1994) analizaron 63 aislados representativos de las ocho razas de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* y 11 aislados de otras *formae speciales* de *F. oxysporum*, especies de *Fusarium* e incluso de otros géneros patogénicos de garbanzo empleando RAPDs. El resultado del análisis UPGMA (“Unweighted Paired Group Method with Arithmetic Averages”) mostró que los aislados de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* se engloban en dos grupos diferentes representativos de

los patotipos de Amarillez y Marchitez, los cuales eran claramente diferentes de aquéllos que contenían otras *formae speciales* y otras especies y géneros. Los resultados obtenidos muestran la idoneidad de esta técnica para diferenciar claramente aislados de los dos patotipos. Posteriormente Jiménez-Gasco et al. (2001) aplicaron este mismo enfoque para estudiar la variabilidad genética dentro de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris*, utilizaron 91 aislados incluyendo tanto aislados patogénicos como no patogénicos. Se pudieron caracterizar mediante sus perfiles RAPD las razas 0, 1B/C, 5 y 6 del patógeno, pero no las razas 1A, 2, 3 y 4. Asimismo el análisis UPMGA de los datos RAPD dictaminó la agrupación de los distintos aislados en tres grupos; los aislados de las razas causantes del síndrome de Amarillez Vascular se agruparon en dos grupos, uno conteniendo los representantes de la raza 0 y otro los de la raza 1B/C, mientras que los aislados de las razas pertenecientes al patotipo de Marchitez se englobaron en un único grupo. Los aislados no patogénicos formaron un grupo independiente de los aislados patogénicos.

A partir de los marcadores RAPD que identificaban a las razas patogénicas de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* en el trabajo anterior (Jiménez-Gasco et al., 2001), se diseñaron iniciadores específicos de cada raza. Para ello se clonaron los fragmentos RAPD seleccionados, se secuenciaron y se desarrollaron iniciadores para PCR específica basados en secuencias SCAR. Los iniciadores desarrollados posibilitaron la exacta identificación de las razas 0, 1A, 5 y 6, de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* y permitieron discriminar aislados de esta *forma specialis* de aislados representantes de otras *formae speciales*, de otros *Fusarium* spp. y de aislados *F. oxysporum* no patogénicos (Jiménez-Gasco y Jiménez-Díaz, 2003).

La diversidad geográfica y fenotípica observada en aislados de este patógeno suscita la posibilidad de que este taxón tenga un origen polifilético, lo cual llevó a Jiménez-Gasco et al. (2002) a plantear la hipótesis nula del origen monofilético de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris*. Para llevar a cabo este trabajo se seleccionaron aislados representativos de los diversos patotipos y razas de diferentes orígenes geográficos del patógeno, así como aislados no patogénicos. Todos los aislados patogénicos compartían la misma secuencia nucleotídica de los genes analizados, la cual era diferente a la compartida por los aislados no patogénicos. El análisis de parsimonia de las secuencias del gen TEF-1 α agrupó a los aislados patogénicos en un único grupo, diferente a los formados por otras

formae speciales y aislados no patogénicos. Estos resultados indican que *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* tiene un origen monofilético, lo cual está de acuerdo con el hecho de que todos sus aislados se agrupan en un único VCG (Nogales Moncada et al., 2009) y presenten el mismo patrón de restricción de su ADNmt (Pérez-Artés et al., 1995).

Posteriormente se abordó el estudio del patrón evolutivo de las distintas razas del patógeno (Jiménez-Gasco et al., 2004) mediante el análisis de huellas de ADN generadas utilizando tres sondas de hibridación de ADN repetitivo del genoma de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris*. Los resultados obtenidos mostraron que las distintas razas patogénicas evolucionaban de forma discreta “paso a paso” mediante la acumulación de mutaciones afectando a la virulencia a partir de un ancestro común, lo cual provocó la variabilidad existente en el genoma de aislados patogénicos y no patogénicos, así como entre las razas patogénicas del patógeno. Estas ligeras diferencias entre razas confirman la hipótesis de que los aislados de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* tienen una estructura genética clonal (Jiménez-Gasco et al., 2001, 2002; Kelly et al., 1994). Asimismo los distintos fenotipos patogénicos se correlacionan con los linajes de huellas de ADN inferidos del análisis filogenético, el cual establece a los aislados del patotipo de Amarillez y los aislados del patotipo de Marchitez en dos grupos claramente independientes, así como a los aislados representativos de cada una de las ocho razas del patógeno en ocho grupos diferentes.

Como se ha citado anteriormente, se desarrollaron marcadores específicos para las razas 0, 1A, 5 y 6 (Jiménez-Gasco y Jiménez-Díaz, 2003), pero no de los aislados del patógeno de las razas 2, 3 y 4, prevalentes en India, Turquía y Etiopía. Gurjar et al. (2009) llevaron a cabo diferentes abordajes biotecnológicos para identificar un número reducido de aislados del patógeno pertenecientes específicamente a las razas prevalentes en India, es decir, las razas 1A, 2, 3 y 4, como son los marcadores específicos de secuencias RFLP-ITS, Inter-Secuencias Simples Repetidas (ISSR) y AFLP. Las tres primeras técnicas permitieron la precisa identificación de las razas 3 y 4 del patógeno, pero no de las razas 1A y 2 de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris*, las cuales sólo se pueden diferenciar inequívocamente mediante AFLPs. Esta última técnica fue utilizada por Sharma et al. (2009) para estudiar la diversidad genética de aislados procedentes de plantas de garbanzo infectadas en la India y separó claramente los aislados patogénicos de los no

patogénicos en dos grupos diferentes. Otros estudios filogenéticos engloban a los aislados de estas cuatro razas prevalentes en India en dos (Dubey y Singh, 2008), tres (Barve et al., 2001; Sivaramakrishnan et al., 2002) y cuatro grupos (Singh et al., 2006). Por su parte, Bayraktar et al. (2008) se basaron en la utilización de RAPD y marcadores ISSR para estudiar la variabilidad genética entre aislados de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* en Turquía obtenidos de la base del tallo de plantas de garbanzo con síntomas de Marchitez Vascular. El análisis de agregación englobó a todos los aislados en tres grupos independientes, pero no existió relación entre éstos y su origen geográfico.

I.1.1.3.4. Aplicación de técnicas basadas en la qPCR a la identificación y cuantificación de ADN de especies del género *Fusarium* y de *formae speciales* dentro de la especie *Fusarium oxysporum*

La técnica de qPCR tiene un enorme potencial para resolver importantes cuestiones en el campo de la Fitopatología a un nivel de precisión inalcanzable hace unos años. La sensibilidad, velocidad y versatilidad de esta técnica, junto con la posibilidad de lograr análisis cuantitativos son factores esenciales que alientan su rápida y amplia aceptación en esta área del conocimiento. Esta herramienta biotecnológica ha posibilitado la exacta cuantificación de una gran variedad de microorganismos asociados a plantas y/o suelos, incluyendo agentes fitopatógenos (revisado por Schaad et al., 2003; Schena et al., 2004). De ahí que la qPCR constituya una herramienta de gran utilidad para estudiar la ecología de poblaciones de *Fusarium* spp., así como de las distintas *formae speciales* de *F. oxysporum* tanto en suelo como en tejido vegetal.

En esta línea, diversos autores buscan identificar y cuantificar las especies fitopatógenas de *Fusarium* causantes de enfermedades importantes económicamente en sus huéspedes susceptibles. Hogg et al. (2007) completaron el trabajo iniciado por Strausbaugh et al. (2005), quienes no encontraron una correlación positiva entre cantidad de ADN de *F. graminearum*, *Fusarium pseudograminearum* O'Donnell & T. Aoki y *F. culmorum*, causantes de la Podredumbre del Cuello del trigo y el nivel de síntomas en ensayos en condiciones naturales. Para ello diseñaron iniciadores y sondas Taqman específicas para una secuencia del gen de la tricodieno sintasa de *F. culmorum* y utilizaron aislados de distintas especies del género *Fusarium*, así como aislados representativos de otros

géneros fitopatógenos. La aplicación del protocolo de qPCR desarrollado mostró una correlación positiva de la cantidad de ADN de *Fusarium* cuantificado con el nivel de severidad de síntomas.

También se han desarrollado metodologías para detectar y cuantificar ADN de las especies de patógenos causantes de la Podredumbre seca de la patata (*Solanum tuberosum* L.) *F. avenaceum*, *Fusarium coeruleum* (Libert) Sacc., *F. culmorum* y *Fusarium sulphureum* Schlechtend. (Cullen et al., 2005). Estos autores diseñaron iniciadores y sondas Taqman específicos de la región ITS del ADNr de cada uno de estos cuatro patógenos y analizaron cerca de 500 aislados pertenecientes a 25 especies de *Fusarium* spp. y a especies de otros géneros de hongos fitopatógenos para la puesta a punto de la técnica. Los resultados mostraron que las especies *F. sulphureum* y *F. coeruleum* son las que presentan cantidades más altas de ADN en el tejido vegetal mientras que *F. culmorum* y *F. sulphureum* son los únicos que se detectaron en suelos infestados artificialmente con las cuatro especies.

Asimismo, conviene resaltar la existencia de trabajos en la literatura fitopatológica en los que se aplica esta herramienta biotecnológica para estudiar la capacidad de hongos micorrizógenos de actuar como agentes de biocontrol de enfermedades originadas por *Fusarium* spp. fitopatógenos. En esta línea, Filion et al. (2003) caracterizaron la interacción *Fusarium solani* (Mart.) Sacc. f. sp. *phaseoli* (Burkholder) W.C. Snyder & H. N. Hans. y *Glomus intraradices* Schenk & Smith. en raíces de judía y en la micorrizosfera del suelo mediante la cuantificación de ADN de ambos microorganismos, llegando a la conclusión de que la reducción de la población del patógeno se debía, más que a interacción directa, a las alteraciones bióticas y/o abióticas causadas en la micorrizosfera por la colonización de *G. intraradices*.

Otros trabajos persiguen la detección y cuantificación de ADN de *formae speciales* de *F. oxysporum*. Inami et al. (2010) diseñaron cinco series de iniciadores y sondas Taqman para detectar y cuantificar al agente causante de la Marchitez Vascular del tomate, *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* y sus tres razas patogénicas. Para ello emplearon aislados de las tres razas del patógeno, de otras *formae speciales* de la especie, de otras especies y de otros géneros fitopatógenos, así como aislados no patogénicos de *F. oxysporum*, seleccionando como diana para la amplificación las secuencias IGS del ADNr y las de los genes de avirulencia SIX4 y

SIX1. La combinación de los iniciadores y las sondas lograba la exacta cuantificación del ADN de los aislados de esta *forma specialis* y de sus tres razas patogénicas extraído de micelio y de suelo artificialmente infestado. Pasquali et al. (2004) también se basaron en el diseño de iniciadores y sondas Taqman específicos para desarrollar una qPCR que posibilitara la identificación exacta de *F. oxysporum* Schlechtend.:Fr. f. sp. *chrysanthemi* G.M. Armstrong, J.K. Armstrong & R.H. Littrell aislado de plantas de magarza (*Argyranthemum frutescens* L.). El protocolo de qPCR desarrollado resultó más eficaz en la identificación y detección del patógeno que la PCR específica convencional debido a su mayor sensibilidad (hasta 300 fg), lo cual permitía la detección del patógeno a los 2 y 5 días después de la inoculación en el tejido radical y caulinar infectado, respectivamente.

Las semillas infectadas y/o infestadas constituyen una fuente de dispersión de agentes fitopatógenos muy importante, de manera que la búsqueda de herramientas que detecten la presencia del patógeno sobre o dentro de la semilla se erige como una medida de suma relevancia en el manejo de enfermedades transmitidas por esta vía. Pasquali et al. (2006) desarrollaron un método que mejoró la detección de *F. oxysporum* Schlechtend.:Fr. f. sp. *basilici* (Dzidzariya) Armstr. & Armstr. en semillas de albahaca (*Ocimum basilicum* L.), hasta entonces realizada mediante PCR anidada o “nested”-PCR. Estos autores diseñaron iniciadores y sondas Taqman basándose en secuencias RAPDs específicas para el patógeno. La técnica qPCR permitió la identificación y cuantificación exacta del patógeno en semillas tanto interna como externamente con una sensibilidad de hasta 1 pg de ADN genómico y con un significativo ahorro de tiempo respecto a la metodología “nested”-PCR.

Por otra parte, Zambounis et al. (2007) diseñaron iniciadores específicos para identificar y cuantificar específicamente ADN de *F. oxysporum* Schlechtend.:Fr. f. sp. *vasinfectum* (Atk.) W.C. Snyder & H.N. Hans. en tejidos de algodón y de suelo basándose en la región IGS del ADNr. Emplearon aislados de *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum*, de otras *formae speciales*, aislados no patogénicos de *F. oxysporum*, de *Fusarium* spp. y aislados de otros géneros fitopatógenos que causan Marchitez Vascular en algodón, y como fluoróforo SYBR Green. La qPCR resultó específica para los aislados de Australia y altamente sensible pudiendo detectar hasta 10^4 conidias/g suelo infestado y 5 pg/ μ l de ADN patógeno procedente de suelo y micelio, respectivamente. Asimismo Zhang et al. (2005)

también emplearon SYBR Green como fluoróforo en el desarrollo de un protocolo de qPCR que posibilitara la correcta identificación y cuantificación de *F. oxysporum* Schlechtend.:Fr. f. sp. *niveum* (E.F. Sm.) W.C. Snyder & H.N. Hans. en suelos naturalmente infestados cultivados de sandía (*Citrullus lanatus* (Thunb.) Matsum. & Nakai) y melón. En el desarrollo de la técnica, se diseñaron iniciadores específicos del patógeno basados en la región ITS del ADNr y emplearon 118 aislados pertenecientes a diversos grupos de oomicetos y hongos (Basidiomicota, Ascomicota y Deuteromicota). Los iniciadores diseñados sólo amplificaron específicamente ADN de los aislados de *F. oxysporum* f. sp. *niveum* con una sensibilidad de hasta 100 fg.

La qPCR también se ha aplicado para dilucidar si las secuencias diana que se persigue amplificar se encuentran en copia única o múltiple en el genoma. Así, Lievens et al. (2007) investigaron si las secuencias RAPD seleccionadas para identificar específicamente los patógenos de pepino (*Cucumis sativus* L.) *F. oxysporum* Schlechtend.:Fr. f. sp. *cucumerinum* J.H. Owen y *F. oxysporum* f. sp. *radicis-cucumerinum* se encontraban en copia única o múltiple en el genoma, obteniendo como resultado del estudio que las secuencias amplificadas se encontraban en copia única.

Por último destacar que esta técnica también se ha aplicado al estudio del papel como agentes de biocontrol de enfermedades de aislados no patogénicos de *F. oxysporum*. Dicho papel se demostró en el estudio realizado por Pantelides et al. (2009) en el patosistema *Verticillium dahliae* Kleb./berenjena (*Solanum melongena* L.), en el que el aislado no patogénico de *F. oxysporum* F2 ocasionó una reducción de la colonización vascular y de la severidad de la enfermedad.

I.1.3.2. Técnicas basadas en microscopía convencional y confocal

I.1.3.2.1 Introducción

Las técnicas de microscopía son de gran importancia en el estudio de las interacciones planta-patógeno, ya que la visualización directa de estas interacciones proporciona un relevante avance en el conocimiento y comprensión del proceso de infección que puede contribuir al desarrollo de estrategias adecuadas de protección de cultivos de interés agronómico frente al microorganismo patógeno. Estas interacciones se inician a nivel celular y pueden ser cruciales para el resultado final de susceptibilidad o resistencia al

establecimiento de la enfermedad. Existen otras aproximaciones para el análisis de estas interacciones como son los estudios bioquímicos de extractos tisulares, pero dichos estudios no proporcionan alta resolución de las respuestas celulares en situaciones en las que las interacciones planta-patógeno no son uniformes dentro de la planta. En estos casos, la capacidad de detectar visualmente las interacciones llega a ser particularmente importante (Heath, 2000), como ocurre en el proceso de penetración del patógeno en la planta huésped (Mendgen et al., 1996), paso crucial para el éxito del parasitismo, que conlleva el desarrollo de diversas estructuras y estrategias de invasión para vencer las barreras presentes en los órganos del huésped y que puede ser abordado y comprendido mediante la aplicación de diversas modalidades de microscopía.

Una de estas modalidades es la microscopía electrónica, con sus dos variantes microscopía electrónica de transmisión (TEM) y microscopía electrónica de barrido (SEM), la cual se emplea principalmente para examinar las interacciones subcelulares entre los tejidos del huésped y microorganismos que tienen lugar durante del proceso de infección de plantas cultivadas por sus patógenos (Gupta et al., 2010). Con el tiempo su utilidad ha aumentado con el desarrollo de procedimientos que posibilitan la identificación y localización de moléculas químicas como proteínas relacionadas con la patogénesis (Floch et al., 2009), con la resistencia a una enfermedad (Das Gupta et al., 2008; Kang et al., 2008) o pigmentos fotosintéticos (Abdel-Fattah et al., 2007); así como de átomos específicos, como por ejemplo átomos de silicio (Fauteux et al., 2006; Ghanmi et al., 2004) o cromo y plomo (Arias et al., 2010), ejerciendo un papel protector frente al agente patógeno el primero, y un efecto nocivo sobre el crecimiento de la planta los segundos; aspectos que quedan fuera de las posibilidades que ofrece la microscopía óptica convencional (Heath, 2000).

La microscopía óptica en el área de la Fitopatología y, concretamente, en el estudio de la interacción planta-hongos fitopatógenos se ha utilizado fundamentalmente para determinar el proceso de infección del patógeno sobre sus huéspedes susceptibles a través del tiempo (Gupta et al., 2009, 2010; Holub et al., 1994; Jiménez-Díaz et al., 1989a; Soyly y Soyly, 2003; Stevenson et al., 1997) con todos los fenómenos y/o alteraciones inherentes a dicho proceso; es decir, formación de nuevas estructuras celulares, degradación de estructuras del huésped, etc. Aunque el microscopio óptico no logra la resolución proporcionada

por el microscopio electrónico, ha experimentado recientemente un resurgimiento en el ámbito de la Fitopatología, debido a la evolución y desarrollo de la microscopía de fluorescencia y la microscopía confocal (Heath, 2000). Estas novedosas variantes permiten el estudio de las interacciones “*in vivo*” y utilizando métodos no destructivos. Para ello ha sido de gran importancia el desarrollo de nuevos marcadores moleculares como son fragmentos de ADN codificantes de proteínas autofluorescentes como la GFP (“Green Fluorescent Protein”) y derivadas, lo cual unido a la creciente facilidad con la que se pueden generar células y plantas transgénicas ha permitido la visualización de estructuras celulares fluorescentes con una mínima manipulación de la muestra. La aplicación de ambas técnicas en el estudio de las interacciones planta-patógeno se puede hacer de forma conjunta y complementaria (Czymmek et al., 2007; Michaelse et al., 2009b; Ramírez-Suero et al., 2010). La proteína GFP ha facilitado mucho el estudio de las interacciones planta-patógeno y se ha empleado en distintas especies patógenas tanto como un marcador para caracterizar el proceso de colonización (Czymmek et al., 2007; Lagopodi et al., 2002; Ramírez-Suero et al., 2010), como para estudiar el patrón espacial de expresión génica y de localización proteica (Michaelse et al., 2009b; van der Does et al., 2008).

I.3.2.2. La microscopía “sensu lato” en el estudio de la interacción *Fusarium* spp./garbanzo

Aunque existen pocos estudios en la literatura fitopatológica en los que se aborde el estudio de proceso de infección de *Fusarium* spp. sobre cultivares de garbanzo mediante la aplicación de la microscopía óptica y la microscopía electrónica, la aplicación de estas dos herramientas biotecnológicas se describe con relativa frecuencia en el estudio de otros patosistemas (Alfaro-Fernández y García-Luis, 2009; Benhamou y Garand, 2001; Olivain y Alabouvette, 1997, 1999; Romero et al., 2007; Waugh et al., 2005).

Gupta et al. (2009, 2010) abordaron el estudio histopatológico de la penetración y colonización de la raíz de la planta de garbanzo por *F. oxysporum* f. sp. *ciceris*. Estudiaron la interacción entre la raza 1A del patógeno y dos cultivares del huésped, JG-62 (susceptible) y WR-315 (resistente). Sus observaciones mediante microscopía óptica, revelaron la presencia de hifas del hongo en los vasos xilemáticos a los 4 días después de la inoculación (ddi) en fragmentos

radicales del huésped en la interacción compatible, aunque no se observó deposición fenólica ni desintegración celular extensa, lo cual sí tuvo lugar a gran escala a los 8 ddi. A los 12 ddi, los vasos xilemáticos estaban totalmente obstruidos por las hifas del patógeno y mostraban indicios de desintegración, de forma que a partir de esta fecha no se pudieron ser analizadas debido a la pérdida de la arquitectura normal de la raíz. En la interacción incompatible no se observó presencia de hifas del hongo en los vasos xilemáticos ni obstrucción de los vasos, incluso en muestreos posteriores a 12 ddi (Gupta et al., 2010).

Estos resultados se confirmaron con observaciones con el microscopio electrónico de barrido (SEM). Así, microconidias del hongo se localizaron en el interior de los vasos xilemáticos del cultivar JG-62 a los 4 ddi y se observó comienzo de deterioro tisular. A los 8 ddi aumentó el número de microconidias y el daño del tejido vascular. A los 12 ddi, las microconidias no sólo se incrementaron en número sino que mostraban diferentes etapas divisionales y se apreciaba la presencia de macroconidias en cadenas, y la arquitectura tisular original resultó destruida. En el cultivar WR-315, las secciones no mostraron anomalía incluso después de 15 ddi, detectándose la presencia de microconidias en el xilema a partir de los 22-24 ddi, y observándose ligera colonización fúngica y desintegración tisular a los 28 ddi (Gupta et al., 2010).

Anteriormente, Jiménez-Díaz et al. (1989a) estudiaron mediante microscopía óptica el proceso de colonización de cultivares de garbanzo por *F. oxysporum* f. sp. *ciceris*, analizando interacciones compatibles e incompatibles con aislados del patógeno representativos de los patotipos de Amarillez (raza 0) y Marchitez (raza 5). Estos autores encontraron un patrón de colonización similar en las interacciones compatibles, en el que la zona de inserción de los cotiledones y sus proximidades constituía el sitio preferencial de penetración de ambas razas, el cual proseguía con la invasión del córtex y finalizaba con la presencia del patógeno en el xilema. La diferencia más destacable entre los dos patotipos radicaba en la velocidad de colonización, siendo mucho mayor en el caso del aislado perteneciente al patotipo de Marchitez. En las interacciones incompatibles no se encontraron estructuras fúngicas en el interior de los tejidos de la planta. Además, la infección del patógeno provocó modificaciones histológicas como la formación de cavidades entre floema y xilema, y xilema y médula, así como la degeneración de células parenquimáticas en la médula. Posteriormente, Stevenson et al. (1997)

también utilizaron esta aproximación metodológica para estudiar el proceso de infección de aislados del patotipo de Marchitez (razas 1A y 2) en interacciones compatibles e incompatibles y observaron, al igual que Jiménez-Díaz et al. (1989a), que la zona de unión de la semilla a la raíz representaba la región preferencial de penetración de las hifas del hongo, debido posiblemente a la existencia en esta zona de numerosos poros. Asimismo, al igual que sus predecesores, no encontraron rastros de micelio invasor en el tejido vascular de las interacciones incompatibles.

El microscopio electrónico de barrido (SEM) se ha utilizado en el estudio de agentes de biocontrol de la Fusariosis Vascular del garbanzo. Un ejemplo lo constituyen los estudios realizados por DasGupta et al. (2006) y Nautiyal et al. (2002), quienes analizaron la capacidad de las cepas bacterianas *Paenibacillus lentimorbus* (Dutky 1940) Pettersson et al. 1999 NRRL B-30488 y *Pseudomonas fluorescens* (Flügge 1886) Migula (1895) NBRI2650 en el control de la enfermedad. Dos horas después de la coinoculación de las plantas de garbanzo se detectaron tanto las cepas bacterianas como las hifas de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* en la superficie de la raíz, teniendo lugar la degradación de las hifas del patógeno por *Pa. lentimorbus* y *P. fluorescens* a las 6 y 12 horas después de la inoculación respectivamente, y la lisis de las mismas a las 12 y 36 horas después de la inoculación. La degradación y lisis implica la producción de enzimas hidrolíticas de la pared celular del patógeno, como quitinasas y β -1,3-glucanasas. Los resultados obtenidos refrendan la idoneidad de la utilización de técnicas de microscopía para el estudio tanto del proceso de patogénesis por diversas *formae speciales* de *F. oxysporum* como de las interacciones existentes entre agentes de control biológico de la enfermedad y este hongo fitopatógeno en el sistema radical de sus plantas huésped.

I.3.2.3. La microscopía confocal en el estudio de la interacción *Fusarium oxysporum*/planta huésped

Como anteriormente se ha comentado en el apartado I.3.2.1., la microscopía de fluorescencia y la microscopía confocal constituyen, en muchos casos, dos herramientas biotecnológicas complementarias en el estudio de las interacciones planta-patógeno.

En esta línea Ramírez-Suero et al. (2010) emplearon ambas herramientas en el estudio de la infección de cultivares de *Medicago trunculata* Gaertn. con diferente nivel de resistencia a aislados de *F. oxysporum* Schlechtend.:Fr. f. sp. *medicaginis* (Weimer) W. C. Snyder & H. N. Hans. transformados con el gen codificante del marcador GFP. Estos autores encontraron que el proceso de colonización variaba ligeramente con respecto al descrito para otras *formae speciales* de *F. oxysporum*, es decir, una vez alcanzados los vasos xilemáticos de la raíz el patógeno progresa intracelularmente restringido en el lumen de los mismos hasta colonizar todo el eje vegetal (Bishop y Cooper, 1983; Jiménez-Díaz et al., 1989a; Kraft, 1994; Ramírez-Suero et al., 2007); sin embargo, en el caso de *F. oxysporum* f. sp. *medicaginis*, una vez alcanzado el xilema, tiene lugar un crecimiento intra e intercelular y además el crecimiento micelial no queda limitado al tejido vascular sino que el patógeno realiza incursiones ocasionales en el córtex. Martín-Rodríguez et al. (2007) extendieron la monitorización del proceso de colonización de la planta de judía por *F. oxysporum* Schlechtend.:Fr. f. sp. *phaseoli* J.B. Kendrick & W.C. Snyder hasta la parte aérea y observaron que el aislado más virulento de los utilizados colonizaba con mayor rapidez los haces xilemáticos que el menos virulento.

Debido a la escasez de sistemas modelo que ilustren los procesos implicados en las enfermedades causadas por hongos fitopatógenos de suelo, Czymmek et al. (2007) emplearon ambas tecnologías para monitorizar y analizar el proceso de colonización de los tejidos radicales de plantas huésped por estos patógenos. Para ello, seleccionaron la interacción *F. oxysporum* y *A. thaliana*. De su estudio concluyeron que la penetración del patógeno tiene lugar a través del ápice de la raíz principal o de las raíces laterales y que es necesaria la acumulación de micelio en dichas zonas para que ésta tenga lugar. Asimismo, estos autores determinaron que la posterior colonización de córtex y xilema conlleva la inducción de autofluorescencia de las células del huésped.

La mayoría de trabajos que se pueden encontrar en la literatura fitopatológica en los que se utiliza la microscopía confocal para estudiar la interacción de aislados patogénicos de *F. oxysporum* con su planta huésped se centran en la planta de tomate. Así, Michaelse et al. (2009b) emplearon la microscopía confocal en el estudio del papel del regulador génico SGE 1 (“SIX Gene Expression 1”) en el proceso de infección de la planta de tomate por *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*. Las imágenes obtenidas mostraron que este regulador transcripcional era necesario para el crecimiento parasítico en raíces de tomate, pero no para la colonización y penetración. Asimismo mediante el empleo de microscopía de fluorescencia demostraron que la localización de esta proteína era nuclear. En cambio la proteína Frp1 (“F-box protein required for pathogenicity”) si resultó imprescindible para la colonización de la raíz de tomate por el mismo patógeno. Así, las imágenes obtenidas mediante microscopía confocal mostraron que la raíz de tomate infectada con aislados mutantes de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* afectados en la expresión de la proteína Frp1 prácticamente no se encontraba colonizada por el patógeno (Duyvesteijn et al., 2005). Van der Does et al. (2008) demostraron mediante esta herramienta biotecnológica que la proteína SIX1 (“Secreted In Xylem 1”), relacionada con la virulencia de este patógeno sobre la planta de tomate, principalmente se expresa cuando tiene lugar el contacto de las hifas del hongo con células vivas del huésped, resultando la expresión muy baja o nula cuando el hongo crece en cultivo axénico sin interacción con el huésped.

Existen investigaciones que se centran en aspectos relacionados con la colonización superficial de la raíz de tomate por el patógeno (Lagopodi et al., 2002), en los cuales se concluye que el contacto inicial tiene lugar entre las hifas de *F. oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* y los pelos radicales de la planta, que los sitios preferenciales de colonización son las zonas de unión entre las células epidérmicas de la raíz del huésped y la ausencia de sitios específicos de infección.

Asimismo, en este mismo patosistema, encontramos numerosos estudios centrados en el control biológico de la enfermedad. En algunos trabajos se investiga la capacidad de biocontrol de aislados no patogénicos de *F. oxysporum* y se llega a la conclusión de que no existe un antagonismo directo con aislados patogénicos de *F. oxysporum*. Además, la competición entre aislados patogénicos y no patogénicos se produce por nutrientes y por inducción de resistencia sistémica más que por ocupación de sitios específicos de infección (Olivain et al., 2006). Por

otra parte, Bolwerk et al. (2005) proponen que la germinación preferente de las conidias de los aislados no patogénicos provocada por los exudados radicales de la planta huésped puede reducir el crecimiento del patógeno hacia la superficie radical (menor cantidad de nutrientes y sitios de unión a la raíz), así como la necesidad de una mayor concentración de inóculo del aislado no patogénico respecto al patogénico para que el control sea efectivo. Bolwerk et al. (2003) analizaron la interacción de cepas bacterianas de *P. fluorescens* y *Pseudomonas chlororaphis* (Guignard and Sauvageau, 1894) Bergey (1930) con aislados de *F. oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* en la rizosfera de plantas de tomate. Los resultados indicaron que tanto la capacidad de colonización de las hifas del hongo por ambas bacterias como la competencia por los sitios específicos de unión juegan un papel importante en el biocontrol de la enfermedad por ambas cepas bacterianas.

En otros patosistemas, esta técnica se ha aplicado para apoyar estudios sobre las vías de señalización que se activan en *A. thaliana* en reacciones de resistencia a la infección por aislados de *F. oxysporum* (Thatcher et al., 2009). También existen trabajos en los que se utiliza la microscopía confocal para determinar la capacidad de *F. oxysporum* como agente de biocontrol sobre malas hierbas (*Orobancha aegyptiaca* Pers.) (Cohen et al., 2002), en los que se indica que el inicio de la penetración de las hifas del hongo en los tubérculos de *O. aegyptiaca* tiene lugar a las 24 h después de la inoculación con esporas del agente de biocontrol.

Como se ha indicado anteriormente la aplicación de la microscopía de fluorescencia en el estudio de las interacciones planta-patógeno suele estar ligada a la microscopía confocal, lo cual no es óbice para que existan diversos trabajos que se basen únicamente en la microscopía de fluorescencia para el estudio del proceso de infección de la raíz de tomate. Di Pietro et al. (2001) se basaron en esta herramienta para ilustrar la importancia de las proteínas MAPK (“mitogen-activated protein kinase”) en el proceso de infección de la raíz de tomate por *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*. La inactivación de dichas proteínas conlleva una disminución en la viabilidad de las hifas del patógeno para penetrar y colonizar los tejidos del huésped. La microscopía de fluorescencia fue la herramienta utilizada por Nahalkova et al. (2008) para mostrar el diferente patrón de colonización de la raíz de tomate por aislados de *F. oxysporum* patogénicos y no patogénicos en

función del medio de cultivo empleado en la inoculación. También Xu et al. (2006) se apoyaron en esta técnica para ilustrar la colonización diferencial de la raíz de tres variedades de tomate por las hifas de *F. oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*. Por lo que respecta a otros patosistemas, Pantelides et al. (2009) se basaron en esta metodología para demostrar la capacidad de aislados no patogénicos de *F. oxysporum* como agentes de biocontrol de *V. dahliae* en berenjena, mientras que Papanicolaou et al. (2009) validaron la utilización de la proteína roja autofluorescente DsRed en aislados no patogénicos de *F. oxysporum* transformados con ésta para investigar la colonización, distribución y supervivencia en plantas de banana.

I.1.3.3. Otras técnicas aplicadas al estudio de procesos relacionados con mecanismos de defensa y patogénesis en la interacción *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*/garbanzo

En todo proceso de infección de un microorganismo patógeno de su planta huésped tiene lugar la activación y síntesis de distintas proteínas y metabolitos secundarios por parte del huésped y del patógeno, que están relacionados con mecanismos de resistencia e infección respectivamente, de cuya interacción depende el establecimiento de enfermedad en el huésped. De ahí que, en el área de la Fitopatología, existan numerosos trabajos que aborden el estudio y caracterización de los distintos procesos bioquímicos implicados en las interacciones planta-patógeno que nos han permitido una mejor comprensión de los mecanismos de patogénesis y resistencia subyacentes a las mismas mediante la aplicación de diferentes herramientas biotecnológicas.

La pared celular tiene un papel crucial en el proceso de infección y colonización de un microorganismo patógeno de su planta huésped, ya que constituye la barrera física más importante y general que interpone la planta a la penetración del patógeno. Su degradación constituye uno de los procesos fundamentales en el inicio del proceso de patogénesis de plantas, de ahí que la mayoría de microorganismos fitopatógenos produzcan una batería de enzimas degradativas de la pared celular vegetal (EDPCV) con actividad frente a los diversos polímeros que la componen. En relación con el patosistema *F. oxysporum* f. sp. *ciceris*/garbanzo, las enzimas pécticas como la poligalacturonasa (PG) y la pectato liasa (PL) juegan un papel muy importante en la patogénesis de la Fusariosis Vascular del garbanzo como demostraron Pérez-Artés y Tena (1989) estimando la

actividad enzimática in vitro de las mismas mediante el método de Somogyi-Nelson en un trabajo en el que utilizaron aislados de los patotipos de Amarillez (raza 0) y Marchitez (raza 5) de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* creciendo en un medio con restos de pared celular de garbanzo como única fuente de carbono. Posteriormente, Pérez-Artés y Tena (1990) abordaron el estudio de la síntesis in vitro de isoformas de estas enzimas por estas dos razas del patógeno obteniendo como resultado tras la purificación de los extractos crudos enzimáticos mediante las metodologías de cromatografía de filtración en gel, cromatografía de intercambio aniónico y cromatografía de intercambio catiónico, la síntesis de tres isoformas de PG y una de PL por la raza 0 del patógeno, mientras que la raza 5 sintetizó una única isoforma de PG y dos de PL. La estimación de la actividad enzimática de las distintas isoformas deparó, en conjunto, una menor actividad degradativa de las isoenzimas sintetizadas por la raza 5. Por lo que respecta al otro grupo de EPDCV, Jorge et al. (2005) estudiaron la producción de xilanasas (XYL) in vitro de aislados de la raza 0 y la raza 5 de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* empleando como única fuente de carbono xilano o restos de pared celular de garbanzo. El análisis de la electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE) de los filtrados de ambos medios de cultivo sólo determinó la existencia de diferencias menores en los patrones proteicos de ambas razas. Los valores de actividad enzimática, estimados mediante el método de Somogyi-Nelson, de las xilanasas sintetizadas mostraron que ambos patotipos producían cantidades similares de xilanasas, al contrario, como hemos mencionado anteriormente de lo que ocurría con la producción de pectinasas (Pérez-Artés y Tena, 1990). La técnica del isoelectroenfoque (IEE) mostró que la actividad xilanasasa de los filtrados conteniendo restos de pared celular se resolvió dentro de las fracciones básica y neutra, mientras que los filtrados derivados de los cultivos creciendo en xilano contenían una fracción ácida adicional. Asimismo, las técnicas de cromatografía de intercambio catiónico y cromatografía de intercambio aniónico permitieron la purificación de una xilanasasa principal común de 21,6 kDa. Posteriormente Jorge et al. (2006) se centraron en determinar la producción de estos dos grupos de EDPCV durante el desarrollo de la Fusariosis Vasculosa en plantas de garbanzo inoculadas con aislados de las razas 0 y 5 de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris*, debido a la carencia de información sobre la actividad de estas enzimas degradativas en la interacción patógeno-garbanzo, existiendo información sólo de estudios in vitro (Jorge et al., 2005; Pérez-Artés y Tena, 1989, 1990). El resultado del análisis de las fracciones obtenidas de la cromatografía de

filtración en gel deparó la síntesis de las mismas isoenzimas pécticas por ambas razas patogénicas, esto es, una PG y dos PL, así como una tendencia general de una mayor actividad de estas isoformas en la raza 5 respecto a la raza 0 del patógeno, a diferencia de los resultados obtenidos en los estudios in vitro en los que se obtenía una síntesis de isoenzimas diferente para las distintas razas y una mayor actividad enzimática de la raza 0 respecto a la 5. Por otro lado el estudio de la correlación entre los niveles de actividad enzimática y el área bajo la curva del progreso de enfermedad estandarizada (ABCPEE) reveló una correlación negativa para PG para la raza 0 y, por el contrario, una correlación positiva para PL para la raza 5 en tallo de garbanzo, lo cual llevó a la conclusión de que la primera enzima juega un papel principal en las fases iniciales de desarrollo de la Fusariosis Vascular mientras que la segunda lo haría en las fases finales (Jorge et al., 2006).

Entre los diversos mecanismos desarrollados por la plantas ante la invasión de patógenos específicos o no específicos de huésped destaca la rápida y transitoria formación de especies reactivas del oxígeno (EROs), las cuales provocan un estallido oxidativo que desencadena la muerte celular y el desarrollo de la denominada respuesta hipersensible (HR) en la región del huésped donde intenta penetrar el patógeno para detener su crecimiento. En el campo de la Fitopatología, estas respuestas defensivas sólo habían sido firmemente establecidas en patógenos biotrofos foliares de plantas, pero existía escasa información sobre el papel de este mecanismo defensivo en patosistemas constituidos por hongos necrotrofos obligados infectando raíces. De ahí que García-Limones et al. (2002) se propusieran determinar el papel de las EROs en el patosistema *F. oxysporum* f. sp. *ciceris*/garbanzo. Se evaluó la tasa de peroxidación de lípidos y los niveles de actividad de varias enzimas antioxidantes (ascorbato peroxidasa (APX), catalasa (CAT), glutatión reductasa (GR), peroxidasa dependiente de guaiacol (GPX) y superóxido dismutasa (SOD)), así como de la diamín oxidasa empleando distintas metodologías espectrofotométricas en raíces y tallos de cultivares de garbanzo susceptibles (JG-62) y resistentes (WR-315) infectados con la raza 5 altamente virulenta del patógeno. Los resultados obtenidos les llevaron a la conclusión de que el aumento de la actividad DAO en tallos y el incremento temprano de la peroxidación de lípidos y de las actividades CAT y SOD en raíces se pueden asociar con resistencia a la Fusariosis Vascular, mientras que la inducción de estos tres últimos parámetros en raíces y tallos junto con la de las actividades APX, GR (sólo en raíces) y GPX (sólo en tallos) se asocian

más con el establecimiento de una interacción compatible. Asimismo, la inducción del sistema enzimático antioxidante y otros marcadores de estrés oxidativo observada en el presente trabajo durante el desarrollo de la enfermedad sugiere que los cambios en el metabolismo oxidativo no tienen por qué estar restringidos a patógenos foliares causando reacciones de resistencia mediante HR. En el estudio anteriormente mencionado, se utilizaron muestras de extractos de plantas completas, es decir, se analizó el estado redox intracelular (simplástico). García-Limones et al. (2009) se propusieron completar el trabajo anterior analizando el estado redox extracelular (apoplástico) de la raíz en las mismas interacciones compatibles e incompatibles. El resultado de la estimación de la actividad enzimática espectrofotométrica basada en la evaluación de la tasa de formación de NADPH, deparó la presencia de las mismas enzimas analizadas en el trabajo anterior (García-Limones et al., 2002) en el fluido apoplástico, excepto de la enzima CAT. Por lo que respecta a las respuestas diferenciales entre las distintas interacciones, la actividad APX se incrementó en la interacción incompatible y decreció en la compatible respecto a las plantas control sin inocular. En el caso de las actividades GR, SOD y SOD el patógeno causó la misma respuesta en ambas interacciones, pero tuvo lugar más temprano (GR y SOD) o en niveles más altos (DAO) en la interacción incompatible.

Otra de las respuestas defensivas de la planta huésped a la infección de un microorganismo patógeno consiste en el incremento de la síntesis de fitoalexinas, las cuales pueden dañar la pared celular, retrasar la maduración, alterar el metabolismo o impedir la reproducción del patógeno en cuestión. Se ha descrito la actividad antifúngica de las fitoalexinas en numerosos patosistemas, sin embargo no son universalmente activas, de ahí que Stevenson et al. (1997) abordaran su síntesis y papel de las fitoalexinas isoflavonoides medicarpina y maackiaina en la interacción de la planta de garbanzo con *F. oxysporum* f. sp. *ciceris*, concretamente de los cvs. JG-62, H208, CPS1 y WR-315 con las razas 1A y 2 (patotipo de Marchitez) del patógeno estimando su producción en la zona radical mediante el empleo de la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). El resultado de este trabajo demostró un incremento de la síntesis de ambas fitoalexinas por los distintos cultivares cuando se inocularon con ambas razas del patógeno, siendo mayor en los cultivares resistentes que en los susceptibles y, por tanto, demostrando la implicación de tales compuestos en la resistencia a las razas de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris*. Asimismo, se observó una menor inducción en la síntesis

de fitoalexinas de los distintos cultivares en la interacciones es las que estaba implicada la raza 2 (más virulenta) respecto a la raza 1A (menos virulenta) del patógeno, lo cual podría estar relacionado con el distinto nivel de virulencia de estas razas. Posteriormente, Cachinero et al. (2002) estudiaron el papel de las fitoalexinas en la inducción de resistencia causado por la inoculación previa con aislados de *F. oxysporum* no patogénicos y de aislados de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* incompatibles en garbanzo. Como resultado de su investigación observaron, mediante el empleo de la tecnología HPLC, que la infección con los agentes inductores favorecía la síntesis de medicarpina y maackiaina en la raíz de la planta, siendo mayor el efecto inductor de los aislados no patogénicos. Asimismo, las estimaciones de actividad enzimática del extracto crudo radical mostraron que esta inducción originó también un incremento de la actividad enzimática de quitinasas, β -1,3 glucanasas y peroxidasas, siendo mayor, de manera similar a lo descrito para las fitoalexinas, la actividad enzimática inducida por los aislados no patogénicos.

Por otra parte, en relación con las respuestas defensivas de la planta huésped y de patogénesis del agente los estudios proteómicos y de genómica funcional constituyen dos importantes aproximaciones metodológicas que pueden facilitar el conocimiento y comprensión de las interacciones planta-patógeno. De ahí, que Palomares Rius (2009) abordara, aplicando ambas metodologías, la determinación de los mecanismos subyacentes a la pérdida/mantenimiento de la resistencia a la Fusariosis Vascular en el patosistema *F. oxysporum* f. sp. *ciceris*/garbanzo mediante la inoculación de cultivares resistentes (CA336.14.3.0 y ICC14216K) a la raza 5 del patógeno. El análisis proteómico llevó a la conclusión que la línea CA336.14.3.0 desarrolla una mayor respuesta a nivel proteómico de proteínas relacionadas con la patogénesis/resistencia que la línea ICC14216K. Por lo que respecta, a los resultados de la expresión de genes relacionados con la respuesta defensiva de la planta se observó una inducción de los genes de la ruta fenilpropanoide, esto es, fenilalanina amoniaco liasa (PAL), trans-cinnamato 4-monoxigenasa (C4H) e isoflavona reductasa (IFR) en ambas líneas de garbanzo en las fases iniciales del establecimiento de la infección.

I.2. NATURALEZA DE LA INVESTIGACIÓN PLANTEADA Y OBJETIVOS

El cultivo del garbanzo puede verse severamente afectado por diversas enfermedades de distinta etiología. Entre ellas, existen enfermedades causadas por distintos agentes fitopatógenos que comparten una gran similitud en cuanto a los síntomas que inducen en la planta. Así tenemos que la denominada “seca” o Marchitez y Podredumbre de Raíz del garbanzo puede ser causada por distintos *Fusarium* spp., *M. phaseolina* (Allen, 1983; Bhatti et al., 1992; Hawtin y Chancellor, 1978; Kraft et al., 1994; Trapero-Casas, 1983; Trapero-Casas y Jiménez-Díaz, 1985a), e incluso virus (Kaiser y Danesh, 1971; Trapero-Casas y Jiménez-Díaz, 1985a), y de forma individual o debido a la coinfección de varios de estos agentes fitopatógenos. Mientras que la identificación de algunos de los hongos fitopatógenos en base a sus caracteres morfológicos microscópicos resulta factible, otros, principalmente ciertos *Fusarium* spp., son difíciles de caracterizar e identificar, pudiendo conducir a una determinación errónea de la etiología de la enfermedad, y por consiguiente a un inadecuado y poco práctico manejo de ésta. La aparición de nuevas tecnologías basadas en el ADN, como la PCR-específica de especie ha permitido en gran medida solventar dicha problemática (Bogale et al., 2007; Capítulo II de la presente Tesis Doctoral), así como detectar y caracterizar la existencia de nuevos patógenos del cultivo del garbanzo hasta ahora no descritos, abriendo nuevas perspectivas en el estudio de la Ecología Microbiana y Epidemiología relacionadas con dicho cultivo.

En relación con la Ecología Microbiana de hongos fitopatógenos, el desarrollo de protocolos de PCR cuantitativa en tiempo real o qPCR ha posibilitado el estudio de Ecología de Poblaciones de diversas *formae speciales* de *F. oxysporum* causantes de Fusariosis Vasculares (Pasquali et al., 2004, 2006; Zhang et al., 2005; Zambounis et al., 2007), pero hasta la fecha no se disponía de un protocolo de qPCR que permitiera la detección y cuantificación específica de ADN de “*F. oxysporum sensu lato*” facilitando así el estudio de las poblaciones patogénicas y no patogénicas de *F. oxysporum* y sus interacciones con la microflora del suelo, medioambiente y genotipos de plantas de garbanzo (Capítulo III de esta Tesis Doctoral). Centrándonos en el estudio de la Ecología Microbiana y la Epidemiología de la Fusariosis Vascular del garbanzo, el desarrollo de un nuevo

protocolo de qPCR específico de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris*, y su posible aplicación junto al protocolo de qPCR específico de la especie ("*F. oxysporum sensu lato*") posibilitaría una mejor comprensión de las interacciones tanto en suelo como en planta de las poblaciones patogénicas y no patogénicas de *F. oxysporum*, siendo de gran utilidad en estudios epidemiológicos, de cuarentena y en el manejo de la enfermedad. En particular este protocolo sería útil para discriminar entre reacciones resistentes y tolerantes del germoplasma de garbanzo a razas de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* mediante la cuantificación del patógeno en infecciones asintomáticas y sintomáticas; valorar con exactitud la reacción de enfermedad mediante la correlación de la cantidad de patógeno en los tejidos de plantas infectadas con la cantidad de enfermedad desarrollada en germoplasma resistente/tolerante y/o la posterior aplicación de otras medidas de control de la enfermedad (biológicas, físicas o químicas); y evitar la utilización de suelos con riesgo mediante la selección de aquellos con cantidades de inóculo del patógeno reducidas o nulas (Capítulo IV de la presente Tesis Doctoral).

Respecto a la patogénesis de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* en garbanzo, la información existente en la literatura fitopatológica que aborda el proceso de infección y colonización de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* de la planta del garbanzo en base a la observación mediante microscopía óptica y/o electrónica es escasa e incompleta (Gupta et al., 2009, 2010; Jiménez-Díaz et al., 1989a; Stevenson et al., 1997). La irrupción de nuevas variantes de esta herramienta analítica como la microscopía láser confocal ha hecho posible estudiar con mayor precisión las interacciones planta-patógeno superando las dificultades en la observación asociadas a las metodologías tradicionales (Czymmek et al., 1994). Esta nueva herramienta metodológica ha permitido el estudio del proceso de infección de varias *formae speciales* de *F. oxysporum* en varios patosistemas (Martín-Rodríguez et al., 2007; Ramírez-Suero et al., 2010; van der Does et al., 2008), por lo que su aplicación al patosistema *F. oxysporum* f. sp. *ciceris*/garbanzo, tras la transformación de los aislados del patógeno con el gen codificante de una proteína exógena (ZsGreen) capaz de emitir autofluorescencia tras su excitación, permitirá caracterizar cualitativa y cuantitativamente el proceso de penetración y colonización de los tejidos vegetales de la planta de garbanzo y, por tanto, completar y mejorar el conocimiento existente en la literatura fitopatológica sobre el proceso de infección en este patosistema en la actualidad (Capítulo V de esta Tesis Doctoral).

Por todo lo anteriormente expuesto, el objetivo general de esta Tesis Doctoral se centra en **adquirir nuevos conocimientos en la Ecología Microbiana y Fitopatología de poblaciones de *Fusarium* spp. patogénicas y no patogénicas asociadas al cultivo del garbanzo que contribuyan al manejo eficiente de la Fusariosis Vascular en este cultivo.**

Para la consecución de dicho objetivo general se plantean los siguientes objetivos particulares:

1. Caracterizar molecular y patogénicamente a *Fusarium redolens* como un nuevo agente causante de “Fusarium yellows” en garbanzo.

2. Identificar y cuantificar con exactitud ADN de poblaciones de “*Fusarium oxysporum sensu lato*” en tejido vegetal y suelo mediante el desarrollo de protocolos de PCR convencional y cuantitativa en tiempo real (qPCR) específicos de la especie.

3. Identificar y cuantificar con exactitud ADN de poblaciones de *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* en tejido vegetal y suelo mediante el desarrollo de protocolos de qPCR que permitan caracterizar la resistencia a la Fusariosis Vascular de germoplasma de garbanzo.

4. Caracterizar cualitativa y cuantitativamente el proceso de infección en interacciones compatibles e incompatibles del patosistema *F. oxysporum* f. sp. *ciceris*/garbanzo mediante el empleo de la microscopía láser confocal.

CAPÍTULO II

Caracterización molecular y patogénica de *Fusarium redolens*, nuevo agente causal de "Fusarium yellows" en garbanzo

II.1. RESUMEN

En la presente Tesis Doctoral se cita por primera vez en la literatura científica de la asociación de *Fusarium redolens* con plantas de garbanzo mostrando síntomas similares a la Fusariosis Vascular en Líbano, Pakistán, Marruecos y España, así como se caracterizan molecular y patogénicamente diferentes aislados del patógeno obtenidos de plantas de garbanzo de distinto origen geográfico. Todos los aislados de *F. redolens* mostraron patrones de Polimorfismo en la Longitud de los Fragmentos de Restricción (RFLP) idénticos de la región del Espaciador Intergénico ribosomal (IGS) cuando se llevó a cabo la digestión con siete enzimas de restricción diferentes. En un análisis de Máxima Parsimonia utilizando el gen del Factor de Elongación y Traducción 1 α (TEF-1 α) todos los aislados de *F. redolens* de garbanzo se agruparon en el mismo clado, dentro del cual se pudieron identificar diferentes subclados. Estos subclados no estuvieron asociados con las distintas *formae speciales* descritas dentro de *F. redolens*, huésped ni origen geográfico de los aislados. Asimismo, en estos subclados, todos los aislados de *F. redolens* de garbanzo de España, Marruecos y Pakistán se agruparon juntos con la excepción del aislado L96-13 del Líbano que se agrupó en un subclado diferente. Los ensayos de patogenicidad utilizando tres cultivares de garbanzo y aislados de *F. redolens* de diferente origen geográfico indicó que este patógeno es moderadamente virulento en garbanzo. Además la infección por el patógeno induce síntomas similares a aquéllos originados por el patotipo de Amarillez de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris*, incluyendo el amarillamiento y necrosis del follaje desarrollado en progresión acrópeta desde la base del tallo y senescencia prematura de la planta y, como característica diferencial, la ausencia de decoloración de los tejidos vasculares. Asimismo se observaron lesiones necróticas en la raíz principal, necrosis en las raíces laterales y, ocasionalmente, necrosis cortical del cuello de plantas infectadas. Por otro lado, ya que *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* y *F. redolens* no son fácilmente distinguibles utilizando métodos de diagnóstico basados en su morfología y además pueden inducir síntomas similares en plantas de garbanzo infectadas, se debe prestar especial cuidado en evitar el diagnóstico erróneo de "Fusarium yellows" en garbanzo y en otros cultivos, como ha sucedido en el pasado. El empleo de protocolos moleculares disponibles en la actualidad que permiten la diferenciación

inequívoca de estos dos patógenos deberían ayudar al diagnóstico preciso de “Fusarium yellows” en la planta de garbanzo.

II.2. INTRODUCCIÓN

El garbanzo (*Cicer arietinum* L.) es una fuente importante de alimentación humana y animal que además contribuye a la mejora de la fertilidad del suelo, principalmente en áreas de secano (Sign y Saxena, 1996). En la Unión Europea, la producción del garbanzo se concentra en la Cuenca Mediterránea, con España como principal productor (FAOSTAT, 2009). En España, la mayor parte de los cultivos de garbanzo se localizan en el sur, principalmente en las provincias de Córdoba y Sevilla en Andalucía (MAPA, 2009).

El cultivo del garbanzo puede verse severamente afectado por varias enfermedades de diversa etiología. Entre ellas, la Fusariosis Vascular del garbanzo, causada por un *Fusarium oxysporum* Schlechtend.: Fr. f. sp. *ciceris* (Padwick) Matuo & K. Sato, constituye la enfermedad más importante de las causadas por patógenos habitantes del suelo, que limita el rendimiento del cultivo fundamentalmente en la Cuenca Mediterránea y el Subcontinente Indio (Jalali y Chand, 1992; Landa et al., 2004; Navas-Cortés et al., 2000). Las plantas afectadas de Fusariosis Vascular pueden mostrar un síndrome de Marchitez Vascular temprano a las pocas semanas después de la siembra o un síndrome de Marchitez Vascular tardío en etapas más avanzadas del ciclo de cultivo. La Marchitez Vascular temprana se caracteriza por la flacidez de las hojas seguida por una coloración verde-grisácea, desecación y colapso de la planta completa; mientras que las plantas que muestran Marchitez Vascular tardía exhiben caída de los peciolos y foliolos, seguida del amarillamiento y necrosis del follaje (Jiménez-Díaz et al., 1989, 2011). Aunque ambos síndromes son consecuencia directa de la infección vascular del patógeno, también pueden ser causados por otros patógenos de plantas, de manera que si no son diagnosticados correctamente pueden ser asignados de manera errónea como debidos a la Fusariosis Vascular. Por ejemplo, varios virus vegetales pueden inducir flacidez y amarillez de hojas en plantas de garbanzo (Kaiser y Danesh, 1971; Nene et al., 1978). Además también se han encontrado con frecuencia plantas mostrando amarillez y necrosis foliar en

cultivos afectados por el complejo de enfermedades denominado 'Marchitez y Podredumbre de Raíz' (MPR) descrito en California, India y sur de España y que se ha asociado con infecciones por diversos hongos de suelo, incluyendo, *F. oxysporum* f. sp. *ciceris*, *F. solani* (Mart.) Appl. & Wr. f. sp. *pisi* (Jones) Snyder & Hans., *Fusarium solani* f. sp. *eumartii* (C. Carpenter) W.C. Snyder & H.N. Hans. (= *Fusarium eumartii* Carpenter), y *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid. (Grewal et al., 1974; Kraft, 1969; Nene et al., 1978; Trapero-Casas y Jiménez-Díaz, 1985; Westerlund et al., 1974). En estos casos, así como en plantas que pueden estar afectadas por estreses abióticos, cuando se han llevado a cabo aislamientos en cultivo puro, se pueden encontrar con relativa frecuencia aislados no patogénicos de *F. oxysporum* Schlecht. Emend. Snyder & Hans. u otros *Fusarium* spp. con morfología similar a la del complejo de especies de *F. oxysporum* (Alves-Santos et al., 1999, Kaiser et al., 1993; Trapero-Casas y Jiménez-Díaz, 1985; R.M. Jiménez-Díaz y B.B. Landa, *resultados no publicados*). Consecuentemente, el aislar una especie de *Fusarium* de plantas de garbanzo mostrando síntomas similares a los descritos para el síndrome de Marchitez Vascular, incluso aunque se realice de la parte alta del tallo, no garantiza que se trate de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* y puede conducir a diagnosticar erróneamente la enfermedad como Fusariosis Vascular si los aislados no son caracterizados posteriormente mediante aproximaciones morfológicas y moleculares.

Generalmente, los diagnósticos basados en la morfología de *Fusarium* spp. suponen un claro desafío para los fitopatólogos, debido principalmente al empleo de diferentes sistemas taxonómicos, al reducido número de micólogos con los conocimientos y la experiencia adecuada para identificar este grupo de hongos y a la falta de caracteres morfológicos suficientemente informativos. Además, la identificación basada en la morfología de *Fusarium* spp. depende de un número limitado de caracteres taxonómicos que constituyen mínimas diferencias morfológicas y de importancia variable en las diferentes especies de *Fusarium* (Leslie et al., 2001). A lo que se une el hecho de la sensibilidad de las características microscópicas a la influencia de las condiciones ambientales y su plasticidad e inter-gradación que puede conllevar a interpretaciones erróneas o inadecuadas (Leslie et al., 2001). Por ejemplo, diferenciar *F. redolens* Wollenweb. de *F. oxysporum* puede resultar particularmente difícil ya que la diferenciación entre ambas especies se basa esencialmente en el tamaño de las macroconidias (Gordon, 1952), complicando aún más la situación la presencia de formas

intermedias de conidias (Baayen y Gams, 1988). Por esta razón, la posición taxonómica de *F. redolens* ha sido siempre problemática. Así, Booth (1971) consideró a este hongo como una variante de *F. oxysporum*, mientras que Nelson et al. (1983) lo consideraron sinónimo de *F. oxysporum*. Sin embargo, la reciente utilización de metodologías basadas en el ADN ha dado lugar a la clara diferenciación entre estas dos especies y asimismo, a revelar que *F. redolens* y *F. oxysporum* son especies que no tienen un grupo hermano común (Baayen et al., 2000a; Gams et al., 1999; O'Donnell et al., 1998a; Waalwijk et al., 1996a, b).

Como ocurre en el complejo *F. oxysporum*, *F. redolens* engloba aislados que pueden causar un amplio rango de enfermedades en plantas incluyendo Podredumbre Radical, Caída de Plántulas y Marchiteces Vasculares (Booth, 1971; Gerlach, 1961; Gerlach y Pag, 1961). Además, diferenciar entre las enfermedades originadas por *F. redolens* y *F. oxysporum* también ha sido complicado en ciertos huéspedes, ya que los síntomas que inducen pueden ser similares como ocurre con la Podredumbre de Corona y Raíz en espárrago (*Asparagus officinalis* L.) asociada al decaimiento del mismo (Wong y Jeffries, 2006). De igual manera, *F. redolens* coexiste con *Fusarium oxysporum* f. sp. *pisi* (J.C. Hall) W.C. Snyder & H.N. Hansen en guisantes (*Pisum sativum* L.) afectados por Marchitez Vascular, pero cada especie por separado puede causar Marchitez Vascular en la planta e inducir síntomas indistinguibles uno del otro (Booth, 1971).

Actualmente, *F. redolens* y *F. oxysporum* se pueden identificar fácilmente en base a los patrones de los Polimorfismos en la Longitud de los Fragmentos de Restricción (RFLP) del Espaciador Interno (ITS) del ADN ribosómico (ADNr) (Waalwijk et al., 1996a, b). Sin embargo, esta metodología ITS-RFLP no permite diferenciar *F. redolens* de *Fusarium hostae* Geiser & Juba, una especie cercana (Baayen et al., 2001; Geiser et al., 2001). La técnica es además cara y técnicamente exigente, ya que requiere el empleo de tres enzimas de restricción. Recientemente, el desarrollo de protocolos de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) específicos de especie para *F. hostae*, *F. redolens* y *F. oxysporum* han facilitado su diagnóstico y han ayudado a clasificar algunos aislados que originalmente se habían asignado erróneamente a especies incorrectas (Baayen et al., 2001; Capítulo III de la presente Tesis Doctoral; Edel et al., 2000; Mishra et al., 2003).

El presente Capítulo de esta Tesis Doctoral se llevó a cabo para determinar comparativamente la naturaleza de las especies de *Fusarium* asociadas con la amarillez foliar de plantas de garbanzo en diferentes países. En el mismo, se describe por primera vez en la literatura fitopatológica la asociación de *F. redolens* con plantas de garbanzo mostrando síntomas parecidos a la Fusariosis Vascular en España y otros países. Además se han caracterizado molecular y patogénicamente aislados de este hongo y posicionado respecto a otros *Fusarium* spp. infectando a garbanzo, otros *F. redolens* infectando diferentes huéspedes y el clado del complejo de especies *F. oxysporum*.

II.3. MATERIALES Y MÉTODOS

II.3.1. Aislados de *Fusarium* spp. de cultivos de garbanzo

Durante la realización de prospecciones fitopatológicas sobre incidencia y distribución de la Fusariosis Vascular en 12 parcelas comerciales de garbanzo en las provincias de Córdoba, Jaén, Sevilla y Granada en el sur de España se observó la ocurrencia en dichas parcelas de plantas afectadas por un síndrome similar al de Fusariosis Vascular. Así, las plantas afectadas mostraban amarillez y/o marchitez y decoloración parda de los tejidos vasculares. De las plantas sintomáticas se muestrearon fragmentos de la parte alta del tallo principal que se utilizaron para realizar aislamientos en medio de cultivo. Los tejidos se desinfectaron superficialmente (NaOCl al 2%, 1,5 min), se cortaron en fragmentos de 5 mm de longitud, se dispusieron en medio VOPA ("Agar-jugo V8-oxgall-PCNB") semiselectivo de *Fusarium* spp. (Bouhot y Rouxel, 1971) y se incubaron durante 7 días a $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ y un fotoperiodo de 12-h de una mezcla de luz blanca fluorescente y cercana al ultravioleta de $36\ \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. La observación de los aislamientos mostró un crecimiento profuso de un hongo morfológicamente similar a *F. oxysporum* (Nelson et al., 1981) a partir del cilindro vascular de los extremos de los fragmentos de tallo sugiriendo, por tanto, la infección vascular de las plantas afectadas. Se recuperaron un total de 84 aislados de *Fusarium* spp., que posteriormente se caracterizaron dentro de su especie correspondiente por medio de protocolos moleculares (véase Apartado II.3.3.). Además, se utilizaron en el estudio 80 aislados de *Fusarium* spp. obtenidos de garbanzo proporcionados por investigadores de distintas regiones del mundo (Tablas II.1 y II.2). Esos últimos aislados se habían asignado originalmente a la *forma specialis ciceris* en el

laboratorio de procedencia, pero, sin embargo, no amplificaron de forma consistente el marcador específico de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* de 1,5-kb mediante ensayos de PCR (Jiménez-Gasco y Jiménez-Díaz, 2003) (véase Apartado II.4.1).

Tabla II.1. Aislados de *Fusarium* spp. caracterizados molecularmente mediante polimorfismos de Longitud de los Fragmentos de Restricción (RFLP) del Espaciador Intergénico (IGS) del ADNr, con origen geográfico, año de aislamiento y fuente

Aislado ^a <i>Fusarium</i> spp.	Origen	Año de aislamiento	Fuente ^b
<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>ciceris</i>			
Raza 0			
7802	Córdoba, España	1978	DPC (IAS-CSIC)
9605	Túnez	1996	CA-ICARDA
L96-5	Líbano	1996	CA-ICARDA
Raza 1B/C			
USA-1987-W17	California, EEUU	1987	DPC (IAS-CSIC)
9602	Túnez	1996	HMH- INRA
Raza 1A			
8272	Jaén, España	1982	DPC (IAS-CSIC)
7989	Hyderabad, India	1979	MPH- ICRISAT
Raza 2			
8605	Kanpur, India	1986	MPH- ICRISAT
1992 R2N	India	1986	MPH- ICRISAT
Raza 3			
8606	India	1986	MPH- ICRISAT
1992 R3N	Gurdaspur, India	1986	MPH- ICRISAT
Raza 4			
8607	India	1986	MPH- ICRISAT
1992 R4N	Jabalpur, India	1986	MPH- ICRISAT
Raza 5			
USA W6-1	California, EEUU	1988	DPC (IAS-CSIC)
8012	Córdoba, España	1980	DPC (IAS-CSIC)
Raza 6			
Tonini	California, EEUU	1988	DPC (IAS-CSIC)
8924	Sevilla, España	1989	DPC (IAS-CSIC)
<i>F. oxysporum</i> no patógeno			
Fo-90105	Córdoba, España	1990	DPC (IAS-CSIC)
Fo-8250	Jaén, España	1982	DPC (IAS-CSIC)
Fo-506	Tarquini, Italia	1989	DPC (IAS-CSIC)
<i>F. redolens</i>			
7982	Córdoba, España	1979	DPC (IAS-CSIC)
L96-13	Líbano	1996	DPC (IAS-CSIC)
34.92*	Marruecos	1996	CA-ICARDA
9914I	Pakistán	1999	SA-NIAB
164-B3	'Castro' Córdoba, España	2004	Este estudio
165-B	'Las Fuentes' Córdoba, España	2004	Este estudio
167-A2	'Monterrite 1' Córdoba, España	2004	Este estudio
167-B	'Monterrite 2' Córdoba, España	2004	Este estudio
181-2A, 181-3A	'Montefrío' Granada, España	2004	Este estudio

^a La raza de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* se determinó mediante ensayos de patogenicidad con líneas diferenciales de garbanzo previo a los ensayos de PCR (Jiménez-Díaz et al., 1993; Jiménez-Gasco y Jiménez-Díaz, 2003; Kelly et al., 1994). Los aislados de *F. oxysporum* listados como no patógenos no son patógenos sobre garbanzo.

^b Los aislados de Italia, España y Estados Unidos (California) se obtuvieron de la colección de cultivos fúngicos del Departamento de Protección de Cultivos (DPC) IAS-CSIC, Córdoba, España. Los aislados de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* de la India fueron proporcionados por M.P. Haware (MPH),

ICRISAT, Hyderabad, India y los de Túnez por M. H. Halila (MHH), Institute Nationale de la Recherche Agronomique, Ariana, Túnez; el aislado del Líbano fue proporcionado por C. Akem (CA) ICARDA, Aleppo, Siria y el aislado *F. redolens* 9914I por S. Alam (SA), Plant Health Group, Nuclear Institute for Agriculture and Biology (NIAB), Faisalabad, Pakistán.

* De este aislado sólo se dispone de ADN

Todos los aislados fúngicos referidos se depositaron en la colección de cultivos microbianos del Departamento de Protección de Cultivos, Instituto de Agricultura Sostenible (IAS-CSIC), Córdoba, España. Para cada uno de ellos, se obtuvieron cultivos monospóricos previamente a su conservación a largo plazo en tubos conteniendo arena estéril a 4°C y en glicerol estéril al 35% en agua destilada a -80°C.

II.3.2. Crecimiento fúngico y extracción de ADN

Se colocó un pequeño trozo de agar de cultivos de *Fusarium* spp. creciendo activamente en agar patata dextrosa (APD) (Laboratorios Difco, Detroit, Michigan, EEUU) sobre una película de celofán estéril extendida sobre una placa de APD y se incubaron durante 3-4 días a 25±1°C y a un fotoperiodo de una mezcla de luz blanca fluorescente y cercana al ultravioleta de 36 $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Posteriormente, el micelio crecido sobre la superficie de celofán se raspó directamente con un escalpelo, se liofilizó y se almacenó a -20°C hasta su empleo.

El ADN se extrajo a partir de 50 mg de micelio liofilizado utilizando el 'G-Spin™ IIp Plant Genomic DNA extraction kit' (Intron Biotechnology, Corea) y el sistema Fast-Prep FP-120 (MP biomedical, Illkirch, Francia) según Jiménez-Fernández et al. (2010). La calidad del ADN se valoró mediante electroforesis en gel y tinción con bromuro de etidio. Todas las muestras se cuantificaron con exactitud utilizando el "Quant-iT DNA Assay Kit Broad Range fluorometric assay" (Molecular Probes Inc., Leiden, Países Bajos) y un fluoroespectrofotómetro Tecan Safire (Tecan España, Barcelona, España) (Landa et al., 2007). El ADN se diluyó con agua ultrapura estéril para obtener una concentración aproximada de 20 ng/ μl .

II.3.3. Caracterización molecular de aislados de *Fusarium* spp.

Los aislados de *Fusarium* spp. de garbanzo del estudio se caracterizaron como *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* o *F. oxysporum* de acuerdo a los marcadores de PCR específicos desarrollados por Jiménez-Gasco y Jiménez-Díaz (2003) (FOC-PCR)

y Jiménez-Fernández et al. (2010) (FO-PCR), respectivamente. Se utilizó un ensayo de PCR específica para *F. redolens* desarrollado por Bogale et al. (2007) para confirmar los datos del análisis filogenético del gen del Factor de Elongación y Traducción 1 α (TEF-1 α) de *Fusarium* spp. (véase Apartado II.4.1.). Además se incluyó la pareja de iniciadores LR3 (5'-CCGTGTTTCAAGACGGG-3') (White et al., 1990) y CS33 (5'-CGAATCTTTGAACGCACATTG-3') (Visser et al., 1995) que amplifica una región de 900 pb de la subunidad mayor (LSU) del ARNr como control interno positivo de amplificación (Fig. II.1).

Todos los aislados de *Fusarium* spp. que se diagnosticaron como *F. redolens* se caracterizaron posteriormente mediante ensayos de RFLP del espaciador intergénico ribosomal (IGS) como se describió previamente (Edel et al., 1995, 1997). Los perfiles obtenidos de estos aislados se compararon con los perfiles de RFLP-IGS de 15 aislados de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* representativos de las ocho razas (0, 1A, 1B/C, 2, 3, 4, 5 y 6) de este patógeno (Jiménez-Fernández et al., 2011) y tres aislados de *F. oxysporum* no patogénicos sobre garbanzo (Tabla II.1). Para ello, se amplificó un fragmento de la secuencia IGS de los aislados mediante un ensayo de PCR utilizando los iniciadores PNFo (5'-CCCGCCTGGCTGCGTCCGACTC-3') y PN22 (5'-CAAGCATATGACTACTGGC-3') y los amplicones se sometieron a digestión con las enzimas de restricción *AluI*, *HaeIII*, *HinfI*, *MspI*, *RsaI*, *ScrFI* y *XhoI* (Edel et al., 1995, 1997). Los patrones de bandas de ADN se separaron mediante electroforesis utilizando geles "ReadyAgarose" (Bio-Rad, Madrid, España) al 3% en tampón TAE teñidos con bromuro de etidio, y tras la electroforesis se visualizaron bajo luz ultravioleta y se digitalizaron. Posteriormente, las imágenes se convirtieron, se normalizaron y se combinaron utilizando el paquete informático Bionumerics 6.1 (Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Bélgica).

Además, se amplificó el gen TEF-1 α de todos los aislados de *Fusarium* spp. de garbanzo que no se pudieron caracterizar molecularmente como *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* o *F. oxysporum* utilizando los iniciadores EF1 (5'-ATGGGTAAGGA(A/G)GACAAGAC-3') y EF2 (5'-GGA(G/A)GTACCAGT(G/C)ATCATGTT-3') (O'Donnell et al., 1998b). Posteriormente, los amplicones del gen TEF-1 α se purificaron utilizando un kit de extracción en gel (GeneClean turbo; Q-BIOgene S.A., Francia), se cuantificaron como se ha descrito anteriormente para el ADN fúngico y se utilizaron para la secuenciación directa del ADN empleando ambos

iniciadores y un “terminator cycle sequencing ready reaction kit” (BigDye; Perkin-Elmer Applied Biosystems, Gran Bretaña) de acuerdo a las instrucciones del fabricante en un secuenciador multicapilar de ADN (Model 3100 genetic analyzer; Applied Biosystems) en las instalaciones de secuenciación de STABVIDA (Monte da Caparica, Portugal). Las secuencias TEF-1 α de *Fusarium* spp. se depositaron en la base de datos del GenBank (GU126796, HQ731047-HQ731068; Tabla II.2). Finalmente, para caracterizar los aislados de *Fusarium* spp. sin identificar, se realizó una búsqueda mediante análisis BLAST frente a las secuencias TEF-1 α de la base de datos FUSARIUM-ID v.1.0 en <http://fusarium.cbio.psu.edu>, que está constituida por una colección filogenéticamente diversa de diferentes secuencias de numerosas especies del género *Fusarium* (Geiser et al., 2004), así como frente a la base de datos del GenBank.

Para el análisis filogenético, las secuencias de *F. redolens* se editaron y se alinearon junto con secuencias homólogas representativas obtenidas de las bases de datos FUSARIUM-ID y GenBank, y con las secuencias TEF-1 α de *Fusarium* spp. incluidas en los trabajos de Baayen et al. (2001), Jiménez-Gasco et al. (2002) y Gurjar et al. (2009) utilizando el paquete informático Bionumerics 6.1. Estos estudios se seleccionaron por incluir el mayor número de secuencias del gen TEF-1 α de aislados de *F. redolens* de diferentes huéspedes o de aislados de *Fusarium* spp. procedentes de garbanzo descritas hasta la fecha. Posteriormente, se generó un árbol filogenético empleando el método de Máxima-Parsimonia (MP) utilizando el paquete informático Bionumerics 6.1. Los filogramas se remuestrearon 1.000 veces para valorar el grado de soporte de la ramificación filogenética indicada por los árboles óptimos. El aislado *Fusarium beomiforme* NRRL25174 se utilizó como grupo raíz.

Tabla II.2. Aislados de *Fusarium* spp. procedentes de garbanzo de diferente origen geográfico originalmente erróneamente identificados como *F. oxysporum* con su asignación de especie ^a

Especie	Aislado	Número Acc.	Origen ^a	Comparación de secuencia con FUSARIUM-ID v. 1.0 ^b		Comparación de secuencia con GenBank (Blast-n) ^b	
				Accesión más relacionada	Similitud de secuencia (%)	Accesión más relacionada	Similitud de secuencia (%)
<i>Neocosmospora vasinfecta</i>	3Pak	HQ731049	Pakistán	NRRL 43467	99,38 (644/648)	AY381148	100 (647/647)
<i>Fusarium</i> spp.	56-93	HQ731047	Marruecos	NRRL 53289*	92,03 (555/603)	EU926322***	90,5 (645/713)
				NRRL 36186*	91,94 (559/608)	EU926307***	90,3 (635/703)
				NRRL 34027**	91,94 (559/608)		
<i>Fusarium solani</i>	cc18F	HQ731048	Israel	NRRL 22278	99,85 (675/676)	AB294872	90,5 (732/737)
<i>Fusarium solani</i>	cc19Y	HQ731050	Israel	NRRL 32343	99,40 (667/671)	DQ452423	99,1 (730/737)
<i>Fusarium solani</i> f. sp. <i>eumartii</i>	cc43A	HQ731051	Israel	NRRL 32343	99,40 (667/671)	AB498982	99,9 (693/694)
<i>Fusarium solani</i>	cc41W	HQ731052	Israel	NRRL 28555	99,70 (668/670)	AB498982	99,9 (693/694)
<i>Fusarium solani</i>	2205I	HQ731053	Pakistán	FD_01373	99,56 (693/696)	GU170631	99,0 (708/715)
<i>Fusarium solani</i>	cc40A	HQ731054	Israel	NRRL 25388	99,85 (682/683)	EU925653	99,6 (717/720)
<i>Fusarium solani</i>	cc20B	HQ731055	Israel	NRRL 32720	99,55 (666/669)	GU170630	99,3 (705/710)
<i>Fusarium solani</i>	cc61C	HQ731056	Israel	NRRL 32720	99,55 (666/669)	GU170630	99,3 (705/710)
<i>Fusarium oxysporum</i>	808	HQ731057	Italia	NRRL 38608	100 (666/669)	GU170630	99,9 (709/710)
<i>Fusarium oxysporum</i>	817	HQ731058	Italia	NRRL 39464	100 (681/681)	DQ837688	100 (691/691)
<i>Fusarium proliferatum</i>	9009	HQ731059	España	NRRL 39464	99,85 (685/686)	DQ837680	99,7 (696/698)
<i>Fusarium redolens</i>	9914I	HQ731060	Pakistán	FD_01389	99,26 (671/676)	FJ538244	100 (678/678)
<i>Fusarium redolens</i>	7982	HQ731061	Córdoba (España)	FD_01103	100 (665/665)	GU250584	100 (703/703)
<i>Fusarium redolens</i>	165-B1	HQ731062	Córdoba (España)	FD_01103	100 (665/665)	GU250584	100 (696/696)
<i>Fusarium redolens</i>	164-B3	HQ731065	Córdoba (España)	FD_01103	99,84 (663/664)	GU250584	99,9 (663/664)
<i>Fusarium redolens</i>	167-A2	GU126796	Córdoba (España)	FD_01103	100 (665/665)	GU250584	100 (678/678)
<i>Fusarium redolens</i>	167-B	HQ731068	Córdoba (España)	FD_01103	100 (665/665)	GU250584	100 (657/657)
<i>Fusarium redolens</i>	181-3a	HQ731066	Granada (España)	FD_01103	100 (663/663)	GU250584	100 (692/692)
<i>Fusarium redolens</i>	181-2A	HQ731067	Granada (España)	FD_01103	99,84 (664/665)	GU250584	100 (649/649)
<i>Fusarium redolens</i>	L96-13	HQ731064	Libano	FD_01101	99,84 (663/664)	GU250584	99,9 (693/694)
<i>Fusarium redolens</i>	34-92	HQ731063	Marruecos	FD_01103	100 (665/665)	GU250584	99,7 (701/703)
							100 (703/703)

^a Aislados procedentes de plantas de garbanzo utilizados en este estudio, su origen geográfico y las accesiones más relacionadas de las bases de datos en los trabajos que han analizado la secuencia del gen del Factor de Elongación y Traducción (TEF-1α)

^b Secuencias más relacionadas de la base de datos FUSARIUM-ID y GenBank. * *Gibberella fujikuroi*; ** *F. biseptatum*; *** *F. dimerum*

II.3.4. Ensayo de patogenicidad

Para los ensayos de patogenicidad en garbanzo se seleccionaron arbitrariamente siete aislados de *F. redolens*. El inóculo de los aislados se incrementó en matraces conteniendo una mezcla esterilizada en autoclave de arena:harina de maíz:agua (AMA), que tras su inoculación se incubó a $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ y un fotoperiodo de 12-h de una mezcla de luz blanca fluorescente y cercana al ultravioleta de $36 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ durante 2 semanas como se ha descrito anteriormente (Landa et al., 2004, 2006). También se incrementó de manera similar el inóculo del aislado 7802 de la raza 0 de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* que induce el síndrome de Amarillez Vascular con fines comparativos. El AMA infestado se mezcló minuciosamente con una mezcla de suelo esterilizado en autoclave (limo:arena:turba, 1:1:1, v/v/v) en una proporción de 1:12 (p/p) para alcanzar una densidad de inóculo de aproximadamente 10^5 unidades formadoras de colonias (ufc)/g de suelo para cada uno de los aislados utilizados en el experimento. Como control se utilizó AMA no infestado mezclado con el suelo esterilizado en la misma proporción anteriormente indicada.

En el estudio se utilizaron tres cultivares de garbanzo (P-2245, PV-60 y PV-61) "kabuli" (semilla redondeada de color beige). Las semillas de los cvs. P-2245 y PV-61 eran medianas (<30 g cada 100 semillas), mientras que el cv. PV-60 es de semilla grande (>44 g cada 100 semillas). Los tres cultivares son susceptibles a diferentes razas de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* (Landa et al., 2006). Las semillas se desinfestaron superficialmente en NaOCl al 2% durante 3 min, se pregerminaron, se seleccionaron por su uniformidad (longitud de radícula= 1 a 2 cm) y se sembraron en macetas de arcilla estériles de 15 cm de diámetro (4 plantas por maceta) rellenas con la mezcla suelo-AMA infestado de cada aislado. Las plantas control crecieron en la mezcla suelo-AMA no infestado. Las plantas se incubaron en una cámara de crecimiento Conviron MTR26 (Conviron Ltd., Winnipeg, Canadá) ajustada a $25\pm 1^{\circ}\text{C}$, humedad relativa del 60 al 90% y un fotoperiodo de 14-h de luz blanca fluorescente de $360 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Las plantas se regaron conforme a sus necesidades y se fertilizaron semanalmente con 100 ml de una solución

fertilizante Hydro-sol al 0,1% (Haifa Chemicals, Ltd., Haifa, Israel, 20-5-32 of N-P-K + micronutrientes). El experimento consistió en un diseño factorial de dos vías con los aislados de *Fusarium* spp. y los cultivares de garbanzo como factores. Se dispusieron cinco macetas (cuatro plantas por maceta) por combinación aislado/cultivar en un diseño completamente al azar. El experimento se repitió una vez.

II.3.6. Evaluación de la enfermedad y análisis de datos

La incidencia y la severidad de enfermedad se evaluaron a intervalos de 2 a 3 días hasta el final del experimento a los 50 días después de la inoculación. La severidad de síntomas en plantas individuales se estimó con una escala de 0 a 4 de acuerdo al porcentaje de follaje con amarillamiento o necrosis (0= 0%, 1= 1 a 33%, 2= 34 a 66%, 3= 67 a 100% y 4= planta muerta) (Landa et al., 2006; Navas-Cortés et al., 2007). La incidencia de síntomas foliares, I (escala 0-1), y los datos de severidad, S (escala 0 a 4) se utilizaron para calcular un índice de intensidad de enfermedad (IIE) mediante la ecuación $IIE = (I \times S)/4$ (Landa et al., 2006; Navas-Cortés et al., 2007). Para cada combinación experimental, se obtuvieron las curvas de progreso de enfermedad a partir de los valores del IIE acumulado a lo largo del tiempo en días desde la fecha de la inoculación. El desarrollo de la enfermedad se caracterizó por tres variables o elementos asociadas a la curva de progreso de la enfermedad: (i) periodo de incubación (PI) = definido como el tiempo en días transcurrido desde la inoculación hasta el inicio de síntomas; (ii) índice de intensidad de enfermedad final (IIE_{final}) = IIE observado en la última fecha de evaluación de enfermedad; y (iii) ABCPIIEE = área bajo la curva de progreso del IIE estandarizada, calculada mediante la integración trapezoidal del desarrollo de la enfermedad estandarizada por la duración en días (Madden et al., 2007). Además, al final del experimento, se llevaron a cabo aislamientos de todas las plantas mostrando una severidad de síntomas <4 para determinar la existencia y extensión de la infección de la planta por los aislados utilizados en el experimento.

Los aislamientos se realizaron de los cuatro entrenudos inferiores del tallo y de la raíz principal (cuatro segmentos), como se ha descrito anteriormente.

El efecto de los aislados de *F. redolens* y los cultivares de garbanzo en las variables PI, IIE_{final} y ABCPIIEE, así como en la extensión de la colonización de tallo y raíz se determinó mediante análisis de varianza multivariante (MANOVA) y ANOVA estándar utilizando el módulo de modelos lineales GLM de SAS (Statistical Analysis System v. 9.2, SAS Institute, Cary, NC, EEUU). Las repeticiones dentro de los experimentos se consideraron efectos al azar en el análisis. Asimismo, se realizaron contrastes de un único grado de libertad para determinar el efecto de diversas combinaciones de tratamientos experimentales seleccionadas a $P < 0,05$. Además, se realizó un Análisis multivariante de Componentes Principales (ACP). En este análisis un autovector se consideró significativo cuando su carga factorial fue $> 0,65$. El análisis se realizó utilizando el módulo PRINCOMP de SAS. Para dicho análisis cada combinación cultivar de garbanzo x aislado de *F. redolens* estuvo caracterizado por los tres elementos de la curva de enfermedad (PI, IIE_{final} y ABCPIIEE) y la extensión de la colonización de raíz y tallo.

II.4. RESULTADOS

II.4.1. Caracterización molecular de los aislados de *Fusarium* spp.

De los 84 aislados de *Fusarium* spp. obtenidos en las prospecciones fitopatológicas realizadas en las 12 parcelas comerciales de garbanzo situadas en las cuatro provincias del sur de España, seis (7,1%) (denominados 164-B3, 165-B, 167-A2, 167-B, 181-2A y 181-3A) no se pudieron asignar a la *forma specialis ciceris* o *F. oxysporum* mediante el empleo de los protocolos FOC-PCR (Jiménez-Gasco Y Jiménez-Díaz, 2003) o FO-PCR (Jiménez-Fernández et al., 2010), respectivamente (Tabla II.1, Fig. II.1). Estos seis aislados se caracterizaron posteriormente como *F. redolens* mediante la secuenciación del gen TEF-1 α y el análisis BLAST-N utilizando la base de datos FUSARIUM-ID (Fig. II.3; Tabla II.1). Adicionalmente, la identidad de los aislados de *F. redolens* se confirmó por medio del protocolo de PCR específica de *F. redolens* (FR-PCR) desarrollado por Bogale et al. (2007) (Fig. II.1).

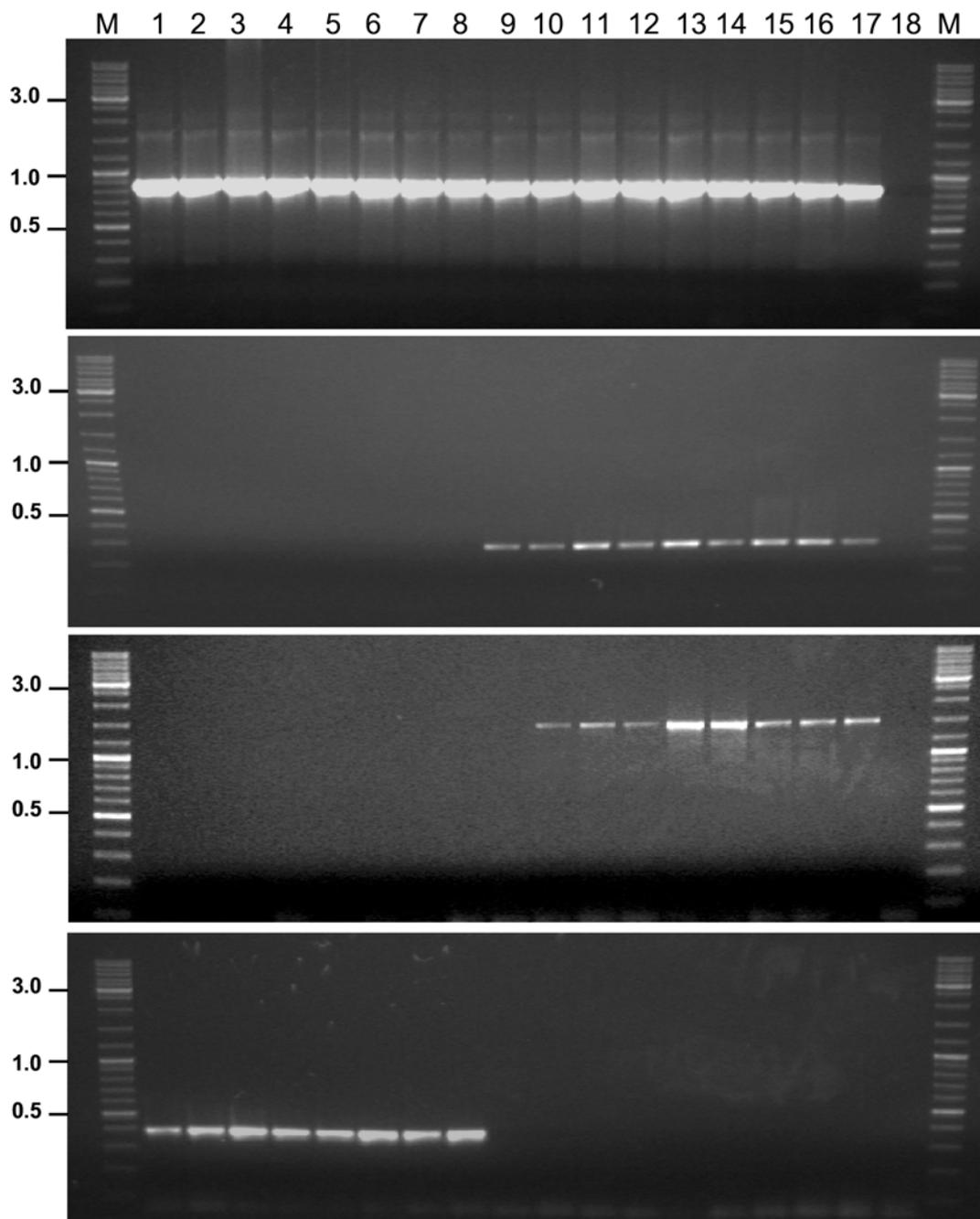


Figura II.1. Electroforesis en gel de los amplicones de ADN de los ensayos de PCR utilizando: **(A)** iniciadores LR3 (White et al., 1990) y CS33 (Visser et al., 1995) que amplifican una región de 900 pb de la subunidad grande (LSU) de ARNr que se incluyó como control positivo interno para la amplificación de la PCR; **(B)** iniciadores específicos de *Fusarium oxysporum* y condiciones descritas por Jiménez-Fernández et al. (2011); **(C)** iniciadores específicos de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* Foc0-12f y Foc0-12r (Jiménez-Gasco y Jiménez-Díaz, 2003); y **(D)** los iniciadores específicos Redolens-F y Redolens-R (Bogale et al., 2007). Los números en la izquierda corresponden a los pesos moleculares (kb) del marcador de peso molecular (M), marcador 'Gene-ruler™ DNA ladder mix' (Fermentas, St Leon-Rot, Alemania); carriles 1-8, aislados *F. redolens* 9914I, 7982, 165-B1, 164-B3, 167-A2, 167-B, 181-2A, L96-13, carril 9 aislado *F. oxysporum* 90105, carriles 9-17 aislados *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* Foc-7802 (Raza 0), -USA-1987-W17 (Raza 1B/C), -7989 (Raza 1A), -8605 (Raza 2), -8606 (Raza 3), -8607 (Raza 4), -8012 (Raza 5), y -8924 (Raza 6), y carril 18 control negativo (agua), respectivamente.

Como una continuación del estudio, se caracterizaron 80 aislados de *Fusarium* spp. de garbanzo incluidos en una colección mundial de aislados procedentes de garbanzo que originalmente se habían considerado como *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* por el laboratorio de procedencia, pero que no se pudieron identificar dentro de esta *forma specialis* empleando el protocolo de FOC-PCR específico (Jiménez-Gasco y Jiménez-Díaz, 2003) (*datos no mostrados*). La utilización de los protocolos de FO-PCR y FR-PCR, y la secuenciación del gen TEF-1 α y el posterior análisis BLAST-N frente a la base de datos de FUSARIUM-ID condujo a identificar a esos aislados de la siguiente forma: *F. redolens*, cuatro aislados (5,0%) (aislados 9914I, L96-13, 34.92 y 7982; Tabla II.1); complejo *F. oxysporum*, 64 aislados (80,0%); complejo *Fusarium solani* (Mart.) Sacc., ocho aislados (10,0%); *Fusarium proliferatum* (T. Matsushima) Nirenberg (un aislado); *Neocosmospora vasinfecta* E. F. Smith (un aislado); y un aislado como una especie de *Fusarium* que no pudo ser identificada, pero que era muy cercano a *Fusarium biseptatum* Schroers, Summerbell & O'Donnell y *Fusarium delphinoides* Schroers, Summerbell, O'Donnell et Lampr. (Tabla II.2). Destacar que uno de los aislados de *F. redolens* (aislado 7982) obtenido de plantas afectadas en una parcela en el sur de España en 1979 se asignó originalmente al patotipo de Amarillez de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* (Jiménez-Gasco et al., 2001) (Fig. II.1, Tabla II.1).

La amplificación de la secuencia IGS utilizando los iniciadores PN22 y PNFo resultó en un fragmento de aproximadamente 1.700 pb de los 15, 3 y 10 aislados de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris*, *F. oxysporum* no patogénicos y *F. redolens*, respectivamente (Tabla II.1). La digestión de los fragmentos con cada una de las siete enzimas de restricción dio lugar a un número de patrones de restricción diferentes comprendido entre dos y cuatro por producto de PCR, dependiendo de la enzima. Entre los distintos aislados utilizados en el ensayo se identificaron cuatro combinaciones diferentes de patrones de restricción, representando cuatro tipos de IGS (En la Fig. II.2 se muestra una selección de ellos). Todos los aislados de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* mostraron un único tipo de perfil IGS idéntico (RFLP-IGS I) independientemente de la raza patogénica o del origen geográfico. Todos los aislados de *F. redolens* también presentaron un mismo tipo de perfil IGS (RFLP-IGS II). Sin embargo, los tres aislados no patogénicos de *F. oxysporum* de garbanzo mostraron dos tipos diferentes de IGS; con los aislados 90105 y 8250 procedentes de España compartiendo un mismo tipo de perfil IGS,

RFLP-IGS III, y siendo el aislado 506 procedente de Italia el único representativo del cuarto tipo de perfil IGS, RFLP-IGS IV (Fig. II.2).

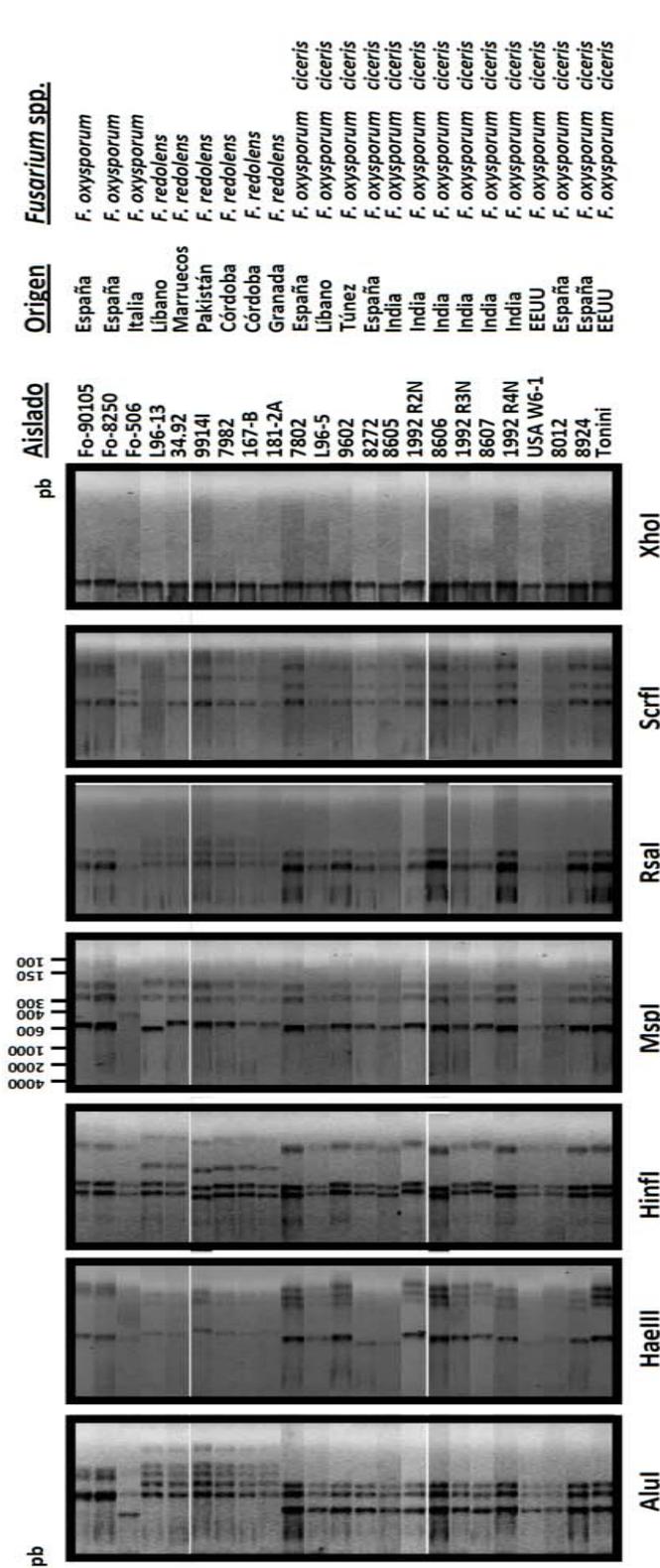


Figura II.2. Electroforesis en gel resultante de los amplicones de la región espaciadora intergénica (IGS) tras la digestión con las enzimas de restricción AluI, HaeIII, HinfI, MspI, RsaI, SrfI y XhoI de aislados de *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* representativos de las ocho razas patogénicas, de *F. oxysporum* no patogénicos y *F. redolens* de distintos orígenes geográficos (Tabla II.1). Los números en zona superior del gel corresponden a los pesos moleculares (pb) del marcador de peso molecular (M), marcador "Amplisize DNA ladder" (Bio-rad, Madrid, España).

Los ensayos de PCR utilizando los iniciadores EF1 y EF2 dieron lugar a un fragmento del gen TEF-1 α de aproximadamente 700 pb de todos los aislados de *Fusarium* spp. empleados en el estudio. El análisis de máxima parsimonia utilizando 690 caracteres que incluían las secuencias del gen TEF-1 α de los aislados de *Fusarium* spp. de los trabajos de Baayen et al. (2001), Jiménez-Gasco et al. (2002) y Gurjar et al. (2009), resultó en un árbol con una topología similar a la descrita por Baayen et al. (2001) para las especies de *Fusarium* spp. comunes a ese trabajo y al presente estudio (Fig. II.3). En nuestro estudio nueve de los aislados de *Fusarium* spp. se agruparon con los aislados del complejo de *F. solani* y con *N. vasinfecta* (100% soporte estadístico o "bootstrap"). El aislado 56.93 de *Fusarium* sp. se agrupó (100% 'bootstrap') con *F. biseptatum* y *F. delphinoides*, dos especies que están dentro del grupo de especies de *Fusarium dimerum* Penz. 1882 (= *Microdochium dimerum* (Penz.) Arx) (Schroers et al., 2009). Estos diez aislados así como las especies de *Fusarium* spp. anteriormente citadas se agruparon (100% "bootstrap") de forma independiente a los restantes aislados de *Fusarium* spp. incluidos en el estudio (Fig. II.3). En este grupo un clado con alto soporte (79% "bootstrap") incluyendo *Fusarium hostae* Geiser & Juba (2001)-*F. redolens* se resolvió como un grupo hermano respecto al resto de taxones del grupo. Todos los aislados de *F. redolens* de garbanzo se incluyeron dentro del mismo clado principal (92% "bootstrap"), dentro del cual se pudieron identificar diferentes subclados. En esos subclados, todos los aislados de *F. redolens* de garbanzo de España, Marruecos y Pakistán se agruparon juntos con la excepción del aislado L96-13 del Líbano que se agrupó en un subclado diferente. De los clados restantes, el clado inferior (86% "bootstrap") fue el más diverso filogenéticamente e incluía los clados de *Fusarium nisikadoi* T. Aoki & Nirenberg 1997-*Fusarium miscanthi* W. Gams, Klammer & O'Donnell 1999 (98% "bootstrap"), así como los complejos *Gibberella fujikuroi* (Sawada) Ito in Ito & K. Kimura y *F. oxysporum* (Fig. II.3).

En el complejo de *F. oxysporum* (88% "bootstrap") se pudieron diferenciar también varios subclados (Fig. II.3). Todos los aislados de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* de nuestra colección mostraron una secuencia idéntica del gen TEF-1 α (Jiménez-Gasco et al., 2002) y se agruparon dentro de un subclado con algunos aislados de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* de la India (Gurjar et al., 2009). Otros aislados de *F. oxysporum* referidos como no patogénicos sobre garbanzo y el aislado NRRL-32158 de la India (referido como *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* (Gurjar et

al., 2009) se agruparon con aislados patogénicos de *F. oxysporum* de otras *formae speciales* en diferentes subclados. Finalmente, el aislado 9009 de garbanzo se incluyó en el complejo *G. fujikuroi* con otro aislado de *F. proliferatum* obtenido de garbanzo en la India (100% “bootstrap”) (Fig. II.3).

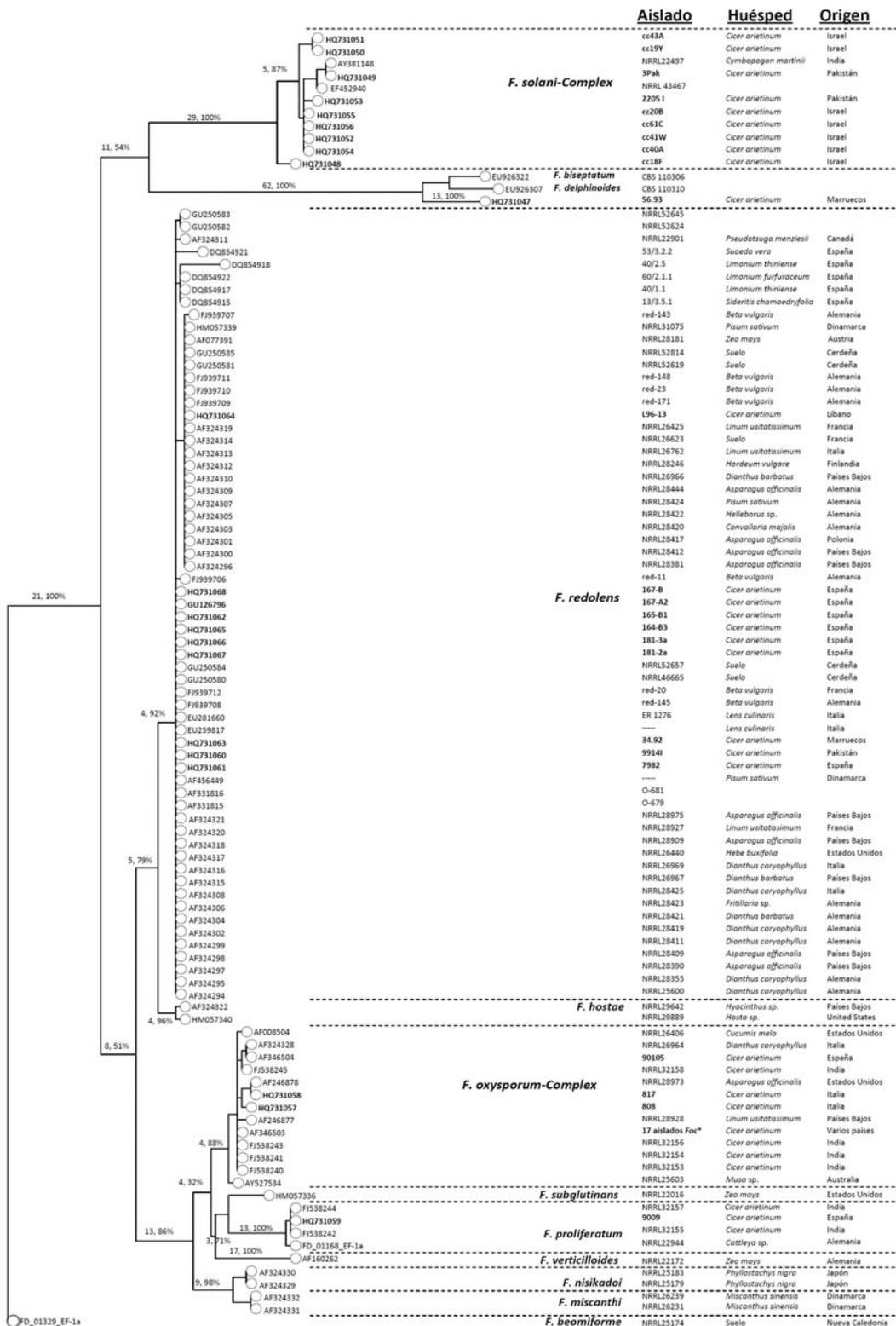


Figura II.3. Filograma de máxima parsimonia inferido de las secuencias del gen TEF-1α de *Fusarium redolens*, *F. oxysporum*, *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* y otros aislados de *Fusarium* spp. de garbanzo derivados de este estudio (en negrita), así como 23 secuencias procedentes del GenBank. Se utilizó una secuencia de *F. beomiforme* para enraizar el árbol mediante el método 'outgroup'. Los valores de soporte estadístico o "Bootstrap" >50% y la distancia derivados de 1000 repeticiones de máxima parsimonia llevada a cabo con Bionumerics 6.1 se indican en la ramas.

II.4.2. Caracterización patogénica de los aislados de *Fusarium redolens*

Los siete aislados de *F. redolens* resultaron patogénicos sobre los tres cultivares de garbanzo utilizados en el estudio. Los síntomas de enfermedad consistieron en amarillamiento y necrosis del follaje. El amarillamiento foliar se desarrolló a los 13 días después de la inoculación (ddi) y progresó acrópetamente a lo largo del eje de la planta, con las plantas severamente afectadas envejeciendo prematuramente. Los folíolos, primero, adquirieron una coloración verde-pálida para posteriormente volverse amarillos, y ocasionalmente necrosar y caer al final del experimento. La observación de las plantas afectadas al final del experimento indicó que no existía decoloración de los tejidos vasculares. Sin embargo, las plantas mostraron lesiones necróticas de color marrón oscuro de 2 a 5 mm en la raíz principal, necrosis de las raíces laterales y, ocasionalmente, necrosis cortical del cuello de la planta. Sin embargo, el aislado tipo de la raza 0 de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* causó un amarillamiento foliar progresivo con decoloración vascular y ausencia de síntomas en el sistema radical en el cv. P-2245. En esta última combinación, la reacción de enfermedad fue más severa, esto es, el comienzo de la enfermedad fue más corto, y los valores del IIE_{final} y ABCPIIEE fueron más altos ($F > 90,24$, $P < 0,0001$), que los observados en cualesquiera de los siete aislados de *F. redolens*. Los aislamientos de plantas afectadas indicaron que los aislados de *F. redolens* crecieron a lo largo del tallo de la planta con una extensión variable. Por el contrario, el aislado de la raza 0 de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* causó infección vascular y colonizó el tallo de la planta en mayor extensión ($F > 90,24$, $P < 0,0001$) en comparación con los aislados de *F. redolens*. No hubo diferencias significativas ($F = 2,97$, $P = 0,0946$) en la extensión de la colonización radical de los aislados de las dos especies fúngicas. Se obtuvo un máximo de incidencia de enfermedad del 100% en todas las combinaciones aislado de *F. redolens* x cultivar de garbanzo, excepto para el aislado 7982 en los cvs. P-2245 y PV-61, que alcanzaron el 95 y el 75% de incidencia de enfermedad, respectivamente, y los aislados L96-13 y 9914I que causaron el 95 y 85% de incidencia de enfermedad en el cv. PV-61, respectivamente (Fig. II.4, II.5A). Sin embargo, las diferencias fueron mayores para otros elementos de la curva de progreso de la enfermedad y estimaciones de colonización de la planta empleados para caracterizar la reacción de enfermedad (Figs. II.4 a II.6).

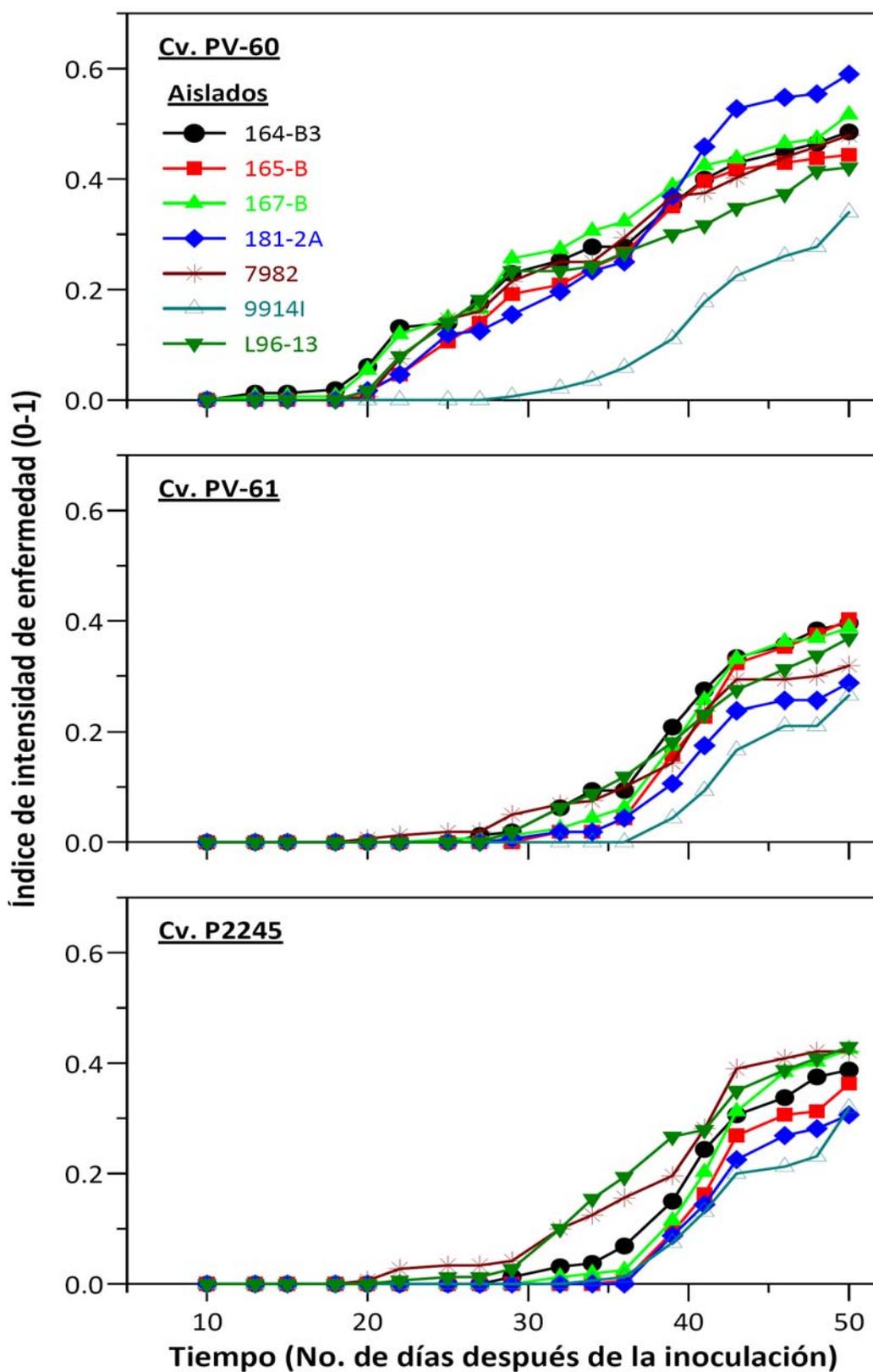


Figura II.4. Curvas de progreso de enfermedad de los tres cultivares de garbanzo creciendo en suelo artificialmente infestado con diferentes aislados de *Fusarium redolens*. Cada punto representa la media del índice de intensidad de enfermedad de cinco repeticiones (macetas) con cuatro plantas por maceta.

En conjunto, las diferencias en el progreso de la enfermedad y la extensión de la colonización de la raíz y tallo estuvieron determinadas principalmente por el aislado de *F. redolens* y el cultivar de garbanzo, y en menor medida por su interacción (Figs. II.4 a II.6, Tabla II.3). Así, el análisis MANOVA utilizando los elementos de la curva del progreso de enfermedad (PI, IIE_{final} y ABCPIIEE) y las variables asociadas con la infección de la planta (colonización de raíz y tallo) revelaron un efecto significativo de los factores aislado de *F. redolens* (Wilks' $\lambda=0,1431$, $P<0,0001$), genotipo de garbanzo (Wilks' $\lambda=0,2032$, $P<0,0001$) y la interacción entre estos dos factores (Wilks' $\lambda=0,2990$, $P=0,0003$) (Tabla II.3). Los autovectores asociados a cada una de las variables dependientes en el análisis MANOVA indicaron que IIE_{final} y ABCPIIEE eran las que ejercían una mayor influencia en el resultado del análisis global, mientras que la extensión de la colonización de raíz y tallo mostraron cargas factoriales intermedias y el PI presentó la carga factorial más baja (*datos no mostrados*). De manera similar a lo ocurrido con el MANOVA, en conjunto, los factores aislado de *F. redolens* y genotipo de garbanzo explicaron en mayor medida la variación representada mediante el modelo ANOVA (38,8 y 37,1% respectivamente) comparada con la explicada por su interacción (24,0%) (Tabla II.3).

El PI fue menor en el cultivar PV-60 independientemente de los aislados de *F. redolens*, excepto para el aislado 9914I que mostró el PI más tardío para los tres cultivares de garbanzo. El tiempo de aparición de los primeros síntomas se estimó en $38,7\pm 2,03$, $41,6\pm 1,10$ y $41,8\pm 1,80$ días para los cvs. PV-60, PV-61 y P-2245, respectivamente (Figs. II.5B). En las restantes combinaciones aislado de *F. redolens* x cultivar de garbanzo, el tiempo hasta el PI se estimó en un rango de 22,4 a 25,5 días en el cv. PV-60 y de 30,9 a 39,8 días en los cvs. PV-61 y P-2245 (Fig. II.5B).

Tabla II.3. Efectos del aislado de *Fusarium redolens*, el cultivar de garbanzo y sus interacciones en los elementos de la curva de progreso de la enfermedad y en la extensión de la infección de la planta

Fuente de variación	MANOVA ^c			Elementos de la curva de progreso de la enfermedad ^a						Colonización de la planta ^b								
	Wilks'λ	P > F	P > F	PI			IIE _{final}			ABCDIIE			Raíz			Tallo		
				F	P > F	P > F	F	P > F	P > F	F	P > F	P > F	F	P > F	P > F	F	P > F	
Aislado	0,1431	<0,0001	17,79	<0,0001	2,62	0,0225	3,51	0,0713	1,21	0,2815	0,06	0,8135	19,11	<0,0001	2,72	0,0184		
Cultivar	0,2036	<0,0001	109,09	<0,0001	13,20	<0,0001	12,04	<0,0001	3,79	0,0265	11,40	<0,0001	0,2987	0,0003	2,98	0,0017		
Aislado x Cultivar	0,2987	0,0003	2,98	0,0017	1,52	0,1340	0,86	0,5860	2,23	0,0171	2,51	0,0073						
Contrastes por aislado dentro cultivares^d																		
Cultivar PV-60																		
España vs. L96-13	0,8393	0,4855	0,74	0,3962	3,51	0,0713	1,21	0,2815	0,06	0,8135	1,56	0,2218						
España vs. 9914I	0,2734	<0,0001	66,48	<0,0001	13,92	0,0009	25,96	<0,0001	1,08	0,3082	5,86	0,0222						
España: Co vs. Gr	0,5982	0,0229	0,81	0,3771	5,88	0,0220	0,45	0,5078	4,43	0,0444	4,23	0,0491						
Cultivar PV-61																		
España vs. L96-13	0,8227	0,4201	0,21	0,6534	0,05	0,8303	0,07	0,7894	2,68	0,1125	0,08	0,7851						
España vs. 9914I	0,6694	0,0697	10,40	0,0032	3,79	0,0616	2,79	0,1059	0,02	0,8855	1,68	0,2049						
España: Co vs. Gr	0,3937	0,0003	3,61	0,0679	3,25	0,0824	2,17	0,1517	6,17	0,0192	10,81	0,0027						
Cultivar P2245																		
España vs. L96-13	0,4494	0,0011	12,84	0,0013	0,72	0,4049	0,88	0,3562	11,65	0,0020	2,21	0,1481						
España vs. 9914I	0,6763	0,0770	7,56	0,0103	1,14	0,2939	1,73	0,1994	1,06	0,3118	0,13	0,7180						
España: Co vs. Gr	0,6941	0,0983	3,12	0,0880	2,48	0,1263	0,45	0,5079	1,59	0,2175	0,20	0,6584						

^a Se calculó un índice de intensidad de enfermedad (IIE) basado en la incidencia y la severidad de síntomas evaluados a intervalos de 2 a 3 días. PI= período de incubación, estimado como el número de días transcurridos desde la inoculación hasta la aparición de síntomas; IIE_{final} = índice de intensidad de enfermedad en la fecha final de evaluación de enfermedad; ABCDIIE = área bajo la curva de progreso de IIE estimada mediante el método de integración trapezoidal y estandarizada para la duración de la epidemia. Los datos son resultado de las medias de cinco repeticiones (macetas), cada una con cuatro plantas.

^b Se llevaron a cabo aislamientos a los 50 días de incubación de todas las plantas mostrando un nivel de severidad < 4, de los cuatro primeros entrenudos empezando por el epicotilo y de la raíz principal (cuatro segmentos) para determinar la extensión de la infección de la planta por el patógeno.

^c Estadístico Wilks'λ y probabilidad asociada (P) para el efecto del aislado de *F. redolens* y el cultivar de garbanzo en un análisis de varianza multivariante (MANOVA).
^d Contrastes lineales de un grado de libertad estimados para evaluar el efecto de combinaciones de tratamientos seleccionadas a un nivel de significación de P < 0,05. Contrastes entre aislado para cada uno de los cultivares: los aislados de *F. redolens* se agruparon de acuerdo a su origen geográfico: España = aislados 164-B3, 165-B, 167-B, 181-2A y 7982; Co = Córdoba: aislados 164-B3, 165-B, 167-B y 7982; Gr = Granada: aislado 181-2A.

La intensidad de enfermedad, estimada por el IIE_{final} y ABCPIIEE estuvo determinada principalmente por el cultivar de garbanzo ($F>12,03$, $P<0,0001$) y en menor extensión por el aislado del patógeno ($F>2,61$, $P<0,0226$), siendo no significativa su interacción ($F<1,53$, $P>0,1339$) (Tabla II.3). Por tanto, independientemente del aislado de *F. redolens*, ambas variables fueron significativamente más altas ($P<0,05$) en el cv. PV-60 y menores en los cvs. PV-61 y P-2245, los cuales no mostraron diferencias significativas ($P\geq 0,05$) entre ellos (Figs. II.4, II.5C y II.5D). Al comparar entre aislados, el IIE_{final} y ABCPIIEE, en general, mostraron un estrecho rango de variación para los diferentes aislados, y osciló entre 0,39 a 0,44 y 0,22 a 0,24, respectivamente, con la excepción del aislado 9914I que alcanzó valores de IIE_{final} y ABCPIIEE mucho más bajos ($P<0,05$) (Figs. II.4, II.5C y II.5D).

La extensión de la colonización radical estuvo determinada principalmente por el aislado de *F. redolens* ($F=19,11$, $P<0,0001$) (Tabla II.3). Globalmente, los aislados 164-B3, 165-B, 167-B, 181-2A y 9914I colonizaron extensamente las raíces de garbanzo de los tres cultivares, en un rango de 3,20 a 3,50 cm, mientras que la extensión de colonización decreció hasta un rango de 2,66 a 3,12 cm y de 1,18 a 2,55 cm para los aislados L96-14 y 7982, respectivamente (Fig. II.6). En contraste, la extensión de colonización del tallo estuvo determinada fundamentalmente por el cultivar de garbanzo ($F=11,40$, $P<0,0001$) (Tabla II.3). En conjunto, la extensión de la colonización del tallo fue mayor en los cvs. P-2245 y PV-60, que en el cv. PV-61 ($P<0,05$) (Fig. II.6). El aislado 181-2A alcanzó la mayor extensión de colonización ($P<0,05$) del tallo en los cvs. PV-60 ($5,90\pm 0,28$ cm) y PV-61 ($5,45\pm 0,61$ cm), mientras que el aislado 7982 mostró los niveles de colonización ($P<0,05$) más altos ($6,63\pm 0,57$ cm) y más bajos ($2,78\pm 0,63$ cm) en los cvs. P-2245 y PV-61, respectivamente. Los restantes cinco aislados de *F. redolens* mostraron niveles de colonización intermedios y similares entre cultivares ($P\geq 0,05$) (Fig. II.6).

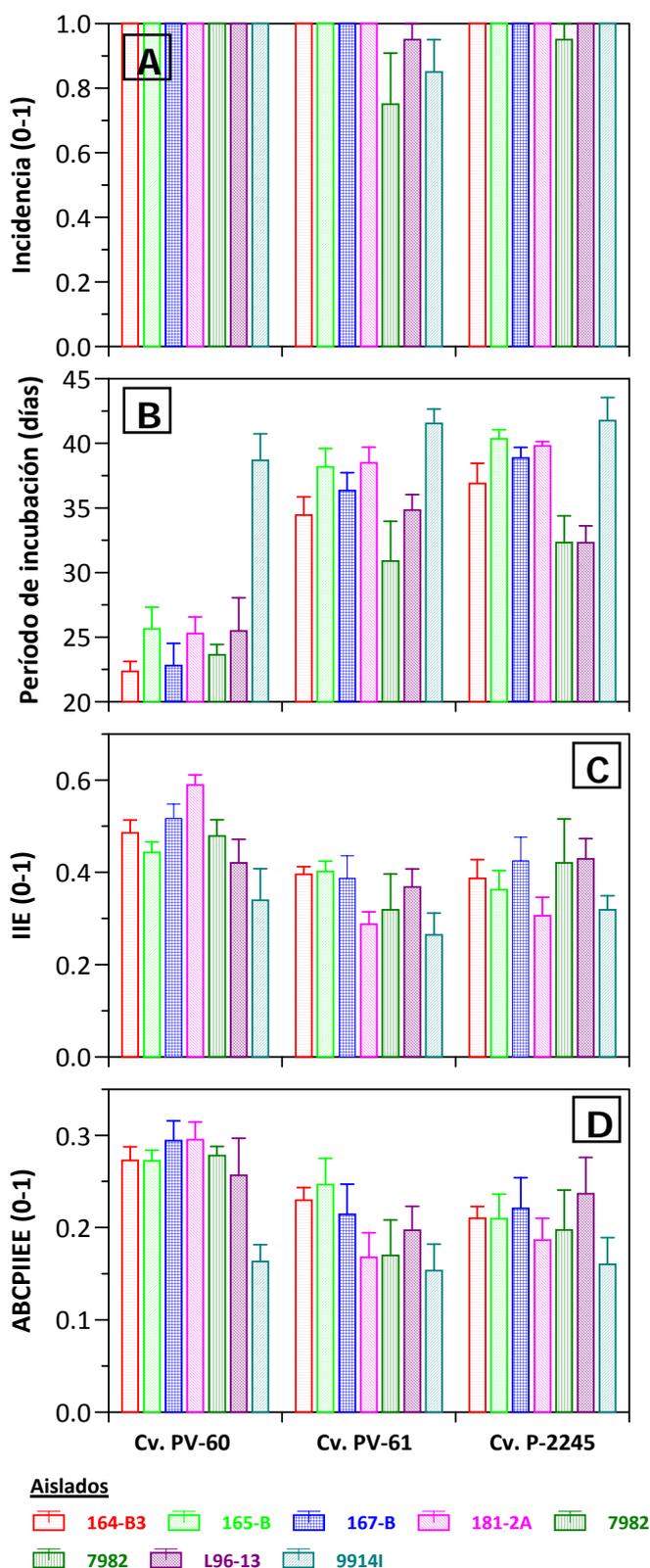


Figura II.5. Reacción de los cultivares de garbanzo creciendo en suelo artificialmente infestado con diferentes aislados de *Fusarium redolens*. (A) Incidencia de enfermedad. (B) PI, estimado como el número de días en que IIE>0. (C) Índice de intensidad de enfermedad, calculado en la última fecha de evaluación. (D) ABCPIIE= área bajo la curva de progreso de IIE estandarizada por la duración en días de la epidemia. Cada barra es la media de cinco repeticiones (macetas) con cuatro plantas por maceta. Las líneas verticales indican el error estándar de la media.

Cuando se agruparon los aislados de *F. redolens* por su origen geográfico, el aislado L96-13 del Líbano y los aislados del sur de España (164-B3, 165-B, 167-B, 181-2A y 7982) no difirieron significativamente ($F < 3,51$, $P > 0,2815$) en ninguna de las variables asociadas a la curva de progreso de la enfermedad y la colonización de la planta, excepto en una extensión de colonización radical significativamente menor ($F = 11,65$, $P = 0,0020$) y PI ($F = 12,84$, $P = 0,0013$) del aislado L96-13, pero sólo en el cv. P-2245 (Tabla II.3, Figs. II.5 y II.6). Por el contrario, el aislado 9914I de Pakistán experimentó un retraso significativo de los síntomas en los tres cultivares ($F > 7,55$, $P < 0,0104$) comparado con la misma serie de aislados españoles, y una menor intensidad de enfermedad ($F > 13,91$, $P < 0,0010$) y menor colonización del tallo ($F = 5,86$, $P = 0,0222$) sólo en el cv. PV-60 (Tabla II.3, Figs. II.5 y II.6). Dentro del grupo de aislados españoles, los procedentes de la provincia de Córdoba (centro-oeste de Andalucía) causaron una reacción de enfermedad similar a aquella originada por el aislado 181-2A procedente de la provincia de Granada (sudeste de Andalucía), excepto por una IIE_{final} significativamente más alta ($F = 5,88$, $P = 0,0220$) en 'PV-60' y una extensión de colonización del tallo y raíz más baja ($F < 10,82$, $P < 0,0492$) en 'PV-60' y 'PV-61' por este último aislado (Tabla II.3, Figs. II.5 y II.6).

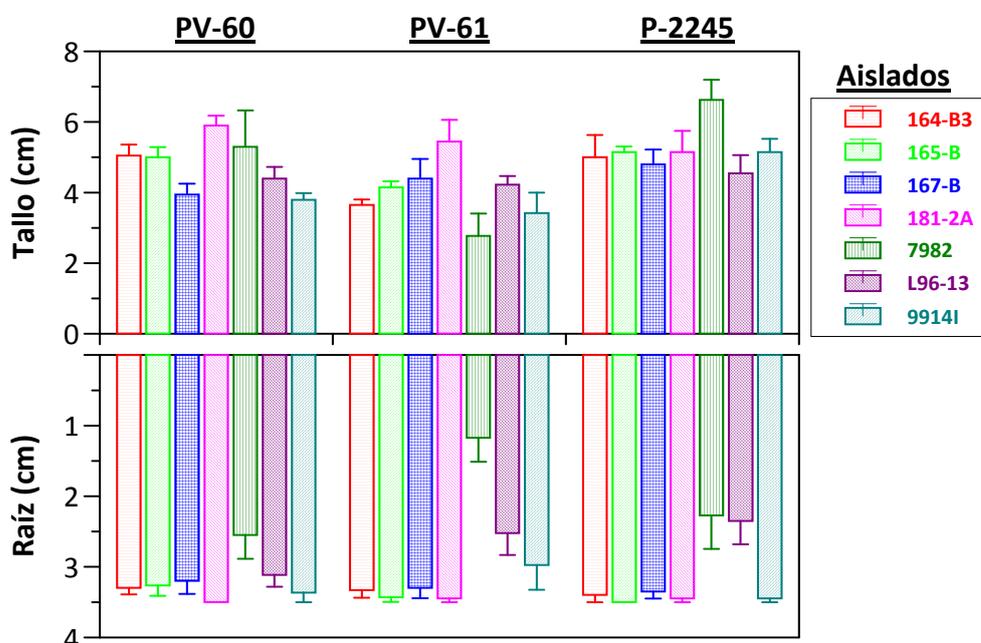


Figura II.6. Extensión de colonización de raíz (panel inferior) y tallo (panel superior) de los tres cultivares de garbanzo creciendo en suelo infestado con diferentes aislados de *Fusarium redolens*. Cada barra es la media de cinco repeticiones (macetas) con cuatro plantas por maceta. Las líneas verticales indican el error estándar de la media.

Para resumir los efectos de los factores principales y sus interacciones, se realizó un análisis multivariante de componentes principales. En este análisis, los dos primeros componentes principales (PCs) explicaron el 82,1% de la varianza total y se presentan en la Fig. II.7. Como resultado, la dimensionalidad de los tres elementos de la curva y las dos variables de colonización de la planta se redujeron eficazmente a dos variables descriptivas, PC1 y PC2. El PC1 explicó el 55,7% de la variación y estuvo dominado por cargas factoriales negativas altas (-0,88) para el PI y por cargas factoriales positivas altas (>0,96) para IIE_{final} y ABCPIIEE, y por lo tanto representa la posición del desarrollo de la reacción de enfermedad a lo largo del tiempo y la cantidad de enfermedad desarrollada. El PC2 explicó el 36,4% de la variación y estuvo dominado por cargas factoriales positivas altas (>0,66) para la extensión de colonización de raíz y tallo por el patógeno (Fig. II.7). De acuerdo a la posición de las epidemias proyectadas en el plano X (PC1) – Y (PC2) en la Figura II.7, el desarrollo de la enfermedad se retrasó de derecha a izquierda y la intensidad de enfermedad global se incrementó a lo largo del eje X. Igualmente, la extensión de la colonización de la planta se incrementó de abajo a arriba a lo largo del eje Y. En conjunto, las reacciones de enfermedad se localizaron de acuerdo a los cultivares de garbanzo, de ahí que las reacciones desarrolladas en los cvs PV-61 y P-2245 se localizaran a la izquierda y en la parte media mientras que las desarrolladas en el cv. PV-60 se localizaron a la derecha (Fig. II.7). Dentro de cada cultivar existieron diferencias menores entre los aislados de *F. redolens*. El aislado 9914I mostró el PI más tardío y la menor intensidad de enfermedad (IIE_{final} y ABCPIIEE) independientemente del cultivar de garbanzo, con un nivel de colonización creciente en los cvs. PV-61, PV-60 y P-2245, en ese orden. Los aislados 181-2A y 9914I indujeron niveles de intensidad de enfermedad y colonización de la planta similares en los cvs. PV-61 y P-2245 de semilla pequeña. Por el contrario, el aislado 181-2A indujo la reacción de enfermedad más severa (esto es, el más bajo PI y los más altos IIE_{final} y ABCPIIEE) y la mayor extensión de colonización en el cv. PV-60. Los aislados 164-B, 165-B y 167-B indujeron niveles de intensidad de enfermedad intermedios en los cvs. PV-61 y P-2245 pero con una extensión de colonización más alta en 'P-2245'. Finalmente, los restantes aislados de *F. redolens* excepto el aislado 9914I originaron una reacción de enfermedad severa en 'PV-60', la cual estaba asociada con niveles de colonización de la planta moderados (aislados 167-B, 7982 y L96-13), o altos (aislados 164-B, 165-B y 181-2A) (Fig. II.7).

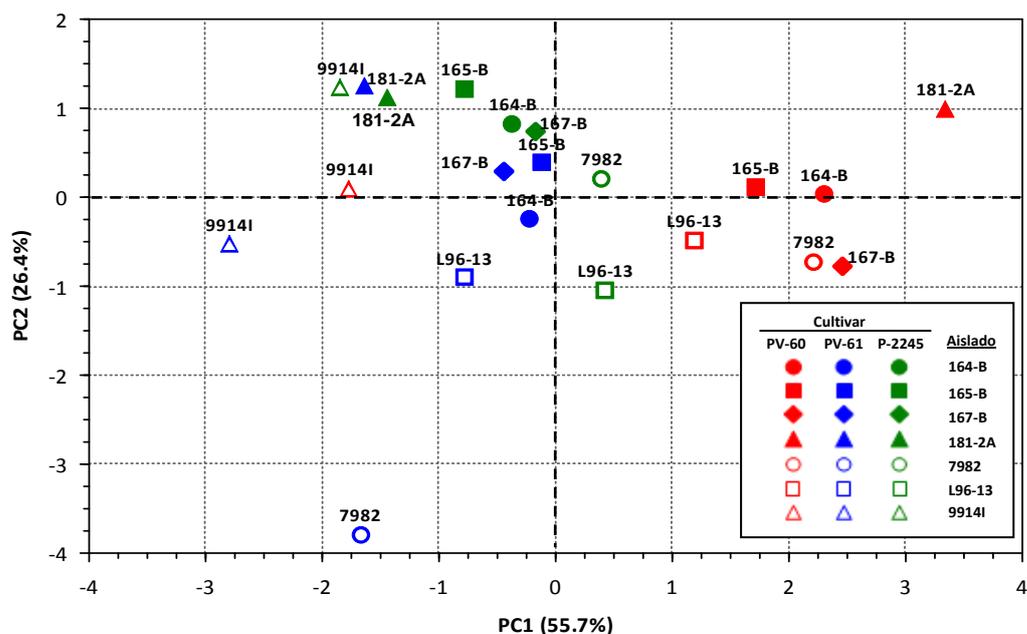


Figura II.7. Proyección de los autovectores sobre el plano de los componentes principales 1 y 2 obtenidos en el análisis de componentes principales para las epidemias desarrolladas en los tres cultivares de garbanzo creciendo en suelo infestado con diferentes aislados de *Fusarium redolens*. De acuerdo a la posición de las epidemias proyectadas en el plano PC1 x PC2, el desarrollo de la enfermedad se retrasó de derecha a izquierda y la intensidad de enfermedad global se incrementó a lo largo del eje X. De manera similar, la extensión de la colonización de la planta se incrementó de abajo a arriba a lo largo del eje Y.

II.5. DISCUSIÓN

La utilización de características morfológicas para diferenciar entre especies de *Fusarium* similares morfológicamente, como *F. oxysporum* y *F. redolens*, puede conducir a una diagnosis errónea del patógeno. Sin embargo, la identificación precisa de las especies de *Fusarium* patogénicas y de las *formae speciales* de *F. oxysporum* es crucial para el manejo adecuado de las enfermedades causadas por *Fusarium*, particularmente si los cultivares resistentes constituyen una de las pocas y más efectivas medidas de control como, por ejemplo, el caso de la Fusariosis Vascular del garbanzo (Jiménez-Díaz et al., 1993; Landa et al., 2004; 2006). En el presente capítulo de la Tesis Doctoral, el empleo de protocolos de PCR específica desarrollados previamente (Bogale et al., 2007; Capítulo III de la presente Tesis Doctoral; Jiménez-Gasco y Jiménez-Díaz, 2003), así como de ensayos de patogenicidad demostraron, por vez primera, que *F. redolens* es patogénico sobre la planta de garbanzo causando necrosis radical y amarillamiento foliar acrópeto. Además, el empleo de estos protocolos de PCR permitió la diferenciación rápida y precisa entre aislados de *F. oxysporum* sensu

lato, *F. redolens* y *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* procedentes de plantas de garbanzo mostrando síndromes parecidos a la Fusariosis Vascular y demostraron que obtener aislados de *Fusarium* parecidos a *F. oxysporum* de plantas de garbanzo mostrando síntomas similares a los de Fusariosis Vascular, aunque se realice de tejidos de la parte alta del tallo, no garantiza necesariamente la recuperación de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* y puede conducir al diagnóstico erróneo de Fusariosis Vascular si los aislados obtenidos no son adecuadamente caracterizados posteriormente.

De hecho, en este capítulo de la Tesis Doctoral, mediante la utilización de los protocolos específicos anteriormente mencionados y la secuenciación del gen TEF-1 α mostramos que varios aislados de *Fusarium* spp. proporcionados por investigadores de distintas regiones del mundo habían sido originalmente asignados erróneamente a la *forma specialis ciceris* por el laboratorio de procedencia. Estos aislados fallaron sistemáticamente en amplificar el marcador específico de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* (Jiménez-Gasco y Jiménez-Díaz, 2003), pero se pudieron identificar como pertenecientes a *F. redolens*, el complejo *F. oxysporum*, el complejo *F. solani*, *F. proliferatum*, *N. vasinfecta* y una especie de *Fusarium* no identificada. Esta identificación errónea se puede atribuir a distintas circunstancias: i) los aislamientos en cultivo puro de plantas de garbanzo afectadas por la Fusariosis Vascular no necesariamente dan lugar a *F. oxysporum* f. sp. *ciceris*, sino que a menudo resultan aislados no patogénicos de *F. oxysporum* u otras especies de *Fusarium* saprofitas con morfología similar a la de los aislados del complejo de especies de *F. oxysporum* (Kaiser et al., 1993; Trapero-Casas y Jiménez-Díaz, 1985; R.M. Jiménez-Díaz y B.B. Landa, *resultados no publicados*). Sin una caracterización adicional, esto conduciría al almacenamiento de aislados erróneamente considerados como *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* por su asociación con síntomas de Fusariosis Vascular; ii) carencia de la experiencia adecuada para identificar las numerosas especies de *Fusarium* puede haber conducido a la no percepción de características morfológicas y rasgos microscópicos clave para diferenciar especies morfológicamente cercanas; iii) la conservación de cultivos masales de los aislados sin reparar en la necesidad de obtener cultivos monospóricos previo a su almacenamiento, puede resultar en la conservación de una mezcla de aislados ocultos; y iv) no se puede excluir la ulterior contaminación de los cultivos monospóricos durante la conservación de los aislados, la cual puede pasar desapercibida sino se controlan los cultivos posteriormente. Todos

estos hechos acentúan la importancia de asegurarse cuidadosamente de que un aislado de *Fusarium* spp. induce exactamente infección vascular y síntomas de enfermedad idénticos en cultivares diferenciadores raciales que una raza de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* descrita previamente utilizados para la tipificación racial de la Fusariosis Vascular antes de proponer propuestas arriesgadas tales como que la previamente descrita raza 3 de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* debería ser re-descrita como *F. proliferatum* (Gurjar et al., 2009).

En el presente capítulo de la Tesis Doctoral, se demostró que la novedosa infección sintomática de *F. redolens* de plantas de garbanzo mostrando síntomas similares a la Fusariosis Vascular en España también existía en otros países productores de garbanzo incluyendo Líbano, Marruecos y Pakistán. Así, demostramos que los aislados de *F. redolens* fueron originalmente mal diagnosticados como *F. oxysporum* f. sp. *ciceris*, y los caracterizamos molecularmente por medio de diferentes protocolos moleculares. De hecho, el empleo de estas protocolos en nuestro laboratorio ha facilitado el diagnóstico correcto de estos aislados y ha ayudado a solucionar la problemática de algunos aislados mal asignados a una determinada especie como sucedió con el aislado 7982 que, en un principio, se asignó al patotipo de Amarillez de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris*. La diferenciación entre *F. redolens* y *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* se vio reforzada posteriormente por su distinto patrón IGS en el análisis RFLP con siete enzimas de restricción, el cual mostró también que todos los aislados de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* representativos de las ocho razas patogénicas descritas presentaron patrones de restricción RFLP-IGS idénticos independientemente de su origen geográfico o raza. Se debería destacar que todos los aislados de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* utilizados en este estudio, y algunos más de otros estudios, incluyendo los aislados de la raza 3, comparten secuencias idénticas de la región espaciadora interna (ITS) del ADNr (D.J. Fernández y B. B. Landa, *resultados no publicados*), así como de un marcador SCAR de 1,5-kb específico de la *forma specialis ciceris* (N^o acc. AF492451, Jiménez-Gasco y Jiménez-Díaz, 2003), lo cual apoya la hipótesis de que cada una de estas ocho razas forman un linaje monofilético (Jiménez-Gasco et al., 2004) y que la raza 3 del patógeno causante de la Fusariosis Vascular del garbanzo debería denominarse *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* y no *F. proliferatum* como se ha sugerido erróneamente (Gurjar et al., 2009).

Un escenario similar con identificaciones incorrectas de aislados pertenecientes a *F. redolens* ha sido descrito para otras *formae speciales* de *F. redolens* incluyendo la *forma specialis dianthi* (Bogale et al., 2000), *lini* y *hebae* (Baayen et al., 2001). De particular interés es la situación de *F. oxysporum* f. sp. *dianthi* y *F. redolens* f. sp. *dianthi* para las cuales, en el pasado, ha sido problemática la clasificación de grupos de compatibilidad vegetativa (VCGs) y razas de aislados pertenecientes a "*F. oxysporum sensu lato*" de clavel (*Dianthus caryophyllus* L.) debido a controversias en la distinción entre *F. redolens* y *F. oxysporum* (Baayen y Gams, 1988; Gerlach y Pag, 1961; Nelson et al., 1983). Así, Baayen y Kleijn (1989) describieron cinco VCGs para aislados pertenecientes a *F. oxysporum* f. sp. *dianthi* de los cuales se ha demostrado recientemente que dos deberían ser clasificados como *F. redolens* f. sp. *dianthi* (Baayen et al., 1997).

Aparte de la diferenciación entre *F. redolens* y *F. oxysporum* indicada por los ensayos de PCR específica y RFLP-IGS, los resultados del análisis filogenético de la secuencia del gen TEF-1 α indicaron claramente que los aislados de *F. redolens* y *F. oxysporum* de plantas de garbanzo no tienen en común un grupo hermano (Fig. II.3). Análisis filogenéticos previos empleando diferentes genes incluyendo el TEF-1 α , la región ITS del ADNr, la subunidad mayor 28S del ADNr nuclear, la subunidad menor mitocondrial (mtSSU) de ADNr y el gen de la β -tubulina han mostrado también que el complejo de *F. oxysporum*, el complejo de *G. fujikuroi* y el clado *F. miscanthi*-*F. nisikadoi* forman un grupo monofilético independiente del clado *F. redolens*-*F. hostae* (e.g., Baayen et al., 2001; Gams et al., 1999; Geiser et al., 2001; Nitschke et al., 2009; O'Donnell et al., 1998a; Waalwijk et al., 1996a, b). En conjunto, los aislados de *F. redolens* constituyen un complejo similar al complejo de *F. oxysporum* incluyendo aislados procedentes de diferentes huéspedes y países, y con la capacidad de inducir distintas enfermedades en diferentes cultivos (Booth, 1971; Gerlach, 1961; Gerlach y Pag, 1961). Así, al igual que en el complejo de *F. oxysporum*, algunos aislados de *F. redolens* muestran especificidad de huésped que ha llevado a agruparlos en *formae speciales*, i.e.: *F. redolens* f. sp. *dianthi* Gerlach (Gerlach, 1961), *F. redolens* f. sp. *spinaciae* (Sherb.) Subramanian (Subramanian, 1971), y *F. redolens* f. sp. *asparagi* Baayen (Baayen et al., 2000b). Por ello, sería de interés desarrollar nuevos ensayos de patogenicidad con aislados de *F. redolens* procedentes de plantas de garbanzo con otras especies de plantas para poder comprobar su especificidad patogénica sobre esta leguminosa.

En el análisis filogenético del gen TEF-1 α , dentro del clado del complejo de *F. redolens* no se observó una correlación evidente entre la agrupación de los aislados dentro de un subclado y su origen geográfico o su planta huésped. Esto está de acuerdo con otros estudios en los que la preferencia de huésped en *F. redolens* agrupados en *formae speciales* no pareció estar relacionada con los diferentes subclados resueltos mediante filogenia molecular, lo cual puede indicar que los miembros de estos *F. redolens* pueden tener orígenes evolutivos independientes (Baayen et al., 2001). En el presente Capítulo de esta Tesis Doctoral, todos los aislados de *F. redolens* de garbanzo procedentes de tres países diferentes mostraron una diversidad genética baja en la secuencia del gen TEF-1 α entre ellos y se agruparon juntos en el mismo subclado, con la excepción del aislado L96-13 del Líbano. Esto podría apoyar la hipótesis de que *F. redolens* es una nueva especie patogénica de garbanzo; esto es, la planta huésped no habría desarrollado aún resistencia específica frente al patógeno, de manera que este último no ha tenido la necesidad de evolucionar.

Fusarium redolens se ha citado como un patógeno importante en diferentes cultivos incluyendo rosal (*Rosa chinensis* Jacq.) (Ypema et al., 1987), *Pelargonium* spp. (Rajeswara Rao et al., 1999), clavel (Baayen et al., 1997; Migheli et al., 1998), espárrago (*Asparagus officinalis* L.) (Wong y Jeffries, 2006), tomate (*Solanum lycopersicum* L.) (Hamini-Kadar et al., 2010), y como un patógeno débil en espinaca (*Spinacia oleracea* L.) (Larsson y Olofsson, 1994). Se ha descrito a *F. redolens* como un patógeno de diferentes cultivos de leguminosas causando la Podredumbre del pie en guisante (*Pisum sativum* L.) y judía (*Phaseolus vulgaris* L.) (Clarkson, 1978), lesiones necróticas de la raíz principal y necrosis de las raíces secundarias en soja (*Glycine max* L.) (Bienapfl et al., 2010), y Podredumbre de raíz y Marchitez en lenteja (*Lens esculenta* Moench) (Riccioni et al., 2008); sin embargo, para nuestro conocimiento, aún no se había informado de su patogenicidad en garbanzo. En el presente Capítulo de la Tesis Doctoral informamos de las diferencias en la virulencia entre siete aislados de *F. redolens* procedentes de tres países en tres cultivares de garbanzo ('P-2245', 'PV-60' y 'PV-61'). Todos los aislados estudiados indujeron síntomas de enfermedad similares a aquéllos descritos anteriormente para los aislados de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* causantes de Amarillez (Jiménez-Díaz et al., 1989, 2011), pero con la ausencia de la infección vascular característica de este último. Los síntomas inducidos por *F. redolens* incluyeron amarillamiento del follaje de los tres cultivares inoculados a

los 13 ddi, el cual progresó gradualmente con tendencia ascendente en los mismos y, además, estaba asociado con necrosis cortical del cuello y de las raíces laterales. Es de destacar que síntomas similares a éstos fueron descritos por Trapero-Casas y Jiménez-Díaz (1985) en plantas de garbanzo inoculadas con lo que estos autores denominaron aislados de *F. oxysporum* formando colonias con micelio de color rojizo obtenidos de plantas afectadas por el complejo de enfermedades MPR o "Seca" en el sur de España. Con este nombre los autores pretendían distinguir los aislados formadores de colonias con micelio de color rojizo de aquéllos formando colonias con micelio color crema-salmón típicas de los aislados de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris*. Curiosamente, alguno de los aislados de *F. redolens* procedentes de España empleados en este estudio formaron colonias de micelio rojizo (*datos no mostrados*), lo cual podría implicar que los aislados que Trapero-Casas y Jiménez-Díaz (1985) caracterizaron empleando un diagnóstico basado únicamente en la morfología, pudieran ser en realidad, aislados de *F. redolens*. Como informaron Trapero-Casas y Jiménez-Díaz (1985) para los aislados de *F. oxysporum* formadores de colonias de color rojizo, los aislados de *F. redolens* de nuestro estudio indujeron amarillez foliar extensa, pero no causaron la muerte de las plantas inoculadas, a diferencia del aislado de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* causante de Amarillez Vascular Foc-7802 el cual originó la muerte de todas las plantas de garbanzo del cultivar P-2245 antes de los 50 ddi. Todas estas consideraciones nos llevan a sugerir que *F. redolens* es un patógeno débil de la planta de garbanzo corroborando la conclusión realizada por Trapero-Casas y Jiménez-Díaz (1985) en su trabajo respecto a los aislados de *F. oxysporum* formadores de colonias de micelio rojizo. Aunque *F. redolens* se ha considerado habitualmente como un patógeno débil en diferentes cultivos de leguminosas, incluyendo guisantes, judías y soja (Bienapfl et al., 2010; Clarkson, 1978), recientemente ha sido descrito como un patógeno altamente virulento del cultivo de lenteja induciendo Podredumbre radical y Marchitez (Riccioni et al., 2008).

Por último, ya que diversas variantes patogénicas de *F. oxysporum* y *F. redolens* pueden ocasionar síntomas similares o indistinguibles sobre el mismo huésped, como se ha mostrado en haba (*Vicia faba* L.) y guisante (Booth, 1971), clavel (Gerlach y Pag, 1961), espárrago (Baayen et al., 2000b; Wong y Jeffries, 2006), espinaca (Larsson y Olofsson, 1994), lenteja (Riccioni et al., 2008), y garbanzo (presente capítulo de la Tesis Doctoral), los resultados obtenidos en la presente Tesis Doctoral destacan la importancia de identificar y diferenciar con

exactitud entre estas dos especies coexistentes en una misma área geográfica mediante la utilización de diferentes protocolos moleculares adecuados disponibles en la actualidad. Esto permitiría una mejor selección de germoplasma resistente de estos cultivos, si existe, y una mejor comprensión de la Etiología y Epidemiología de las enfermedades causadas por las diferentes *formae speciales* de *F. oxysporum* y *F. redolens*.

II.6. LITERATURA CITADA

Alves-Santos, F. M., Benito, E. P., Eslava, A. P. y Díaz-Mínguez, J. M. 1999. Genetic diversity of *Fusarium oxysporum* strains from common bean fields in Spain. Appl. Environ. Microbiol. 65:3335-3340.

Baayen, R. P. y Gams, W. 1988. The Elegans fusaria causing wilt disease of carnation. I. Taxonomy. Netherlands J. Plant Pathol. 94:273-278.

Baayen, R. P. y Kleijn, J. 1989. The elegans fusaria causing wilt disease of carnation. II. Distinction of vegetative compatibility groups. Neth. J. Plant Pathol. 95:185-194.

Baayen, R. P., O'Donnell, K., Bonants, P. J.M., Cigelnik, E., Kroon, L. P. N. M., Roebroek, E. J. A. y Waalwijk, C. 2000a. Gene genealogies and AFLP analyses in the *Fusarium oxysporum* complex identify monophyletic and non-monophyletic formae speciales causing wilt and rot diseases. Phytopathology 90:891-900.

Baayen, R.P., O'Donnell, K., Breeuwsma, S., Geiser, D.M. y Waalwijk, C. 2001. Molecular relationships of fungi within the *Fusarium redolens*-*F. hostae* clade. Phytopathology 91:1037-1044.

Baayen, R. P., Van den Boogert, P. H. J. F., Bonants, P. J. M., Poll, J. T. K., Blok, W. J. y Waalwijk, C. 2000b. *Fusarium redolens* f. sp. *asparagi*, causal agent of asparagus root rot, crown rot and spear rot. Eur. J. Plant Pathol. 106:907-912.

Baayen, R.P., Van Dreven, F., Krijger, M.C. y Waalwijk, C. 1997. Genetic diversity in *Fusarium oxysporum* f.sp. *dianthi* and *Fusarium redolens* f.sp. *dianthi*. Eur. J. Plant Pathol. 103:395-408.

Bienapfl, J. C., Malvick, D. K. y Percich, J. A. 2010. First report of *Fusarium redolens* causing root rot of soybean in Minnesota. Plant Dis. 94:1069.

Bogale, M., Wingfield, B. D., Wingfield, M. J. y Steenkamp, E. T. 2007. Species-specific primers for *Fusarium redolens* and a PCR-RFLP technique to distinguish among three clades of *Fusarium oxysporum*. FEMS Microbiol. Lett. 271:27-32.

Booth, C. 1971. The genus *Fusarium*. Commonwealth Mycological Institute, Kew, Reino Unido. 237 pp.

Bouhot, D. y Rouxel, F., 1971. Technique selective et quantitative d'analyse des *Fusarium oxysporum* et *Fusarium solani* dans le sol. Mode d'emploi. Ann. Phytopathol. 3:251-254.

Clarkson, 1978. Pathogenicity of *Fusarium* spp. associated with foot-rots of peas and beans. Plant Pathol. 27:110-117.

Edel, V., Steinberg, C., Avelange, I., Laguerre, G. y Alabouvette, C. 1995. Comparison of three molecular methods for the characterization of *Fusarium oxysporum* strains. *Phytopathology* 85:579-585.

Edel, V., Steinberg, C., Gautheron, N. y Alabouvette, C. 1997. Populations of nonpathogenic *Fusarium oxysporum* associated with roots of four plant species compared to soilborne populations. *Phytopathology* 87:693-697.

Edel, V., Steinberg, C., Gautheron, N. y Alabouvette, C. 2000. Ribosomal DNA-targeted oligonucleotide probe and PCR assay specific for *Fusarium oxysporum*. *Mycol. Res.* 104:518-526.

Food and Agriculture Organization of the United Nations Statistical Database (FAOSTAT). 2009. FAOSTAT production statistics of crops. Disponible online en <http://faostat.fao.org/site/567/default.aspx#ancor>.

Gams, W., Klammer, L. y O'Donnell, K. 1999. *Fusarium miscanthi* sp. nov. from *Miscanthus* litter. *Mycologia* 91:263-268.

Geiser, D. M., Jiménez-Gasco, M. M., Kang, S., Makalowska, I., Veeraraghavan, N., Ward, T. J., Zhang, N., Kuldau, G. A. y O'Donnell, K. 2004. FUSARIUM-ID v. 1.0: A DNA sequence database for identifying *Fusarium*. *Eur. J. Plant Pathol.* 110:473-479.

Geiser, D. M., Juba, J. H., Wang, B. y Jeffers, S. N. 2001. *Fusarium hostae* sp. nov., a relative of *F. redolens* with a *Gibberella* teleomorph. *Mycologia* 93:670-678.

Gerlach, W. 1961. *Fusarium redolens* Wr., seine Morphologie und systematische Stellung. Ein Beitrag zur Kenntnis der *Elegans*-Fusarien. *Phytopathol. Z.* 42:150-160.

Gerlach, W. y Pag, H. 1961. *Fusarium redolens* Wr., seine phytopathologische Bedeutung und eine an *Dianthus*-Arten gefäßparasitäre Form (*F. redolens* Wr. f. *dianthi* Gerlach). *Phytopathol. Z.* 42:349-361.

Gordon, W. L. 1952. The occurrence of *Fusarium* species in Canada. II. Prevalence and taxonomy of *Fusarium* species in cereal seeds. *Can. J. Bot.* 30:236-238.

Grewal, J. S., Pal, M. y Kulshrestha, D. D. 1974. A new record of wilt of gram caused by *Fusarium solani*. *Curr. Sci.* 43:767.

Gurjar, G., Barve, M., Giri, A. y Gupta, V. 2009. Identification of Indian pathogenic races of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* with gene specific, ITS and random markers. *Mycologia* 101:484-495.

Hamini-Kadar, N., Edel-Hermann, V., Gautheron, N., and Steinberg, C., 2010. First report of *Fusarium commune* and *Fusarium redolens* causing crown and root rot on tomato in Algeria. *New Dis. Rep.* 22:3.

Jalali, B. L. y Chand, H. 1992. Chickpea wilt. En: *Plant Diseases of International Importance. Vol. I. Diseases of Cereals and Pulses.* U. S. Singh, A. N. Mukhopadhyay, J. Kumar y H. S. Chaube, eds., Prentice Hall, Englewood Cliffs, NJ, EEUU. pp. 429-444.

Jiménez-Díaz, R. M., Basallote Ureba, M. J. y Rapoport, H. 1989. Colonization and pathogenesis in chickpea infected by races of *Fusarium oxysporum* f.sp. *ciceri*. En: *Vascular wilt diseases of plants* (E. C. Tjamos and C. H., eds.) NATO ASI Series, Vol. 28, Springer-Verlag, Berlin. pp. 113-121.

Jiménez-Díaz, R. M., Crinó, P., Halila, M. H., Mosconi, C. y Trapero-Casas, A. 1993. Screening for resistance to *Fusarium* wilt and *Ascochyta* blight in chickpea. En: *Breeding for Stress*

Tolerance in Cool-Season Food Legumes. K. B. Singh, and M. C. Saxena, eds. John Wiley and Sons, Chichester, Reino Unido. pp. 77-96.

Jiménez-Díaz, R. M., Jiménez-Gasco, M. M., Landa, B. B., Castillo, P. y Navas-Cortés, J. A. 2011. Fusarium Wilt of Chickpea. En: Compendium of Chickpea and Lentil Diseases and Pests. W. Chen, H. C. Sharma, and F. J. Muehlbauer, eds. APS Press, MN, EEUU. pp. 16-20.

Jiménez-Fernández, D., Montes-Borrego, M., Jiménez-Díaz, R. M., Navas-Cortés, J. A. y Landa, B. B. 2011. *In Planta* and soil quantification of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* and evaluation of Fusarium wilt resistance in chickpea with a newly developed quantitative PCR Assay. *Phytopathology* 101:250-262.

Jiménez-Fernández, D., Montes-Borrego, M., Navas-Cortés, J. A., Jiménez-Díaz, R. M. y Landa, B. B. 2010. Identification and quantification of *Fusarium oxysporum* *in planta* and soil by means of an improved specific and quantitative PCR assay. *Appl. Soil Ecol.* 46:372-382.

Jiménez-Gasco, M. M. y Jiménez-Díaz, R. M. 2003. Development of a specific polymerase chain reaction based-assay for the identification of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* and its pathogenic races 0, 1A, 5 and 6. *Phytopathology* 93:200-209.

Jiménez-Gasco, M. M., Milgroom, M. G. y Jiménez-Díaz, R. M. 2002. Gene genealogies support *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* as a monophyletic group. *Plant Pathol.* 51:72-77.

Jiménez-Gasco, M. M., Pérez-Artés, E. y Jiménez-Díaz, R. M. 2001. Identification of pathogenic races 0, 1B/C, 5, and 6 of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* with random amplified polymorphic DNA (RAPD). *Eur. J. Plant Pathol.* 107:237-248.

Kaiser, W. J. y Danesh, D. 1971. Etiology of virus-induced wilt of *Cicer arietinum*. *Phytopathology* 61:453-457.

Kaiser, W. J., Klein, R. E., Larsen, R. C. y Wyatt, S. D. 1993. Chickpea wilt incited by pea streak carlavirus. *Plant Dis.* 77:922-926.

Kelly, A. G., Alcalá-Jiménez, A. R., Bainbridge, B. W., Heale, J. B., Pérez-Artés, E. y Jiménez-Díaz, R. M. 1994. Use of genetic fingerprinting and random amplified polymorphic DNA to characterize pathotypes of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* infecting chickpea. *Phytopathology* 84:1293-1298.

Kraft, J. M. 1969. Chickpea, a new host of *Fusarium solani* f. sp. *pisi*. *Plant Dis. Rep.* 53:110-111.

Landa, B. B., Montes-Borrego, M., Muñoz-Ledesma, F. J. y Jiménez-Díaz, R. M. 2007. Phylogenetic analysis of Downy Mildew pathogens of opium poppy and PCR-based *in planta* and seed detection of *Peronospora arborescens*. *Phytopathology* 97:1380-1390.

Landa, B. B., Navas-Cortés, J. A. y Jiménez-Díaz, R. M. 2004. Integrated management of Fusarium wilt of chickpea with sowing date, host resistance and biological control. *Phytopathology* 94:946-960.

Landa, B. B., Navas-Cortés, J. A., Jiménez-Gasco, M. M., Katan, J., Retig, B. y Jiménez-Díaz, R. M. 2006. Temperature response of chickpea cultivars to races of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*, causal agent of Fusarium wilt. *Plant Dis.* 90:365-374.

Larsson, M. y Olofsson, J. 1994. Prevalence and pathogenicity of spinach root pathogens of the genera *Aphanomyces*, *Phytophthora*, *Fusarium*, *Cylindrocarpon*, and *Rhizoctonia* in Sweden. *Plant Pathol.* 43:251-260.

Leslie, J. F., Zeller, K. A. y Summerell, B. A. 2001. Icebergs and species in populations of *Fusarium*. *Physiol. Molec. Plant Pathol.* 59:107-117.

Madden, L. V., Hughes, G. y van den Bosch, F. 2007. The Study of Plant Disease Epidemics. The American Phytopathological Society, St. Paul, MN, EEUU. 421 pp.

Migheli, Q., Briatore, E. y Garibaldi, A. 1998. Use of random amplified polymorphic DNA (RAPD) to identify races 1, 2, 4 and 8 of *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* in Italy. *Eur. J. Plant Pathol.* 104:49-57.

Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino. 2009. Anuario de Estadística. 13. Superficies y producciones de cultivos. Disponible online en <http://www.mapa.es/es/estadistica/pags/anuario/2009/indice.asp>.

Mishra, P. K., Fox, R. T. V. y Culham, A. 2003. Development of a PCR-based assay for rapid and reliable identification of pathogenic *Fusaria*. *FEMS Microbiol. Lett.* 213:329-332.

Navas-Cortés, J. A., Hau, B. y Jiménez-Díaz, R. M. 2000. Yield loss in chickpeas in relation to development of *Fusarium* wilt epidemics. *Phytopathology* 90:1269-1278.

Navas-Cortés, J. A., Landa, B. B., Méndez-Rodríguez, M. A. y Jiménez-Díaz, R. M. 2007. Quantitative modeling of the effects of temperature and inoculum density of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* races 0 and 5 on the development of *Fusarium* wilt in chickpea cultivars. *Phytopathology* 97:564-573.

Nelson, P. E., Tousson, T. A. y Cook, R. J. 1981. *Fusarium: Diseases, Biology, and Taxonomy*. The Pennsylvania University Press, University Park, PA, EEUU. 457 pp.

Nelson, P. E., Toussoun, T. A. y Marasas, W. F. O. 1983. *Fusarium* species. An Illustrated Manual for Identification. Pennsylvania State University Press, University Park, PA, EEUU. 193 pp.

Nene, Y. L., Haware, M. P. y Reddy, M.V. 1978. Diagnosis of some wilt disorders of chickpea (*Cicer arietinum* L.). ICRISAT Information Bulletin, Vol. 3. Hyderabad, India. 44 pp.

Nitschke, E., Nihlgard, M. y Varrelmann, M. 2009. Differentiation of eleven *Fusarium* spp. isolated from sugar beet, using restriction fragment analysis of a Polymerase Chain Reaction–Amplified Translation Elongation Factor 1 α gene fragment. *Phytopathology* 99: 921-929.

O'Donnell, K., Cigelnik, E. y Nirenberg, H. I. 1998a. Molecular systematics and phylogeography of the *Gibberella fujikuroi* species complex. *Mycologia* 90:465-493.

O'Donnell, K., Kistlerr, H. C., Cigelnik, E. y Ploetz, R. C. 1998b. Multiple evolutionary origins of the fungus causing panama disease of banana: Concordant evidence from nuclear and mitochondrial gene genealogies. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95:2044-2049.

Rajeswara Rao, B.R., Bhattacharya, A.K., Singh, H.B. y Mallavarapu, G.R. 1999. The impact of wilt disease on oil yield and quality of two cultivars of rose-scented geranium (*Pelargonium* species). *J. Essent. Oil Res.* 11:769-775.

Riccioni, L., Haegi, A. y Valvassori, M. 2008. First report of vascular wilt caused by *Fusarium redolens* on lentil in Italy. *Plant Dis.* 92:1132.

Schroers, H.-J., O'Donnell, K., Lamprecht, S. C., Kammeyer, P. L., Johnson, S., Sutton, D. A., Rinaldi, M. G., Geiser, D. M. y Summerbell, R. C. 2009. Taxonomy and phylogeny of the *Fusarium dimerum* species group. *Mycologia* 101:44-70.

Snyder, W. C. y Hansen, H. N. 1940. The species concept in *Fusarium*. *Amer. J. Bot.* 27: 64–67.

Subramanian, C. V. 1971. Hyphomycetes. An account of Indian species, Except Cercosporae. Indian Council for Agricultural Research, New Delhi, India. 930 pp.

Trapero-Casas, A. y Jiménez-Díaz, R. M. 1985. Fungal wilt and root rot diseases of chickpea in southern Spain. *Phytopathology* 75:1146-1151.

Visser, C., Wingfield, M. J., Wingfield, B. D. y Yamaoka, Y. 1995. *Ophiostoma polonicum* is a species of *Ceratostyis sensu stricto*. *Syst. Appl. Microbiol.* 18:403-409.

Waalwijk, C., Baayen, R. P., de Koning, J. R. A. y Gams, W. 1996a. Ribosomal DNA analyses challenge the status of *Fusarium* sections *Liseola* and *Elegans*. *Sydowia* 48: 90-104.

Waalwijk, C., de Koning, J. R. A. y Gams, W. 1996b. Discordant groupings of *Fusarium* spp. from sections *Elegans*, *Liseola* and *Dlaminia* based on ribosomal ITS1 and ITS2 sequences. *Mycologia* 88:361-368.

Westerlund, F. V., Campbell, R. N. Jr. y Kimble, K. A. 1974. Fungal root rots and wilt of chickpea in California. *Phytopathology* 64:432-436.

White, T. J., Bruns, T., Lee S. y Taylor, J. W. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. En: *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky and T. T. White, eds. Academic Press Inc., New York, EEUU. pp. 315-322.

Wong, J. Y. y Jeffries, P. 2006. Diversity of pathogenic *Fusarium* populations associated with asparagus roots in decline soils in Spain and the UK. *Plant Pathol.* 55:331-342.

Ypema, H.L., Van De Pol, P.A. y Bollen, G.J. 1987. Black rot of stentlings of roses: A disease caused by various soil fungi. *Sci. Hortic.* 33:269-280.

CAPÍTULO III

Identificación y cuantificación de *Fusarium oxysporum* en planta y suelo por medio de un protocolo de PCR específica mejorado y PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR)

III.1. RESUMEN

La correcta identificación y cuantificación de las poblaciones de *Fusarium oxysporum* que habitan el suelo y la rizosfera de las plantas son de gran importancia para estudios de Ecología Microbiana y Fitopatología. En el presente capítulo de la Tesis Doctoral se ha mejorado un protocolo de PCR-específica para la identificación del complejo de especies de *F. oxysporum* y su conversión en un protocolo de PCR-cuantitativa (qPCR) para la cuantificación de hasta 1 pg de ADN del hongo en suelo y diferentes tejidos de la planta. La eficiencia de amplificación, sensibilidad y reproducibilidad de los ensayos de qPCR no se vieron influenciados por la presencia de ADN no diana tanto de planta como de suelo. La aplicabilidad del nuevo protocolo recién desarrollado para estudios de poblaciones de *F. oxysporum* se demostró utilizando la técnica para la cuantificación del hongo en diferentes muestras medioambientales complejas. El empleo del protocolo de qPCR permitió cuantificar con exactitud hasta 25 pg de ADN de *F. oxysporum*/g de suelo naturalmente infestado, así como identificar diferencias significativas en la cantidad de ADN de *F. oxysporum* en raíces de diferentes cultivares de garbanzo que crecieron en una parcela infestada con diversas poblaciones de *F. oxysporum* patogénicas y no patogénicas. Este protocolo de qPCR puede ser especialmente útil para estudios de Ecología Microbiana y Fitopatología ya que proporciona una nueva oportunidad para analizar poblaciones de *F. oxysporum* y sus interacciones con la microflora del suelo, medioambiente y genotipos de plantas huésped.

III.2. INTRODUCCIÓN

Fusarium oxysporum Schlecht. Emend. Snyder & Hans. constituye un amplio complejo de hongos anamórficos similares morfológicamente con múltiples orígenes filogenéticos (Baayen et al., 2000; Bogale et al., 2006; O'Donnell et al., 1998b). Este complejo de especies se encuentra bien representado entre las comunidades fúngicas en diferentes tipos de suelo en todo el mundo (Burgess, 1981), y se consideran miembros comunes de las comunidades fúngicas en la rizosfera de plantas (Gordon y Martyn, 1997). No obstante, dentro de este complejo de especies algunos aislados pueden causar enfermedades devastadoras incluyendo principalmente Marchiteces y Podredumbres de Raíz en gran número de cultivos de gran importancia económica. Estos aislados fúngicos fitopatógenos muestran una alta especificidad patogénica para las especies y cultivares de sus plantas huésped, en base a la cual son clasificados en más de 100 *formae speciales* y en razas patogénicas dentro de aquéllas, respectivamente (Armstrong y Armstrong, 1981; Edel et al., 1995; Nelson et al., 1983). Además de aislados fitopatógenos, los suelos agrícolas albergan también importantes poblaciones de *F. oxysporum* no patogénicos que comparativamente han recibido menos atención que los patogénicos, a pesar de que juegan un papel relevante en la ecología de las enfermedades causadas por *Fusarium* spp. (Alabouvette et al., 2007; Fravel et al., 2003). De hecho, ciertos estudios han establecido el importante papel de los aislados de *F. oxysporum* no patogénicos en la supresividad natural de algunos suelos a Fusariosis Vasculares (Alabouvette, 1990; Alabouvette et al., 1993; Larkin et al., 1996) y que condujeron a la evaluación y selección de aislados de *F. oxysporum* no patogénicos efectivos como agentes de biocontrol (Alabouvette et al., 1993; Paulitz et al., 1987; Postma y Rattink, 1992).

Tanto los aislados de *F. oxysporum* patogénicos como los no patogénicos de plantas son capaces de sobrevivir en el suelo durante largos periodos de tiempo en forma de clamidosporas. Los aislados no patogénicos pueden también sobrevivir mediante crecimiento saprofito sobre la materia orgánica existente en el suelo y en la rizosfera de muchas especies de plantas, y muchos de estos aislados son capaces de infectar tejidos corticales de la raíz sin causar síntomas visibles de enfermedad (Garrett, 1970; Burgess, 1981). Aunque el mecanismo de acción de los aislados no patogénicos aún no se comprende completamente,

pruebas experimentales indican que compiten por nutrientes y sitios de colonización con las poblaciones fitopatógenas de *F. oxysporum* en el suelo y en las raíces, y que también inducen resistencia sistémica en la planta huésped (Alabouvette et al., 2007). Por consiguiente, ya que tanto las poblaciones patogénicas como las no patogénicas de *F. oxysporum* juegan un papel importante en la ecología del suelo y en la patología de las plantas, son muchos los estudios que han abordado la caracterización de estas poblaciones y analizar sus interacciones con el medioambiente y la microflora del suelo en cultivos específicos (Abo et al., 2005; Appel y Gordon, 1994, 1996; Edel et al., 1997, 2001; Lori et al., 2004).

Generalmente, el diagnóstico de especies de *Fusarium* spp., incluyendo *F. oxysporum*, basados en la morfología son enormemente desafiantes. Esto se debe a la utilización de diversos sistemas taxonómicos, al reducido número de micólogos con experiencia adecuada en la identificación de estos hongos y a la falta de características morfológicas que sean suficientemente informativas, ya que la identificación de especies depende fundamentalmente de pequeñas diferencias en la morfología. Además, diferenciar *F. oxysporum* de otras especies de *Fusarium* pertenecientes a las secciones *Elegans* y *Liseola* puede ser a veces especialmente difícil (Fravel et al., 2003). Para complicar más la situación, los aislados patogénicos de plantas, saprófitos y agentes de biocontrol de *F. oxysporum* son indistinguibles morfológicamente.

Durante la última década, se han desarrollado nuevas tecnologías basadas en el ADN como los protocolos de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) para apoyar y reemplazar las identificaciones basadas únicamente en la morfología de hongos fitopatógenos. Actualmente la disminución del coste de los consumibles de PCR y de los equipos termocicladores, ha hecho que la identificación molecular y específica de microorganismos pueda ser más accesible y rápida para estudios de biología de poblaciones a gran escala que hace unos pocos años. En el caso de *F. oxysporum*, la mayoría de protocolos de PCR específica se desarrollaron para diferenciar aislados patogénicos de plantas (es decir, *formae speciales*) causando Fusariosis Vasculares (Alves-Santos et al., 2002; Hirano y Arie, 2006; Jiménez-Gasco y Jiménez-Díaz, 2003; Lievens et al., 2007; Pasquali et al., 2007, 2004, 2006; Zambounis et al., 2007; Zhang et al., 2005) o podredumbres de corona (De Haan et al., 2000; Hirano y Arie, 2006; Lievens et al., 2007), o identificar incluso razas o

patotipos dentro de una *forma specialis* (Hirano y Arie, 2006; Jiménez-Gascó y Jiménez-Díaz, 2003; Kelly et al., 1998; Lin et al., 2009; Pasquali et al., 2007), o aún más específicamente aislados de *F. oxysporum* agentes de control biológico (Cipriani et al., 2009). Sin embargo, sólo unos pocos de esos protocolos se desarrollaron para la cuantificación de una determinada *forma specialis* de *F. oxysporum* (Pasquali et al., 2004, 2006; Zambounis et al., 2007; Zhang et al., 2005). Asimismo, según nuestro conocimiento sólo se han desarrollado dos protocolos de PCR específica para la detección de "*F. oxysporum sensu lato*", pero ninguno de ellos es de naturaleza cuantitativa (Edel et al., 2000; Mishra et al., 2003).

Edel et al. (2000) desarrollaron iniciadores específicos para *F. oxysporum* seleccionando para ello los dominios variables del ADN ribosómico (ADNr) de la región 28S, los cuales amplificaron un fragmento de 70 pb. Cuando se utilizó este protocolo para la caracterización de una gran colección de aislados de *F. oxysporum*, encontramos que la reproducibilidad de los resultados puede verse influenciada por diversos factores convirtiendo el protocolo en poco fiable (B.B. Landa, *datos no publicados*): (i) el amplicón no fue amplificado con igual eficacia por diversas marcas comerciales de Taq ADN polimerasa (Edel et al., 2000); (ii) la electroforesis de los productos de PCR debía realizarse utilizando un gel con un alto contenido en agarosa (4%) para poder visualizar correctamente el amplicón diana; (iii) el fragmento de ADN es demasiado corto para detectar polimorfismo de secuencia mediante análisis de Longitud de los Fragmento de Restricción (RFLP) o secuenciación entre aislados de *F. oxysporum*.

Más tarde, Mishra et al. (2003) desarrollaron ensayos PCR para la rápida identificación de algunas especies de *Fusarium* incluyendo *F. oxysporum*. Esta técnica se basó en el diseño de iniciadores que tenían como diana la región ITS del ADNr y que amplifican un fragmento de 340 pb. Comparado con el protocolo desarrollado por Edel et al. (2000), el de Mishra et al. (2003) tiene la ventaja de que la secuencia ITS muestra algún grado de variación a nivel intraespecífico dentro de *F. oxysporum*, que se puede revelar mediante análisis RFLP (Thangavelu y Jayanthi, 2009). Consecuentemente, el protocolo de PCR específica de Mishra et al. (2003) podría ser útil para la identificación de aislados de *F. oxysporum*, así como para valorar el grado de diversidad genética entre ellos. Sin embargo, cuando en el presente trabajo se probaron los iniciadores específicos de *F.*

oxysporum y las condiciones de amplificación descritas originalmente por Mishra et al. (2003) encontramos que los iniciadores amplificaban de forma cruzada varias especies de *Fusarium* diferentes de *F. oxysporum*.

Los ensayos de PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR) pueden ser una herramienta útil para estudios de ecología de poblaciones de *F. oxysporum* en el suelo y la rizosfera. Diversos ensayos de qPCR han permitido la cuantificación precisa e independiente del cultivo de una gran variedad de microorganismos asociados a plantas o suelo, incluyendo patógenos de plantas procedentes de tejidos vegetales, semillas o el suelo (e.g., revisado en Schaad et al., 2003; Schena et al., 2004). Los principales agentes químicos empleados en la detección de la fluorescencia en la qPCR se pueden agrupar en agentes no específicos (SYBR Green) y específicos (TaqMan, Molecular Beacons, PCR Scorpion, etc.) de la secuencia del amplicón (Schaad et al., 2003; Schena et al., 2004), siendo estos últimos más específicos pero más costosos. El marcador de tipo intercalar SYBR Green puede proporcionar un enfoque más flexible para el análisis de complejos de especies como es el caso de "*F. oxysporum sensu lato*".

En el presente capítulo de la Tesis Doctoral, se ha mejorado el protocolo de PCR específica de *F. oxysporum* desarrollado por Mishra et al. (2003) y se ha transformado en un protocolo de qPCR para la identificación y cuantificación de ADN de *F. oxysporum* en diferentes tejidos de plantas y suelo. Para ello se evaluó la robustez y reproducibilidad del protocolo recién desarrollado utilizando diferentes aislados de *F. oxysporum* y/o diferentes especies de plantas y tejidos del huésped. Finalmente, se demostró y discutió la aplicabilidad del protocolo de qPCR desarrollado para estudios de poblaciones de *F. oxysporum* utilizando la técnica para cuantificar el hongo: (i) en diferentes suelos infestados natural y artificialmente, y (ii) en raíces de cultivares de garbanzo (*Cicer arietinum* L.) que crecieron en un suelo infestado con diferentes poblaciones de *F. oxysporum* patogénicas y no patogénicas bajo condiciones naturales de campo.

III.3. MATERIALES Y MÉTODOS

III.3.1. Aislados del hongo

Los aislados de *Fusarium* spp. utilizados en el estudio se muestran en la Tabla III.1. La mayoría de los aislados (58) se obtuvieron de una colección de Ex-tipos de *Fusarium* spp. depositada en el Departamento de Patología Vegetal, Universidad del Estado de Kansas, Manhattan, EEUU. Los aislados utilizados incluyen aislados representativos de las principales secciones de *Fusarium*; i.e., *Discolor*, *Elegans*, *Gibbosum*, *Lateritium*, *Liseola*, *Martiella*, *Roseum*, *Spicarioides* y *Sporotrichiella* (Leslie y Summerell, 2006), así como algunas especies de *Fusarium* que pueden ser erróneamente identificadas como *F. oxysporum* por su similitud morfológica con esta especie. Además, incluimos en el estudio 14 aislados de *F. oxysporum*, de los cuales ocho son fitopatógenos y representativos de las *formae speciales*, *F. oxysporum* Schlechtend.: Fr. f. sp. *ciceris* (Padwik) Matuo & K. Sato, *F. oxysporum* Schlechtend.:Fr. f. sp. *lycopersici* W.C. Snyder & H.N. Hans., *F. oxysporum* f. sp. *melonis* W. C. Snyder & H. N. Hans. y *F. oxysporum* f. sp. *pisi* (J.C. Hall) W.C. Snyder & H.N. Hans. (Tabla III.1). Todos los aislados de *Fusarium* spp. se almacenaron en tubos con suelo estéril a 4°C y en glicerol al 35% en agua estéril a -80°C para su conservación prolongada.

Tabla III.1. Especies y aislados de *Fusarium* spp. utilizados en este estudio, resultados del ensayo de PCR específica de *F. oxysporum* utilizando los iniciadores FO1/FOR1 con las condiciones de amplificación originales (Mishra et al., 2003) y las optimizadas en el presente Capítulo de la Tesis Doctoral, números de acceso de las secuencias ITS y su homología con la secuencia de los aislados de *Fusarium* spp. que presentaron amplificación cruzada con estos iniciadores

Fusarium spp.	Aislado	Amplificación PCR ^a		Número Acc.	Homología secuencia (%)		Fusarium spp.	Aislado	Amplificación PCR ^a		Número Acc.	Homología secuencia (%)	
		Original	Optimizada		FO1	FOR1			Original	Optimizada		FO1	FOR1
<i>F. acuminatum</i>	11442	-/-	-/-	nr ^b	---	---	<i>F. pseudoanthophilum</i>	10755	±/+	-/-	---	---	90,5
<i>F. acutatum</i>	10769	-/-	-/-	nr	---	---	<i>F. pseudocircinatum</i>	10761	±/+	-/-	---	---	95,0
<i>F. armeniacum</i>	11623	±/+	-/-	nr	90,0	90,5	<i>F. pseudograminearum</i>	11435	-/-	-/-	---	---	---
<i>F. andiyazi</i>	4647	±/+	-/-	nr	95,0	95,2	<i>F. pseudonygmatai</i>	10762	±/+	-/-	---	---	95,0
<i>F. anthropophilum</i>	11560	-/-	-/-	nr	---	---	<i>F. ramigenum</i>	10760	±/+	-/-	---	---	95,2
<i>F. avenaceum</i>	11440	-/-	-/-	nr	---	---	<i>F. sacchari</i>	278	±/+	-/-	---	---	90,0
<i>F. babinda</i>	11478	-/-	-/-	nr	---	---	<i>F. sacchari</i>	B-3852	±/+	-/-	---	---	95,2
<i>F. begoniae</i>	10767	±/+	-/-	nr	95,0	95,2	<i>F. sacchari</i>	B-3853	±/+	-/-	---	---	95,0
<i>F. brevicatenulatum</i>	10756	±/+	-/-	nr	95,0	95,2	<i>F. scirpi</i>	11409	-/-	-/-	---	---	---
<i>F. bulbicola</i>	10759	±/+	-/-	nr	95,0	95,2	<i>F. semitectum</i>	11432	-/-	-/-	---	---	---
<i>F. chlamydosporum</i>	11397	-/-	-/-	nr	---	---	<i>F. solani</i>	11420	-/-	-/-	---	---	---
<i>F. circinatum</i>	10766	±/+	-/-	nr	95,0	95,2	<i>F. solani</i>	Fsp4	-/-	-/-	---	---	---
<i>F. circinatum</i>	H-10847	±/+	-/-	nr	95,0	95,2	<i>F. sporotrichioides</i>	11552	-/-	-/-	---	---	---
<i>F. circinatum</i>	H-10850	±/+	-/-	nr	95,0	95,2	<i>F. subglutinans</i>	11544	±/+	-/-	---	---	95,0
<i>F. compactum</i>	11624	-/-	-/-	nr	---	---	<i>F. subglutinans</i>	E-990	±/+	-/-	---	---	95,0
<i>F. concentricum</i>	10765	-/-	-/-	nr	---	---	<i>F. subglutinans</i>	E-2192	±/+	-/-	---	---	95,2
<i>F. crookwellense</i>	11451	-/-	-/-	nr	---	---	<i>F. thapsinum</i>	F-4093	-/-	-/-	---	---	---
<i>F. culmorum</i>	11427	-/-	-/-	nr	---	---	<i>F. thapsinum</i>	F-4094	-/-	-/-	---	---	---
<i>F. decemcellulare</i>	11411	-/-	-/-	nr	---	---	<i>F. thapsinum</i>	11419	-/-	-/-	---	---	---
<i>F. denticulatum</i>	10763	±/+	-/-	nr	95,0	95,2	<i>F. trinctum</i>	11566	-/-	-/-	---	---	---
<i>F. dimerum</i>	11425	-/-	-/-	nr	---	---	<i>F. verticilloides</i>	11556	±/+	-/-	---	---	---
<i>F. equiseti</i>	11439	-/-	-/-	nr	---	---	<i>F. verticilloides</i>	A-149	±/+	-/-	---	---	---
<i>F. globosum</i>	11554	-/-	-/-	nr	---	---	<i>F. verticilloides</i>	A-999	±/+	-/-	---	---	85,0
<i>F. guttiforme</i>	10764	±/+	-/-	nr	95,0	90,5	<i>F. verticilloides</i>	Fo-90101	±/+	-/-	---	---	95,0
<i>F. lactis</i>	10757	±/+	-/-	nr	95,0	95,2	<i>F. oxysporum</i> ^c	Fo-90105	±/+	±/+	---	---	100
<i>F. lateritium</i>	11403	-/-	-/-	nr	---	---	<i>F. oxysporum</i> ^c	11390	±/+	±/+	---	---	100
<i>F. longipes</i>	11428	-/-	-/-	nr	---	---	<i>F. oxysporum</i> ^c	Fsp7	±/+	±/+	---	---	100
<i>F. nelsonii</i>	11564	-/-	-/-	nr	---	---	<i>F. oxysporum</i> ^c	Fsp8	±/+	±/+	---	---	100
<i>F. nisekadal</i>	10758	±/+	-/-	nr	100	90,5	<i>F. oxysporum</i> ^c	Fsp9	±/+	±/+	---	---	100
<i>F. nygamai</i>	5111	-/-	-/-	nr	---	---	<i>F. oxysporum</i> ^c	Foc-7802	±/+	±/+	---	---	100
<i>F. phyllophilum</i>	10768	-/-	-/-	nr	---	---	<i>F. o. ciceris</i> ^c	Foc-8012	±/+	±/+	---	---	100
<i>F. poae</i>	11470	-/-	-/-	nr	---	---	<i>F. o. ciceris</i> ^c	Foc-9605	±/+	±/+	---	---	100
<i>F. polyhalidicum</i>	11414	-/-	-/-	nr	---	---	<i>F. o. lycopersici</i> ^c	Fol-325	±/+	±/+	---	---	100
<i>F. proliferatum</i> ^b	Fo-9009	-/-	-/-	nr	---	---	<i>F. o. melonis</i> ^c	Fom-9016	±/+	±/+	---	---	100
<i>F. proliferatum</i> ^b	11558	-/-	-/-	nr	---	---	<i>F. o. pisi</i>	Fop-79	±/+	±/+	---	---	100
<i>F. proliferatum</i> ^b	D-4853	-/-	-/-	nr	---	---	<i>F. o. pisi</i>	Fop-80	±/+	±/+	---	---	100
<i>F. proliferatum</i> ^b	D-4854	-/-	-/-	nr	---	---	<i>F. o. pisi</i>	Fop-4A	±/+	±/+	---	---	100

^a El protocolo de PCR-específica de *F. oxysporum* se realizó siguiendo las condiciones de amplificación descritas por Mishra et al. (2003) (original) o las condiciones de amplificación puestas a punto en el presente Capítulo de la Tesis Doctoral (optimizada). (+) = Amplificación positiva intensa; (±) = Amplificación positiva débil; (-) = no amplificación. Los resultados presentados se obtuvieron por dos operadores independientes.

^b nr: no realizada

^c Los aislados 7802, 8012 y 9605 de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris*, 90105, 90101, Fsp7, Fsp8 y Fsp9 de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*, 325 de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*, 9016 de *F. oxysporum* f. sp. *melonis*, 9009 de *F. proliferatum* y Fsp4 de *F. solani* procedían de la colección de cultivos fúngicos del Departamento de Protección de Cultivos, Instituto de Agricultura Sostenible (IAS-CSIC), Córdoba, España. Los aislados de *F. oxysporum* f. sp. *pisi* fueron proporcionados por W. Boge, USDA-ARS Pacific West Area, Prosser, WA, EEUU. Los restantes aislados de *Fusarium* spp. fueron proporcionados por J. F. Leslie, Department of Plant Pathology, Kansas State University, Manhattan, EEUU.

Para la extracción de ADN fúngico, se colocó un pequeño trozo de agar de cultivos activos creciendo en agar patata dextrosa (APD) (Laboratorios Difco, Detroit, Michigan, EEUU) sobre una película de celofán estéril dispuesta sobre una placa de APD e incubada durante 3-4 días a $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ con un fotoperiodo de 12-h de una mezcla de luz blanca fluorescente y cercana al ultravioleta de $36 \mu\text{Em}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$. Posteriormente, el micelio crecido sobre la superficie de celofán se raspó con un escalpelo estéril, se liofilizó y se almacenó a -20°C hasta su empleo.

III.3.2. Muestras de tejido vegetal

Para los ensayos de qPCR, se obtuvieron muestras de raíces, y tallos con hojas de plántulas de garbanzo, melón y guisante que crecieron en macetas con arena estéril en una cámara de cultivo de plantas visitable (Euroclima, Córdoba, España) ajustada a $25\pm 2^{\circ}\text{C}$, 60-90% de humedad relativa y 14-h de fotoperiodo de luz fluorescente de $360 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. A los 40 días, se obtuvieron muestras de raíz y tallo de las plantas, se lavaron bajo agua de grifo y se desinfectaron superficialmente en 2% de NaOCl durante 1,5 min, se liofilizaron, se homogeneizaron y se almacenaron a -20°C hasta su utilización.

III.3.3. Extracción de ADN y cuantificación

El ADN fúngico y vegetal se extrajo de muestras de 50 mg de micelio o tejido vegetal liofilizado utilizando el 'G-Spin™ IIp Plant Genomic DNA extraction kit' (Intron Biotechnology, Corea) y el Fast-Prep FP-120 (MP biomedical, Illkirch, Francia) de acuerdo a Landa et al. (2007).

La calidad de ADN se valoró mediante electroforesis en gel y tinción con bromuro de etidio. Todas las muestras de ADN se cuantificaron con exactitud utilizando el 'Quant-iT DNA Assay Kit Broad Range fluorometric assay' (Molecular Probes Inc., Leiden, Países Bajos) y un fluoroespectrofotómetro Tecan Safire (Tecan Spain, Barcelona, España) (Landa et al., 2007). Se puso especial cuidado en la obtención de concentraciones exactas de ADN del patógeno y del huésped mediante la cuantificación de cada muestra de ADN por triplicado, en dos microplacas independientes. Se incluyeron muestras de ADN de concentración conocida en cada placa de cuantificación de ADN como control interno. El ADN se diluyó con agua estéril ultrapura según correspondiese.

III.3.4. Secuenciación del ADN

Se utilizaron los 25 aislados de *Fusarium* spp. que habían mostrado amplificación cruzada con la pareja de iniciadores FOF1/FOR1 (Mishra et al., 2003) y todos los aislados de *F. oxysporum* de este estudio. En total, las regiones ITS1-5,8S-ITS2 del ADNr de los 39 aislados de *Fusarium* spp. se amplificaron en ensayos de PCR utilizando los iniciadores universales ITS4 e ITS5 (White et al., 1990) y las condiciones descritas por Landa et al. (2007) para determinar la especificidad de los iniciadores. Los productos de PCR amplificados se purificaron utilizando el 'GeneClean Turbo Kit' (Qbiogene, Illkirch, Francia), se cuantificaron con un espectrofotómetro NanoDrop ND-1100 (NanoDrop, Wilmington, Delaware, EEUU) y se utilizaron para la secuenciación directa del ADN. Los amplicones de PCR se secuenciaron utilizando el iniciador ITS5 con un 'terminator cycle sequencing ready reaction kit' (BigDye, Perkin-Elmer, Applied Biosystems, Madrid, España) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los productos resultantes se purificaron y se procesaron en un secuenciador multicapilar de ADN (Abiprism 3100 genetic analyzer, Applied Biosystems) en las instalaciones de secuenciación de la Universidad de Córdoba. Todas las secuencias ITS1-5,8S-ITS2 obtenidas en el estudio se depositaron en GenBank con los números de acceso mostrados en la Tabla III.1.

III.3.5. Optimización del protocolo PCR-específica de *Fusarium oxysporum*

Inicialmente se utilizaron las condiciones iniciales descritas por Mishra et al. (2003) para la amplificación específica de los aislados de *F. oxysporum*. Los resultados indicaron que tenía lugar la amplificación cruzada de varias especies de *Fusarium*, pero al menos uno de los dos iniciadores no mostró 100% de homología con las secuencias ITS de estos aislados de *Fusarium* spp. Por lo tanto, se modificaron diferentes parámetros del protocolo de PCR para incrementar la especificidad respecto al protocolo original, incluyendo la concentración de MgCl₂ (1,0, 1,5 ó 2,0 mM), iniciadores (0,2 ó 0,35 µM) y dNTPs (100 ó 200 µM), así como la temperatura de hibridación. Todas las reacciones se repitieron al menos dos veces y siempre incluyeron controles positivos (ADN de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* Foc-9605) y negativos (ausencia de ADN). Los productos de amplificación se separaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 1,5% en tampón TAE 1x durante 60-80 min a 80 V, se tiñeron con bromuro de etidio y se visualizaron bajo

luz ultravioleta. Para la electroforesis se utilizó el marcador 'Gene-ruler™ DNA ladder mix' (Fermentas, St Leon-Rot, Alemania).

III.3.6. Curvas estándar de ADN para qPCR

Las curvas estándar de ADN se obtuvieron a partir de diluciones seriadas 10X de ADN de los aislados Foc-9605 de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris*, Fop-4A de *F. oxysporum* f. sp. *pisi* y Fom-9016 de *F. oxysporum* f. sp. *melonis* (Tabla III.1). Para este propósito, el ADN (10 ng/μl) de estos aislados de *F. oxysporum* se diluyó seriadamente [1:1, 1:10, 1:10², 1:10³, 1:10⁴ y 1:10⁵] en agua estéril ultrapura (series A: A/Foc-9605, A/Fom-9016 y A/Fop-4A) así como en un fondo fijo de ADN de planta huésped (10 ng/μl) extraído de tallos (TG/Foc-9605) y raíces (RG/Foc-9605) de garbanzo, raíces de melón (*Cucumis melo* L.) (RM/Fom-9016) y raíces de guisante (*Pisum sativum* L.) (RGu/Fop-4A), o en un fondo fijo de ADN (10 ng/μl) extraído de un suelo natural (S/Foc-9605) (Ver apartado II.3.8). Cada curva estándar incluyó ADN de suelo o de la planta únicamente o no incluyeron ADN como controles negativos. Se obtuvieron dos curvas estándar independientes utilizando fuentes independientes de ADN del patógeno, de suelo y de la planta.

III.3.7. Optimización, reproducibilidad y sensibilidad del protocolo de qPCR recién desarrollado

Todas las amplificaciones de qPCR se realizaron utilizando la mezcla de reacción 'iQ SYBR Green Supermix' (Bio-Rad, Madrid, España) y el termociclador iCycler IQ (Bio-Rad). Las condiciones de reacción tales como el volumen de reacción, temperatura de hibridación, concentración de iniciadores y la temperatura de medida de la señal de fluorescencia del amplicón se ajustaron experimentalmente para optimizar el protocolo de qPCR. Después del ciclo de amplificación final se obtuvo un perfil de temperatura de la curva de fusión o 'melting' calentando hasta 95°C, enfriando hasta 72°C y calentando lentamente hasta 95°C a intervalos de 0,5°C cada 10 s con medida continua de la fluorescencia a 520 nm. Todas las reacciones se analizaron mediante electroforesis en gel para confirmar que sólo se amplificó un único producto de PCR de las muestras conteniendo ADN genómico de aislados de *F. oxysporum* y no se obtuvo producto de amplificación en los controles negativos.

La influencia potencial del ADN huésped y/o de la fuente de ADN [tejido de la planta (raíz vs. tallo); especie huésped (garbanzo, melón o guisante); y del aislado de *F. oxysporum* (Foc-9605, Fom-9016 y Fop-4A)] en la eficiencia de las amplificaciones de qPCR se determinó en un experimento independiente. Para ello, la comparación entre los distintos fondos de ADN se realizó en la misma placa de PCR de 96 pocillos. Se llevó a cabo un experimento similar para determinar la influencia del fondo de ADN de suelo en las amplificaciones. Las amplificaciones de PCR cuantitativa de cada serie de curvas estándar de ADN incluyeron tres repeticiones por tratamiento y placa. Todos los experimentos se repitieron dos veces de forma independiente (diferentes placas de PCR, operadores y curvas estándar de ADN) y siempre incluyeron una curva estándar de ADN común para poder estimar la variabilidad entre y dentro de los experimentos. Por último, la sensibilidad del protocolo de qPCR se determinó utilizando dos series de tres curvas estándar de ADN (A/Foc-9605, RG/Foc-9605 y S/Foc-9605) y comparándolas con el protocolo de PCR simple utilizando los iniciadores FOF1/FOR1, así como con un protocolo de PCR anidada utilizando los iniciadores ITS1F (Gardes y Bruns, 1993)/ITS4 en la primera ronda de amplificación y FOF1/FOR1 en la segunda, siguiendo un enfoque similar al descrito en Montes-Borrego et al. (2009).

III.3.8. Aplicación del protocolo de qPCR a estudios de Ecología Microbiana del suelo

Para validar la utilización de la técnica de qPCR recién desarrollada en estudios de Ecología Microbiana mediante la cuantificación de la cantidad de *F. oxysporum* en tejidos de la planta naturalmente infectados, así como en suelo natural y artificialmente infestado se realizaron tres experimentos diferentes.

Muestras de tejido vegetal naturalmente infectado por *F. oxysporum*

Se extrajo el ADN total de muestras de raíces de seis cultivares de garbanzo diferentes [CV-1, P-2245, PV-60, PV-61, JG-62 y 12071/10054 (PV-1)] que crecieron en un suelo natural de una parcela localizada en la Estación Experimental del Campus de Rabanales, Universidad de Córdoba, Córdoba, España. Esta parcela está infestada con una mezcla de diversas poblaciones de *F. oxysporum*, incluyendo diversas razas de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* y varios ribotipos de *F. oxysporum* (Landa et al., 2009; S. Garcés-Romay, R.M. Jiménez-Díaz

y B.B. Landa, *resultados no publicados*). Para cada cultivar se dispusieron tres bloques, cada uno con dos filas de 40 m de largo y espaciadas 25 cm. Las semillas se sembraron a mano a unos 5 cm de profundidad el 21 de marzo de 2005. Las malas hierbas se eliminaron manualmente, y los insecticidas y fertilizantes se aplicaron según las prácticas agrícolas pertinentes. En el estado de floración, se seleccionaron tres plantas de cada fila de forma arbitraria y se eliminó el exceso de suelo de la raíz sacudiéndola cuidadosamente. Las raíces (sistema radical completo obtenido de los 10-15 cm de la capa superior del suelo) de las seis plantas muestreadas de cada bloque (repetición) se mezclaron, se colocaron en una bolsa de plástico, se trasladaron al laboratorio y se almacenaron a 4°C hasta su procesamiento al día siguiente.

Recogida y preparación de muestras de suelo natural o artificialmente infestadas por *F. oxysporum*

Para la inoculación artificial de muestras de suelo el inóculo de *F. oxysporum* se incrementó en matraces conteniendo 100 ml de caldo de patata-dextrosa (Laboratorios Difco) de acuerdo a lo descrito por Landa et al. (2004). Los cultivos líquidos se filtraron a través de ocho capas de gasa estéril y las conidias se obtuvieron mediante centrifugación (10.000 x g durante 10 min), lavándose dos veces con agua destilada estéril para eliminar las trazas de nutrientes. La concentración del inóculo (principalmente microconidias) en la suspensión se estimó utilizando un hematocitómetro y se ajustó a 1×10^6 unidades formadoras de colonias (ufc)/ml. Posteriormente, se realizó una dilución seriada (1/2x) de 1×10^6 a $7,81 \times 10^3$ ufc/ml en agua estéril ultrapura. Se utilizaron tres suelos naturales denominados como suelo A (arenoso, pH 8,3, materia orgánica (M.O.) 0,1%), Suelo B (arcilloso pH 7,8, M.O. 1%) y Suelo C (arcilloso, pH 8,1, M.O. 1%) en los que previamente se había comprobado la ausencia de *F. oxysporum*. Los suelos se pasteurizaron a 74°C durante 30 min, se secaron a temperatura ambiente (24-28°C) durante una semana y se tamizaron a través de una malla de 1 cm x 1 cm. En un primer experimento, el suelo A se utilizó para comparar el número mínimo de conidias que podían estimarse (límite de detección) mediante dilución en placa y el ensayo de qPCR. Para ese propósito, 40 ml de cada dilución de la suspensión de conidias (de 1×10^6 a $7,81 \times 10^3$ ufc/ml en agua estéril ultrapura) se mezcló minuciosamente en una bolsa de plástico con 100 g del Suelo A pasteurizado (para obtener aproximadamente de 4×10^5 ufc/g de suelo a $3,1 \times 10^3$ ufc/g de suelo). En

un experimento diferente, 40 ó 10 ml de la suspensión de microconidias de $1,56 \times 10^4$ ufc/ml se mezcló con 100 g del Suelo B y Suelo C, respectivamente. Los suelos se secaron como se ha descrito anteriormente y se mantuvieron a 4°C durante 5 meses hasta su empleo. Además, se utilizó una muestra de suelo naturalmente infestado de la parcela localizada en el Campus de Rabanales. Este suelo se secó y tamizó como se ha descrito anteriormente como paso previo a la extracción de ADN.

Estimación del inóculo de *F. oxysporum* en suelo y en planta mediante dilución en placa

Para estimar la colonización endofita de la raíz de plantas de garbanzo por *Fusarium* spp., las raíces se lavaron con cuidado bajo agua de grifo, se secaron entre hojas de papel de filtro estéril y se desinfestaron superficialmente en NaOCl al 2% durante 1,5 min. Después, para cada combinación planta-cultivar el sistema radical entero se seccionó en fragmentos de 5 cm de longitud, los fragmentos se mezclaron y se tomaron muestras de 1 g que se molieron en un homogeneizador Osterizer® 890-48H (Sunbeam-Oster Products, Hattiesburg, MS, EEUU) durante 1,5 min en 100 ml de agar-agua destilada al 0,1% estéril. Las restantes muestras de raíz desinfestadas se liofilizaron para la extracción de ADN. De igual modo, al mismo tiempo que la extracción de ADN, se determinó el número de propágulos de *Fusarium* spp. o de *F. oxysporum* en muestras de suelo natural o artificialmente infestado mediante dilución en placa utilizando seis repeticiones de 1 g de suelo cada una como se ha descrito anteriormente (Landa et al., 2004). Para ello, diluciones seriadas de las suspensiones de raíz y suelo se dispensaron sobre medio “Agar-jugo V8-oxgall-PCNB” (VOPA), un medio semiselectivo de *Fusarium* spp. (Bouhot y Rouxel, 1971) y se incubaron a $25 \pm 1^\circ\text{C}$ y 12-h de fotoperiodo de una mezcla de luz blanca fluorescente y cercana al ultravioleta de $36 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ durante 5 días. Se dispusieron dos repeticiones por dilución y repetición de muestra de raíz o suelo.

Tras 5 días de incubación, se estimó el número total de ufc de *Fusarium* spp. o de *F. oxysporum*. Posteriormente, se seleccionaron arbitrariamente tres colonias de *Fusarium* spp. con morfología similar a *F. oxysporum* al observarlas al microscopio de aquellas placas de dilución (derivadas de muestras de plantas o del suelo natural o artificialmente infestado) seleccionadas como las más apropiadas para estimar poblaciones de *Fusarium* spp. (entre 20-100 colonias por

placa) y se transfirieron a APD. Posteriormente, se obtuvo ADN de los putativos aislados de *F. oxysporum* como se ha descrito anteriormente y se confirmó su pertenencia a *F. oxysporum* utilizando el protocolo de PCR específica. Se analizaron un total de 27 y 30 aislados de *Fusarium* spp. para cada cultivar de garbanzo y muestras de suelo infestado, respectivamente.

Cuantificación de *F. oxysporum* en tejidos de planta infectados naturalmente y suelo infestado natural o artificialmente

Se extrajo el ADN total a partir de 50 mg de raíces de garbanzo liofilizadas (tres repeticiones) como se ha descrito anteriormente, o de 250 mg (seis repeticiones) de suelo infestado, utilizando el “MoBio Ultraclean™ soilDNA isolation kit” (MoBio laboratories, Inc.; Carlsbad, CA, EEUU) y el sistema Fast-Prep FP-120 (MP Biomedicals, Illkirch, Francia) a una velocidad de 5,0 m/s durante 40 s de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Previo a los ensayos de qPCR, el ADN total se cuantificó en triplicado utilizando el método ‘Quant-iT DNA Assay Kit Broad Range fluorometric’ como se ha descrito previamente y se diluyó a 10 ng/μl. Posteriormente, la cantidad de ADN de *F. oxysporum* en cada muestra de raíz se estimó utilizando las condiciones de qPCR optimizadas y la curva estándar RG/Foc-9605 (diluciones seriadas de ADN de Foc-9605 en un fondo fijo de ADN de raíz de garbanzo de 10 ng/μl). Para muestras de ADN de suelo, se utilizaron dos curvas estándar de ADN: A/Foc-9605 y diluciones seriadas de Foc-9605 en un fondo fijo de ADN (10 ng/μl) extraído del Suelo A para valorar la potencial interferencia de inhibidores de PCR en el suelo (S/Foc-9605). Previamente se había comprobado la ausencia de *F. oxysporum* en este suelo.

III.3.9. Análisis de datos

Los valores del ciclo umbral (C_T) de cada reacción de qPCR se calcularon determinando el número del ciclo de PCR al cual la señal de fluorescencia excedía la del fondo utilizando los criterios de estimación por defecto en el programa iCycler IQ version 3.0a (Bio-Rad). Posteriormente, para comparar y establecer relaciones entre las diferentes curvas estándar de ADN generadas a partir de diferentes tratamientos, la posición umbral se definió y fijó en la misma posición para todos los tratamientos y experimentos (Vaerman et al., 2004). La eficiencia de amplificación (EA) se calculó a partir de las pendientes de las curvas estándar utilizando la ecuación $EA = 10^{(1/\text{pendiente})} - 1$ (Adams, 2006; Higuchi et al., 1993).

Posteriormente, se realizaron regresiones lineales del logaritmo en base 10 de concentraciones conocidas del ADN diana frente a los valores C_T para cada curva estándar utilizando el módulo GLM de SAS (Statistical Analysis System, version 9.1; SAS Institute, Cary, NC, EEUU). Las rectas de regresión estándar de cada placa elegidas como curvas de referencia se utilizaron para transformar los valores C_T experimentales en cantidades de ADN del patógeno (ng). Todas las rectas de regresión obtenidas para los diferentes ADNs genómicos de *F. oxysporum* y para los diferentes fondos de ADN de la planta se compararon estadísticamente para la homogeneidad ($P \geq 0,05$) de varianza mediante el test de Bartlett y para la igualdad de pendientes y ordenadas en el origen mediante el test *F* a una $P < 0,05$. Todos los datos de población de *Fusarium* spp. se expresaron como log ufc/g de peso fresco de raíz para satisfacer las condiciones del test estadístico paramétrico utilizado. Las diferencias en densidades de población de *Fusarium* spp. y concentración de *F. oxysporum* entre cultivares se determinó mediante un análisis de varianza estándar y las medias de los tratamientos se compararon de acuerdo al Contraste de la Mínima Diferencia Significativa protegido de Fisher a $P < 0,05$ utilizando el módulo GLM de SAS. Finalmente, se llevaron a cabo análisis de regresión para determinar la relación entre la concentración de inóculo de *F. oxysporum* en el suelo artificialmente infestado y las estimaciones de ufc o la concentración de ADN utilizando los módulos GLM y NLIN de SAS para modelos lineales y no lineales, respectivamente.

III.4. RESULTADOS

III.4.1. Optimización del ensayo de PCR específica de *Fusarium oxysporum*

El empleo de las condiciones originales de amplificación descritas por Mishra et al. (2003) resultó en amplificaciones cruzadas para 25 aislados pertenecientes a especies diferentes a *F. oxysporum*, de un total de 74 aislados de *Fusarium* spp. utilizados en el estudio (Tabla III.1, Fig. III.1). Los aislados de *Fusarium* spp. que amplificaron de forma cruzada incluyeron hasta 17 especies diferentes: *Fusarium andiyazi* Marasas, Rheeder, Lampr., K.A. Zeller & J.F. Leslie, *Fusarium armeniacum* (G.A. Forbes, Windels & L.W. Burgess) L.W. Burgess & Summerell, *Fusarium begoniae* Nirenberg & O'Donnell, *Fusarium brevicatenuatum* Nirenberg, O'Donnell, Kroschel & Andrianaivo, *Fusarium bulbicola* Nirenberg & O'Donnell, *Fusarium circinatum* Nirenberg & O'Donnell,

Fusarium denticulatum Nirenberg & O'Donnell, *Fusarium guttiforme* Nirenberg & O'Donnell, *Fusarium lactis* Pirotta, *Fusarium nisikadoi* T. Aoki & Nirenberg, *Fusarium pseudoanthophilum* Nirenberg, O'Donnell & Mubat., *Fusarium pseudocircinatum* O'Donnell & Nirenberg, *Fusarium pseudonygamai* O'Donnell & Nirenberg, *Fusarium ramigenum* O'Donnell & Nirenberg, *Gibberella sacchari* Leslie JF, Summerell BA, Bullock S, Doe FJ. (= *Fusarium sacchari* (E.J. Butler & Hafiz Khan) W. Gams), *Fusarium subglutinans* (Wollenw. & Reinking) P. E. Nelson, Toussoun & Marasas y *Fusarium verticillioides* (Sacc.) Nirenberg (Tabla III.1).

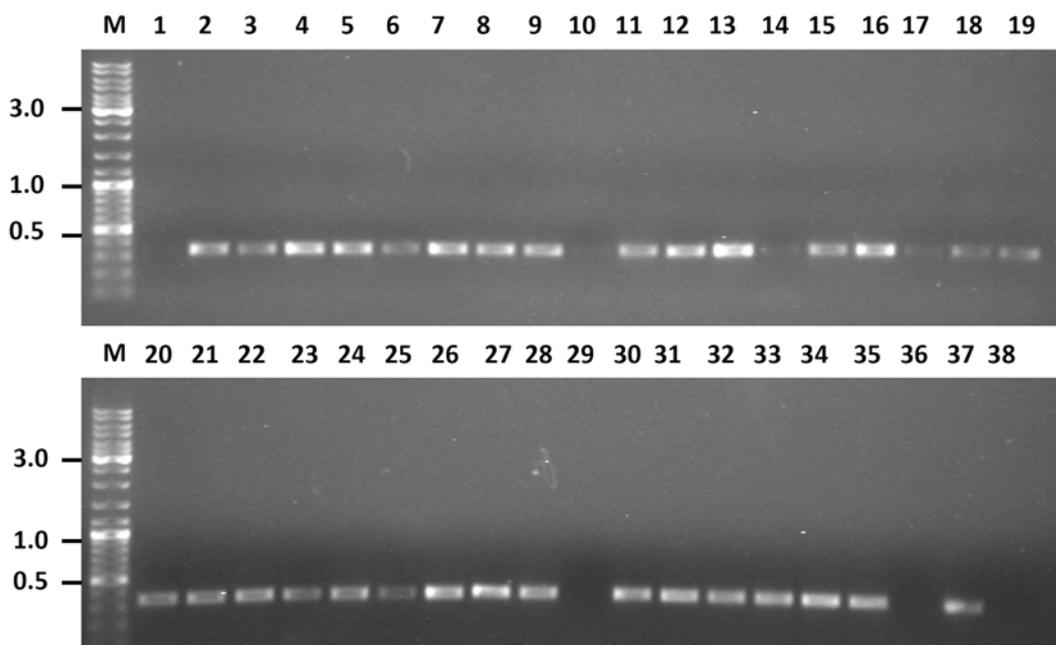


Figura III.1. Gel de agarosa mostrando los productos de amplificación (340-pb) de las reacciones en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando la pareja de iniciadores FOF1 y FOF2 y las condiciones descritas por Mishra et al. (2003). (M) Marcador de peso molecular Gene-ruler™ ADN (Fermentas, St Leon-Rot, Alemania), los números en la izquierda corresponden a los pesos moleculares (kb); carriles 1-38 *Fusarium armeniacum* 11623, *F. andiyazi* 4647, *F. begoniae* 10767, *F. brevicatenulatum* 10756, *F. bulbicola* 10759, *F. circinatum* 10766, *F. circinatum* H-10847, *F. circinatum* H-10850, *F. denticulatum* 10763, *F. guttiforme* 10764, *F. lactis* 10757, *F. nisikadoi* 10758, *F. oxysporum* 11390, *F. pseudoanthophilum* 10755, *F. pseudocircinatum* 10761, *F. pseudonygamai* 10762, *F. ramigenum* 10760, *F. sacchari* 278, *F. sacchari* B-3853, *F. subglutinans* 11544, *F. subglutinans* E-990, *F. subglutinans* E-2192, *F. verticillioides* 11556, *F. verticillioides* A-149, *F. verticillioides* A-999, *F. oxysporum* Fo-90101, *F. oxysporum* Fo-90105, *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* Foc-8012, *F. solani* Fsp4, *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* Fol-325, *F. oxysporum* Fsp7, *F. oxysporum* Fsp8, *F. oxysporum* Fsp9, *F. oxysporum* f. sp. *melonis* Fom-9016, *F. oxysporum* f. sp. *psi* Fop-79, *F. proliferatum* Fo-9009, *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* Foc-9605, y control negativo (agua), respectivamente.

Se obtuvieron 39 secuencias ITS que incluían tanto las de los 25 aislados de *Fusarium* spp. que amplificaron de forma cruzada como las de los 14 aislados de *F. oxysporum* utilizados en este estudio (Tabla III.1). La comparación de las secuencias ITS de los aislados de *Fusarium* spp. con la de los iniciadores FOF1 y FOR1 indicó una homología que osciló entre el 85,0% al 95,0% y el 90,5% al 92,5%, respectivamente. El iniciador FOF1 mostró una homología del 100% con la secuencia ITS de *F. nisikadoi*. Ambos iniciadores FOF1 y FOR1 mostraron una homología del 100% con las secuencias ITS de todos los aislados de *F. oxysporum* analizados en este estudio, que a su vez mostraron una similitud de entre el 98,8 al 99,8% en su secuencia ITS completa indicando la existencia de cierta diversidad genética entre ellos.

Después de verificar que al menos una secuencia de los iniciadores FOF1 y FOR1 no mostraba 100% de homología con las secuencias ITS de los aislados de *Fusarium* spp. que amplificaron de forma cruzada con los iniciadores específicos de *F. oxysporum* de este estudio, se modificaron varios parámetros del protocolo de PCR para tratar de incrementar la especificidad. Si bien, se procuró aumentar la especificidad sin perder eficiencia en la amplificación. La mezcla de reacción optimizada (volumen final 20 µl) consistió en 2,0 µl de tampón de reacción 10x [160mM (NH₄)₂SO₄, 670mM Tris-HCl (pH 8,8 a 25°C), estabilizador 0,1% (Bioline, Londres, Reino Unido)], 0,35 µM de cada iniciador, 200 µM de cada dNTP, 1 unidad de ADN Polimerasa *BioTaq* (Bioline), 1,5 mM MgCl₂ (la concentración original era de 2,0 mM) y 1 µl de ADN molde (5-20 ng de ADN). Las amplificaciones se llevaron a cabo en un termociclador C1000 (Bio-Rad). Las reacciones de amplificación incluyeron un paso de desnaturalización inicial durante 1 min a 94°C, seguido de 25 ciclos de 1 min de desnaturalización a 94°C, 30 s a una temperatura de hibridación de 65°C (un incremento de 7°C en comparación al protocolo original) y 1 min de extensión a 72°C. El ciclo final consistió en 5 min a 72°C seguido de enfriamiento a 4°C. Tras la optimización de las condiciones de PCR, no tuvo lugar amplificación cruzada para ninguno de los aislados de las distintas especies de *Fusarium* en los que se había dado anteriormente (Tabla III.1, Fig. III.2).

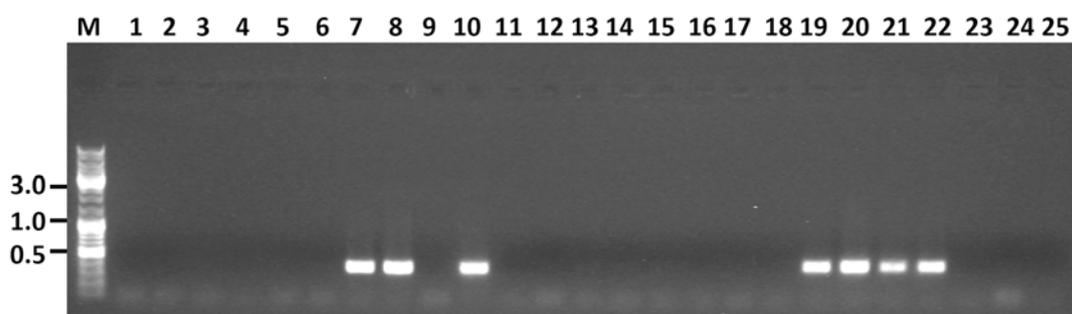


Figura III.2. Gel de agarosa mostrando los productos de amplificación (340-pb) de reacciones en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando la pareja de iniciadores FOF1 y FOF2 y las condiciones optimizadas de este estudio. Los números en la izquierda corresponden a los pesos moleculares (kb) del marcador de peso molecular (M) Gene-ruler™ ADN (Fermentas, St Leon-Rot, Alemania); carriles 1-25, *Fusarium armeniacum* 11623, *F. andiyazi* 4647, *F. begoniae* 10767, *F. brevicatenulatum* 10756, *F. bulbicola* 10759, *F. circinatum* 10766, *F. oxysporum* 11390, *F. oxysporum* Fsp7, *F. denticulatum* 10763, *F. oxysporum* f. sp. *melonis* Fom 9016, *F. guttiforme* 10764, *F. lactis* 10757, *F. nisikadoi* 10758, *F. pseudoanthophilum* 10755, *F. pseudocircinatum* 10761, *F. pseudonygamai* 10762, *F. ramigenum* 10760, *F. sacchari* 278, *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* 325, *F. oxysporum* f. sp. *melonis* Fom 9016, *F. oxysporum* f. sp. *pisi* Fop 79, *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* Foc-9605, *F. subglutinans* E-990, *F. verticillioides* 11556, y control negativo (agua), respectivamente.

III.4.2. Desarrollo del ensayo de qPCR

Se llevó a cabo un proceso de puesta a punto precisa del protocolo de qPCR optimizando los siguientes parámetros: concentración de iniciador, temperatura de hibridación y volumen final de las reacciones de PCR. Esto se realizó utilizando las curvas estándar de ADN (A/Foc-9605, RG/Foc-9605 y TG/Foc-9605). La reducción del volumen de la reacción de 50 a 20 μ l no tuvo efecto en la precisión del ensayo (*datos no mostrados*). Consecuentemente, se seleccionó un volumen final de 20 μ l para minimizar el coste por ensayo de qPCR.

La mezcla de reacción de PCR optimizada consistió para un volumen final de 20 μ l en: 1 μ l de muestra de ADN, 1X iQ SYBR Green Supermix (Bio-Rad) y 0,3 μ M de cada iniciador. Las condiciones de amplificación consistieron en una desnaturalización inicial de 2 min a 95°C durante seguida por 35 ciclos de 1 min a 95°C, 30 s a 65°C, 30 s a 72°C y 10 s a 79°C. Ocasionalmente, se observó la presencia de picos débiles entre 72 y 75°C en la curva de 'melting'. Esto se debió a la presencia de dímeros del iniciador ya que estas amplificaciones inespecíficas no se detectaron por electroforesis en gel de agarosa al 1,2% (peso/vol) (*datos no mostrados*). Para evitar la interferencia de estas amplificaciones inespecíficas, la fluorescencia del amplicón diana (temperatura de fusión o 'melting' (T_m) = 88°C)

se detectó a 79°C (Weng et al., 2005). No se observó fluorescencia del amplicón diana en los controles negativos que contenían alguno de los ADNs extraídos de tejidos de plantas de garbanzo, melón o guisante. Para determinar los valores de C_T se fijó una posición umbral de 350 Unidades Relativas de Fluorescencia (URF) para todos los experimentos.

Después de optimizar los ensayos de qPCR, se generaron rectas de regresión estándar para cada curva estándar de ADN utilizando un rango de ADN de 10 ng a 0,1 pg. Se obtuvo una alta reproducibilidad de las amplificaciones con una alta eficiencia a lo largo de cinco órdenes de magnitud de concentración de ADN, con un rango lineal de amplificación. Sin embargo, no se pudo cuantificar de forma precisa el ADN de *F. oxysporum* a una concentración de 0,1 pg/ μ l tanto si éste estaba diluido en un fondo de agua como en un fondo de ADN extraído de tejidos de raíz o tallo de garbanzo; esto es, se obtuvo un valor de C_T de $33,5 \pm 2$ o no se obtuvo amplificación (Tabla III.2). Por tanto, el límite de detección del ensayo de qPCR se fijó a una concentración de ADN de *F. oxysporum* de 0,1 pg. Por otro lado, los límites de detección de los ensayos de PCR simple y anidada utilizando los iniciadores FOF1/FOR1 fueron de 10 pg/ μ l y 0.1 pg/ μ l (la concentración más baja de las ensayadas), respectivamente. La presencia de un fondo de ADN extraído de suelo o de planta no influyó en la sensibilidad de los iniciadores FOF1/FOR1 tanto en los ensayos de PCR simple como los de qPCR (Tabla III.2).

Tabla III.2. Sensibilidad de los iniciadores específicos de *Fusarium oxysporum* utilizados en los ensayos de PCR simple, anidada y cuantitativa (qPCR) utilizando ADN purificado de *F. oxysporum* sólo o mezclado con ADN extraído de planta o de suelo

Protocolo PCR ^a	ADN CE ^b	Fondo de ADN ng/ μ l ^b	ADN de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>ciceris</i> Foc-9605 (ng/ μ l) ^b						Control Negativo
			10	1	0.1	0.01	0.001	0.0001	
Simple	A/Foc-9605	0	+/+	+/+	+/+	-/±	-/-	-/-	-/-
	RG/Foc-9605	10	+/+	+/+	+/+	±/±	-/-	-/-	-/-
	S/Foc-9605	10	+/+	+/+	+/+	±/-	-/-	-/-	-/-
Cuantitativa	A/Foc-9605	0	+/+ 12,7±0,1	+/+ 16,2±0,1	+/+ 20,7±0,3	+/+ 24,4±0,1	+/+ 28,2±0,3	-/ na	-/ na
	RG/Foc-9605	10	+/+ 12,9±0,1	+/+ 16,4±0,2	+/+ 20,5±0,1	+/+ 24,6±0,3	+/+ 27,8±0,3	-/ na	-/ na
	S/Foc-9605	10	+/+ 12,8±0,3	+/+ 15,7±0,7	+/+ 21,5±0,4	+/+ 24,4±0,1	+/+ 28,0±0,6	-/ na	-/ na
Anidada	A/Foc-9605	0	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	-/-
	RG/Foc-9605	10	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	-/-
	S/Foc-9605	10	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr

^a Los iniciadores FOF1/FOR1 se utilizaron en protocolos de PCR simple o anidada (utilizando los iniciadores ITS1-F/ITS4 en la 1ª ronda de PCR) o en un protocolo de PCR cuantitativa con las condiciones optimizadas en esta Tesis Doctoral.

^b Se obtuvieron dos curvas estándar de ADN independientes (CE) mediante diluciones en serie de ADN de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* Foc-9605 (10 ng/ μ l) para obtener de 10 ng a 0,1 pg de ADN por reacción de PCR en agua destilada estéril (A/Foc-9605; 0 ng de ADN de fondo) o en ADN extraído de raíces de garbanzo (RG/Foc-9605; 10 ng de ADN de fondo) o de suelo natural (S/Foc-9605; 10 ng de ADN de fondo) para evaluar la posible influencia del ADN del huésped o del suelo en la sensibilidad de las reacciones de PCR. Los resultados mostrados se obtuvieron para dos series y mediante dos operadores independientes. + = Amplificación positiva; ± = Amplificación positiva débil; - = no amplificación; na = no amplificación mediante qPCR (valores de C_T estaban por debajo de un valor umbral de fluorescencia de 350 URF); nr= no realizado, debido a la presencia de ADN fúngico autóctono en el suelo natural que amplificaría con los iniciadores universales ITS1-F/ITS-4. Los números mostrados en los ensayos de PCR cuantitativa corresponden a 12 valores de C_T ± desviación estándar de dos CE independientes, cada una realizada por dos operadores independientes y tres repeticiones dentro de cada placa.

El empleo del protocolo de detección de qPCR con curvas estándar de ADN preparadas independientemente o por operadores diferentes no influyó en la reproducibilidad y consistencia de los resultados (*datos no mostrados*). Consecuentemente, sólo se describen los resultados de los experimentos más representativos. Las rectas de regresión estándar obtenidas para todas las combinaciones mostraron amplificaciones altamente reproducibles, alta eficiencia (EA=79,66-89,45%) y un alto coeficiente de determinación (R²=0,994-0,998), los cuales son valores considerados dentro del rango ideal para ensayos de qPCR. El análisis ANOVA de los valores de C_T derivados de las curvas estándar de A/Foc-

9605, RG/Foc-9606 y TG/Foc-9605 indicaron homogeneidad de varianzas ($P \geq 0,05$). El origen del fondo de ADN de garbanzo (agua vs. raíces o tallos) no influyó en los resultados de los ensayos de qPCR (*datos no mostrados*). La comparación estadística de las rectas de regresión de las tres curvas estándar indicó la ausencia de diferencias significativas entre las ordenadas en el origen ($P=0,9975$) o pendientes ($P=0,1038$). Se obtuvieron resultados similares en un experimento diferente en el que se observó que la presencia de un fondo de ADN de garbanzo, melón o guisante no influyó significativamente ($P > 0,2224$) en las amplificaciones de qPCR (curvas estándar: A/Foc-9605 vs. RG/Foc-9605; A/Fom-9016 vs. RM/Fom-9016; A/Fop-4A vs. RGu/Fop-4A ADN) (Fig. III.3, Tabla III.3). Además, ni el origen de ADN de *F. oxysporum* (Foc-9605, Fom-9016 y Fop-4A) ni la procedencia del fondo de ADN de la planta (garbanzo, melón o guisante) influyeron en los resultados de los ensayos de qPCR (Fig. III.3, Tabla III.3). Así, las comparaciones de las rectas de regresión estándar mostraron que sus pendientes no diferían significativamente ($P > 0,1081$) entre los aislados de *F. oxysporum* (A/Foc-9605 vs. A/Fom-9016 vs. A/Fop-4A) y/o fondos de ADN de la planta huésped (RG/Foc-9605 vs. RM/Fom-9016 vs. RGu/Fop-4A). Sólo para las series en agua, la ordenada en el origen de la recta de regresión A/Fop-4A fue significativamente menor ($P < 0,05$) que aquellas de las rectas de regresión A/Foc-9605 y A/Fom-9016. De manera similar, la presencia de un fondo de ADN extraído de un suelo natural no influyó significativamente ($P > 0,5777$) en las amplificaciones de qPCR (curvas estándar: A/Foc-9605 vs. S/Foc-9605) (*datos no mostrados*).

Puesto que la utilización de fondos de ADN de especies de plantas huésped diferentes no influyó en la reproducibilidad y eficiencia de los ensayos de amplificación, se seleccionó la curva estándar de ADN RG/Foc-9605 para estimar la cantidad de *F. oxysporum* en tejidos de plantas infectados naturalmente, y la curva estándar de ADN S/Foc-9605 para estimar la cantidad de *F. oxysporum* en muestras de suelo infestadas natural o artificialmente.

Tabla III.3. Ecuaciones de regresión lineal de diluciones seriadas 10x de ADN (10 ng/μl) de *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* (Foc-9605), *F. oxysporum* f. sp. *melonis* (Fom-9016) y *F. oxysporum* f. sp. *pisi* (Fop-4A) diluido en agua estéril ultrapura (Series agua) o en ADN de la planta (10 ng) extraído de raíces de garbanzo, melón o guisante, respectivamente (Series raíz) y estadísticos para valorar la igualdad de pendientes y ordenada en el origen

ADN <i>F. oxysporum</i> / ADN Planta	Fondo DNA								Valor P ^a	
	Series agua				Series raíz				Ordenada origen	Pendiente
	Ordenada origen	Pendiente	AE (%)	R ²	Ordenada origen	Pendiente	AE (%)	R ²		
Foc-9605/Garbanzo	16,51	-3,930	79,66	0,998	16,63	-3,806	83,13	0,997	0,9020	0,2224
Fom-9016/Melón	16,63	-3,765	84,33	0,997	16,63	-3,655	87,76	0,994	0,5564	0,3948
Fop-4A/Guisante	16,02	-3,702	86,26	0,995	16,48	-3,604	89,45	0,996	0,0583	0,4522
Valor P ^a	0,0001	0,1081			0,1615	0,3194				

^a Las rectas de regresión lineal obtenidas para los diferentes ADN genómicos de *F. oxysporum* y para los diferentes fondos de ADN de planta se compararon estadísticamente para la homogeneidad ($P \geq 0.05$) de varianza (test de Bartlett) y para la igualdad de pendientes y ordenadas en el origen utilizando un test *F* a $P < 0,05$.

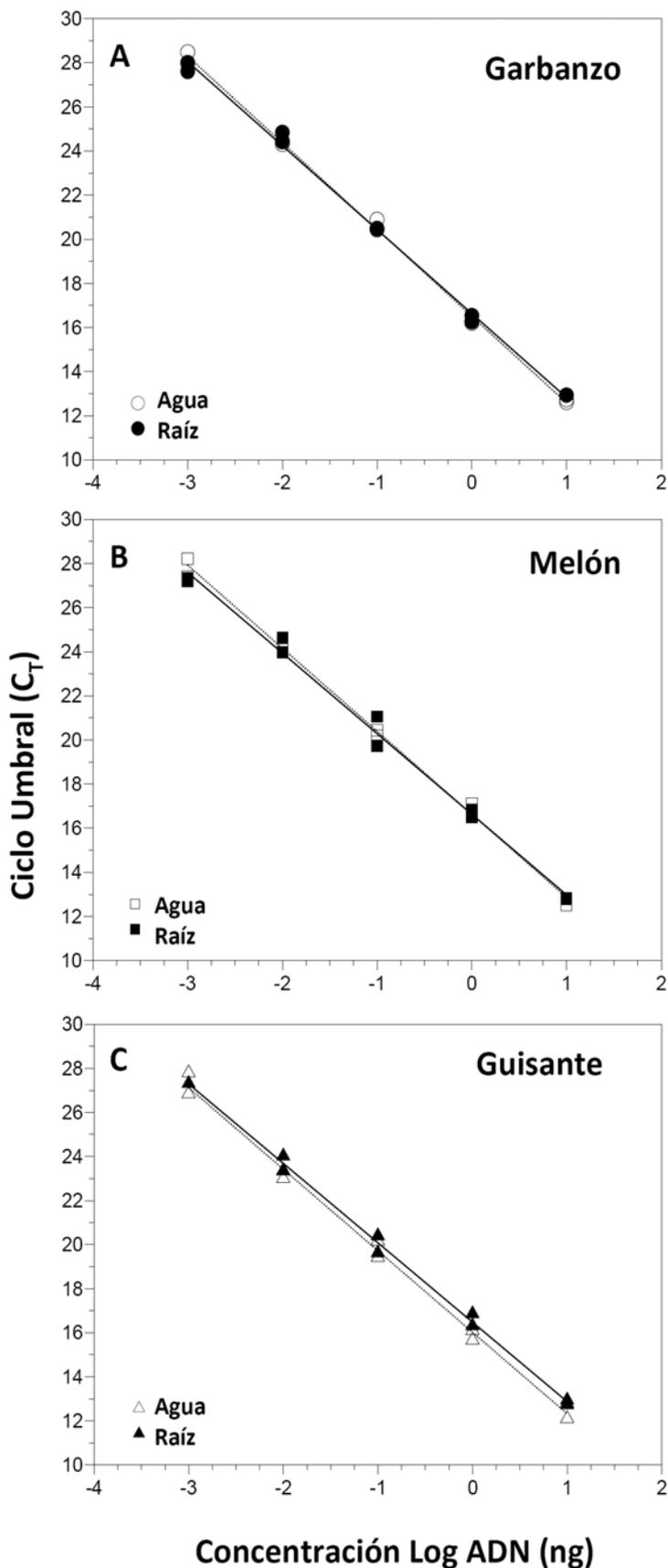


Figura III.3. Rectas de regresión estándar de diluciones seriadas 10x de ADN (10 ng/μl) de *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* (Foc-9605) (A), *F. oxysporum* f. sp. *melonis* (Fom-9016) (B), y *F. oxysporum* f. sp. *lisi* (Fop-4A) (C) diluido en agua estéril ultrapura (Series agua) o en ADN de planta (10 ng/μl) extraído de raíces de garbanzo, melón o guisante, respectivamente (Series raíz). Se representó el ciclo umbral (C_T) frente al log del ADN genómico de las curvas estándar de concentraciones conocidas. Las ecuaciones de regresión se muestran en la Tabla III.3.

III.4.3. Aplicación del protocolo de qPCR para estudios de Ecología Microbiana del suelo

Cuantificación de *F. oxysporum* en tejidos de plantas infectados naturalmente

Las densidades de población total de *Fusarium* spp. en raíces de garbanzo oscilaron entre $6,05 \times 10^4$ a $2,67 \times 10^5$ ufc/g de raíz (Fig. III.4A), mientras que las de *F. oxysporum* oscilaron entre $4,91 \times 10^4$ a $2,26 \times 10^5$ ufc/g de raíz (Fig. III.4B). Estas poblaciones difirieron significativamente entre cultivares para *Fusarium* spp. ($P=0,0286$), así como para *F. oxysporum* ($P=0,0341$) (Fig. III.4A y III.4B). Los cultivares de garbanzo CV-1, JG-62 y PV-61 albergaron poblaciones significativamente ($P<0,05$) más bajas de *F. oxysporum* comparadas con los cultivares de garbanzo PV-1, P-2245 y PV-60 (Fig. III.4B).

La utilización del protocolo de qPCR permitió la detección de ADN de *F. oxysporum* en el 100% de las muestras de raíz de los seis cultivares de garbanzo (Fig. III.4C). La cantidad relativa de ADN de *F. oxysporum* en muestras de ADN de raíces difirió significativamente ($P=0,0175$) entre los seis cultivares de garbanzo, oscilando entre 2,72‰ en el cv. PV-61 a 26,08‰ en el cv. CV-1 (Fig. III.4C).

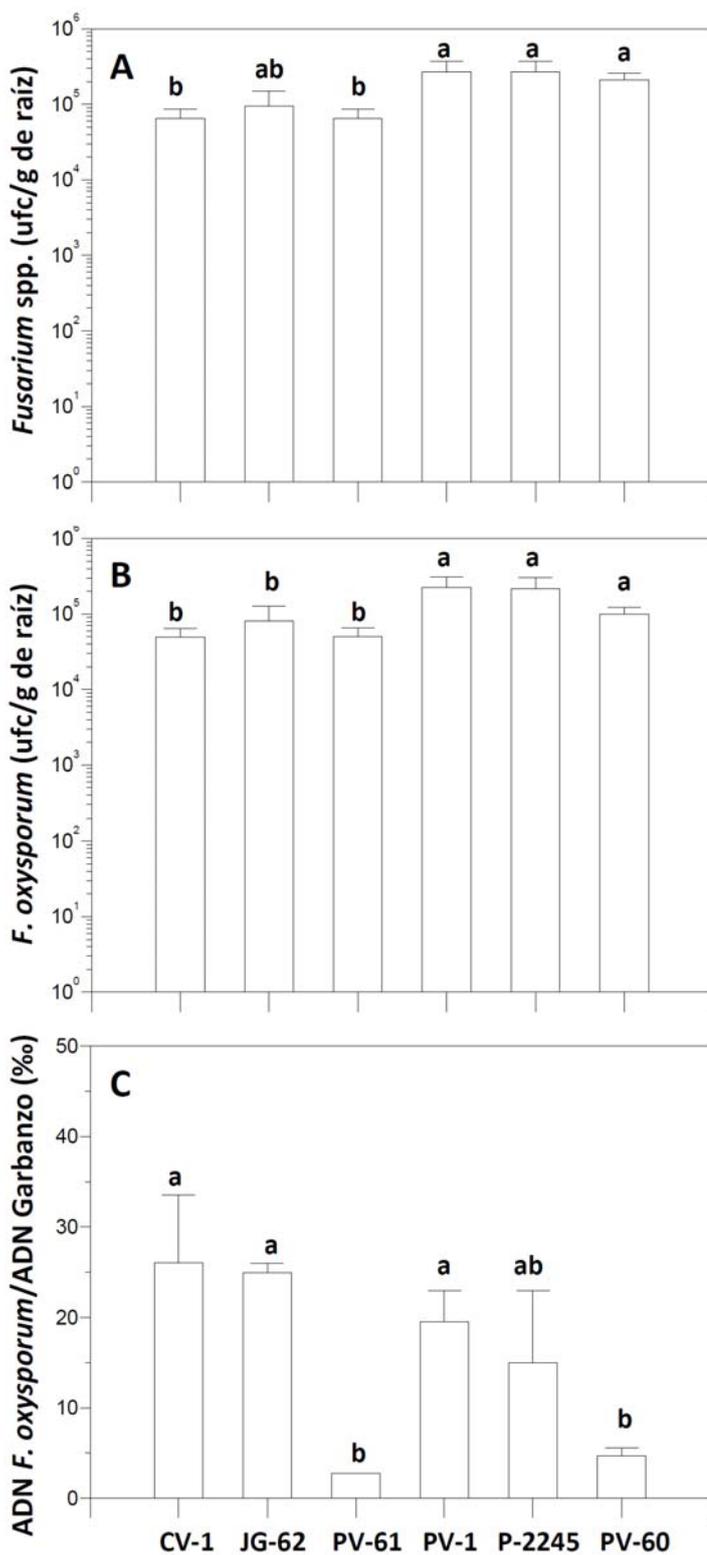


Figura III.4. Densidades de población de *Fusarium* spp. (A) y *F. oxysporum* (B), y cantidad de ADN de *F. oxysporum* (C) en raíces de seis cultivares de garbanzo determinadas por la técnica de dilución en placa utilizando un medio semiselectivo de *Fusarium* spp. (A y B) o el ensayo de qPCR específica de *F. oxysporum*.

Cuantificación de *F. oxysporum* en suelo natural o artificialmente infestado

La inoculación de suspensiones del Suelo A artificialmente infestado con *F. oxysporum* en medio VOPA resultó en densidades medias de población que oscilaron entre $4,06 \times 10^5$ a $3,87 \times 10^3$ ufc/g de suelo seco en las muestras de suelo infestadas con las suspensiones de conidias con la concentración más alta (1×10^6 ufc/ml) y más baja ($7,81 \times 10^3$ ufc/ml), respectivamente (Fig. III.5). Las densidades de población de *F. oxysporum* en los Suelos B y C artificialmente infestados tuvieron unos valores medios de $4,64 \times 10^3$ y $2,98 \times 10^3$ ufc/g de suelo, respectivamente. Las densidades de población de *F. oxysporum* autóctonos en el suelo del Campus de Rabanales infestado naturalmente con *F. oxysporum* tuvieron un valor medio de $8,92 \times 10^2$ ufc/g de suelo (Fig. III.6). Estas densidades de población fueron más bajas y mostraron una variabilidad más alta entre repeticiones comparadas con las obtenidas en los suelos infestados artificialmente.

Como se esperaba, las concentraciones de ADN de *F. oxysporum* y la estimación de ufc en el Suelo A artificialmente infestado decrecieron asintóticamente y linealmente con la concentración decreciente de inóculo, respectivamente (Fig. III.5). Los cambios en estos dos parámetros estuvieron además significativa y positivamente correlacionados ($r=0,9548$, $P=0,0115$). Sin embargo, la relación entre las concentraciones fúngicas expresadas por los recuentos de ufc y la concentración teórica de inóculo de suelo fue mucho más elevada en comparación con aquella obtenida con el ADN fúngico, ya que el ADN de *F. oxysporum* no se pudo cuantificar con exactitud a densidades de inóculo menores de 6.250 ufc/g de suelo (Fig. III.5). A esta última densidad de inóculo, los valores de C_T fueron similares a aquéllos obtenidos para las concentraciones de ADN de *F. oxysporum* en el límite de detección de la qPCR (0,1 pg; $C_T=33,5 \pm 2$) o no hubo amplificación.

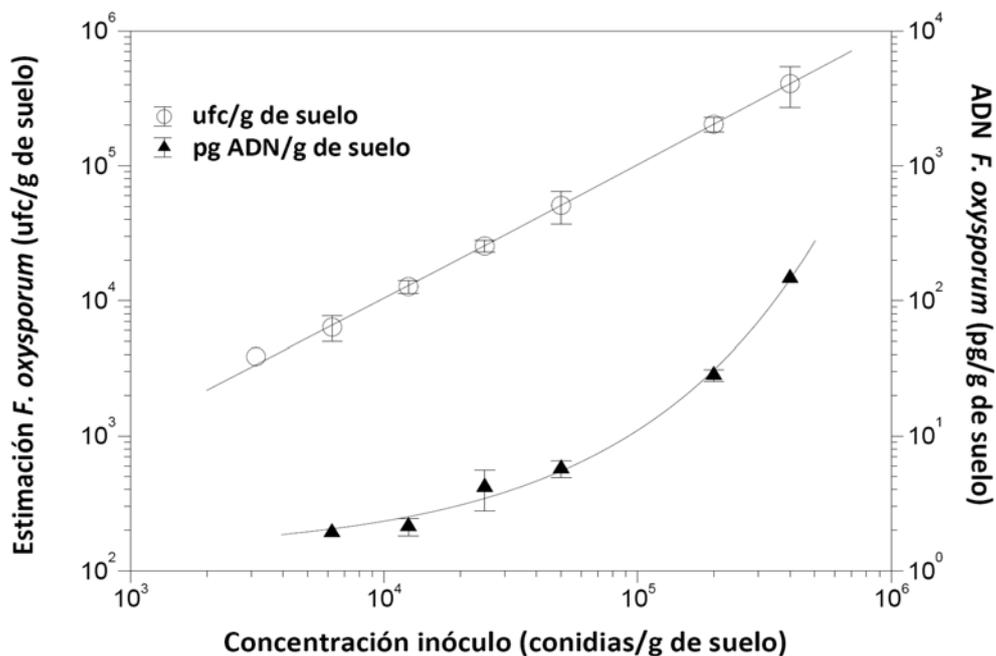


Figura III.5. Concentraciones de ADN de *Fusarium oxysporum* estimadas mediante el ensayo de qPCR específica de *F. oxysporum* comparadas con el número de unidades formadoras de colonias (ufc) por gramo de suelo estimadas mediante la técnica de dilución en placa en medio semiselectivo de *Fusarium* spp. en un suelo infestado artificialmente (Suelo A) con diluciones en serie de una suspensión de conidias (1×10^6 a $7,81 \times 10^3$ conidias/ml en agua estéril ultrapura). Nótese que el ADN de *F. oxysporum* no pudo cuantificarse a densidades de inóculo menores de 6.250 ufc/g de suelo.

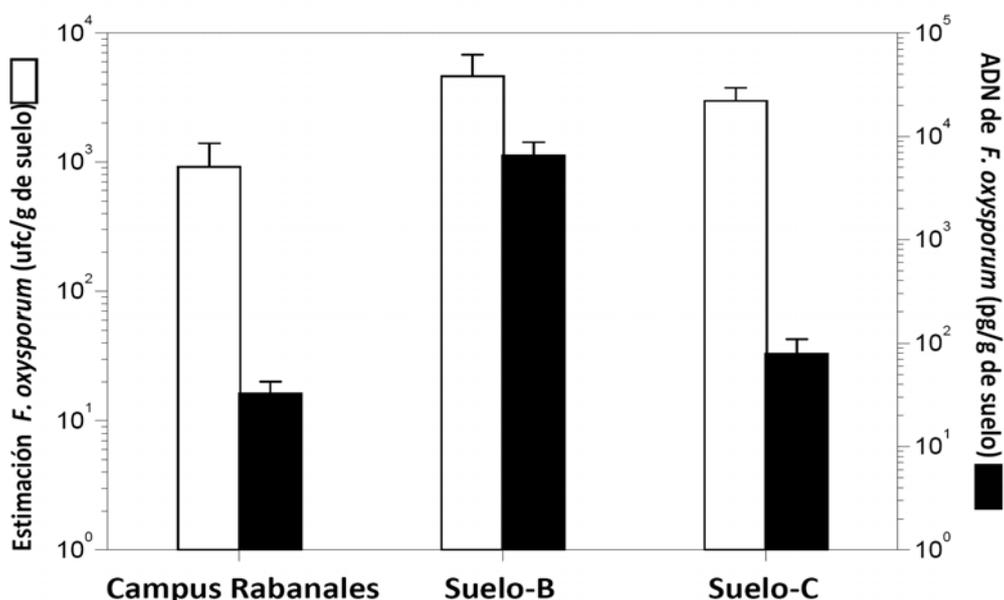


Figura III.6. Concentraciones de ADN de *Fusarium oxysporum* estimadas mediante el ensayo de qPCR específica de *F. oxysporum* comparadas con el número de unidades formadoras de colonias (ufc) por gramo de suelo estimadas mediante la técnica de dilución en placa en medio semiselectivo de *Fusarium* en dos suelos infestados artificialmente (Suelo B y C) o naturalmente (Campus de Rabanales) por el patógeno. Los Suelos B y C se inocularon respectivamente con 40 y 10 ml de una suspensión de conidias ($1,56 \times 10^4$ conidias/ml mezcladas con 100 g de suelo), se secaron y se mantuvieron a 4°C durante 5 meses como paso previo a la estimación de la concentración de *F. oxysporum*.

El empleo del protocolo de qPCR permitió la detección de ADN de *F. oxysporum* en el 100% de las muestras (seis extracciones de ADN independientes) de los Suelos B y C artificialmente infestados, con el ADN de *F. oxysporum* oscilando entre $6.485,4 \pm 2.292,2$ a $79,23 \pm 29,95$ pg/g de suelo seco para esos suelos, respectivamente (Fig. III.6). Las estimaciones de la cantidad de *F. oxysporum* en los dos suelos por medio del ensayo de qPCR y los recuentos de ufc estuvieron positiva y significativamente correlacionados ($r=0,8510$, $P=0,0230$). Por el contrario, el ADN de *F. oxysporum* sólo se pudo cuantificar en el 50% de las seis extracciones de ADN independientes obtenidas en el suelo del Campus de Rabanales que estaba infestado naturalmente con *F. oxysporum*. La cantidad de ADN de *F. oxysporum* en estas muestras de suelo fueron variables, oscilando entre 23,81 y 46,21 pg/g de suelo (Fig. III.6).

III.5. DISCUSIÓN

Cuando se diseñan protocolos de PCR específica se deben tener en cuenta diversas variables físicas y químicas con objeto de lograr una optimización completa que conlleve la obtención de resultados fiables y de alta calidad. Además, hay distintos niveles de control de calidad que se deberían considerar cuando se desarrolla un protocolo de PCR específica para diagnóstico, y que implican el diseño de iniciadores, la optimización de las condiciones de amplificación para los iniciadores específicos diseñados (concentración de: dNTPs, polimerasa, iniciadores y Mg^{2+} ; pH; parámetros de temperatura de cada ciclo; etc.) y tener un control de calidad *per se* (van Pelt-Verkuil et al., 2008). Por ello, son especialmente importantes disponer de controles adecuados, siendo necesario incluir en cada serie de reacciones de PCR tanto controles positivos (estándar de alta y baja concentración de ADN) como negativos. Así, deberían incluirse como controles negativos sólo agua y ADN de especies estrechamente relacionadas o secuencias con alta homología a aquéllas del amplicón diana para descartar reacciones falsas positivas causadas por contaminación o amplificación cruzada, respectivamente. Además, debería realizarse un test *in silico* de especificidad de iniciadores cotejando las secuencias de los iniciadores específicos diseñados frente a la base de datos no-redundante del Gen-Bank para la identificación de emparejamientos cortos casi exactos que pueden invalidar la especificidad de los iniciadores.

El protocolo de PCR específica desarrollado por Mishra et al. (2003) satisface muchos de los parámetros de control de calidad deseables referidos anteriormente, pero falló al incluir un rango inadecuado de diferentes especies de *Fusarium* que podrían potencialmente amplificar de forma cruzada al utilizar los iniciadores diseñados. En su protocolo original, ninguno de los 91 aislados de *Fusarium avenaceum* (Fr.:Fr.) Sacc. (75), *Fusarium culmorum* (Wm. G. Sm.) Sacc. (3), *Fusarium equiseti* (Corda) Sacc. (ocho) y *Fusarium sulphureum* Schlechtend. (= *F. sambucinum* Fuckel.) (cinco) analizados amplificaron de forma cruzada al utilizar los iniciadores FOF1/FOR1. Es de destacar que ninguna de las secuencias ITS de los aislados pertenecientes a esas especies de *Fusarium* que se incluyeron en nuestro estudio (aislados Ex-tipo) mostraron alta homología con las secuencias de los iniciadores FOF1/FOR1 y consecuentemente no amplificaron de forma cruzada en los ensayos de PCR utilizando las condiciones originales de amplificación.

La mayoría de aislados de *Fusarium* spp. Ex-tipo que amplificaron de forma cruzada utilizando los iniciadores FOF1/FOR1 (14 de 17 especies) eran miembros del complejo de especies *Gibberella fujikuroi* (Sawada) Ito in Ito & K. Kimura (e.g. *F. circinatum*, *F. sacchari*, *F. subglutinans* y *F. verticilloides*), los cuales se pueden distinguir morfológicamente de *F. oxysporum* por la producción de microconidias en mono y polifialidas y la ausencia de clamidosporas. Sin embargo, las tres especies restantes de *Fusarium* (*F. andiyazi*, *F. armeniacum* y *F. nisikadoi*), requieren de mayor experiencia en taxonomía de *Fusarium* spp. para ser diferenciadas de *F. oxysporum*. Interesantemente, otras especies de *Fusarium* que podrían ser erróneamente identificadas con *F. oxysporum* como *F. redolens* (O'Donnell et al., 1998a) no mostraron amplificación cruzada utilizando los iniciadores FOF1/FOR1 (Véase Capítulo II de la presente Tesis Doctoral). Por otro lado, el incremento en la astringencia de la reacción de amplificación llevado a cabo en nuestro estudio por medios químicos (disminuyendo la concentración de Mg^{2+} de 2 mM a 1,5 mM) y/o físicos (incrementando la temperatura de anidamiento en 7°C) solventó los problemas de amplificación cruzada y validó el protocolo específico para *F. oxysporum*. Además, la sensibilidad del protocolo no se vio afectada por el incremento de las condiciones de astringencia, ya que fuimos capaces de detectar hasta 0,01 ng de ADN de *F. oxysporum* mediante PCR convencional.

Después de optimizar las condiciones de PCR para lograr la máxima especificidad, implementamos el protocolo para ser cuantitativo. De acuerdo a nuestro conocimiento, ninguno de los dos protocolos desarrollados para la detección de "*F. oxysporum sensu lato*" (Edel et al., 2000; Mishra et al., 2003) era de carácter cuantitativo, y ningún estudio publicado hasta la fecha ha desarrollado un protocolo de qPCR como tal para "*F. oxysporum sensu lato*". Después de adaptar las condiciones de amplificación para cuantificar ADN de *F. oxysporum*, demostramos la utilidad del protocolo para cuantificar tres aislados diferentes de *F. oxysporum* en tres series diferentes de muestras. Además, demostramos que la sensibilidad del protocolo de qPCR no resultó afectada por la naturaleza de la muestra, ya que fuimos capaces de detectar y cuantificar el patógeno en matrices complejas infestadas o infectadas de diverso origen, incluyendo diferentes tejidos de planta (raíces y tallos), plantas huésped (garbanzo, melón y guisante) y suelos. En esas muestras complejas, detectamos hasta 1 pg de ADN de *F. oxysporum* en suelo y tejido vegetal sin perder exactitud. Límites de detección similares se han encontrado para otros protocolos de otras especies de *Fusarium* o *formae speciales* de *F. oxysporum* cuando se aplicaron a muestras de suelo o planta (Filion et al., 2003; Pasquali et al., 2004,2006; Zambounis et al., 2007). Además, la eficiencia de amplificación (EA), sensibilidad y reproducibilidad del ensayo de qPCR recién desarrollado no se vieron afectadas por la presencia de ADN no diana de diferentes fuentes (ADN de suelo o planta). En otros estudios, la potencial interferencia del ADN de fondo de los tejidos de la planta huésped o suelo en los ensayos de qPCR no se consideró (Filion et al., 2003; Pasquali et al., 2004) o si fue analizada mostró una reducción (Li et al., 2008; Pasquali et al., 2006; Schena et al., 2006) o ningún efecto (Atallah et al., 2007; Lievens et al., 2006; Valsesia et al., 2005) en la eficiencia, exactitud y límite de detección de las amplificaciones.

En el presente Capítulo de la Tesis Doctoral, hemos demostrado que el ADN de *F. oxysporum* puede ser cuantificado con exactitud a lo largo de un amplio rango de concentraciones utilizando la qPCR en matrices biológicas complejas, incluyendo muestras infestadas artificial y naturalmente de diversos orígenes, y en las cuales muchos organismos diferentes pueden coexistir con las especie diana. En el caso de muestras de raíces o suelo naturalmente infestadas similares a las utilizadas en esta Tesis Doctoral, no es posible distinguir con exactitud el hongo diana, "*F. oxysporum sensu lato*", de otros *Fusarium* spp. por medio de técnicas poco discriminativas como la dilución en placa en medio de cultivo.

Además, tal procedimiento es tedioso y retrasa la identificación de las colonias de *F. oxysporum* hasta la observación microscópica detallada de sus características morfológicas diagnósticas. Consecuentemente, la disponibilidad de este protocolo de qPCR recién desarrollado para identificar y cuantificar "*F. oxysporum sensu lato*" puede ser una herramienta útil para estudios de ecología de poblaciones naturales de *F. oxysporum* en suelo y la rizosfera de plantas.

En nuestro estudio, el protocolo fue eficiente en cuantificar con exactitud la concentración de ADN de *F. oxysporum* en muestras de suelo pasteurizado artificialmente infestado (Suelo A). Así, se encontró un alto grado de correlación entre la densidad de inóculo establecida del hongo y la concentración calculada de ADN molde, demostrando el potencial de la técnica para cuantificar con precisión el ADN de *F. oxysporum* existente en un suelo. Asimismo, se encontró una alta correlación entre la estimación de la población del hongo mediante dilución en placa y la cantidad de ADN cuantificada en muestras de suelo naturalmente infestado y en los dos suelos infestados artificialmente (Suelos B y C) que se almacenaron a 4°C durante 5 meses antes de la extracción de ADN. Sin embargo, la sensibilidad de detección era más alta en esas últimas muestras de suelo en comparación con la obtenida para el Suelo A debido probablemente a la presencia de clamidosporas del hongo, ya que el rendimiento de ADN diana después de la extracción del suelo puede ser más alto comparado con aquel procedente de microconidias utilizadas para infestar el Suelo A. Incluso con esta limitación, fuimos capaces de cuantificar hasta 10^4 microconidias/g de suelo en el Suelo A artificialmente infestado. Un nivel de sensibilidad de detección similar se encontró para *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum* en muestras de suelo artificialmente infestadas con microconidias del hongo (Zambounis et al., 2007). Por el contrario, fuimos capaces de cuantificar aproximadamente entre 900 y 4.500 propágulos de *F. oxysporum* en el suelo "Campus de Rabanales" naturalmente infestado y en los Suelos B y C artificialmente infestados. El hecho de que el ADN se extrajera a partir de pequeñas alícuotas de muestras de suelo (250 mg) podría explicar la falta de amplificación y la mayor variabilidad encontrada en la cuantificación de algunas repeticiones del suelo naturalmente infestado. En este sentido serían necesarias algunas modificaciones en nuestro procedimiento para poder incrementar la sensibilidad cuando se utilicen suelos naturalmente infestados, tales como incrementar el tamaño de la muestra de suelo y/o el número de repeticiones de cada muestra. Una opción sería utilizar el protocolo de qPCR con

el empleo del “UltraClean® Mega Soil DNA Isolation kit” (MoBio laboratorios, Inc.; Carlsbad, CA, EEUU) que permite aislar ADN de hasta 10 g de suelo por repetición.

Además de un habitante común del suelo, *F. oxysporum* también se considera un miembro común de las comunidades fúngicas habitantes de la rizosfera de plantas (Gordon y Martín, 1997). Puesto que tanto los aislados patogénicos como no patogénicos de *F. oxysporum* son capaces de colonizar interna y externamente la rizosfera de muchas especies de plantas huésped y no huésped, la disponibilidad del protocolo de qPCR desarrollado en esta Tesis Doctoral para cuantificar “*F. oxysporum sensu lato*”, junto con protocolos de qPCR específicos que pueden estar disponibles o ser desarrollados para *formae speciales* concretas (Véase Capítulo IV de la presente Tesis Doctoral), podrían ayudar a conseguir nuevas percepciones de las interacciones entre poblaciones de *F. oxysporum* patogénicas y no patogénicas en suelo y la rizosfera, así como el modo en que esta interacción puede ser modulada entre otras por las condiciones medioambientales, por otra microflora del suelo y/o por la especie cultivada o el cultivar de ésta.

En la presente Tesis Doctoral, los seis cultivares de garbanzo que crecieron en un suelo naturalmente infestado con *F. oxysporum* (suelo “Campus de Rabanales”) mostraron niveles de colonización significativamente diferentes en su sistema radical por este complejo de especies fúngicas (Fig. III.4.B). Puesto que este suelo está infestado con una mezcla de poblaciones diferentes de *F. oxysporum*, incluyendo las razas 0, 5 y 6 de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris*, estas diferencias se pueden deber a las reacciones diferenciales que esos cultivares muestran a estas razas (Landa et al., 2009; S. Garcés-Romay, R.M. Jiménez-Díaz y B.B. Landa, *datos no publicados*). Asimismo, es interesante observar que en el momento del muestreo ningún cultivar de garbanzo mostró síntomas de enfermedad, aunque albergaban altas poblaciones de *F. oxysporum* en su sistema radical. Además, un estudio de diversidad genética basado en análisis PCR-RFLP de la región IGS (Edel et al., 2001) llevado a cabo con mas de 100 aislados obtenidos del sistema radical de esos mismos cultivares de garbanzo ha indicado que esos cultivares no sólo sostienen diferentes niveles de población de *F. oxysporum* sino hasta 32 haplotipos diferentes (S. Garcés-Romay, R.M. Jiménez-Díaz y B.B. Landa, *datos no publicados*).

En conclusión, los resultados del presente Capítulo de esta Tesis Doctoral indican que la optimización del protocolo específico de "*F. oxysporum sensu lato*" y su conversión en un ensayo de qPCR para la cuantificación de este hongo en matrices complejas, incluyendo tejidos de planta y suelos, puede ser de gran valor para estudios dirigidos a mejorar la comprensión de la Ecología de "*F. oxysporum sensu lato*" y sus interacciones con la microflora del suelo, el medioambiente y/o cultivos específicos o cultivares de éstos.

III.6. LITERATURA CITADA

Abo, K., Klein, K.K., Edel-Hermann, V., Gautheron, N., Traore, D. y Steinberg, C. 2005. High genetic diversity among strains of *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* from cotton in Ivory Coast. *Phytopathology* 95:1391-1396.

Adams, P.S. 2006. Data analysis and reporting. En: Tevfik Dorak, M. (Ed.), *Real-Time PCR*. Taylor y Francis, New York, EEUU, pp. 39-62.

Alabouvette, C. 1990. Biological control of *Fusarium* wilt pathogens in suppressive soils. En: *Biological Control of Soil-borne Plant Pathogens*. D. Hornby, ed. CAB International, Wallingford, Reino Unido, pp 27-43.

Alabouvette, C., Lemanceau, P. y Steinberg, C. 1993. Recent advances in biological control of *Fusarium* wilts. *Pestic. Sci.* 37:365-373.

Alabouvette, C., Olivain, C., L'Haridon, F., Aimé, S. y Steinberg, C. 2007. Using strains of *Fusarium oxysporum* to control *Fusarium* wilts: Dream or reality?. En: *Novel Biotechnologies for Biocontrol Agent Enhancement and Management*, M. Wurro y J. Gressel, eds. Springer, pp. 157-177.

Alves-Santos, F.M., Ramos, B., García-Sánchez, M.A., Eslava, A.P. y Díaz-Mínguez, J.M. 2002. A DNA-based procedure for in planta detection of *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*. *Phytopathology* 92:237-244.

Appel, D.J. y Gordon, T.R. 1994. Local and regional variation in populations of *Fusarium oxysporum* from agricultural field soils. *Phytopathology* 84:786-791.

Appel, D.J. y Gordon, T.R. 1996. Relationships among pathogenic and nonpathogenic isolates of *Fusarium oxysporum* based on the partial sequence of the intergenic spacer region of the ribosomal DNA. *Mol. Plant-Microbe Interaction* 9:125-138.

Armstrong, G.M. y Armstrong, J.K. 1981. *Formae speciales* and races of *Fusarium oxysporum* causing wilt diseases. En: *Fusarium: Diseases, Biology and Taxonomy*. P. E. Nelson, T. A., Toussoun, R. J. y Cook, R.J. eds. The Pennsylvania State University Press, University Park, EEUU, pp. 391-399.

Atallah, Z.K., Bae, J. Jansky, S.H. Rouse, D.I. y Stevenson, W.R. 2007. Multiplex real-time quantitative PCR to detect and quantify *Verticillium dahliae* colonization in potato lines that differ in response to *Verticillium* wilt. *Phytopathology* 97:865-872.

Baayen, R.P., O'Donnell, K., Bonants, P.J.M., Cigelnik, E., Kroon, L.P.N.M., Roebroek, E.J.A. y Waalwijk, C. 2000. Gene genealogies and AFLP analyses in the *Fusarium oxysporum* complex identify monophyletic and non-monophyletic formae speciales causing wilt and rot diseases. *Phytopathology* 90:891-900.

Bogale, M., Wingfield, B.D., Wingfield, M.J. y Steenkamp, E.T. 2006. Characterization of *Fusarium oxysporum* isolates from Ethiopia using AFLP, SSR, and DNA sequence analyses. *Fungal Divers.* 23:51-66.

Bouhot, D. y Rouxel, F. 1971. Technique selective et quantitative d'analyse des *Fusarium oxysporum* et *Fusarium solani* dans le sol. Mode d'emploi. *Ann. Phytopathol.* 3:251-254.

Burgess, L. W. 1981. General ecology of the Fusaria. En: *Fusarium: Diseases, Biology and Taxonomy*. P. E. Nelson, T. A., Toussoun, R. J. y Cook, R.J. eds. The Pennsylvania State University Press, University Park, EEUU, pp. 225-235.

Cipriani, M.G., Stea, G., Moretti, A., Altomare, C., Mulè, G. y Vurro, M. 2009. Development of a PCR-based assay for the detection of *Fusarium oxysporum* strain FT2, a potential mycoherbicide of *Orobancha ramosa*. *Biol. Control* 50:78-84.

De Haan, L.A.M., Numansen, A., Roebroek, E.J.A. y van Doorn, J. 2000. PCR detection of *Fusarium oxysporum* f. sp. *gladioli* race 1, causal agent of *Gladiolus* yellows disease, from infected corms. *Plant Pathol.* 49:89-100.

Edel, V., Steinberg, C., Avelange, I., Laguerre, G. y Alabouvette, C. 1995. Comparison of three molecular methods for the characterization of *Fusarium oxysporum* strains. *Phytopathology* 85:579-585.

Edel, V., Steinberg, C., Gautheron, N. y Alabouvette, C. 1997. Populations of nonpathogenic *Fusarium oxysporum* associated with roots of four plant species compared to soilborne populations. *Phytopathology* 87:693-697.

Edel, V., Steinberg, C., Gautheron, N. y Alabouvette, C. 2000. Ribosomal DNA-targeted oligonucleotide probe and PCR assay specific for *Fusarium oxysporum*. *Mycol. Res.* 104:518-526.

Edel, V., Steinberg, C., Gautheron, N., Recorbet, G. y Alabouvette, C. 2001. Genetic diversity of *Fusarium oxysporum* populations isolated from different soils in France. *FEMS Microbiol. Ecol.* 36:61-71.

Filion, M., St-Arnaud, M. y Jabaji-Hare, S. H. 2003. Quantification of *Fusarium solani* f. sp. *phaseoli* in mycorrhizal bean plants and surrounding mycorrhizosphere soil using real-time polymerase chain reaction and direct isolations on selective media. *Phytopathology* 93:229-235.

Fravel, D., Olivain, C. y Alabouvette, C. 2003. *Fusarium oxysporum* and its biocontrol. *New Phytol.* 157:493-502.

Gardes, M. y Bruns, T.D. 1993. ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes-application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Mol. Ecol.* 2:113-118.

Garrett, S.D. 1970. *Pathogenic Root-Infection Fungi*. Cambridge University Press, London, Reino Unido, 294 pp.

Gordon, T.R. y Martyn, R.D. 1997. The evolutionary biology of *Fusarium oxysporum*. Annu. Rev. Phytopathol. 35:111-128.

Higuchi, R., Fockler, C. Dollinger, G. y Watson, R. 1993. Kinetic PCR analysis: real time monitoring of DNA amplification reactions. Biotechnology 11:1026-1030.

Hirano, Y. y Arie, T. 2006. PCR-based differentiation of *Fusarium oxysporum* ff. spp. *lycopersici* and *radicis-lycopersici* and races of *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*. J. Gen. Plant Pathol. 72:273-283.

Jiménez-Gasco, M.M. y Jiménez-Díaz, R.M. 2003. Development of a specific polymerase chain reaction-based assay for the identification of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* and its pathogenic races 0, 1A, 5, and 6. Phytopathology 93:200-209.

Kelly, A.G., Bainbridge, B.W., Heale, J.B., Pérez-Artés, E. y Jiménez-Díaz, R.M. 1998. In planta-polymerase-chain-reaction detection of the wilt-inducing pathotype of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* in chickpea (*Cicer arietinum* L.). Physiol. Mol. Plant Pathol. 52:397-409.

Landa, B.B., Navas-Cortés, J.A. y Jiménez-Díaz, R.M. 2004. Integrated management of Fusarium Wilt of chickpea combining the use of choice of sowing date, host resistance, and biological control. Phytopathology 94:946-960.

Landa, B.B., Montes-Borrego, M., Muñoz-Ledesma, F.J. y Jiménez-Díaz, R.M. 2007. Phylogenetic analysis of Downy Mildew pathogens of opium poppy and PCR-based in planta and seed detection of *Peronospora arborescens*. Phytopathology 97:1380-1390.

Landa, B.B., Jiménez-Gasco, M.M. y Jiménez-Díaz, R.M. 2009. Influence of disease resistant management strategies on genetic and pathogenic diversity in plant pathogen populations: Fusarium wilt of chickpea, a case study. IOBC/WPRS Bull. 42:119-122.

Larkin, R.P., Hopkins, D.L. y Martin, F.N. 1996. Suppression of Fusarium wilt of watermelon by nonpathogenic *Fusarium oxysporum* and other microorganisms recovered from a disease-suppressive soil. Phytopathology 86:812-819.

Leslie, J.F. y Summerell, B.A. 2006. The *Fusarium* Laboratory Manual. Blakwell Publishing Ltd., Oxford, Reino Unido, 388 pp.

Li, W., Li, D., Twieg, E., Hartung, J.S. y Levy, L. 2008. Optimized quantification of unculturable *Candidatus Liberibacter* spp. in host plants using real-time PCR. Plant Dis. 92:854-861.

Lievens, B., Brouwer, M. Vanachter, A.C.R.C. Cammue, B.P.A. y Thomma B.P.H.J. 2006. Real-time PCR for detection and quantification of fungal and oomycete tomato pathogens in plant and soil samples. Plant Sci. 171:155-165.

Lievens, B., Claes, L., Vakalounakis, D. J., Vanachter, A.C.R.C. y Thomma, B.P.H.J. 2007. A robust identification and detection assay to discriminate the cucumber pathogens *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum* and f. sp. *radicis-cucumerinum*. Environ. Microbiol. 9:2145-2161.

Lin, Y.-H., Chang, J.-Y., Liu E.-T., Chao, C.-P., Huang, J.-W. y Linda Chang, P.-F. 2009. Development of a molecular marker for specific detection of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* race 4. Eur. J. Plant. Pathol. 123:353-365.

Lori, G., Edel-Hermann, V., Gautheron, N. y Alabouvette, C. 2004. Genetic diversity of pathogenic and nonpathogenic populations of *Fusarium oxysporum* isolated from carnation fields in Argentina. Phytopathology 94:661-668.

Mishra, P.K., Fox, R.T.V. y Culham, A. 2003. Development of a PCR-based assay for rapid and reliable identification of pathogenic *Fusaria*. FEMS Microbiol. Lett. 218:329-332.

Montes-Borrego, M., Muñoz-Ledesma, F.J., Jiménez-Díaz, R.M. y Landa B.B., 2009. A Nested-PCR Protocol for detection and population biology studies of *Peronospora arborescens*, the downy mildew pathogen of opium poppy, using herbarium specimens and asymptomatic, fresh plant tissues. Phytopathology 99:73-81.

Nelson, P.E., Toussoun, T.A. y Marasas, W.F.O. 1983. *Fusarium* species. An Illustrated Manual for Identification. The Pennsylvania State University Press, University Park, EEUU, 193 pp.

O'Donnell, K., Cigelnik, E., Nirenberg, H.I. 1998a. Molecular systematics and phylogeography of the *Gibberella fujikuroi* species complex. Mycologia 90:465-493.

O'Donnell, K., Kistler, H.C., Cigelnik, E. y Ploetz, R.C. 1998b. Multiple evolutionary origins of the fungus causing Panama disease of banana: concordant evidence from nuclear and mitochondrial gene genealogies. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 95:2044-2049.

Pasquali, M., Dematheis, F., Gullino, M.L. y Garibaldi, A. 2007. Identification of race 1 of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae* on lettuce by inter-retrotransposon sequence-characterized amplified region technique. Phytopathology 97:987-996.

Pasquali, M., Marena, L., Fiora, E., Piatti, P., Gullino, M.L. y Garibaldi, A. 2004. Real-time polymerase chain reaction for identification of a highly pathogenic group of *Fusarium oxysporum* f. sp. *chrysanthemi* on *Argyranthemum frutescens* L. J. Plant Pathol. 86:53-59.

Pasquali, M., Piatti, P., Gullino, M.L. y Garibaldi, A. 2006. Development of a real-time polymerase chain reaction for the detection of *Fusarium oxysporum* f. sp. *basilici* from basil seed and roots. J. Phytopathol. 154:632-636.

Paulitz, T.C., Park, C.S. y Baker, R. 1987. Biological control of *Fusarium* wilt of cucumber with nonpathogenic isolates of *Fusarium oxysporum*. Can. J. Microbiol. 33:349-353.

Postma, J. y Rattink, H. 1992. Biological control of *Fusarium* wilt of carnation with a nonpathogenic isolate of *Fusarium oxysporum*. Can. J. Bot. 70:1199-1205.

Schaad, N.W., Frederick, R.D., Shaw, J., Schneider, W.L., Hickson, R., Petrillo, M.D. y Luster, D.G. 2003. Advances in molecular-based diagnostics in meeting crop biosecurity and phytosanitary issues. Annu. Rev. Phytopathol. 41:305-324.

Schena, L., Hughes, K.J.D. y Cooke D.E.L. 2006. Detection and quantification of *Phytophthora ramorum*, *P. kernoviae*, *P. citricola* and *P. quercina* in symptomatic leaves by multiplex real-time PCR. Mol. Plant Pathol. 7:365-379.

Schena, L., Nigro, F., Ippolito, A. y Gallitelli, D. 2004. Real-time quantitative PCR: a new technology to detect and study phytopathogenic and antagonistic fungi. Eur. J. Plant Pathol. 110:893-908.

Thangavelu, R. y Jayanthi, A. 2009. RFLP analysis of rDNA-ITS regions of native non-pathogenic *Fusarium oxysporum* isolates and their field evaluation for the suppression of *Fusarium* wilt disease of banana. Australas. Plant Path. 38:13-21.

Vaerman, J.L., Saussoy, P. y Ingargiola, I. 2004. Evaluation of real-time PCR data. J. Biol. Regul. Homeost. Agents 18:212-214.

Valsesia, G., Gobbin D., Patocchi, A., Vecchione, A., Pertot, I. y Gessler, C. 2005. Development of a high-throughput method for quantification of *Plasmopara viticola* DNA in

grapevine leaves by means of quantitative real-time polymerase chain reaction. *Phytopathology* 95:672-678.

van Pelt-Verkuil, E., van Belkum, A. y Hays, J. P. 2008. Principles and Technical Aspects of PCR Amplification. Springer, Dordrecht, Países Bajos, 332 pp.

Weng, T., Jin, N. y Liu, L. 2005. Differentiation between amplicon polymerization and nonspecific products in SYBR green I real-time polymerase chain reaction. *Anal. Biochem.* 342:167-169.

White, T.J., Bruns, T., Lee, S. y Taylor, J.W. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. En: *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. Academic Press Inc. M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky y T. T. White, eds., New York, EEUU, pp. 315-322.

Zambounis, A.G., Paplomatas, E. y Tsafaris, A.S. 2007. Intergenic spacer-RFLP analysis and direct quantification of Australian *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* isolates from soil and infected cotton tissues. *Plant Dis.* 91:1564-1573.

Zhang, Z., Zhang, J., Wang, Y. y Zheng, X. 2005. Molecular detection of *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum* and *Mycosphaerella melonis* in infected plant tissues and soil. *FEMS Microbiol. Lett.* 249:39-47.

CAPÍTULO IV

Cuantificación de *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris in planta* y en suelo, y evaluación de resistencia a la Fusariosis Vascular en germoplasma de garbanzo mediante un nuevo protocolo de PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR)

IV.1. RESUMEN

El manejo de la Fusariosis Vascular del garbanzo causada por *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* se puede llevar a cabo mediante la evaluación del riesgo de enfermedad y la utilización de cultivares resistentes. Un método fiable para la detección y cuantificación de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* en suelo y tejidos de garbanzo contribuiría en gran medida a la aplicación de estas estrategias de manejo de la enfermedad. En este Capítulo de la Tesis Doctoral, se desarrolló un protocolo de Reacción en Cadena de la Polimerasa Cuantitativa en Tiempo Real (qPCR) que permite cuantificar hasta 1 pg de ADN de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* en suelo, así como en la raíz y en el tallo de la planta. El protocolo de qPCR permitió cuantificar niveles de inóculo de hasta 45 unidades formadoras de colonia (ufc) de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris*/g de suelo seco procedente de una parcela experimental infestada con diversas razas del patógeno. Además, el protocolo permitió distinguir claramente reacciones del huésped susceptibles y resistentes al patógeno a los 15 días después de la siembra en un suelo artificialmente infestado, así como diferencias en la virulencia entre dos razas de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris*. Asimismo, el protocolo detectó infecciones radicales asintomáticas tempranas e identificó diferencias significativas en el nivel de resistencia de 12 cultivares de garbanzo que crecieron en la parcela experimental referida. La utilización de este protocolo para la cuantificación rápida, precisa y económica de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* en tejidos de garbanzo asintomáticos en las fases iniciales del proceso de infección puede ser de gran valor para los programas de mejora de germoplasma de garbanzo y para estudios epidemiológicos de la enfermedad tanto en cámaras de crecimiento, como en invernaderos y parcelas experimentales.

IV.2. INTRODUCCIÓN

El garbanzo (*Cicer arietinum* L.) es uno de los cultivos de leguminosas más importantes del mundo junto con la judía (*Phaseolus vulgaris* L.) y el guisante (*Pisum sativum* L.) (FAOSTAT, 2009). Este cultivo no sólo es una fuente importante de proteínas para la alimentación humana y animal, sino que ayuda a incrementar la fertilidad del suelo, especialmente en tierras de secano y en zonas tropicales semiáridas donde se concentra su producción (Singh y Saxena, 1996). La Fusariosis Vascular del garbanzo, causada por *Fusarium oxysporum* Schlechtend.:Fr. f. sp. *ciceris* (Padwick) Matuo & K. Sato, es la enfermedad más importante de las originadas por patógenos que habitan en el suelo, la cual limita la producción de esta leguminosa en todo el mundo, pero principalmente en la Cuenca Mediterránea y el Subcontinente Indio (Jalali y Chand, 1992; Trapero-Casas y Jiménez-Díaz, 1985). Las pérdidas anuales de rendimiento por esta enfermedad se han estimado entre el 10 y el 15% (Jalali y Chand, 1992; Trapero-Casas y Jiménez-Díaz, 1985). Sin embargo, las epidemias de Fusariosis Vascular pueden ser devastadoras para algunos cultivos causando pérdidas del 100% de la producción en condiciones favorables (Halila y Strange, 1996; Navas-Cortés et al., 1998, 2000b). En particular, los ataques de la enfermedad son devastadores si se producen bajo condiciones de cultivo de alta temperatura y estrés hídrico durante las fases de floración y llenado de semilla (Bhatti y Kraft, 1992; Landa et al., 2004a; Navas-Cortés et al., 2000b; Sugha et al., 1994).

Fusarium oxysporum f. sp. *ciceris* muestra una gran variabilidad patogénica. Hasta la fecha, han sido descritas ocho razas del patógeno (razas 0, 1A, 1B/C, 2, 3, 4, 5 y 6) (Cabrera de la Colina et al., 1985; Haware y Nene, 1982; Jiménez-Díaz et al., 1989, 1993a), las cuales pueden ser agrupadas dentro de los patotipos de Marchitez y Amarillez basándose en los síntomas de enfermedad que inducen en ensayos de patogenicidad (Trapero-Casas y Jiménez-Díaz, 1985). El patotipo de Amarillez induce un progresivo amarilleamiento foliar con decoloración vascular, seguida por la muerte de la planta en los 40 días después de la inoculación. El patotipo de Marchitez induce clorosis severa y flacidez, decoloración vascular y muerte de la planta en los 20 días después de la inoculación. Las razas 0 y 1B/C pertenecen al patotipo de Amarillez y se consideran menos virulentas en comparación con las razas 1A y 2 a 6 que

pertenecen al patotipo de Marchitez (Jiménez-Díaz et al., 1993a; Jiménez-Gasco y Jiménez-Díaz, 2003). Esta diferencia en la virulencia se refleja en diferencias en la cantidad de inóculo necesaria para causar enfermedad severa en un cultivar de garbanzo susceptible (Landa et al., 2001; Navas-Cortés et al., 2000a; 2007). Las razas 2 y 3 han sido descritas en Etiopía, India y Turquía (Dolar, 1997; Haware y Nene, 1982; Jalila y Chand, 1992; Shehabu et al., 2008), mientras que la raza 4 sólo ha sido descrita en Etiopía e India (Haware y Nene, 1982; Jalila y Chand, 1992; Shehabu et al., 2008). Las razas 0, 1B/C, 5 y 6 se han descrito en la Cuenca Mediterránea y en California (Halila y Strange, 1996; Jiménez-Díaz et al., 1993a; Jiménez-Gasco y Jiménez Díaz, 2003; Jiménez-Gasco et al., 2001). La raza 1A ha sido descrita en la India (Haware y Nene, 1982), California, y la Cuenca Mediterránea (Jiménez-Díaz et al., 1993a; Jiménez-Gasco y Jiménez-Díaz, 2003; Jiménez-Gasco et al., 2001).

La utilización de cultivares resistentes es una de las pocas y más eficaces medidas disponibles para el manejo de la Fusariosis Vascular del garbanzo (Jiménez-Díaz et al., 1993b; Landa et al., 2004a, 2006), pero su utilización no ha sido extensa debido a que los cultivares resistentes desarrollados poseen en su mayoría características agronómicas y/o comerciales inadecuadas. Además, la alta variabilidad patogénica existente en las poblaciones de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* puede limitar la eficacia y el empleo extenso de la resistencia disponible (Haware y Nene, 1982; Jiménez-Díaz et al., 1991, 1993b). Se han explorado e identificado (Sharma et al., 2005; Sharma y Muehlbauer, 2007) diversas fuentes de resistencia a *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* en varios programas de mejora de garbanzo (Jiménez-Díaz et al., 1993a, 1991; Pande et al., 2006; Sharma et al., 2005; Sharma y Muehlbauer, 2007), y se han desarrollado un número razonable de líneas de germoplasma de garbanzo con resistencia operativa frente a razas específicas del patógeno. Por consiguiente, la adecuada caracterización de la resistencia de líneas y cultivares de garbanzo a razas específicas de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* es esencial para la utilización de ésta.

Ante la ausencia de cultivares resistentes adecuados agronómica y/o comercialmente, para el manejo de la Fusariosis Vascular del garbanzo se puede utilizar la predicción del riesgo potencial de enfermedad en un área geográfica basada en la estimación de la raza patogénica y los umbrales de densidad del inóculo en suelo, y la susceptibilidad de los cultivares (Navas-Cortés et al., 2007).

Por ejemplo, adelantar la fecha de siembra de cultivares moderadamente susceptibles de inicios de primavera a inicios de invierno puede contribuir a controlar la enfermedad en ambientes mediterráneos; pero estos beneficios pueden ser anulados si prevalece en el suelo una alta densidad de inóculo o una raza altamente virulenta (Landa et al., 2004a; Navas-Cortés et al., 1998, 2000b).

Mientras que los aislados de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* pueden ser identificados o asignados a razas patogénicas mediante diferentes protocolos basados en la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) (García-Pedrajas et al., 1999; Jiménez-Gasco y Jiménez-Díaz, 2003; Jiménez-Gasco et al., 2001; Kelly et al., 1994, 1998), la caracterización de las reacciones de resistencia en germoplasma de garbanzo siguen dependiendo de los tradicionales y laboriosos ensayos de patogenicidad. Este método de caracterización de resistencia es sencillo conceptualmente, pero costoso en tiempo (50 a 60 días), instalaciones y recursos necesarios (Dubey et al., 2010; Jiménez-Díaz et al., 1993a, 1991; Landa et al., 2006; Sharma et al., 2005; Trapero-Casas y Jiménez-Díaz, 1985). Además, el desarrollo de la enfermedad en genotipos de garbanzo durante la tipificación patogénica puede verse influida por varios factores incluyendo la humedad del suelo, la densidad de inóculo del patógeno (Gupta et al., 1987; Landa et al., 2001, 2004b; Navas-Cortés et al., 2000a, 2007) y la temperatura (Landa et al., 2001, 2006; Navas-Cortés et al., 2007). En consecuencia, un ajuste inadecuado de estas fuentes de variabilidad puede llevar a la incorrecta identificación de razas de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* o a la apreciación errónea de resistencia en genotipos de garbanzo. Por lo tanto, son necesarios nuevos y mejores métodos para la rápida, fiable y reproducible identificación y cuantificación de las razas de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* en raíces y tallo de la planta, lo cual sería una evidencia de infección vascular, y podría facilitar la evaluación de resistencia en germoplasma de garbanzo. Por otra parte, estas técnicas también serían útiles para un manejo más eficiente de la enfermedad si pudiesen proporcionar la detección y cuantificación del inóculo del patógeno en suelo y así ayudar en la predicción del riesgo de enfermedad.

La metodología de PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR) puede ser una herramienta útil para lograr los retos anteriormente mencionados en el manejo de la Fusariosis Vascular del garbanzo. Así, los protocolos de qPCR han permitido la cuantificación exacta e independiente de medio del cultivo de una variedad de

microorganismos asociados al suelo o a las plantas, incluyendo patógenos de plantas en tejidos vegetales, semillas y suelos (revisado en Schaad et al., 2003; Schena et al., 2004). En estudios previos, se han desarrollado varios protocolos basados en la PCR para la caracterización de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris*, sus patotipos y algunas de las ocho razas patogénicas descritas (e.g., García-Pedrajas et al., 1999; Jiménez-Gasco y Jiménez-Díaz, 2003; Jiménez-Gasco et al., 2001; Kelly et al., 1994, 1998;). Aunque algunos de estos protocolos se han desarrollado para ser aplicados en la planta y en el suelo (García-Pedrajas et al., 1999; Kelly et al., 1994, 1998), ninguno de ellos permite cuantificar el patógeno en el suelo o estimar el nivel de infección en la planta. Solventar estas limitaciones por medio de un método fiable de PCR cuantitativa sería particularmente útil para los estudios epidemiológicos, de cuarentena y el manejo de la enfermedad. En particular, este método sería muy útil para: (i) discriminar entre reacciones resistentes y tolerantes del germoplasma de garbanzo a razas de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* mediante la cuantificación del patógeno en infecciones asintomáticas y sintomáticas; (ii) valorar con exactitud la reacción de enfermedad mediante la correlación de la cantidad de patógeno en los tejidos de plantas infectadas con la cantidad de enfermedad desarrollada en germoplasma resistente/tolerante y/o la posterior aplicación de otras medidas de control de la enfermedad (biológicas, físicas o químicas); y (iii) evitar la utilización de suelos de alto riesgo mediante la selección de aquellos con las cantidades de inóculo del patógeno más bajas o nulas.

Por consiguiente, el objetivo del presente capítulo de la Tesis Doctoral fue desarrollar un protocolo de PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR), que permitiese discriminar selectivamente aislados pertenecientes a cualesquiera de las ocho razas de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* de los aislados no patogénicos de *F. oxysporum* de garbanzo, otras *formae speciales* de *F. oxysporum* y de otros *Fusarium* spp., y al mismo tiempo permitiese la cuantificación precisa de todas las razas del patógeno en tejidos de la planta y en el suelo.

IV.3. MATERIALES Y MÉTODOS

IV.3.1. Aislados del patógeno y condiciones de cultivo

En este estudio se utilizó una colección de 115 aislados de *Fusarium* spp. (Tabla IV.1), de los cuales 50 eran representativos de diferentes *formae speciales* de *F. oxysporum*, incluyendo *ciceris* (42), *F. oxysporum* Schlechtend.:Fr. f. sp. *lycopersici* W.C. Snyder & H.N. Hans. (uno), *F. oxysporum* f. sp. *melonis* W. C. Snyder & H. N. Hans. (uno), *F. oxysporum* Schlechtend.:Fr. f. sp. *niveum* (E.F. Sm.) W.C. Snyder & H.N. Hans. (uno), *F. oxysporum* Schlechtend.:Fr. f. sp. *phaseoli* J.B. Kendrick & W.C. Snyder (uno) y *F. oxysporum* f. sp. *pisi* (J.C. Hall) W.C. Snyder & H.N. Hans. (cuatro), y seis aislados no patogénicos de *F. oxysporum*. Los 59 aislados restantes de *Fusarium* spp. se obtuvieron de la colección de Ex-tipos de *Fusarium* spp. del Departamento de Patología Vegetal de la Universidad del Estado del Estado de Kansas, Manhattan, Kansas, EEUU. Estos últimos aislados eran representativos de diversas secciones del género *Fusarium*: *Discolor*, *Elegans*, *Gibbosum*, *Lateritium*, *Liseola*, *Martiella*, *Roseum*, *Spicarioides* y *Sporotrichiella* (Leslie y Summerell, 2006).

Los 42 aislados de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* procedían de diversos orígenes geográficos y eran representativos de las ocho razas descritas hasta la fecha (0, 1A, 1 B/C, 2, 3, 4, 5 y 6); los seis aislados no patogénicos de *F. oxysporum* se obtuvieron de raíces de plantas sanas de garbanzo y en estudios previos se había demostrado que eran no patogénicos sobre garbanzo (Tabla IV.1). Todos los aislados se conservaron en tubos conteniendo suelo estéril a 4°C y en glicerol estéril al 35% en agua destilada a -80°C para su conservación a largo plazo.

Los cultivos activos de los aislados se obtuvieron colocando pequeñas alícuotas del cultivo de suelo en placas de petri con agar patata dextrosa (APD) (Laboratorios Difco, Detroit, Michigan, EEUU) e incubándolas durante 4 días a 25°C y a un fotoperíodo de 12-h de una mezcla de luz blanca fluorescente y cercana al UV de $36 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Para la extracción de ADN del hongo, se colocó un pequeño trozo de los cultivos activos de los aislados de *Fusarium* spp. sobre una película estéril de celofán extendida sobre una placa de APD e incubada durante 5-7 días como se describió anteriormente (Landa et al., 2006). Posteriormente, el micelio crecido sobre la superficie de celofán se raspó con un escalpelo estéril, se liofilizó y se almacenó a -20°C hasta su empleo.

Tabla IV.1. Aislados de *Fusarium* spp. evaluados mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con las parejas de iniciadores FOCP1 y FOCP2, número de referencia, origen geográfico y clasificación racial

Referencia aislado ^a	Origen Geográfico ^b	Referencia aislado ^c
<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>ciceris</i>		<i>F. acuminatum</i> 11442
Raza 0		<i>F. acutatum</i> 10769
Foc-7802, -7952, -8207, -9032, - 91100	España	<i>F. armeniacum</i> 11623
Foc -9605, -9606	Túnez	<i>F. andiyazi</i> 4647
Foc-cc62R, -cc63K, -cc22C	Israel	<i>F. anthophilum</i> 11560
Raza 1B/C		<i>F. avenaceum</i> 11440
Foc-USA 3-1JG-62, -1987-W-17	EEUU	<i>F. babinda</i> 11478
Foc-9602	Túnez	<i>F. begoniae</i> 10767
Foc-T-96-1-1, -96-1-2, -96-2-1, 96-2-2	Turquía	<i>F. brevicatenulatum</i> 10756
Foc-cc22D	Israel	<i>F. bulbicola</i> 10759
Raza 1A		<i>F. chlamydosporum</i> 11397
Foc-7989	India	<i>F. circinatum</i> 10766, H-10847, H-10850
Foc-9166	Marruecos	<i>F. compactum</i> 11624
Foc-9168		<i>F. concentricum</i> 10765
Foc-8272	España	<i>F. crookwellense</i> 11451
Foc-9027 PV1		<i>F. culmorum</i> 11427
Raza 2		<i>F. decemcellulare</i> 11411
Foc-8605, -1992 R2N	India	<i>F. denticulatum</i> 10763
Raza 3		<i>F. dimerum</i> 11425
Foc-8606, -1992 R3N	India	<i>F. equiseti</i> 11439
Raza 4		<i>F. globosum</i> 11554
Foc-8607, -1992 R4N	India	<i>F. guttiforme</i> 10764
Raza 5		<i>F. lactis</i> 10757
Foc-8012, -8508, -8408	España	<i>F. lateritium</i> 11403
Foc-USA1-1JG62, -USA W6-1	EEUU	<i>F. longipes</i> 11428
Raza 6		<i>F. nelsonii</i> 11564
Foc-8905, -8924	España	<i>F. nisikadoi</i> 10758
Foc-9170, -9164	Marruecos	<i>F. nygamai</i> 5111
Foc-Tonini	EEUU	<i>F. phyllophilum</i> 10768
Foc-9620, -9622, -9628	Israel	<i>F. poae</i> 11470
<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> Fol-325-3	Desconocido	<i>F. polyphialidicum</i> 11414
<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>melonis</i> Fom-9016	Desconocido	<i>F. proliferatum</i> 11558, D-4853, D-4854
<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>niveum</i> Fon-8822	Desconocido	<i>F. pseudoanthophilum</i> 10755
<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>phaseoli</i> Fop-DR85	Desconocido	<i>F. pseudocircinatum</i> 10761
<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>pisi</i>	Desconocido	<i>F. pseudograminearum</i> 11435
Raza 1		<i>F. pseudonygamai</i> 10762
F-22		<i>F. ramigenum</i> 10670
Raza 2		<i>F. sacchari</i> 278, B-3852, B-3853
F-35,-42		<i>F. scirpi</i> 11409
Raza 6		<i>F. semisectum</i> 10670
F-207		<i>F. solani</i> 11420, Fsp4
<i>F. oxysporum</i> no patogénico		<i>F. sporotrichioides</i> 11552
Fo-90101, -90105	España	<i>F. subglutinans</i> 11544, E-990, E-2192
Fo-9169	Marruecos	<i>F. thapsinum</i> F-4093, F-4094
Fo-Fsp7	Argelia	<i>F. torulosum</i> 11419
Fo-506, -526	Italia	<i>F. trincicum</i> 11566
		<i>F. verticillioides</i> 11556, A-149, A-999

^a La raza de los aislados de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* se determinó mediante ensayos de patogenicidad utilizando líneas de garbanzo diferenciadoras en trabajos previos a los ensayos de PCR (Jiménez-Díaz et al., 1993a; Jiménez-Gasco et al., 2001; Kelly et al., 1994).

^b Los aislados de *F. oxysporum* de las ff. spp. *lycopersici*, *melonis*, *niveum*, y *phaseoli* proceden de la colección de aislados fúngicos del Departamento de Protección de Cultivos, Instituto de Agricultura Sostenible (IAS-CSIC), Córdoba, España. El aislado de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* Fol-325-3 fue proporcionado por D. Fravel, United States Department of Agriculture-Agricultural Research Service (USDA-ARS), Vegetable Development Laboratory, Beltsville, M, EEUU. Los aislados de *F. oxysporum* f. sp. *psi* fueron proporcionados por W. Boge, USDA-ARS Pacific West Area, Prosser, WA, EEUU. Los aislados de Argelia, Italia, Marruecos, España, y EEUU (California) proceden la colección de aislados fúngicos del IAS-CSIC. Los aislados de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* de India fueron proporcionados por M. P. Haware, ICRISAT, Hyderabad, India; los de Túnez por M. H. Halila, Institute Nationale de la Recherche Agronomique, Ariana, Túnez; los de Israel por J. Katan, Department of Plant Pathology and Microbiology, The Hebrew University of Jerusalem, Israel; los de Líbano, Siria, y Turquía por C. Akem, ICARDA, Aleppo, Siria. Los aislados de *F. oxysporum* listados como no patogénicos lo son sobre garbanzo. Desconocido = origen geográfico desconocido.

^c Los restantes aislados de *Fusarium* spp. proceden de J. F. Leslie, Department of Plant Pathology, Kansas State University, Manhattan, Kansas, EEUU. El origen geográfico de estos aislados no se proporcionó.

IV.3.2. Material vegetal de garbanzo

En este estudio se utilizaron los cultivares de garbanzo 12071/10054 (PV-1), PV-60, BG-212, P-2245, ICCV-2, UC-15, JG-62, CA-334.20.4, ICC-14216, PV-61, WR-315 y CPS-1. Estos cultivares muestran una reacción de resistencia diferencial a la infección por las distintas razas de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* (Tabla IV.2; Jiménez-Díaz et al., 1993a). Se utilizaron diferentes cultivares y tejidos de garbanzo en cada experimento. Para optimizar el protocolo de qPCR recién desarrollado, el ADN de la planta se extrajo de fragmentos de tallo y raíz muestreados de plantas de 'PV60' después de 30 días creciendo en arena estéril en una cámara de crecimiento ajustada a una temperatura de $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ y a una humedad relativa del 60 al 90% con un fotoperíodo de 14-h de luz blanca fluorescente a una intensidad de $360\ \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Los tejidos muestreados se lavaron bajo agua de grifo, se desinfectaron superficialmente con NaOCl al 2% durante 1,5 min, se secaron entre láminas de papel de filtro estériles, se liofilizaron, se molieron y se almacenaron a -20°C hasta su utilización. Para la evaluación de resistencia utilizando el protocolo de qPCR, el ADN genómico total se extrajo directamente de tejidos congelados de raíz y tallo de los cultivares P-2245 y JG-62 (véase apartado IV.3.3). Para el experimento en campo, se utilizaron

los 12 cultivares de garbanzo referidos anteriormente y el ADN se extrajo de tejido radical liofilizado y molido (véase apartado IV.3.3).

Tabla IV.2. Cultivares y líneas de garbanzo diferenciadores y su reacción a la Fusariosis Vascular (FV) causada por las diferentes razas de *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* (Foc)^a

Cultivar/línea de garbanzo	Raza de Foc y su reacción a la FV ^a							
	0	1A	1B/C	2	3	4	5	6
PV-1	S	M	S	R	R	R	R	R/M ^b
JG-62	R	S	S/M ^b	S	S	S	S	S
CPS-1	R	R	R	S	M	M	M	R
BG-212	R	R	R	S	M	M	R	R
WR-315	R	R	R	R	S	R	R	R
UC-15	R	R	R	— ^c	—	—	R	R
ICCV-2	R	R	R	S	S	S	S	M
ICC-14216K	R	R	R	R	—	—	R	R
CA-334.20.4	R	S	R	—	—	—	R	R
PV-60	R/M	S	S	—	—	—	S	S
PV-61	R/M	S	S	—	—	—	S/M	S
P-2245	S	S	S	S	S	S	S	S

^a La reacción a la enfermedad se evaluó utilizando una escala de severidad de 0–4 basada en el porcentaje de tejido foliar sintomático (0 = 0%, 1 = 1–33%, 2 = 34–66%, 3 = 67–100%, y 4 = planta muerta) al final del experimento (Landa et al., 2006). Valores medios de severidad < 1 y > 3 se consideran reacciones resistentes (R) y susceptibles (S), respectivamente (Landa et al., 2001, 2006). Valores de severidad intermedios (≥ 1 y ≤ 3) se consideran reacciones moderadamente susceptibles (M) (Jiménez-Díaz et al., 1991; Landa et al., 2001, 2006).

^b R/M, S/M indica reacciones diferentes obtenidas en distintos estudios, que se pueden deber a diferentes condiciones medioambientales en cámara de crecimiento o ensayos en campo (Landa et al., 2006) o diferentes entradas de los cultivares o líneas de garbanzo (Sharma y Muehlbauer, 2007; Singh y Saxena, 1996).

^c Reacción desconocida

IV.3.3. Extracción y cuantificación de ADN, y desarrollo de curvas estándar de ADN

El ADN se extrajo de 50 mg de tejido vegetal liofilizado o de 100 mg de tejido fresco (según el experimento), o de 50 mg de micelio del patógeno liofilizado, utilizando el ‘G-Spin™ IIp Plant Genomic DNA extraction kit’ (Intron Biotechnology, Corea) y el sistema Fast-Prep FP-120 (MP biomedical, Illkirch, Francia) según Landa et al. (2007). El ADN se extrajo de muestras de suelo de 250 mg utilizando el sistema Fast-Prep FP-120 a una velocidad de 5,0 m/s durante 40 s combinado con el empleo del ‘MoBio Ultraclean™ soil DNA isolation kit’ (MoBio laboratories, Inc.; Carlsbad, CA, EEUU) según las instrucciones del fabricante.

La calidad del ADN se valoró mediante electroforesis en gel y tinción con bromuro de etidio. Todas las muestras de ADN se cuantificaron con exactitud utilizando el ensayo fluorimétrico Quant-iT DNA Assay Kit Broad Range (Molecular Probes Inc., Leiden, Países Bajos) y un fluoroespectrofotómetro Tecan Safire (Tecan España, Barcelona, España) (Landa et al., 2007). Se puso especial cuidado en la obtención de concentraciones exactas de ADN del huésped y el patógeno cuantificando cada muestra por triplicado y en dos microplacas independientes. Como control interno de cuantificación de ADN, en cada placa de cuantificación se incluyeron muestras de ADN de concentración conocida. El ADN se diluyó con agua estéril ultrapura para obtener una concentración de ADN total que varió de 0 a 10 ng/ μ l.

Las curvas estándar de ADN para los ensayos de qPCR se obtuvieron de diluciones seriadas 10X de ADN del aislado de Foc-9605 de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* (Tabla IV.1). Para este propósito, el ADN del aislado (10 ng/ μ l) se diluyó seriadamente (1:1, 1:10, 1:10², 1:10³, 1:10⁴ y 1:10⁵) en agua estéril ultrapura (A/Foc-9605), así como en un fondo fijo de ADN de la planta (10 ng/ μ l) extraído de tallos (TG/Foc-9605) y raíces (RG/Foc-9605) del cultivar PV-60 o de una mezcla de suelo artificial (S/Foc-9605). Se demostró previamente que la mezcla de suelo artificial no contenía ADN de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* por medio de un ensayo de PCR específica. Cada curva estándar siempre incluyó ADN de la planta o de suelo únicamente y/o ausencia de ADN como controles negativos. Se obtuvieron dos curvas estándar de ADN utilizando fuentes independientes de ADN de patógeno, de suelo y de la planta.

IV.3.4. Diseño de iniciadores y desarrollo del protocolo de PCR específica de *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*

Se diseñaron dos parejas de iniciadores, denominadas FOCP1 y FOCP2, para amplificar específicamente una porción interna de una secuencia SCAR de 1,5-kb específica de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* (AF492451; Jiménez-Gasco y Jiménez-Díaz, 2003) utilizando el programa Bionumerics 6.1 (Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Bélgica) (Tabla IV.3). Se llevó a cabo un test *in silico* de especificidad de iniciadores cotejando las secuencias de los iniciadores frente a la base de datos no redundante del GenBank con parámetros establecidos para la identificación de emparejamientos cortos casi exactos.

Tabla IV.3. Iniciadores^a para PCR diseñados en este estudio para la identificación y cuantificación de todas las razas patogénicas de *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*, sus secuencias y características

Pareja iniciadores	Nombre	Sentido	Secuencia (5'-3')	Temperatura de fusión (°C)	Tamaño del amplicón (pb)
FOCP1	IV-SP	Forward	TACGGTACCAGATCATGGCGT	71	160
	IV-ASP	Reverse	CGCTTTCGATCGTGGCTATG	70	
FOCP2	P3-SP	Forward	CATGGTTTCGTTAGGCCAGT	68	158
	P3-ASP	Reverse	CGCAGTCTTCGTCGTCATTA	68	

^a La utilización de las secuencias descritas para la cuantificación de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* en tejido vegetal y suelo está protegida por una patente española propiedad del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) y la Universidad de Córdoba. N° de solicitud: **P201031615**.

Se ajustaron experimentalmente las condiciones de reacción incluyendo la temperatura de hibridación y las concentraciones de los iniciadores y de MgCl₂ para optimizar la amplificación con cada pareja de iniciadores. Todas las reacciones se repitieron al menos dos veces y siempre se incluyeron controles positivos (ADN de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris*, aislado Foc-9605) y negativos (ADN de otras especies de *Fusarium*, *F. oxysporum* no patogénicos u otras *formae speciales* de *F. oxysporum* y ausencia de ADN molde). Los productos de amplificación se separaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 2% en tampón 1× TAE durante 60-80 min a 80 V, se tiñeron con bromuro de etidio y se visualizaron bajo luz UV. Para la electroforesis se utilizó el marcador de peso molecular Gene-ruler™ DNA ladder mix (Fermentas, St Leon-Rot, Alemania).

IV.3.5. Optimización, reproducibilidad y sensibilidad del protocolo de qPCR recién desarrollado

Para optimizar el protocolo de qPCR se ajustaron experimentalmente las condiciones de reacción (volumen de reacción, temperatura de hibridación, concentración de iniciadores, temperatura de medida de la señal de fluorescencia del amplicón, etc.) empleando ambas parejas de iniciadores y las curvas estándar de ADN A/Foc-9605 y TG/Foc-9605. Todas las amplificaciones de qPCR se realizaron utilizando la mezcla de reacción iQ SYBR Green Supermix, placas de PCR iQ 96-thin well, y láminas de sellado óptico (Bio-Rad, Madrid, España), y el termociclador iCycler IQ (Bio-Rad). Después del ciclo de amplificación final, se obtuvo un perfil de temperatura de la curva de “melting” o fusión calentando hasta 95°C, enfriando a 55°C y calentando lentamente hasta 95°C a intervalos de 0,5°C cada 10 s con medida continua de fluorescencia a 520 nm. Todas las

reacciones se analizaron mediante electroforesis en gel para confirmar que sólo tuvo lugar la amplificación de un producto de PCR de las muestras que contenían ADN genómico de aislados de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* y no se obtenía producto amplificado en los controles negativos.

En diferentes experimentos se valoró también la influencia potencial de la presencia de ADN del huésped y/o su procedencia (tejido de la planta: raíz frente a tallo) así como de ADN extraído del suelo en la eficiencia de las amplificaciones de la qPCR. Para ese propósito, se utilizó sólo la pareja de iniciadores FOCP1, ya que los resultados iniciales indicaron que eran más eficientes proporcionando resultados más reproducibles en comparación con la pareja de iniciadores FOCP2. Para estos experimentos, las comparaciones de fondos de ADN se realizaron en la misma placa de PCR de 96 pocillos. Las amplificaciones de PCR cuantitativa de cada serie de curva estándar de ADN incluyeron tres repeticiones por tratamiento y placa. Todos los experimentos se repitieron dos veces de forma independiente (diferentes placas de PCR, operadores y curvas estándar de ADN) y siempre incluyeron una curva estándar de ADN común para comparar variabilidad entre y dentro de los experimentos. Finalmente, la sensibilidad del protocolo de qPCR se determinó comparando dos series de tres curvas estándar de ADN (A/Foc-9605, RG/Foc-9605 y S/Foc-9605) con el protocolo de PCR simple utilizando los iniciadores FOCP1.

IV.3.6. Evaluación de la resistencia de la planta de garbanzo y de la virulencia de los aislados de *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* utilizando el protocolo de qPCR

Se llevó a cabo un experimento para determinar la utilidad del protocolo de qPCR recién desarrollado para evaluar la resistencia de cultivares de garbanzo a la Fusariosis Vascular. Se utilizaron los aislados Foc-USA W6-1 (raza 5; altamente virulenta) y Foc-7802 (raza 0; menos virulenta) de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* (Landa et al, 2001; Navas-Cortés et al, 2000a). El inóculo de los aislados del patógeno para el experimento se incrementó en una mezcla de arena:harina de maíz:agua (AMA) como se describió previamente (Trapero-Casas y Jiménez-Díaz, 1985). La densidad de inóculo en esa mezcla (número de unidades formadoras de colonias (ufc)/g de AMA infestado) se determinó por el método de dilución en placa utilizando un medio semi-selectivo para *Fusarium* spp. ("Agar-jugo V8-

oxgall-PCNB; VOPA) (Bouhot y Rouxel, 1971). Posteriormente, el AMA infestado se mezcló minuciosamente con una mezcla de suelo (limo/arena/turba, 1:1:1, v/v/v) esterilizada en autoclave (121°C, durante 75 min, dos veces) en la proporción adecuada para obtener una densidad de inóculo de 10^5 ufc/g de suelo.

En este experimento se utilizaron los cultivares de garbanzo P-2245 y JG-62. Estos cultivares muestran reacciones de resistencia diferencial bien caracterizadas a los aislados Foc-USA W6-1 y Foc-7802 de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* (Tabla IV.2; Jiménez-Díaz et al, 1993a). Se sembraron semillas pregerminadas, seleccionadas por su uniformidad (longitud de la radícula= 1 a 2 cm), en macetas de arcilla de 15 cm de diámetro (una planta por maceta), que se rellenaron con la mezcla de suelo infestado y se incubaron en una cámara de crecimiento visitable ajustada a una temperatura de $25\pm 2^\circ\text{C}$ y a una humedad relativa del 60 al 90% con un fotoperiodo de 14-h de luz blanca fluorescente de $360 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ durante 45 días. Se dispusieron 14 plantas de garbanzo por combinación aislado de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris*-cultivar. Para cada combinación, se muestrearon seis plantas para la extracción de ADN a los 15 días después de la siembra. Las ocho plantas restantes se utilizaron para valorar el desarrollo de la enfermedad hasta los 45 días después de la siembra, periodo de tiempo utilizado habitualmente en ensayos de evaluación de resistencia a la Fusariosis Vascular (Landa et al., 2006). Las plantas se extrajeron de las macetas, se lavaron ligeramente bajo agua de grifo, se desinfectaron en NaOCl 2% durante 1,5 min y se secaron entre láminas de papel de filtro. Para cada planta muestreada, se separó el tallo y la raíz, se congelaron en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80°C . El ADN se extrajo de 100 mg de tejidos de la raíz o tallo principales congelados como se ha descrito anteriormente.

Se evaluó la incidencia, *I*, (escala 0-1) y la severidad de síntomas foliares, *S*, (escala de 0 a 4) de cada planta individual a intervalos de 2-3 días (Landa et al., 2001). Valores de severidad media <1 y >3 se consideraron reacciones resistentes (R) y susceptibles (S), respectivamente, y resultados comprendidos entre esos valores (≥ 1 y ≤ 3) se consideraron reacciones moderadamente susceptibles (M) (Landa et al., 2001, 2006).

También se validó la utilización del protocolo de qPCR para cuantificar el ADN de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* en plantas de garbanzo creciendo en condiciones naturales. Para lograr ese objetivo, se extrajo ADN de raíces de los

cultivares de garbanzo PV-1, PV-60, BG-212, P-2245, ICCV-2, UC-15, JG-62, CA-334.20.4, ICC-14216, PV-61, WR-315 y CPS-1 que crecieron en una parcela localizada en la estación experimental del “Campus de Rabanales”, Universidad de Córdoba, España. El suelo de esta parcela (Vertisol, Haploxerets; 50% arcilla, 33% limo, 17% arena; pH 8,6, 1,4% materia orgánica) está infestado con una combinación de diferentes poblaciones de *F. oxysporum* patogénicas y no patogénicas de garbanzo incluyendo las razas 0, 5 y 6 de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* (Landa et al., 2009; S. Garcés-Romay, R.M. Jiménez-Díaz y B. B. Landa, datos *no publicados*). Para cada cultivar se dispusieron tres bloques, cada uno con dos filas de 40 m de largo y espaciadas 25 cm. Las semillas se sembraron a mano a 5 cm de profundidad. Se eliminaron manualmente las malas hierbas de la parcela, y los insecticidas y fertilizantes se aplicaron de acuerdo con las prácticas agrícolas pertinentes. En el inicio de la etapa de floración (aproximadamente 35 días después de la siembra), se seleccionaron dentro de cada fila de forma arbitraria tres plantas sin síntomas de enfermedad, se arrancaron cuidadosamente y se eliminó el exceso de suelo de las raíces sacudiendo ligeramente la planta. Posteriormente, el sistema radical completo de las seis plantas de cada bloque se mezclaron en una bolsa de plástico, se trasladaron al laboratorio y se almacenaron a 4°C hasta su utilización. El ADN se extrajo de 50 mg de raíces de garbanzo liofilizadas como se describió anteriormente. En este experimento, se utilizaron raíces liofilizadas en lugar de congeladas en fresco para incrementar la uniformidad de las muestras procesadas. En trabajos previos, no se encontraron diferencias significativas en el resultado de la amplificación mediante qPCR cuando el fondo de ADN de la planta extraído procedía de tejidos radicales frescos o liofilizados (*datos no mostrados*). Después del muestreo de plantas asintomáticas, se valoró la reacción de enfermedad de los 12 cultivares de garbanzo en la parcela, mediante la evaluación de la incidencia de plantas con síntomas y muertas por Fusariosis Vascular a intervalos de 10-15 días durante el periodo completo de crecimiento del cultivo.

La cantidad de ADN de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* en muestras de raíz y tallo se estimó utilizando las condiciones de qPCR optimizadas, la curva estándar RG/Foc-9605 (diluciones seriadas de ADN de Foc-9605 en un fondo fijo de ADN de raíz de garbanzo de 10 ng/μl) y seis plantas. El ensayo de qPCR se repitió dos veces para cada muestra.

IV.3.7. Cuantificación de *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* en suelo mediante el protocolo de qPCR

Para llevar a cabo la inoculación artificial del suelo, el inóculo de los aislados Foc-7802 y Foc-USA W6-1 de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* se incrementó en matraces conteniendo 100 ml de caldo de patata-dextrosa (CPD) (Laboratorios Difco) como se ha descrito previamente (Landa et al., 2004b). Los cultivos líquidos se filtraron a través de ocho capas de gasa estéril, se separaron las conidias mediante centrifugación (10.000 x g durante 10 min) y se lavaron dos veces con agua destilada estéril para eliminar las trazas de nutrientes. La concentración de inóculo (principalmente microconidias) en la suspensión se estimó utilizando un hemocitómetro y se ajustó a 2×10^4 ufc/ml con agua estéril ultrapura. Un suelo natural (Entisol, Xerofluvents; 27% arcilla, 9,3% limo y 63,8% arena; pH 7,4, 1,9% materia orgánica) en el que previamente se había comprobado la ausencia de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris*, se pasteurizó a 74°C durante 30 min, se secó a temperatura ambiente (24 a 28°C) durante una semana y se tamizó con una malla de 1x1 cm. Posteriormente, 10 ml de la suspensión de microconidias (2×10^4 ufc/ml) de cada aislado se mezclaron minuciosamente con 100 g de suelo en una bolsa de plástico para obtener aproximadamente 2×10^3 ufc/g de suelo. El suelo infestado se secó a temperatura ambiente y se almacenó a 4°C durante 5 meses antes de su utilización. Además, se utilizó una muestra de suelo naturalmente infestado de la parcela localizada en el “Campus de Rabanales”. El suelo se secó y se tamizó como se ha descrito anteriormente previo a la extracción de ADN.

El número de propágulos de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* en las muestras de suelo natural y artificialmente infestadas se determinó, al mismo tiempo que la extracción de ADN, mediante dilución en placa disponiendo seis repeticiones de 1 g de suelo cada una como se ha descrito previamente (Landa et al., 2004b). Se dispensaron diluciones seriadas de las suspensiones de suelo en placas de petri con medio VOPA semi-selectivo para *Fusarium* spp. y se incubaron a una temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$ con un fotoperiodo de 12-h de una mezcla de luz blanca fluorescente y cercana al UV de $36 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ durante 5 días. Se dispusieron dos repeticiones por dilución y repetición de cada tipo de suelo. A los 5 días de incubación se estimó el número total de ufc de *Fusarium* spp. (suelo natural) y *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* (suelo artificialmente infestado). Posteriormente, se seleccionaron al azar en las placas con muestras de suelo naturalmente infestado

aproximadamente el 10% de colonias con morfología similar a *F. oxysporum* bajo observación microscópica y se transfirieron a APD. El ADN de los putativos aislados de *F. oxysporum* se obtuvo como se ha descrito anteriormente y se utilizó para llevar a cabo ensayos de PCR simple con la pareja de iniciadores FOCP1 específica para *F. oxysporum* f. sp. *ciceris*.

La cantidad de ADN de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* en las muestras de suelo se estimó utilizando las condiciones de qPCR optimizadas y la curva estándar S/Foc-9605 (diluciones seriadas de ADN de Foc-9605 en un fondo fijo de ADN extraído de suelo de 10 ng/μl). Se llevaron a cabo seis repeticiones de cada muestra por tipo de suelo y dos reacciones de qPCR por muestra.

IV.3.8. Análisis de datos

Los valores del ciclo umbral (C_T) para cada reacción de qPCR se calcularon determinando el número de ciclo de PCR al cual la señal de fluorescencia excedía la del valor umbral utilizando los criterios de estimación por defecto en el programa iCycler IQ version 3.0a (Bio-Rad). Posteriormente, para comparar y establecer relaciones entre las diferentes curvas estándar de ADN generadas a partir de diferentes tratamientos, la posición umbral se definió manualmente y con el mismo valor para todos los tratamientos y experimentos (Vaerman et al., 2004). La eficiencia de amplificación (EA) se calculó a partir de las pendientes de las curvas estándar utilizando la ecuación $EA = 10^{(1/pendiente)} - 1$ (Adams, 2006; Higuchi et al., 1993).

Posteriormente, se realizaron análisis de regresión lineal del logaritmo en base 10 de concentraciones conocidas del ADN diana frente a los valores C_T para cada curva estándar utilizando el módulo GLM de SAS (Statistical Analysis System, version 9.1; SAS Institute, Cary, NC, EEUU). Las rectas de regresión estándar de cada placa seleccionadas como curvas de referencia se utilizaron para transformar los valores C_T experimentales en cantidades de ADN del patógeno (ng). Todas las rectas de regresión obtenidas para los diferentes fondos de ADN de la planta se compararon estadísticamente para la homogeneidad ($P \geq 0,05$) de varianza (Test de Bartlett) y para la igualdad de pendientes y ordenadas en el origen mediante el test F a $P < 0,05$. Los datos de población de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* se expresaron como log (ufc/g de suelo) para satisfacer las condiciones del test estadístico paramétrico utilizado. Las diferencias en la concentración de *F. oxysporum* f. sp.

ciceris entre los cultivares de garbanzo y las razas del patógeno se determinó mediante un análisis de varianza estándar y las medias de cada tratamiento se compararon de acuerdo al Contraste de la Mínima Diferencia Significativa protegido de Fisher a $P < 0,05$ empleando el módulo GLM de SAS. Finalmente, se llevó a cabo un análisis de regresión lineal para determinar la relación entre la concentración de inóculo de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* en las raíces de los diferentes cultivares de garbanzo y la incidencia de enfermedad final utilizando el módulo GLM de SAS.

IV.4. RESULTADOS

IV.4.1. Diseño de un nuevo protocolo de PCR específica para *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*

Las parejas de iniciadores FOCP1 y FOCP2 mostraron su idoneidad para la identificación específica de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris*. Estos iniciadores se diseñaron a partir de una secuencia SCAR ya disponible para esta *forma specialis* (AF492451; Jiménez-Gasco y Jiménez-Díaz, 2003). En primer lugar, para cada pareja de iniciadores se comprobó la ausencia de homología con las secuencias depositadas en la base de datos del GenBank. Posteriormente, se evaluaron diferentes parámetros en el protocolo de PCR para optimizar las condiciones de amplificación. En la Tabla IV.3 se presenta la denominación de los iniciadores desarrollados, su secuencia y el tamaño de los productos de PCR que amplifican con las condiciones de amplificación optimizadas. La mezcla de reacción optimizada fue similar para ambos iniciadores (volumen final de 20 μ l): 2,0 μ l de 10 \times tampón de reacción [160mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 670mM Tris-HCl (pH 8,8 a 25°C), 0,1% estabilizador] (Bioline, Londres, Reino Unido), 0,35 μ M de cada iniciador, 200 μ M de cada dNTP, 1 unidad de *BioTaq* ADN Polimerasa (Bioline), 1,5 mM MgCl_2 , y 1 μ l de ADN molde (20 a 40 ng de ADN). Las reacciones de amplificación se llevaron a cabo en un termociclador C1000 (Bio-Rad) con las condiciones de amplificación: desnaturalización durante 1 min a 94°C, seguido de 25 ciclos de 30 s de desnaturalización a 94°C, 30 s a una temperatura de hibridación de 55°C y 30 s de extensión a 72°C. El ciclo final consistió en 5 min a 72°C seguido de enfriamiento a 4°C.

En ensayos de PCR simple utilizando las parejas de iniciadores FOCP1 y FOCP2 y ADN genómico de 42 aislados de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* representativos de las razas 0, 1A, 1B/C, 2, 3, 4, 5 y 6, y de un amplio rango geográfico, se obtuvo la amplificación de un único producto de 160 y 158 pb, respectivamente (Fig. IV.1; Tabla IV.1). Ocasionalmente, se observaron algunos dímeros con la pareja de iniciadores FOCP2 (Fig. IV.1). No amplificaron ninguno de estos productos específicos cuando se utilizó ADN de aislados no patogénicos de *F. oxysporum* (siete), de otras ff. spp. de *F. oxysporum* (ocho), o de otras especies de *Fusarium* spp. (59) como ADN molde en los ensayos de PCR específica con las parejas de iniciadores FOCP1 y FOCP2 (Fig. IV.2; sólo se presentan los resultados para el iniciador FOCP1).

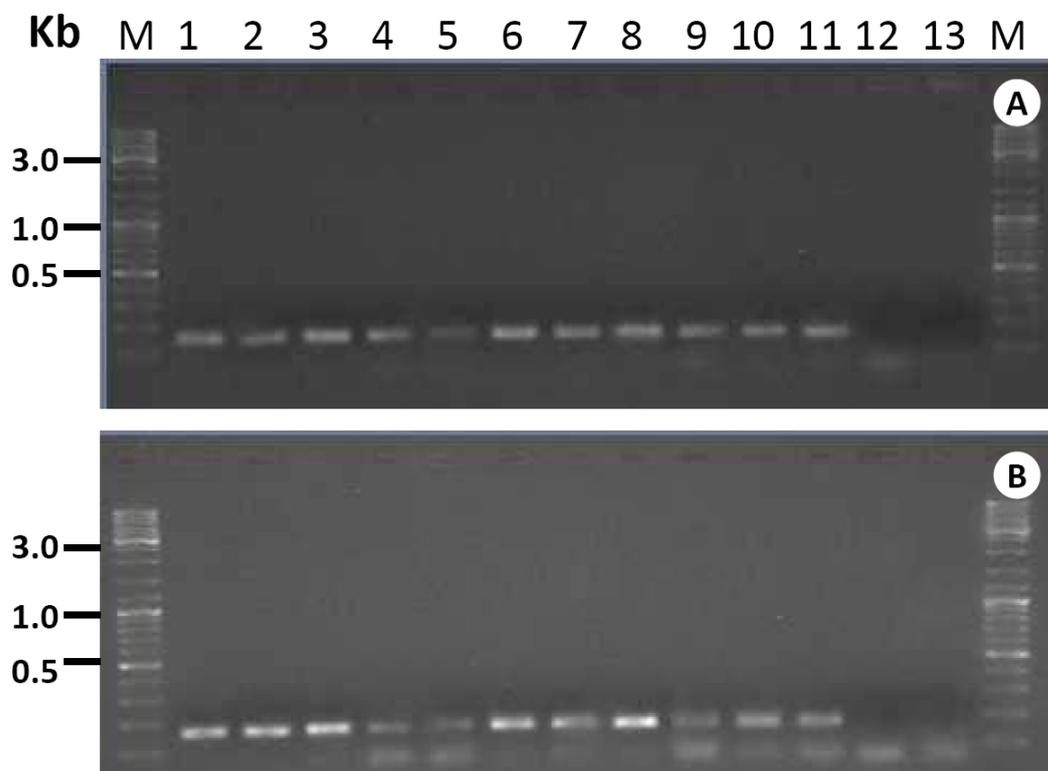


Figura IV.1. Geles de agarosa mostrando los productos de amplificación de reacciones en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando las parejas de iniciadores (A) FOCP1 o (B) FOCP2 y ADN genómico de aislados de *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*. M, Marcador de peso molecular Generuler™ DNA (Fermentas, St Leon-Rot, Alemania). Carriles 1 a 11, aislados *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* Foc-cc62R y Foc-9032 (Raza 0), Foc-cc-22D (Raza 1B/C), Foc-9166 y Foc-9027 PV1 (Raza 1A), Foc-8605 (Raza 2), Foc-8606 (Raza 3), Foc-8607 (Raza 4), Foc-8508 y Foc-USA 1-1 JG-62 (Raza 5), y Foc-8924 (Raza 6); carril 12, ADN de garbanzo, y carril 13, control negativo (agua), respectivamente.

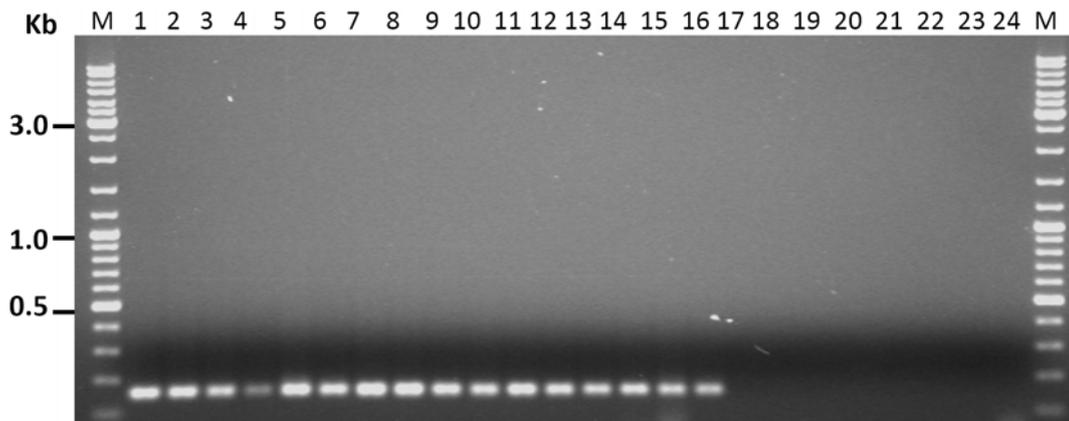


Figura IV.2. Gel de agarosa representativo mostrando los productos de amplificación de reacciones en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando la pareja de iniciadores FOCP1. M, Marcador de peso molecular Gene-ruler™ DNA (Fermentas, St Leon-Rot, Alemania). Carriles 1 a 16, aislados *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* Foc-7802 y Foc-9605 (Raza 0), Foc-1987-W-17 y Foc-9602 (Raza 1B/C), Foc-7989 y Foc-8272 (Raza 1A), Foc-1992 R2N y Foc-8605 (Raza 2), Foc-1992 R3N y Foc-8606 (Raza 3), Foc-1992 R4N y Foc-8607 (Raza 4), Foc-8012 y Foc-USA W6-1 (Raza 5), y Foc-8905 y Foc-KC1 (Raza 6); carril 17, *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* Fol-325-3, carril 18, *F. oxysporum* f. sp. *melonis* Fom-9616, carril 19, *F. oxysporum* f. sp. *pisi* F-42, carril 20, *F. oxysporum* f. sp. *niveum* Fon-8822, carril 21, *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli* Fop-DR85, carril 22, *F. oxysporum* Fo-90101, carril 23, *F. culmorum* 11427, carril 24, *F. nisikadoi* 10758.

IV.4.2. Optimización del protocolo de qPCR específica para *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*

Posteriormente se llevó a cabo un proceso de puesta a punto preciso para cada una de las parejas de iniciadores FOCP1 y FOCP2 que incluyó los siguientes parámetros de PCR: concentración del iniciador, temperatura de hibridación y volumen final de las reacciones de PCR. Para ello, se utilizaron las curvas estándar de ADN A/Foc-9605, y TG/Foc-9605. La reducción del volumen estándar de la reacción de 50 a 20 μ l no modificó la precisión del ensayo (*datos no mostrados*); en consecuencia, se seleccionó un volumen final de 20 μ l para minimizar el coste por ensayo de qPCR.

La mezcla de reacción de PCR optimizada consistió para un volumen final de 20 μ l en: 1 μ l of ADN muestra, 1 \times iQ SYBR Green Supermix (Bio-Rad), y 0,3 μ M de cada iniciador. Las condiciones de amplificación consistieron en una desnaturalización inicial a 95°C de 1 min seguida por 40 ciclos de 30 s a 95°C, 30 s a 55°C, y 30 s a 72°C. La fluorescencia emitida por el amplicón diana se detectó a 72°C. Ocasionalmente, se observaron picos débiles entre 72-75°C en la curva de “melting”, especialmente para la pareja de iniciadores FOCP2. Esto se debió a la

presencia de dímeros del iniciador ya que estas amplificaciones inespecíficas no se detectaron por electroforesis en gel de agarosa al 1,2 % (peso/vol) (*datos no mostrados*). No se observó señal de fluorescencia en los controles negativos utilizando agua o ADN extraído de los tejidos de garbanzo. Para todos los experimentos se fijó un valor umbral de 200 Unidades Relativas de Fluorescencia (URF) para determinar los valores de C_T .

Aunque el empleo de ambas parejas de iniciadores dio lugar a amplificaciones altamente reproducibles, las rectas de regresión estándar obtenidas para la pareja de iniciadores FOCP1 indicaron una reproducibilidad ligeramente superior, mejor eficiencia de amplificación (EA) y mayores valores del coeficiente de determinación (EA=93,9-102,6%; $R^2=0,991-0,999$) en comparación con los valores obtenidos para la pareja de iniciadores FOCP2 (EA=81,7-104,9%; $R^2=0,989-0,998$). En consecuencia, se seleccionó la pareja de iniciadores FOCP1 para los experimentos posteriores.

Tras la optimización del protocolo de qPCR, se generaron rectas de regresión estándar para cada curva estándar de ADN utilizando un rango de ADN de 10 ng a 0,1 pg. La utilización del protocolo de qPCR con curvas estándar de ADN construidas de forma independiente o por diferentes operadores, no influyó en la reproducibilidad y consistencia de los resultados (*datos no mostrados*). Se obtuvo una alta reproducibilidad en las amplificaciones con una alta eficiencia a lo largo de cinco órdenes de magnitud de concentración de ADN, con un rango lineal de amplificación. Sin embargo, no se pudo cuantificar con exactitud el ADN de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* a una concentración de 0,1 pg, tanto si éste estaba diluido en un fondo de agua como en un fondo de ADN extraído de tejidos de tallo o raíz de plantas de garbanzo, o de suelo; esto es, se obtuvo un valor de C_T de $34,5 \pm 2$ o ausencia de amplificación (Tabla IV.4). En consecuencia, el límite de detección del protocolo de qPCR se fijó en una concentración de ADN de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* de 0,1 pg o un valor de C_T de 35 ciclos.

Tabla IV.4. Ecuaciones de regresión lineal de las curvas de ADN^a de *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* diluido en diferentes fondos de ADN, estadísticos asociados a la comparación de pendientes y ordenadas en el origen y sensibilidad de los iniciadores específicos de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* utilizados en ensayos de PCR convencional o cuantitativa (qPCR)

ADN de fondo	Parámetros de la regresión ^b				Sensibilidad de la PCR	
	Ordenada en el origen	Pendiente	EA (%)	R ²	Convencional (ng)	Cuantitativa (ng; C _T)
Agua	21,75	-3,463	94,43	0,993	1	0,001; 32,44±0,64
Tallo	22,40	-3,261	102,60	0,995	1	0,001; 31,60±0,35
Raíz	22,07	-3,439	95,34	0,991	1	0,001; 32,43±0,73
Suelo	22,01	-3,477	93,91	0,996	1	0,001; 31,80±0,40
Valor de P	0,097	0,2556				

^a Las curvas estándar de ADN se obtuvieron mediante dilución seriada 10X de ADN de Foc-9605 (10 ng/μl) de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* para obtener de 10 ng a 0,1 pg de ADN por reacción PCR diluido en agua destilada estéril o en ADN extraído de raíces o tallo de garbanzo (10 ng ADN de fondo) o de una muestra de mezcla de suelo artificial (10 ng ADN de fondo) para determinar la influencia del ADN del huésped o del suelo en la sensibilidad de las reacciones PCR. Los valores mostrados en los ensayos de qPCR corresponden a la media de 12 valores de C_T ± desviación estándar obtenidos a partir de dos curvas de ADN estándar independientes, cada una llevada a cabo por operadores independientes y dos repeticiones en cada placa PCR.

^b Los parámetros de las ecuaciones de regresión se compararon estadísticamente para homogeneidad ($P \geq 0.05$) de varianzas (Test de Bartlett) y para igualdad de pendientes y de ordenadas en el origen utilizando un test F a $P = 0,05$.

^c La eficiencia de amplificación (EA) se calculó a partir de las pendientes de las curvas estándar utilizando la ecuación $AE = 10^{(1/\text{pendiente})} - 1$ (Adams, 2006; Higuchi et al., 1993).

El análisis de los valores de C_T obtenidos para las diferentes curvas de ADN estándar A/Foc-9605, RG/Foc-9605, TG/Foc-9605 y S/Foc-9605 indicó homogeneidad de las varianzas entre los diferentes tratamientos ($P \geq 0,05$). El origen del fondo de ADN (agua vs. raíz o tallo o suelo) no modificó los resultados de los ensayos de qPCR (Fig. IV.4). Así, la comparación estadística de los parámetros de las cuatro rectas de regresión estándar indicó la ausencia de diferencias significativas entre las ordenadas en el origen ($P = 0,0970$) o pendientes ($P = 0,2556$) (Tabla IV.4). Puesto que la utilización de fondos de ADN de diferentes tejidos del huésped o extraído de suelo no influyó en la reproducibilidad y eficiencia de los protocolos, se seleccionó la curva de ADN estándar RG/Foc-9605 para estimar la cantidad de ADN de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* en tejidos de la planta naturalmente infectados por el patógeno, y la curva de ADN estándar

S/Foc-9605 para estimar la cantidad de ADN patógeno en suelos natural o artificialmente infestados.

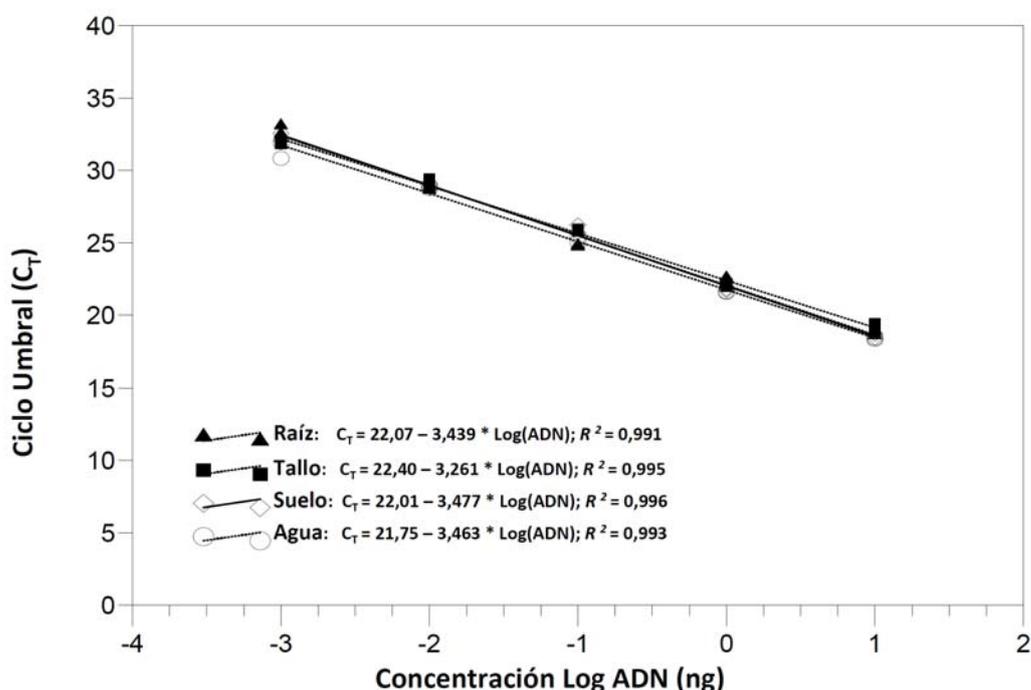


Figura IV.3. Rectas de regresión estándar de una dilución en serie 10X de ADN de *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* (Foc-9605) (10 ng/μl) diluido en agua ultrapura estéril (Series “Agua”) o en ADN (10 ng) extraído a partir de fragmentos de tallo o raíz de garbanzo o de suelo (10 ng). Los valores de ciclo umbral (C_T) se representaron frente el logaritmo de ADN genómico de las curvas estándar de concentración conocida.

IV.4.3. Utilización del protocolo de qPCR desarrollado para la evaluación de resistencia de cultivares de garbanzo y estudios de biología de poblaciones de *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*

No se observaron síntomas de Fusariosis Vascular en plantas de garbanzo del cultivar JG62 resistente, ni del cultivar P-2245 susceptible, inoculadas con la raza 0 (menos virulenta), cuando éstas se muestrearon a los 15 días después de la siembra (dds) en el suelo artificialmente infestado. Por el contrario, en ese mismo periodo, las plantas inoculadas con la raza 5 (más virulenta) mostraron una incidencia de enfermedad en ‘JG62’ y ‘P-2245’ del 33,3 y 54,3%, respectivamente. No obstante, la severidad media de síntomas de la enfermedad alcanzada fue muy baja ($S < 0,5$, en una escala 0 a 4) (Fig. IV.4C). Al final del experimento, 45 dds, todas las plantas de las combinaciones compatibles (‘P-2245’/raza 0, ‘P-2245’/raza 5 y ‘JG-62’/raza 5) murieron como consecuencia de la infección ($S=4$).

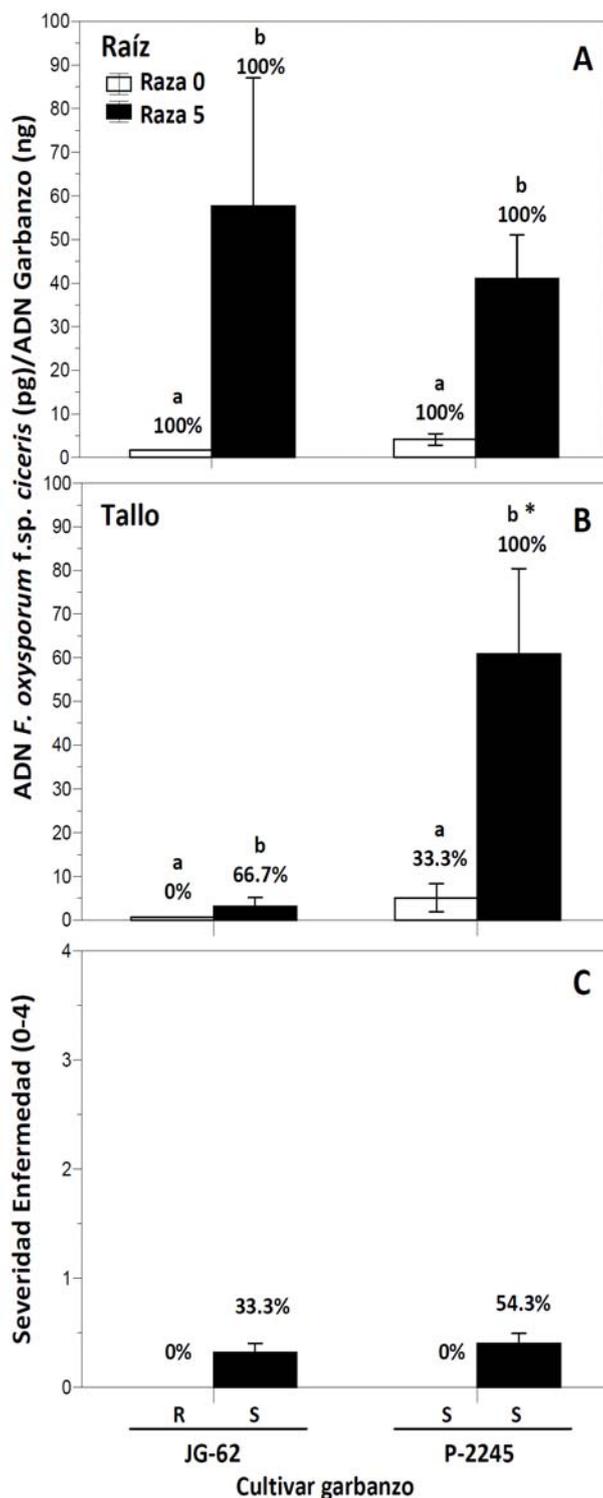


Figura. IV.4. Cantidad de ADN de *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* y reacción de enfermedad (valores medios \pm desviación estándar) de los cultivares de garbanzo JG-62 y P-2245 presentando resistencia diferencial a las razas 0 y 5 de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* (R: Resistente; S: Susceptible). Las plantas crecieron en suelo artificialmente infestado con dichas razas bajo condiciones de ambiente controlado durante 15 días. La cantidad de ADN del patógeno en la raíz (A) o el tallo (B) se estimó mediante un protocolo de PCR cuantitativa específica de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris*. Los porcentajes mostrados sobre las barras corresponden al número de muestras que presentaron amplificación positiva en el ensayo de qPCR. (C) Valor de severidad de la reacción de enfermedad (S, escala 0-4). Los porcentajes mostrados sobre las barras corresponden a la incidencia de plantas mostrando síntomas de Fusariosis Vascular. Barras con letras diferentes indican diferencias significativas ($P < 0,05$) entre la cantidad de cada raza detectada en el mismo cultivar. El asterisco (*) indica diferencias significativas ($P < 0,05$) entre cultivares para la misma raza del patógeno.

La utilización del protocolo de qPCR desarrollado permitió la detección de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* en todas las muestras de raíz de todas las plantas independientemente de la combinación raza-cultivar a los 15 dds en un suelo infestado. Sin embargo, las cantidades de ADN del patógeno estimadas en la raíz para las combinaciones más compatibles (cultivar altamente susceptible/raza altamente virulenta; 'P-2245'/raza 5 y 'JG-62'/raza 5) fue significativamente ($P=0,0002$) superior comparada tanto con la estimada para la combinación incompatible ('JG-62'/raza 0), como en la menos compatible ('P-2245'/raza 0) (Fig. IV.4A). En cambio, no se observaron diferencias significativas ($P=0,2017$) en la concentración de ADN del patógeno estimada en la raíz de los dos cultivares de garbanzo para las dos razas a los 15 dds en suelo infestado (Fig. IV.4A).

No se detectó el patógeno en muestras de ADN extraído de tallos de garbanzo de la combinación incompatible ('JG-62'/raza 0), pero logró detectarse en el 33,3% de las muestras de tallo del cultivar 'P-2245' inoculado con la raza 0 (Fig. IV.4B). Sin embargo, se detectaron cantidades del patógeno significativamente ($P=0,0083$) mayores y en un mayor porcentaje de muestras de tallo de las combinaciones más compatibles ('P-2245'/raza 5 y 'JG-62'/raza 5); siendo la cantidad de ADN de la raza 5 detectada en el tallo en 'P2245' significativamente mayor ($P=0,0006$) que la detectada en 'JG-62' (Fig. IV.4B).

La utilización del protocolo de qPCR desarrollado permitió la detección de ADN de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* en el 100% de las muestras de raíz de los tres cultivares de garbanzo (PV-61, P-2245 y PV-60) sembrados en la parcela experimental infestada utilizada en el estudio y que son susceptibles a las razas del patógeno que están presentes en este suelo (0, 5 y 6). De forma similar, tuvo lugar la detección positiva en el 100% de las muestras de raíz de 'PV-1' y 'JG-62' que son, respectivamente, susceptibles a las razas 0 y 6, y susceptible a la raza 5. También hubo una detección positiva en el 83,3% de muestras de raíz de 'ICCV-2', que es resistente a la raza 0 pero susceptible a las razas 5 y 6, y sólo una detección del 41,7% de las muestras de raíz de 'CPS-1', que es moderadamente susceptible a la raza 5 pero resistente a las razas 0 y 6 (Fig. IV.5). La cantidad relativa de ADN de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* en muestras de raíz de cultivares de garbanzo susceptibles a las razas 0, 5 y 6 varió significativamente ($P<0,0001$) entre cultivares, oscilando entre 2,1 pg en el cv. ICCV-2 y 102,1 pg en el cv. P-2245 (Fig. IV.5). Por otro lado, los valores de incidencia final de plantas muertas por la

enfermedad estuvo positiva y significativamente correlacionada ($r=0,8722$; $P=0,0235$) con la cantidad de ADN del patógeno estimada 35 días después de la siembra, antes del inicio del desarrollo de síntomas de Fusariosis Vascular (Fig. IV.5). Estos resultados demuestran la utilidad del protocolo de qPCR para la predicción de la reacción de resistencia/susceptibilidad de cultivares de garbanzo a la Fusariosis Vascular en condiciones de campo. Es de destacar además, que el patógeno se pudo cuantificar en el 25 al 66,7% de las muestras del resto de cultivares de garbanzo en el experimento, excepto para los cultivares BG-212 y WR-315, los cuales son resistentes a las razas 0, 5 y 6 de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* que infestan el suelo de la parcela, aunque en estos cultivares los valores de C_T fueron próximos a los establecidos como límite de detección $C_T=35$ (32,6-34,0) (Fig. IV.5).

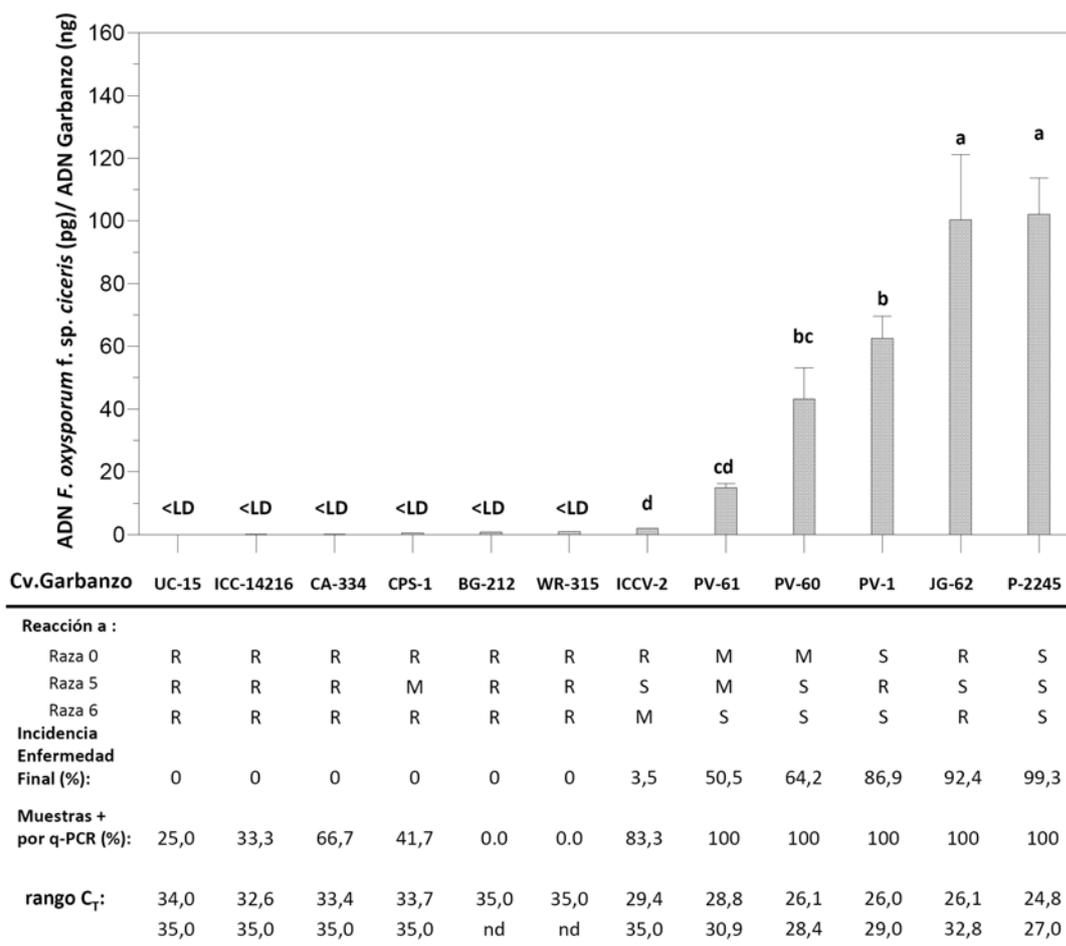


Figura IV.5. Cantidad de ADN de *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* (valores medios ± desviación estándar) en la raíz de 12 cultivares de garbanzo estimada mediante un protocolo de PCR cuantitativa específica de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* a los 35 días después de la siembra (dds) en una parcela infestada con las razas 0, 5 y 6 de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris*. Para cada cultivar de garbanzo se indica: la reacción a las razas 0, 5 y 6 (R: Resistente; M: Moderadamente susceptible; S: Susceptible); la incidencia final de enfermedad estimada por el porcentaje de plantas muertas a los 85 dds; el porcentaje de muestras amplificadas mediante el protocolo de qPCR; y los valores de ciclo umbral (C_T). Barras con letras diferentes indican diferencias significativas (P<0,05) en la cantidad de ADN de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* detectada mediante el protocolo qPCR. nd= no detectado. LD= Límite de Detección, i.e., muestras con valores de C_T próximos o por encima a 35 ciclos.

IV.4.4. Cuantificación de *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* en suelo mediante qPCR

La siembra de suelo artificialmente infestado con los aislados Foc-7802 y Foc-USA W6-1 de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* sobre medio VOPA indicó una densidad media de población de $4,96 \times 10^3$ y $2,98 \times 10^3$ ufc/g de suelo, respectivamente. Las densidades de poblaciones indígenas de *Fusarium* spp. y de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* en el suelo naturalmente infestado procedente del “Campus de Rabanales” se estimaron en $8,92 \times 10^2$ y 44,5 ufc/g de suelo, respectivamente (Fig. IV.6). Las colonias de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* representaron menos del 5% del total de colonias de *Fusarium* spp. en esta parcela. Además de dar lugar a una densidad de población menor, las muestras de suelo naturalmente infestado mostraron una mayor variabilidad experimental entre repeticiones en comparación con la observada en los suelos artificialmente infestados.

La utilización del protocolo de qPCR permitió la detección de ADN de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* en el 100% de las muestras (seis extracciones de ADN independientes) tomadas del suelo artificialmente infestado, alcanzando $692,6 \pm 149,4$ y $10,7 \pm 5,6$ pg ADN/g de suelo seco para Foc-7802 y Foc-USA W6-1, respectivamente (Fig. IV.6), indicando una diferente capacidad de supervivencia de estos dos aislados tras permanecer el suelo infestado almacenado durante 5 meses a 4°C. Por el contrario, sólo se pudo cuantificar ADN de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* en el 66,7% de las seis extracciones de ADN independientes en el suelo naturalmente infestado “Campus de Rabanales”. La cantidad de ADN de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* en el suelo fue variable, y osciló entre 2,7 a 9,4 pg ADN/g de suelo (Fig. IV.6).

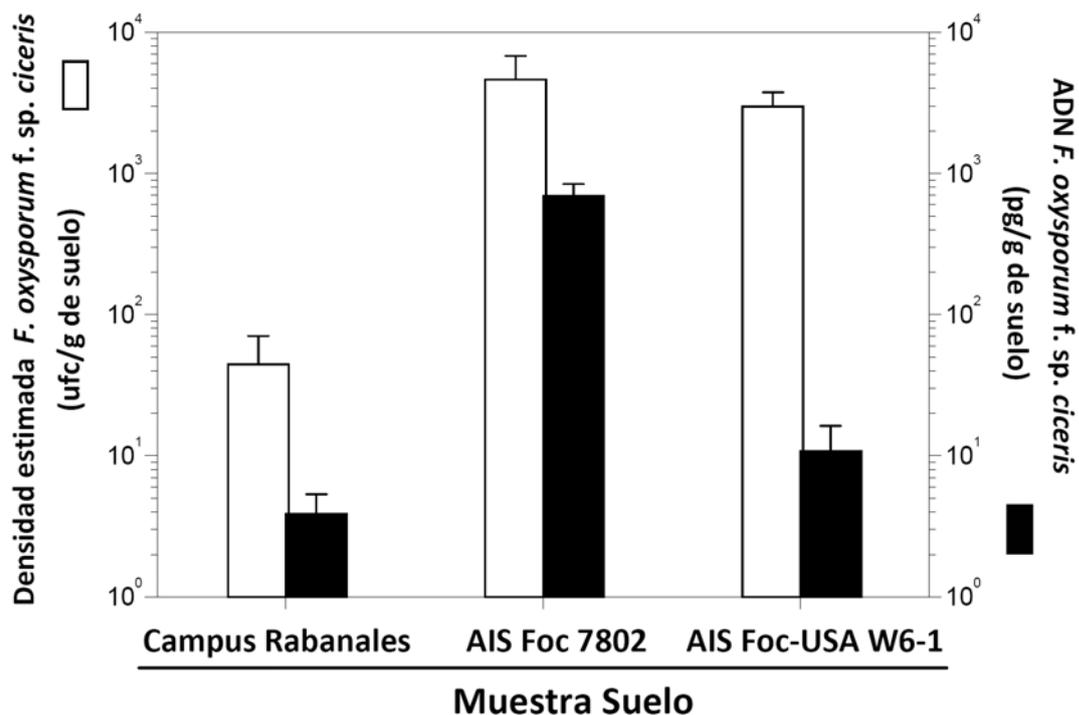


Figura IV.6. Concentraciones de ADN de *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* estimadas mediante el protocolo de PCR cuantitativa específica de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* comparadas con el número de unidades formadoras de colonia (ufc) de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris*/g de suelo presentes en un suelo artificialmente infestado (AIS) o en un suelo naturalmente infestado “Campus de Rabanales”. El suelo infestado artificialmente se inoculó con una suspensión de conidias de Foc-7802 y Foc-USA W6-1 para alcanzar aproximadamente 2×10^3 conidias/g de suelo, se secó al aire y se mantuvo a 4°C durante 5 meses antes de estimar la concentración de inóculo. Los valores de ufc de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* se estimaron mediante dilución en placa en un medio semiselectivo de *Fusarium* spp. y posterior análisis del 10% de las colonias de *F. oxysporum* mediante un protocolo de PCR específica de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* con la pareja de iniciadores FOCP1.

IV.5. DISCUSIÓN

En el presente Capítulo de esta Tesis Doctoral se desarrolló un protocolo de PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR) utilizando cualesquiera de dos parejas de iniciadores diseñados que permiten la identificación y cuantificación de todas las razas patogénicas conocidas de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* en suelo y en tejidos vegetales de garbanzo. Estos iniciadores son internos a la secuencia amplificada por aquéllos diseñados por Jiménez-Gasco y Jiménez-Díaz (2003) en un protocolo de PCR convencional con un límite de detección de 0,1 ng, utilizando ADN extraído de micelio de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris*. Nuestros resultados demostraron que las dos nuevas parejas de iniciadores diferenciaban inequívocamente *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* de otras *formae speciales* de *F. oxysporum*, de aislados no patogénicos de *F. oxysporum* y otros *Fusarium* spp. reproduciendo la especificidad descrita por Jiménez-Gasco y Jiménez-Díaz (2003), pero con la diferencia de que las nuevas parejas de iniciadores permitían la detección y cuantificación en suelo y en planta. Este protocolo de qPCR recién desarrollado puede ser particularmente útil para discriminar *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* tanto de aislados de *F. oxysporum* no patogénicos como del resto de *Fusarium* spp. con morfología similar a *F. oxysporum*. Tales *Fusarium* spp. son frecuentemente aislados de plantas con síntomas similares a los de Fusariosis Vascular, pero afectadas por infecciones virales o estreses abióticos, o incluso a partir de plantas severamente afectadas de Fusariosis Vascular (Alves-Santos et al., 1999, Kaiser et al., 1993; Trapero-Casas y Jiménez-Díaz, 1985; R.M. Jiménez-Díaz y B.B. Landa, *datos no publicados*; Capítulo II de la presente Tesis Doctoral).

Nuestros resultados indicaron que la sensibilidad del ensayo desarrollado no se vio afectada por la procedencia del ADN utilizado como han descrito otros investigadores para otros protocolos de PCR convencional o cuantitativa para la detección de *formae speciales* de *F. oxysporum* de plantas o suelo (García-Pedrajas et al., 1999; Kelly et al., 1998; Mbofung y Pryor, 2010; Pasquali et al., 2006). Este protocolo nos permitió detectar y cuantificar con facilidad *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* en raíces y tallos de plantas de garbanzo naturalmente infectadas y suelo naturalmente infestado. La eficiencia de amplificación, sensibilidad y reproducibilidad de nuestros ensayos no se vieron influenciadas por la presencia de otras fuentes de ADN no diana. Fuimos capaces de detectar hasta 1 pg de ADN de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* extraído tanto de suelo como de tejidos

vegetales sin perder exactitud. Límites de detección similares se han encontrado en otros protocolos de qPCR utilizados para la detección y cuantificación tanto en planta como en suelo de otros hongos patógenos vasculares, incluyendo diferentes especies de *Fusarium* u otras *formae speciales* de *F. oxysporum* (Atallah et al., 2007; Filion et al., 2003; Lievens et al., 2007; Pasquali et al., 2004, 2006; Schena et al., 2006; Valsesia et al., 2005; Zambounis et al., 2007; Zhang et al., 2005). Sin embargo, en esos estudios no se indicó la potencial interferencia en el ensayo de qPCR de la presencia de un fondo de ADN procedente de los tejidos de la planta huésped o del suelo (Filion et al., 2003; Pasquali et al., 2004; Zambounis et al., 2007) o si esto se consideró, no mostró efecto (Atallah et al., 2007; Lievens et al., 2007; Valsesia et al., 2005; Zhang et al., 2005) o en algún caso redujo la eficiencia, precisión y límite de detección de las amplificaciones (Pasquali et al., 2006; Schena et al., 2006). Es de destacar que a pesar de tener límites de detección similares, en todos los protocolos anteriormente referidos la secuencia diana de las reacciones de qPCR estaba dentro del ADN ribosomal que se presenta en multicopias (Judelson y Randall, 1998); mientras que la secuencia diana específica SCAR (AF492451) que utilizamos en nuestro protocolo se presenta en copia simple en el genoma de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* (Jiménez-Gasco y Jiménez-Díaz, 2003).

Actualmente, la técnica disponible para la cuantificación de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* utilizando el método de dilución en placa de suspensiones de suelo en un medio semiselectivo está basada en la estimación de propágulos (colonias) de *F. oxysporum* sin poder discriminar morfológicamente *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* de los aislados de *F. oxysporum* no patogénicos. Además, la utilización de este procedimiento para la identificación de *F. oxysporum* es tedioso y requiere la detallada observación microscópica de caracteres morfológicos diagnósticos. Este proceso se puede complementar con la utilización de los iniciadores específicos desarrollados en esta Tesis Doctoral o en el trabajo de Jiménez-Gasco y Jiménez-Díaz (2003) y protocolos de PCR convencional para poder diferenciar *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* de todas las colonias de *F. oxysporum* creciendo en las placas; no obstante, todo este proceso completo de identificación puede requerir cierto tiempo.

El protocolo de qPCR descrito en esta Tesis Doctoral permite también identificar y cuantificar con exactitud poblaciones de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* en

suelo. Nuestros resultados indican que pueden ser detectadas alrededor de 45 ufc de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* /g de suelo seco, lo cual corresponde aproximadamente a 4 pg de ADN/g de suelo. Un inóculo de aproximadamente 50 ufc/g de suelo seco de una mezcla de razas de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* (0, 5 y 6) presentes en el suelo muestreado (Landa et al., 2009), fue capaz de causar el 100% de plantas muertas en cultivares de garbanzo altamente susceptibles (Fig. IV.5). García-Pedrajas et al. (1999) experimentaron serias dificultades cuando trataron de detectar *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* en muestras procedentes de la misma parcela experimental utilizando un protocolo de PCR anidada, que amplificaba una banda específica para los aislados pertenecientes al patotipo de Marchitez del patógeno. Estos autores atribuyeron la baja consistencia de las amplificaciones al alto contenido en arcilla de dicho suelo. En este aspecto, la utilización del 'MoBio Ultraclean™ soil DNA isolation kit' (MoBio Laboratories Inc.) en nuestro estudio puede haber contribuido a incrementar la consistencia y sensibilidad de la amplificación.

Una posible limitación del protocolo de qPCR desarrollado en esta Tesis Doctoral y compartida por todos los métodos moleculares de detección y cuantificación basados en la amplificación de ADN, es la incapacidad para distinguir propágulos fúngicos viables de no viables o muertos. Sin embargo, es probable que el ADN de células muertas se degrade rápidamente en el suelo debido a la alta actividad microbiana, y por tanto podemos especular que la amplificación de ADN de propágulos muertos puede ser de escasa importancia, si alguna (Herdina et al., 2004; Lievens et al., 2006). Además, tomados aisladamente, los datos de concentración de ADN del patógeno en un suelo pueden ser útiles sólo para comparaciones relativas entre muestras de suelo, ya que no reflejan necesariamente la viabilidad o el potencial de inóculo del patógeno. Además, aunque la incidencia y severidad de las epidemias de Fusariosis Vascular del garbanzo dependen en gran medida de la densidad de inóculo del patógeno, también pueden ser fuertemente influenciadas por las condiciones ambientales, virulencia de las razas del patógeno prevalentes en el suelo, la susceptibilidad del cultivar de garbanzo a dichas razas, y sus interacciones (Landa et al., 2001, 2004a, 2006; Navas-Cortés et al., 1998, 2000a, 2000b, 2007). Aún con estas limitaciones, la disponibilidad del nuevo protocolo de qPCR desarrollado en esta Tesis Doctoral para la cuantificación en suelo de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* puede ser una herramienta de gran utilidad para estudios de Ecología de poblaciones naturales

de este patógeno en suelo, y determinar la existencia y distribución del patógeno en suelos agrícolas ayudando así a evitar la siembra en suelos con alto contenido del patógeno.

La Fusariosis Vascular del garbanzo es una enfermedad de difícil manejo, no existiendo una medida de control completamente eficaz. Actualmente, la utilización de cultivares resistentes al patógeno se presenta como la medida más práctica y económicamente eficiente para el manejo de la enfermedad y es además un componente clave en los programas de Manejo Integrado de enfermedades (Jalali y Chand, 1992; Jiménez-Díaz et al., 1991, 1993b). La caracterización de las reacciones de resistencia en germoplasma de garbanzo dependen de los tradicionales ensayos de patogenicidad que son simples conceptualmente, pero costosos en tiempo, infraestructura, y recursos, y más importante aún, las respuestas a la enfermedad puede verse afectada por diversos factores medioambientales (Gupta et al., 1987; Jiménez-Díaz et al., 1991, 1993b; Landa et al., 2001, 2004a, 2006; Navas-Cortés et al., 1998, 2000a, 2007; Sharma et al., 2005; Trapero-Casas y Jiménez-Díaz, 1985). El nuevo protocolo de qPCR desarrollado en esta Tesis Doctoral proporciona un método rápido, fiable y reproducible para la caracterización inequívoca de resistencia completa de genotipos de garbanzo a las razas del patógeno cuando se valore la capacidad del patógeno de alcanzar el tallo de los cultivares inoculados. La utilización del protocolo permitió distinguir claramente entre respuestas susceptibles y resistentes de genotipos de garbanzo a razas del patógeno en base a la cantidad de ADN del hongo cuantificado en tejidos de raíz y tallo en una fase tras la inoculación en la cual las plantas aún no mostraban síntomas o éstos eran apenas distinguibles.

La mayoría de los protocolos de PCR convencional o cuantitativa desarrollados para otras *formae speciales* de *F. oxysporum* permiten detectar o cuantificar el patógeno en raíces pero no en tallos de plantas asintomáticas, y normalmente sólo en tejidos que muestran síntomas claros de la enfermedad (Alves-Santos et al., 2002; Kelly et al., 1998; Pasquali et al., 2004; Zhang et al., 2005). Por ejemplo, Kelly et al. (1998) utilizando un protocolo de PCR convencional específico para el patotipo de Marchitez de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* detectaron la raza 5 del patógeno en raíz pero no en tallo de plantas de garbanzo asintomáticas del cv. P-2245 a los 6 días después de la inoculación. Sin

embargo, de acuerdo a nuestros resultados, en esta misma combinación altamente favorable para el desarrollo de la enfermedad, la cantidad de ADN del patógeno detectada en el tallo fue mayor que la detectada en la raíz, lo cual puede indicar la temprana y rápida progresión del patógeno desde los vasos xilemáticos de la raíz a los del tallo. El examen histológico de los tejidos vasculares de los cvs. de garbanzo JG-62 y P-2245 infectados por la raza 5 de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* reveló la existencia de relativamente pocas hifas del hongo en los vasos xilemáticos de la raíz y ninguna en el tallo a los 10 días después de la inoculación, pero se observó abundante micelio en los vasos de la raíz y, en menor extensión, en los vasos del tallo 10 días más tarde (Jiménez-Díaz et al., 1989). Comparativamente, para la combinación menos compatible 'P-2245'/raza 0 la colonización de los vasos xilemáticos tuvo lugar más tarde y en menor extensión comparada a la que se produjo en la combinación altamente compatible 'P-2245'/raza 5 (Jiménez-Díaz et al., 1989). No obstante, los resultados descritos no tienen por qué reflejar globalmente el proceso de infección para las diferentes interacciones cultivar de garbanzo/raza del patógeno. Así en el Capítulo V de esta Tesis Doctoral, en el que se ha llevado a cabo un detallado estudio del proceso de infección en varias de las interacciones referidas anteriormente (raza 5/'JG-62' y 'P-2245'; raza 0/'P-2245') utilizando microscopía láser confocal y aislados de razas de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* transformadas con la proteína fluorescente ZsGreen, indican que la colonización extensa del tejido vascular del tallo tiene lugar a los 10 días después de la inoculación. De forma similar a nuestros resultados, Zambounis et al. (2007) encontraron mayor cantidad de ADN genómico de *F. oxysporum* Schlechtend.:Fr. f. sp. *vasinfectum* (Atk.) W.C. Snyder & H.N. Hans. en el cv. de algodón (*Gossypium hirsutum* L.) susceptible Lacta comparado con el cv. resistente Emerald, pero en ambos casos se detectó una mayor cantidad de ADN del patógeno en los tejidos del hipocotilo comparada con la detectada en los tejidos de la raíz.

Además de poder diferenciar reacciones resistentes de susceptibles, el protocolo de qPCR desarrollado también detectó diferencias en el nivel de virulencia entre las razas 0 y 5 de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* en el cultivar de garbanzo P-2245. Así, la cantidad de ADN de la raza 5 (altamente virulenta) en tejidos de garbanzo fue más alta que la de la raza 0 (menos virulenta). Correlaciones similares se han descrito para otros hongos patógenos causantes de Marchiteces Vasculares. Utilizando un protocolo convencional SCAR-PCR, Alves-

Santos et al. (2002) pudieron detectar ADN sólo de los aislados altamente virulentos de *F. oxysporum* Schlechtend.:Fr. f. sp. *phaseoli* J.B. Kendrick & W.C. Snyder en tejidos de judía, pero no de los aislados poco virulentos. De forma similar, Mercado-Blanco et al. (2003) encontraron mayores cantidades de ADN del patotipo defoliante de *Verticillium dahliae* Kleb. (altamente virulento) en tejidos de olivo (*Olea europaea* L.) comparadas con las detectadas para el patotipo no defoliante de *V. dahliae* (menos virulento).

La aplicación práctica del protocolo de qPCR desarrollado en esta Tesis Doctoral para su utilización en programas de mejora de resistencia a la Fusariosis Vascular se demostró con los resultados obtenidos en el experimento desarrollado en campo. De hecho, pudimos diferenciar claramente reacciones altamente susceptibles de resistentes en una colección de 12 cultivares de garbanzo que crecieron en un suelo infestado por diversas razas del patógeno, en base a la cantidad de ADN de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* en las raíces de éstos. Más aún, existió una correlación significativa entre la cantidad de ADN de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* cuantificada al inicio del ciclo de cultivo en las raíces de plantas de garbanzo que en ese momento estaban asintomáticas y la incidencia de plantas muertas por la enfermedad al final del mismo. Además, fuimos capaces de cuantificar ADN de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* en raíces de algunos cultivares de garbanzo resistentes a las razas 0, 5 y 6 presentes en el suelo de la parcela. Esto se puede explicar por la existencia de infección y extensa colonización del córtex de la raíz en combinaciones incompatibles raza/cultivar tal y como ha sido descrito para otras *formae speciales* de *F. oxysporum*, incluyendo *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* (Olivain et al., 2003, 2006; Capítulo V de la presente Tesis Doctoral). Además, en esta parcela experimental se han podido detectar nuevas variantes patogénicas de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* en baja frecuencia que no han podido ser caracterizadas dentro de las razas del patógeno descritas (Landa et al., 2009). De acuerdo a nuestro conocimiento, esta es la primera vez que se demuestra la utilización de un protocolo de qPCR para la evaluación de resistencia en un número elevado de genotipos de garbanzo creciendo en un suelo infestado por *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* en condiciones naturales de campo.

En conclusión, la posibilidad de demostrar la ausencia del *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* en plantas de garbanzo asintomáticas y de cuantificar el patógeno en plantas sin mostrar síntomas o ligeramente afectadas por la Fusariosis Vascular

por medio del protocolo de qPCR desarrollado en esta Tesis Doctoral, entre otras aplicaciones, será de gran interés para la evaluación de germoplasma de garbanzo resistente a la enfermedad. Este hecho permitirá la rápida selección de líneas de mejora con una posible resistencia completa y seleccionar expresamente aquellas que posean una resistencia parcial, Marchitez tardía o tolerancia, pero portando caracteres de interés comercial y/o agronómico. En conclusión, estamos seguros que el protocolo de qPCR desarrollado en esta Tesis Doctoral para la identificación y cuantificación de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* en tejidos de garbanzo y suelo será de gran utilidad para estudios que pretendan una mejor comprensión de la Epidemiología de la Fusariosis Vascular del garbanzo y un manejo más adecuado de la enfermedad por la exclusión del patógeno, predicción del riesgo potencial de enfermedad y programas de mejora de resistencia a la misma.

IV.6. LITERATURA CITADA

Adams, P. S. 2006. Data analysis and reporting. En: Real-Time PCR. M. Tevfik Dorak, ed. Taylor & Francis, New York, EEUU. pp. 39-62.

Alves-Santos, F. M., Benito, E. P., Eslava, A. P. y Díaz-Mínguez, J. M. 1999. Genetic diversity of *Fusarium oxysporum* strains from common bean fields in Spain. Appl. Environ. Microbiol. 65:3335-3340.

Alves-Santos, F. M., Ramos, B., García-Sánchez, M. A., Eslava, A. P. y Díaz-Mínguez, J. M. 2002. A DNA-based procedure for in planta detection of *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*. Phytopathology 92:237-244.

Atallah, Z. K., Bae, J., Jansky, S. H., Rouse, D. I. y Stevenson, W.R. 2007. Multiplex real-time quantitative PCR to detect and quantify *Verticillium dahliae* colonization in potato lines that differ in response to *Verticillium* wilt. Phytopathology 97:865-872.

Bhatti, M. A. y Kraft, J. M. 1992. Effects of inoculum density and temperature on root rot and wilt of chickpea. Plant Dis. 76:50-54.

Bouhot, D. y Rouxel, F. 1971. Technique selective et quantitative d'analyse des *Fusarium oxysporum* et *Fusarium solani* dans le sol. Mode d'emploi. Ann. Phytopathol. 3:251-254.

Cabrera de la Colina, J., Trapero-Casas, A. y Jiménez-Díaz, R. M. 1985. Races of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceri* in Andalucía, southern Spain. Int. Chickpea Newsl. 13:24-26.

Dolar, F. S. 1997. Determination of the races of *Fusarium oxysporum* f.sp. *ciceris* in Ankara province. Turkey. J. Turk. Phytopath. 26:11-15.

Dubey, S.C., Singh, S.R. y Singh, B. 2010. Morphological and pathogenic variability of Indian isolates of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* causing chickpea wilt. Arch. Phytopathol. Plant Prot. 43:174-189.

Filion, M., St-Arnaud, M. y Jabaji-Hare, S. H. 2003. Quantification of *Fusarium solani* f. sp. *phaseoli* in mycorrhizal bean plants and surrounding mycorrhizosphere soil using real-time polymerase chain reaction and direct isolations on selective media. *Phytopathology* 93:229-235.

Food and Agriculture Organization of the United Nations Statistical Database (FAOSTAT). 2009. FAOSTAT production statistics of crops. Available online at <http://faostat.fao.org/site/567/default.aspx#ancor>.

García-Pedrajas, M. D., Bainbridge, B. W., Heale, J. B., Pérez-Artés, E. y Jiménez-Díaz, R. M. 1999. A simple PCR-based method for the detection of the chickpea-wilt pathogen *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* in artificial and natural soils. *Eur. J. Plant Pathol.* 105:251-259.

Gupta, O., Kotasthane, S. R. y Khare, M. N. 1987. Factors influencing epidemiology of vascular wilt of chickpea. *Proc. Natl. Acad. Sci. India* 57:86-91.

Halila, M. H. y Strange, R. N. 1996. Identification of the causal agent of wilt of chickpea in Tunisia as *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceri* race 0. *Phytopathol. Mediterr.* 35:67-74.

Haware, M. P. y Nene, Y. L. 1982. Races of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceri*. *Plant Dis.* 66:809-810.

Herdina, K., Neate, S., Jabaji-Hare, S. y Ophel-Keller, K. 2004. Persistence of DNA of *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* in soil as measured by a DNA based assay. *FEMS Microbiol. Ecol.* 47:143-152.

Higuchi, R., Fockler, C., Dollinger, G. y Watson, R. 1993. Kinetic PCR analysis: real time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology* 11:1026-1030.

Jalali, B. L. y Chand, H. 1992. Chickpea wilt. En: *Plant Diseases of International Importance*. Vol. I. Diseases of Cereals and Pulses. U. S. Singh, A. N. Mukhopadhyay, J. Kumar, and H. S. Chaube, eds. Prentice Hall, Englewood Cliffs, NJ., EEUU. pp. 429-444.

Jiménez-Díaz, R. M., Alcalá-Jiménez, A. R., Hervás, A. y Trapero-Casas, J. L. 1993a. Pathogenic variability and host resistance in the *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*/*Cicer arietinum* pathosystem. En: *Proc. Eur. Semin. Fusarium Mycotoxins, Taxonomy, Pathogenicity and Host Resistance*, 3rd. Hodowla Róślin Aklimatyzacja i Nasiennictwo. Plant Breeding and Acclimatization Institute, Radzików, Poland. pp. 87-94.

Jiménez-Díaz, R. M., Basallote-Ureba, M. J. y Rapoport, H. 1989. Colonization and pathogenesis in chickpea infected by races of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceri*. En: *Vascular Wilt Diseases of Plants*. E. C. Tjamos and C. H. Beckman, eds. NATO ASI Series H Vol 28. Heidelberg, Springer-Verlag, Alemania. pp. 113-121.

Jiménez-Díaz, R. M., Crinó, P., Halila, M. H., Mosconi, C. y Trapero-Casas, A. 1993b. Screening for resistance to *Fusarium* wilt and *Ascochyta* blight in chickpea. En: *Breeding for Stress Tolerance in Cool-Season Food Legumes*. K. B. Singh, and M. C. Saxena, eds. John Wiley and Sons, Chichester, Inglaterra. pp. 77-96.

Jiménez-Díaz, R. M., Singh, K. B., Trapero-Casas, A. y Trapero-Casas, J. L. 1991. Resistance in kabuli chickpeas to *Fusarium* wilt. *Plant Dis.* 75:914-918.

Jiménez-Gasco, M. M. y Jiménez-Díaz, R. M. 2003. Development of a specific polymerase chain reaction based assay for the identification of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* and its pathogenic races 0, 1A, 5, and 6. *Phytopathology* 93:200-209.

Jiménez-Gasco, M. M., Pérez-Artés, E. y Jiménez-Díaz, R. M. 2001. Identification of pathogenic races 0, 1B/C, 5, and 6 of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* with random amplified polymorphic DNA (RAPD). *Eur. J. Plant Pathol.* 107:237-248.

Judelson, H. S. y Randall, T. A. 1998. Families of repeated DNA in the oomycete *Phytophthora infestans* and their distribution within the genus. *Genome* 41:605-615.

Kaiser, W. J., Klein, R. E., Larsen, R. C. y Wyatt, S. D. 1993. Chickpea wilt incited by pea streak carlavirus. *Plant Dis.* 77:922-926.

Kelly, A. G., Alcalá-Jiménez, A. R., Bainbridge, B. W., Heale, J. B., Pérez-Artés, E. y Jiménez-Díaz, R. M. 1994. Use of genetic fingerprinting and random amplified polymorphic DNA to characterize pathotypes of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* infecting chickpea. *Phytopathology* 84:1293-1298.

Kelly, A. G., Bainbridge, B. W., Heale, J. B., Pérez-Artés, E. y Jiménez-Díaz, R. M. 1998. In planta-polymerase-chain-reaction detection of the wilt-inducing pathotype of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* in chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 52:397-409.

Landa, B. B., Jiménez-Gasco, M. M. y Jiménez-Díaz, R.M. 2009. Influence of disease resistant management strategies on genetic and pathogenic diversity in plant pathogen populations: Fusarium wilt of chickpea, a case study. *IOBC/WPRS Bull.* 42:119-122.

Landa, B. B., Montes-Borrego, M. Muñoz-Ledesma, F. J. y Jiménez-Díaz, R. M. 2007. Phylogenetic analysis of Downy Mildew pathogens of opium poppy and PCR-based in planta and seed detection of *Peronospora arborescens*. *Phytopathology* 97:1380-1390.

Landa, B. B., Navas-Cortés, J. A., Hervás, A. y Jiménez-Díaz, R. M. 2001. Influence of temperature and inoculum density of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* on suppression of Fusarium wilt of chickpea by rhizosphere bacteria. *Phytopathology* 91:807-816.

Landa, B. B., Navas-Cortés, J. A. y Jiménez-Díaz, R. M. 2004a. Integrated management of Fusarium wilt of chickpea with sowing date, host resistance and biological control. *Phytopathology* 94:946-960.

Landa, B. B., Navas-Cortés, J. A. y Jiménez-Díaz, R. M. 2004b. Influence of temperature on plant-rhizobacteria interactions related to biocontrol potential for suppression of Fusarium wilt of chickpea. *Plant Pathol.* 53:341-352.

Landa, B. B., Navas-Cortés, J. A., Jiménez-Gasco, M. M., Katan, J., Retig, B. y Jiménez-Díaz, R. M. 2006. Temperature response of chickpea cultivars to races of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*, causal agent of Fusarium wilt. *Plant Dis.* 90:365-374.

Leslie, J. F. y Summerell, B. A. 2006. The *Fusarium* Laboratory Manual. Blackwell Publishing Ltd., Oxford, Reino Unido. 388 pp.

Lievens, B., Brouwer, M., Vanachter, A. C. R. C., Cammue, B. P. A. y Thomma B. P. H. J. 2006. Real-time PCR for detection and quantification of fungal and oomycete tomato pathogens in plant and soil samples. *Plant Sci.* 171:155-165.

Lievens, B., Claes, L., Vakalounakis, D. J., Vanachter, A. C. R. C. y Thomma, B. P. H. J. 2007. A robust identification and detection assay to discriminate the cucumber pathogens *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum* and f. sp. *radicis-cucumerinum*. *Environ. Microbiol.* 9:2145-2161.

Mbofung, G. C. Y. y Pryor, B. M. 2010. A PCR-based assay for detection of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae* in lettuce seed. *Plant Dis.* 94:860-866.

Mercado-Blanco, J., Collado-Romero, M., Parrilla-Araujo, S., Rodríguez-Jurado, D. y Jiménez-Díaz, R. M. 2003. Quantitative monitoring of colonization of olive genotypes by *Verticillium dahliae* pathotypes with real-time polymerase chain reaction. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 63:91-105.

Navas-Cortés, J. A., Alcalá-Jiménez, A. R., Hau, B. y Jiménez-Díaz, R. M. 2000a. Influence of inoculum density of races 0 and 5 of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* on development of Fusarium wilt in chickpea cultivars. *Eur. J. Plant Pathol.* 106:135-146.

Navas-Cortés, J. A., Hau, B. y Jiménez-Díaz, R. M. 1998. Effect of sowing date, host cultivar, and race of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* on development of Fusarium wilt of chickpea. *Phytopathology* 88:1338-1346.

Navas-Cortés, J. A., Hau, B. y Jiménez-Díaz, R. M. 2000b. Yield loss in chickpeas in relation to development of Fusarium wilt epidemics. *Phytopathology* 90:1269-1278.

Navas-Cortés, J. A., Landa, B. B., Méndez-Rodríguez, M. A. y Jiménez-Díaz, R. M. 2007. Quantitative modeling of the effects of temperature and inoculum density of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* races 0 and 5 on the development of Fusarium wilt in chickpea cultivars. *Phytopathology* 97:564-573.

Olivain, C., Humbert, C., Nahalkova, J., Fatehi, J., L'Haridon, F. y Alabouvette, C. 2006. Colonization of tomato root by pathogenic and nonpathogenic *Fusarium oxysporum* strains inoculated together and separately into the soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 72: 523-1531.

Olivain, C., Trouvelot, S., Binet, M.-N., Cordier, C., Pugin, A. y Alabouvette, C. 2003. Colonization of flax roots and early physiological responses of flax cells inoculated with pathogenic and nonpathogenic strains of *Fusarium oxysporum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 69:5453-5462.

Pande, S., Krishna Kishore, G., Upadhyaya, H. D. y Narayana-Rao, J. 2006. Identification of sources of multiple disease resistance in mini-core collection of chickpea. *Plant Dis.* 90:1214-1218.

Pasquali, M., Marena, L., Fiora, E., Piatti, P., Gullino, M. L. y Garibaldi, A. 2004. Real-time polymerase chain reaction for identification of a highly pathogenic group of *Fusarium oxysporum* f. sp. *chrysanthemi* on *Argyranthemum frutescens* L. *J. Plant Pathol.* 86:53-59.

Pasquali, M., Piatti, P., Gullino, M. L. y Garibaldi, A. 2006. Development of a real-time polymerase chain reaction for the detection of *Fusarium oxysporum* f. sp. *basilici* from basil seed and roots. *J. Phytopathol.* 154:632-636.

Schaad, N. W., Frederick, R. D., Shaw, J., Schneider, W. L., Hickson, R., Petrillo, M. D. y Luster, D. G. 2003. Advances in molecular-based diagnostics in meeting crop biosecurity and phytosanitary issues. *Annu. Rev. Phytopathol.* 41:305-324.

Schena, L., Hughes, K. J. D. y Cooke, D. E. L. 2006. Detection and quantification of *Phytophthora ramorum*, *P. kernoviae*, *P. citricola* and *P. quercina* in symptomatic leaves by multiplex real-time PCR. *Mol. Plant Pathol.* 7:365-379.

Schena, L., Nigro, F., Ippolito, A. y Gallitelli, D. 2004. Real-time quantitative PCR: a new technology to detect and study phytopathogenic and antagonistic fungi. *Eur. J. Plant Pathol.* 110:893-908.

Sharma, K. D., Chen, W. y Muehlbauer, F. J. 2005. Genetics of chickpea resistance to five races of *Fusarium* wilt and a concise set of race differentials for *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*. Plant Dis. 89:385-390.

Sharma, K. D. y Muehlbauer, F. J. 2007. *Fusarium* wilt of chickpea: Physiological specialization, genetics of resistance and resistance gene tagging. Euphytica 157:1-14.

Shehabu, M., Ahmed, S. y Sakhuja, K. 2008. Pathogenic variability in Ethiopian isolates of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* and reaction of chickpea improved varieties to the isolates. Int. J. Pest Manag. 54:143-149.

Singh, K. B. y Saxena, M. C. 1996. Winter chickpea in Mediterranean-type environments. A technical Bulletin, ICARDA, Aleppo, Siria. 39 pp.

Sugha, S. K., Kapoor, S. K. y Singh, B. M. 1994. Factors influencing *Fusarium* wilt of chickpea (*Cicer arietinum* L.). Indian J. Mycol. Plant Pathol. 24:97-102.

Trapero-Casas, A. y Jiménez-Díaz, R. M. 1985. Fungal wilt and root rot diseases of chickpea in southern Spain. Phytopathology 75:1146-1151.

Vaerman, J. L., Saussoy, P. y Ingargiola, I. 2004. Evaluation of real-time PCR data. J. Biol. Regul. Homeost. Agents 18:212-14.

Valsesia, G., Gobbin, D., Patocchi, A., Vecchione, A., Pertot, I. y Gessler, C. 2005. Development of a high-throughput method for quantification of *Plasmopara viticola* DNA in grapevine leaves by means of quantitative real-time polymerase chain reaction. Phytopathology 95:672-678.

Zambounis, A. G., Paplomatas, E. y Tsiftaris, A. S. 2007. Intergenic spacer-RFLP analysis and direct quantification of Australian *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* isolates from soil and infected cotton tissues. Plant Dis. 91:1564-1573.

Zhang, Z., Zhang, J., Wang, Y. y Zheng, X. 2005. Molecular detection of *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum* and *Mycosphaerella melonis* in infected plant tissues and soil. FEMS Microbiol. Lett. 249:39-47.

CAPÍTULO V

**CARACTERIZACIÓN CUALITATIVA Y
CUANTITATIVA DEL PROCESO DE INFECCIÓN EN
EL PATOSISTEMA *Fusarium oxysporum* f. sp.
ciceris/GARBANZO EN INTERACCIONES
COMPATIBLES E INCOMPATIBLES MEDIANTE
MICROSCOPIA LÁSER CONFOCAL**

V.1. RESUMEN

La Fusariosis Vascular del garbanzo causada por *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* afecta severamente al rendimiento del cultivo del garbanzo en el mundo. En este trabajo se ha profundizado en el conocimiento de la Epidemiología de la Fusariosis Vascular del garbanzo estudiando el proceso de infección de las razas 0 y 5 de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris*, representativas de los patotipos de Amarillez y Marchitez, respectivamente, en cultivares de garbanzo P-2245, JG-62 y WR-315, con resistencia diferencial a dichas razas. Para ello, se seleccionaron aislados de cada raza transformados genéticamente con la proteína autofluorescente ZsGreen, estables en cuanto a sus características de crecimiento, patogenicidad y virulencia en comparación a los aislados silvestres. Inicialmente, y para la diferentes combinaciones experimentales de cultivar/raza de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris*, el hongo coloniza la superficie de la raíz formando grupos de hifas en el ápice y zona de elongación que actúan como sitio preferente de penetración. Posteriormente, en combinaciones compatibles (cv. P-2245/*F. oxysporum* f. sp. *ciceris* razas 0 y 5, y cv. JG-62/*F. oxysporum* f. sp. *ciceris* raza 5) el patógeno coloniza extensamente los espacios intercelulares del córtex de la zonas de elongación e inferior de la raíz alcanzando los haces vasculares del xilema a los 6 días después de la inoculación (ddi) en la combinación cv. P-2245/*F. oxysporum* f. sp. *ciceris* raza 5 y 2 días más tarde en el resto de combinaciones. Una vez en el xilema, el patógeno progresa en el eje vertical de la planta a través del mismo hasta alcanzar los tejidos vasculares del tallo de los cvs. P-2245 y JG-62 a los 8 ddi para la raza 5 de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* y 2 días más tarde en la combinación P-2245/*Foc*-0 coincidiendo con la expresión de síntomas de la enfermedad. En combinaciones incompatibles (cv. JG-62/*F. oxysporum* f. sp. *ciceris* raza 0 y cv. WR-315/*F. oxysporum* f. sp. *ciceris* razas 0 y 5) las plantas permanecieron libres de síntomas a pesar de que la raza 0 invadió y colonizó extensamente los haces del xilema de raíz y tallo, aunque únicamente en el cv. JG-62, y más lentamente y con menor intensidad a la alcanzada en interacciones compatibles. Por el contrario, para el cv. WR-315, el patógeno quedó restringido a los espacios intercelulares del córtex de la raíz sin invasión del xilema para la raza 0, aunque para la raza 5 del patógeno alcanzó éste progresando verticalmente aunque sólo hasta el hipocotilo. La información generada será de gran interés para la adecuada caracterización de cultivares y líneas resistentes en programas de Mejora genética, así como para

determinar el modo de acción y nivel de eficacia de medidas de control de naturaleza química o biológica.

V.2. INTRODUCCIÓN

El garbanzo (*Cicer arietinum* L.) representa una de las principales fuentes de alimentación humana y animal, y es uno de los cultivos de leguminosas más importantes del mundo junto con la judía (*Phaseolus vulgaris* L.) y el guisante (*Pisum sativum* L.) (FAOSTAT, 2009). El cultivo se desarrolla adecuadamente en regiones tropicales, subtropicales y templadas del mundo incluyendo Australia, Bangladesh, Canadá, Etiopía, India, México, Myanmar, Nepal, Pakistán y países de la Cuenca del Mediterráneo (Nene et al., 1996). La Fusariosis Vascular causada por *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* (Padwick) Matuo & K. Sato limita seriamente la producción de este cultivo. Las pérdidas anuales alcanzan del 10 al 15% de la producción mundial, pudiéndose llegar a la pérdida total del cultivo bajo condiciones favorables para su desarrollo (Haware y Nene, 1982, Halila y Strange, 1996). *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* es un hongo de suelo que presenta dos patotipos; el patotipo de Amarillez que induce un amarillamiento foliar progresivo con coloración castaño-oscura del xilema y muerte tardía de la planta, mientras que el patotipo de Marchitez induce una rápida y severa clorosis, flacidez, coloración castaño-oscura del xilema y muerte rápida de la planta. Para ambos síndromes, las partes subterráneas de las plantas afectadas no muestran síntomas externos. Hasta el momento, se han identificado ocho razas patogénicas de origen monofilético en *F. oxysporum* f. sp. *ciceris*, denominadas 0, 1A, 1B/C, 2, 3, 4, 5 y 6 (Jiménez-Gasco y Jiménez-Díaz, 2003; Jiménez-Gasco et al., 2002). Las razas 0, 1B/C, 5 y 6 se localizan principalmente en la Cuenca Mediterránea y California (EEUU) (Halila y Strange, 1996, Jiménez-Díaz et al., 1993, Jiménez-Gasco y Jiménez-Díaz, 2003, Jiménez-Gasco et al., 2001). La raza 1A está presente en India (Haware y Nene, 1982), California y la Cuenca Mediterránea (Jiménez-Díaz et al., 1993, Jiménez-Gasco y Jiménez-Díaz, 2003, Jiménez-Gasco et al., 2001). Las razas 2 y 3 se han descrito en Etiopía, India y Turquía (Dolar, 1997; Haware y Nene, 1982; Shehabu et al., 2008), mientras que de la raza 4 sólo ha sido descrita en Etiopía e India (Haware y Nene, 1982; Shehabu et al., 2008). Las razas 0 y 1B/C inducen el síndrome de Amarillez Vascular, mientras que el resto causan el

síndrome de Marchitez Vascular (Jiménez-Díaz et al., 1993, Jiménez-Gasco y Jiménez-Díaz, 2003).

La Fusariosis Vascular del garbanzo, como ocurre con la mayoría de las enfermedades causadas por patógenos de suelo es una enfermedad de difícil control, por ello el estudio de la biología del patógeno y su interacción con el huésped se presenta como un paso que podría contribuir al diseño de estrategias de control más eficientes. En este contexto, la principal y más efectiva medida de control de la Fusariosis Vascular del garbanzo es el empleo de cultivares resistentes (Nene y Reddy, 1987). Sin embargo, su eficacia está seriamente limitada por la variabilidad patogénica de las poblaciones de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* existente en suelos de cultivo. Las diferencias de virulencia de las diferentes razas del patógeno podrían traducirse, entre otros aspectos, en diferencias en el proceso de patogénesis en cultivares de garbanzo, cuyo conocimiento sería de gran valor para la caracterización de cultivares resistentes a las distintas razas del patógeno. Sin embargo, son muy pocos los trabajos que hayan abordado este proceso. La información disponible indica que *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* invade las plántulas de garbanzo susceptibles poco después de entrar en contacto con ella en ausencia de heridas, preferentemente a través de los cotiledones y de las zonas de unión del hipocotilo y epicotilo subterráneos y en menor extensión a través de diversas áreas de la raíz principal excepto el ápice de ésta (Jiménez-Díaz et al., 1989). Tras la penetración, el patógeno alcanza el xilema colonizándolo de forma extensa, lo que en combinaciones compatibles conduce a la aparición de síntomas de Marchitez o Amarillez Vascular, y finalmente el colapso y oclusión de los vasos del xilema con la consiguiente muerte de la planta (Jiménez-Díaz et al., 1989). Paralelamente, Gupta et al. (2009) y Stevenson et al. (1997) en estudios dirigidos a dilucidar los mecanismos de resistencia al patógeno indican asimismo la capacidad de las razas 1A y 2 del patógeno de invadir y colonizar los vasos del xilema tras pocos días después de la inoculación en cultivares susceptibles, aunque su estudio está restringido a la raíz. Sin embargo, la información disponible sobre los procesos de patogénesis en combinaciones incompatibles es aún más fragmentaria, aunque es esencial para la apropiada caracterización de reacciones de resistencia al patógeno.

Aunque la aplicación de la microscopía óptica y electrónica ha dilucidado algunos aspectos relevantes en la interacción planta-patógeno en este

patosistema, estas herramientas muestran importantes limitaciones para el estudio de este tipo de procesos, en particular los artefactos inducidos por los procesos de fijación necesarios para la observación de los tejidos del huésped y estructuras del patógeno (Heath et al., 2000), y la imposibilidad de manejar gran número de muestras o de realizar estudios *in vivo*. Esto hace necesaria la aplicación de nuevas metodologías que mitiguen estas limitaciones y que conduzcan a un mejor conocimiento y comprensión de las interacciones compatibles e incompatibles existentes en este patosistema.

La aparición de nuevas tecnologías como la microscopía láser confocal unida a la posibilidad de transformar genéticamente microorganismos con el ADN de proteínas exógenas autofluorescentes han abierto nuevas vías para el estudio de las interacciones planta-patógeno venciendo, en parte, las limitaciones asociadas a las metodologías tradicionales (Czymmek et al., 1994). En concreto, es posible obtener mejor calidad de imagen con información más precisa, mayor facilidad en la adquisición de éstas y flexibilidad en su tratamiento y análisis, todo ello acompañado de una considerable reducción en el tiempo y recursos necesarios para la preparación de las muestras (Czymmek et al., 1994). La transformación genética con proteínas autofluorescentes ha incrementado en gran medida el potencial de adquirir imágenes *in vivo* de los procesos de patogénesis de plantas con inequívoca identidad del organismo y de su localización dentro del tejido del huésped (Czymmek et al., 2007), así como poder monitorizar el proceso de infección y colonización del patógeno en tejidos vegetales intactos o en secciones de tejido sin requerir cofactores o sustratos (Bolwerk et al., 2005; Shan y Godwin, 2004).

Recientemente, la microscopía láser confocal se ha utilizado con relativa frecuencia en el estudio de diversos aspectos relacionados con el proceso de infección y colonización de distintos hongos fitopatógenos de suelo (e.g., Baumgartner et al., 2010; Eynck et al., 2007; Jansen et al., 2005; Vallad y Subbarao, 2008), la activación de rutas defensivas del huésped (Thatcher et al., 2009) o genes relacionados con el cambio de hábito saprofítico a parasítico del patógeno (Michielse et al., 2009). Asimismo, esta técnica ha permitido abordar la dinámica temporal del proceso de infección de distintos aislados patogénicos de *F. oxysporum* en diferentes plantas huésped. Así, entre otros, ha permitido identificar al meristemo radical de plantas de *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh

como el punto preferente de infección de *F. oxysporum* Schlecht. Emend. Snyder & Hans. (Czymmek et al., 2007); constatar la similitud de los patrones de colonización de *F. oxysporum* Schlechtend.:Fr. f. sp. *medicaginis* (Weimer) W. C. Snyder & H. N. Hans. en cultivares susceptibles y tolerantes de *Medicago truncatula* Gaertn. (Ramírez-Suero et al., 2010); o asociar la virulencia diferencial de aislados de *F. oxysporum* Schlechtend.:Fr. f. sp. *phaseoli* Kendrick & W.C. Snyder en judía con la rapidez de colonización de los vasos xilemáticos (Martín-Rodriguez et al., 2007). Especial atención se ha prestado al estudio de los procesos de patogénesis en tomate (*Solanum lycopersicum* L.) por aislados patogénicos de *F. oxysporum* Schlechtend.:Fr. f. sp. *lycopersici* W.C. Snyder & H.N. Hans. (Duyvesteijn et al., 2005; Nahalkova y Fatehi, 2003; Olivain et al., 2006; van der Does et al., 2008), por *F. oxysporum* Schlechtend.:Fr. f. sp. *radicis-lycopersici* W.R. Jarvis & Shoemaker (Lagopodi et al., 2002), o el análisis de la interacción entre aislados no patogénicos de *F. oxysporum* como agentes de biocontrol con aislados patogénicos de ambas *formae speciales* (Bolwerk et al., 2005; Nahalkova et al., 2008; Olivain et al., 2006). En este mismo sentido, la microscopía láser confocal ha permitido evaluar la potencialidad como agentes de biocontrol de la podredumbre de raíz y pie del tomate de distintas cepas bacterianas de *Pseudomonas fluorescens* (Flügge 1886) Migula (1895) y *P. chlororaphis* (Guignard and Sauvageau, 1894) Bergey (1930) (Bolwerk et al., 2003), o de *P. fluorescens* frente a *Verticillium dahliae* Kleb. en olivo (*Olea europaea* L.) (Prieto et al., 2009).

El objetivo de este Capítulo de la Tesis Doctoral fue determinar la zona(s) preferente(s) de infección, el patrón de colonización espacial y temporal, y la intensidad de colonización vascular de las razas 0 y 5 de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris*, representativas de los patotipos de Amarillez y Marchitez, respectivamente, en cultivares de garbanzo con reacción diferencial a dichas razas en combinaciones compatibles e incompatibles. Para ello aislados de ambas razas del patógeno se transformaron con la proteína verde autofluorescente ZsGreen de coral, se seleccionaron por su estabilidad en cuanto a sus características de crecimiento, patogenicidad y virulencia en comparación a los aislados silvestres no transformados, se inocularon en condiciones controladas, determinándose cualitativa y cuantitativamente el proceso de infección y colonización en cultivares de garbanzo susceptibles y resistentes. De acuerdo a nuestro conocimiento este es el primer trabajo de investigación en que se aplica la microscopía láser confocal para el estudio de la interacción *F. oxysporum* f. sp. *ciceris*/garbanzo, siendo

además prácticamente inexistentes las investigaciones en que se ha abordado el estudio de los procesos de infección de un huésped por una *forma specialis* de *F. oxysporum* en todos los órganos de la planta, i.e., raíz y parte aérea, y en combinaciones compatibles e incompatibles en una planta de interés agrícola.

V.3. MATERIALES Y MÉTODOS

V.3.1. Crecimiento, conservación y transformación genética de aislados de *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*

Se llevó a cabo la transformación genética de dos aislados de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* (Foc-7802, raza 0, patotipo de Amarillez; y Foc-W6-1, raza 5, patotipo de Marchitez) con la proteína verde autofluorescente ZsGreen. En total se obtuvieron una colección de 17 transformantes, incluyendo seis aislados derivados del aislado silvestre Foc-7802, y 11 aislados derivados del aislado silvestre Foc-W6-1. Los cultivos activos de los aislados, se obtuvieron colocando pequeñas alícuotas del cultivo de suelo en placas conteniendo agar patata dextrosa (APD) (Laboratorios Difco, Detroit, Michigan, EEUU) e incubándolas durante 4 días a $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ y un fotoperiodo de 12-h de una mezcla de luz blanca fluorescente y cercana al ultravioleta de $36\ \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$.

Para obtener macroconidias se colocó un pequeño trozo de los cultivos activos de los aislados silvestres de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* en el centro de una placa conteniendo medio agar agua - hoja de clavel (*Dianthus caryophyllus* L.). Las macroconidias se recuperaron añadiendo agua destilada estéril a las placas con micelio creciendo durante 5 días en las condiciones descritas anteriormente y raspando la superficie con un asa de Henle. La suspensión de macroconidias se filtró a través de ocho capas de gasa estéril para eliminar los restos de micelio. Los protoplastos se prepararon de acuerdo a Proctor et al. (1999). El fragmento codificante de la proteína ZsGreen se clonó en los sitios *Xba*I-*Hind*III del plásmido pBHt2 (Mullins et al., 2001). Se utilizó la cepa EHA105 de *Agrobacterium tumefaciens* (Smith & Townsend, 1907) Conn 1942 (Klee, 2000) para la transformación de los aislados que se realizó de acuerdo a lo descrito por Khang et al. (2006). Todos los transformantes crecieron en medio mínimo de *Fusarium* spp. (Puhalla, 1985) enmendado con higromicina B (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Para comprobar el éxito y estabilidad de la transformación se observaron cultivos puros monoconídicos de los aislados transformados mediante el microscopio láser

confocal (Nikon TE 2000-S, Melville, NY, EEUU). De los 17 aislados transformados con éxito y por su mayor intensidad de señal de emisión de fluorescencia, se seleccionaron cuatro aislados de cada una de las razas 0 y 5 para posteriores análisis denominados F3, F8, F11 y F12 los derivados del aislado silvestre Foc-7802 (raza 0) y F73, F83, F93 y F94 los derivados del aislado silvestre Foc-W6-1 (raza 5). La transformación genética de los aislados fue realizada en el Laboratorio del Dr. Seogchan Kang, Departamento de Patología Vegetal de la Universidad del Estado de Pensilvania, Pensilvania, EEUU.

Todos los aislados silvestres y transformados se conservaron en tubos conteniendo suelo estéril a 4°C y en glicerol estéril al 35% en agua destilada a -80°C para su conservación prolongada en la colección de cultivos microbianos del Departamento de Protección de Cultivos, Instituto de Agricultura Sostenible (IAS-CSIC), Córdoba, España.

V.3.2. Caracterización de aislados de *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* transformados

Para cada uno de los aislados transformados con la proteína ZsGreen, se comparó su morfología, tasa de crecimiento micelial y capacidad patogénica de los aislados transformados con aquéllas de sus respectivos aislados silvestres.

Para evaluar el crecimiento y morfología de los aislados transformados se colocó un disco de APD conteniendo micelio activo de cada aislado sobre una placa de APD y se dispusieron en incubadores microbiológicos Conviron CMP 3244 (Conviron Ltd., Winnipeg, Canadá) a 25±1°C con un fotoperiodo de 12-h de una mezcla de luz blanca fluorescente y cercana al ultravioleta de 36 $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. En todos los experimentos se dispusieron tres repeticiones (placas de Petri) por cada aislado del patógeno, adoptándose un diseño completamente al azar. El crecimiento micelial radial (CR) de los aislados se determinó diariamente midiendo la longitud de cuatro radios perpendiculares entre sí y prefijados en cada una de las colonias fúngicas, de forma que las medidas se tomaron siempre sobre los mismos radios. La velocidad del crecimiento radial (VCR) de la colonia fúngica se estimó por la pendiente de la recta de regresión lineal simple del radio medio de la colonia sobre el tiempo. Para ello, al valor de la longitud del radio geométrico de la colonia se le restó el radio del disco de micelio (2 mm) del que partió cada colonia. Para valorar cambios en la morfología se realizaron

observaciones sobre la coloración del micelio, superficie limítrofe de las colonias, y de cualquier rasgo que resultase llamativo o anómalo respecto a las colonias de los aislados silvestres.

La caracterización patogénica de los aislados transformados se llevó a cabo mediante un ensayo de inoculación en suelo infestado con las razas 0 y 5 de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* y cultivares de garbanzo con resistencia diferencial a dichas razas, incluyendo el cv. P-2245 (susceptible a ambas razas), PV-1 (susceptible a la raza 0 y resistente a la 5), JG-62 (resistente a la raza 0 y susceptible a la 5) y WR-315 (resistente a ambas razas). El inóculo de los aislados silvestres y transformados se incrementó en matraces Erlenmeyer de 1 L conteniendo 400 g de una mezcla de arena de río lavada, harina de maíz y agua (AMA) infestada por el hongo (Trapero Casas y Jiménez Díaz, 1985). El AMA infestado se mezcló minuciosamente con una mezcla de suelo (limo/arena/turba, 1:1:1, v/v/v) esterilizada en autoclave (121°C, durante 75 min, dos veces) en la proporción adecuada para obtener una densidad de inóculo de 10^5 ufc/g de suelo. Las semillas se desinfestaron superficialmente en NaOCl al 2% durante 3 min, se pregerminaron, se seleccionaron por su uniformidad (longitud de radícula= 1 a 2 cm) y se sembraron en macetas de arcilla estériles de 15 cm de diámetro (4 plantas por maceta) rellenas con la mezcla suelo-AMA infestado de cada aislado. Las plantas control crecieron en la mezcla suelo-AMA no infestado. Las plantas se incubaron en una cámara de crecimiento ajustada a $25 \pm 2^\circ\text{C}$ con un fotoperiodo de 14-h de luz blanca fluorescente de $360 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ durante 42 días. Para cada aislado se dispusieron cuatro repeticiones (macetas, 4 plantas por maceta) dispuestas en cuatro bloques completos al azar. Las reacciones de enfermedad se evaluaron a intervalos de 2-3 días por la incidencia *I*, (escala 0-1) y severidad, *S* (escala 0 a 4, según el porcentaje de follaje afectado (0= 0%, 1= 1-33%, 2= 34-66%, 3= 67–100%, 4= planta muerta) que se utilizaron para calcular el Índice de Intensidad de Enfermedad (IIE) mediante la ecuación $\text{IIE}=(I \times S)/4$ (Navas-Cortés et al., 2007). Las curvas de progreso de enfermedad se obtuvieron a partir del IIE acumulado a lo largo del tiempo en días desde la fecha de inoculación.

V.3.3. Estudio del proceso de patogénesis en combinaciones compatibles e incompatibles mediante microscopía láser confocal

En base a los resultados obtenidos del apartado V.3.1 y V.3.2, se utilizaron dos aislados representativos de las razas 0 y 5 de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris*, respectivamente transformados con la proteína verde autofluorescente ZsGreen seleccionados por su estabilidad en cuanto a sus características de crecimiento, patogenicidad y virulencia en comparación a los aislados silvestres no transformados. En el ensayo se utilizaron cultivares de garbanzo P-2245, JG-62 y WR-315 con resistencia diferencial a dichas razas, descrita en el apartado anterior. Las semillas se pregerminaron en arena estéril en una cámara de crecimiento Conviron MTR26 (Conviron Ltd., Winnipeg, Canadá) ajustada a $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ con un fotoperiodo de 14-h de luz blanca fluorescente de $360\ \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. El inóculo consistió en una suspensión de conidias (mayoritariamente microconidias) del patógeno obtenida en matraces Erlenmeyer de 250 ml de capacidad conteniendo 100 ml de caldo de patata dextrosa (CPD) (250 g de patata, 20 g de D-glucosa, 1.000 ml de agua desionizada) en los que se depositaron seis discos de APD de 5 mm de diámetro con micelio del aislado correspondiente de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* tomados del margen de una colonia en crecimiento activo. Una vez inoculados, los matraces se incubaron en un agitador orbital (ISF-1-V, Adolf Kühner AG, Birsfelden, Suiza) a 140 rpm a $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ y un fotoperiodo de 12-h de luz blanca y cercana al ultravioleta de $36\ \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ durante 7 días. Transcurrido este período, los cultivos líquidos, se filtraron a través de ocho capas de gasa estéril. La concentración de la suspensión de conidias se determinó mediante un hematocitómetro y se realizaron las diluciones apropiadas en agua estéril para obtener una concentración de 1×10^5 conidias/ml.

Cuando las plántulas, pregerminadas en arena estéril, alcanzaron una longitud de radícula de aproximadamente 2 cm se transfirieron a vasos estériles de 6 cm de diámetro y 100 ml de capacidad conteniendo 80 ml de la suspensión de conidias. En las plantas control, la suspensión de conidias se sustituyó por agua destilada estéril. Se dispusieron dos plantas/vaso para cada combinación raza patogénica/cultivar y tiempo de muestreo. Las plantas crecieron en una cámara de crecimiento visitable ajustada a una temperatura de $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ y a una humedad relativa del 60 al 90% con un fotoperiodo de 14-h de luz blanca fluorescente de $360\ \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ y colocadas en un agitador orbital a 120 rpm. Diariamente, se complementó el volumen de los cultivos hidropónicos con solución nutritiva completa de Hoagland según se requería para mantener la disponibilidad de nutrientes y compensar el consumo de agua (Hoagland y Arnon, 1950).

Las reacciones de enfermedad se evaluaron por la severidad de síntomas foliares (S) que presentaron las plantas en las combinaciones susceptibles en base a la escala anteriormente descrita desde el momento de la inoculación hasta los 18 días después de la inoculación (ddi) para ambas razas en intervalos de 1 día. Se realizaron dos experimentos independientes para cada raza del patógeno siguiendo un diseño en bloques completos al azar, que se repitieron dos veces.

V.3.4. Microscopía láser confocal

Se muestrearon cuatro plantas (dos vasos) por combinación raza-cultivar para las plantas inoculadas y dos plantas (un vaso) para los tratamientos control no inoculados para cada tiempo de muestreo a los 1, 2, 3, 4, 6, 8, 9, 10, 12, 14, 16 y 18 ddi. En primer lugar, para cada una de las plantas se observó mediante epifluorescencia la superficie completa de la raíz principal y raíces laterales, seguida de observación mediante microscopía láser confocal utilizando en ambos casos un microscopio Nikon TE 2000-S (Nikon Inc.) excitando con un láser de argón a 488 nm y detectando la fluorescencia emitida por el patógeno a 515/30 nm, y a 590/50 nm la autofluorescencia emitida por los tejidos de la planta huésped. Posteriormente se realizaron cortes transversales de distintas regiones de la raíz principal (próxima al ápice, intermedia e hipocotilo inmediatamente anterior a la inserción de los cotiledones) y del tallo (epicotilo inmediatamente posterior a la inserción de los cotiledones y cada entrenudo vascularmente colonizado), los cuales se montaron embebidos con una gota de agua desionizada estéril en un portaobjetos sin ninguna manipulación externa para su posterior observación. Los cortes, de *ca.* 400 μm de grosor, se realizaron con ayuda de un micrótopo manual utilizando como medio de inclusión de fragmentos de aproximadamente 1 cm de longitud de raíz o tallo, segmentos cilíndricos de zanahoria. Se analizaron dos plantas por tiempo de muestreo y combinación raza/cultivar. Los cortes se observaron a 200x (objetivo Plan Fluor ELWD 20X), 400x (objetivo Plan Fluor ELWD 40X) y 600x (objetivo Plan ADO VC 60x) (Nikon Inc.), aunque tanto las imágenes que aparecen en este Capítulo como la cuantificación de vasos xilemáticos colonizados se llevó a cabo mediante imágenes a 200x. Las imágenes obtenidas se grabaron y, para su posterior análisis, se transfirieron al procesador de imagen EZ-C1 3.90 (Nikon Inc.). Finalmente, las imágenes se procesaron utilizando el paquete informático Adobe Photoshop CS4 Versión 11.0 (Adobe Systems Inc., San Jose, CA, EEUU). Para cuantificar los vasos

xilemáticos colonizados (i.e., con presencia de estructuras del patógeno) se estableció una malla de 4 x 5 celdas de 1 cm x 1 cm por celda superpuesta sobre cada imagen. Para estandarizar los resultados se cuantificó el número de vasos colonizados hasta el tercer entrenudo del tallo (considerando el primer entrenudo la región justo después del epicotilo). Para cada planta y zona muestreada se observaron cuatro bloques con 20 celdas por bloque. Con los datos obtenidos se calculó la Incidencia e Intensidad de Colonización vascular (*ItCv*) de cada región de la planta de cada una de las combinaciones cultivar, raza y tiempo de muestreo. La Incidencia de colonización vascular se estimó por la ausencia o presencia de estructuras fúngicas en la sección del vaso del xilema, mientras que la Intensidad de Colonización vascular se estimó como el área de lumen de la sección del vaso del xilema ocupado por estructuras fúngicas.

V.3.5. Análisis de datos

Caracterización de aislados de *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* transformados

El radio de la colonia fúngica (CR_{final}) tras 9 días de incubación, así como la velocidad de crecimiento radial (VCR) obtenidos para cada uno de los aislados de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris*, se analizaron mediante análisis de varianza con el módulo de modelos lineales (GLM) del paquete estadístico SAS v. 9.2 (Statistical Analysis System, SAS Institute Inc., Cary, NC, EEUU). Para cada una de la razas de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris*, los valores estimados para cada una de las dos variables de crecimiento fúngico de los aislados del patógeno transformados se compararon con los correspondientes al aislado silvestre utilizando el contraste de Dunnett a un nivel de significación de $P < 0,05$.

Por otro lado, la reacción de las plantas inoculadas con los aislados transformados y silvestres se caracterizó por tres variables o elementos asociadas a la curva de progreso de la enfermedad: (i) periodo de incubación (PI) = definido como el tiempo en días transcurrido desde la inoculación hasta el inicio de síntomas; (ii) Índice de intensidad de enfermedad final (IIE_{final}) = IIE observado en la última fecha de evaluación de enfermedad; y (iii) ABCPIIEE = Área bajo la curva de progreso del IIE estandarizada calculada mediante la integración trapezoidal estandarizada por la duración en días, del desarrollo de la enfermedad (Madden et al., 2007). Los valores estimados para los aislados transformados y silvestres se

compararon de acuerdo a lo descrito para las variables asociadas al crecimiento miceliar.

Cuantificación de la colonización de cultivares de garbanzo con reacción diferencial por las razas 0 y 5 de *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*

Los valores de Incidencia e *ItCv* para cada combinación raza de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris*/cultivar de garbanzo, zonas y tiempos de muestreo se analizaron mediante análisis de varianza utilizando el módulo de modelos GLM de SAS. Asimismo, para cada combinación raza/cultivar se realizaron contrastes de un único grado de libertad para determinar el efecto de diversas combinaciones de tratamientos experimentales seleccionadas a $P < 0,05$.

V.4. RESULTADOS

V.4.1. Caracterización de aislados de *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* transformados

Los valores de crecimiento miceliar y reacción de enfermedad para los aislados transformados seleccionados y aislados silvestres de los que se derivan para cada una de las razas 0 y 5 de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* se presentan en la Tabla V.1. En general, los aislados transformados mostraron valores muy próximos a los alcanzados por los aislados silvestres, no obstante estas diferencias resultaron significativas ($P < 0,05$) en algunas de las variables analizadas. Así, de los cuatro aislados seleccionados de la raza 0 del patógeno, no se observaron diferencias significativas ($P < 0,05$) en cuanto a sus características de crecimiento, estimada por la extensión (CR_{final}) y VCR, ni de virulencia, estimada por el período de incubación, IIE_{final} o ABCPIIEE, a excepción de una reducción significativa en el período de incubación de los aislados F3 y F8, en el cv. P-2245, y de los aislados F3, F8 y F12 en el cv. PV-1 (Tabla V.1). Por otro lado, para los cuatro aislados seleccionados derivados del aislado Foc-W6-1, representativo de la raza 5 de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris*, los aislados F73 y F94 presentaron valores significativamente inferiores ($P < 0,05$) a los del aislado silvestre para CR_{final} y VCR, así como una reducción significativa en el período de incubación en los aislados F83, F93 y F94 en el cv. JG-62 (Tabla V.1). En ninguno de los aislados analizados se observaron diferencias en cuanto a la morfología de la colonia fúngica,

pigmentación o aspecto del micelio (Fig. V.1). En base a estos resultados se seleccionaron los aislados F11 (raza 0) y F93 (raza 5) para el estudio de los procesos de infección y patogénesis en cultivares de garbanzo.

Tabla V.1. Caracterización de aislados de las razas 0 y 5 de *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* transformados con la proteína fluorescente ZsGreen

Aislados ^a	Crecimiento micelial ^b		Elementos de la curva de progreso de enfermedad ^c														
	CR _{Final} (mm)	VCR (mm/h)	IEE _{final}				ABCPIIEE				PI						
			P-2245	JG-62	PV-1	WR-315	P-2245	JG-62	PV-1	WR-315	P-2245	JG-62	PV-1	WR-315			
<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>ciceris</i> raza 0																	
F3	36,3	0,18	1	0,00	1	0,00	0,00	0,81	0,00	0,76	0,00	0,81	0,00	16,37*	-	16,50*	-
F8	36,3	0,18	1	0,00	1	0,00	0,00	0,84	0,00	0,75	0,00	0,84	0,00	16,87*	-	16,50*	-
F11	35,8	0,18	1	0,00	1	0,00	0,00	0,81	0,00	0,71	0,00	0,81	0,00	20,12	-	18,87	-
F12	35,9	0,18	1	0,00	1	0,00	0,00	0,83	0,00	0,73	0,00	0,83	0,00	19,40	-	17,43*	-
Foc-7802†	36,2	0,18	1	0,00	1	0,00	0,00	0,84	0,00	0,71	0,00	0,84	0,00	20,00	-	20,30	-
<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>ciceris</i> raza 5																	
F73	29,3 ^{cd}	0,14*	1	1	0,00	0,00	0,00	0,90	0,00	0,87	0,90	0,00	0,00	13,75	15,62	-	-
F83	37,3	0,17	1	1	0,00	0,00	0,00	0,88	0,00	0,89	0,88	0,00	0,00	12,53	12,60*	-	-
F93	36,6	0,17	1	1	0,00	0,00	0,00	0,90	0,00	0,90	0,90	0,00	0,00	13,00	12,68*	-	-
F94	31,5*	0,15*	1	1	0,00	0,00	0,00	0,87	0,00	0,88	0,87	0,00	0,00	13,07	14,28*	-	-
Foc-W6-1†	40,2	0,19	1	1	0,00	0,00	0,00	0,90	0,00	0,86	0,90	0,00	0,00	12,93	15,56	-	-

^a Los aislados marcados con † corresponden a los aislados silvestres. Los aislados se transformaron genéticamente con la proteína autofluorescente ZsGreen de acuerdo a Khang et al. (2006).

^b CR_{Final} = Crecimiento Radial Final, estimado por el valor medio del radio de la colonia fúngica alcanzado tras 9 días de crecimiento a 25±1°C con un fotoperiodo de 12-h de una mezcla de luz blanca fluorescente y cercana al ultravioleta de 36 µE·m⁻²·s⁻¹. VCR = Velocidad Crecimiento Radial; pendiente de la recta de regresión estimada para el crecimiento diario del radio de la colonia fúngica sobre el tiempo de incubación. Cada valor es media de tres repeticiones (placas petri).

^c El desarrollo de la enfermedad se calculó según una escala de severidad de 0 a 4 cada 2 ó 3 días durante 42 días de crecimiento en cámara de crecimiento ajustada a 25±2°C y a una humedad relativa del 60 al 90% con un fotoperiodo de 14-h de luz blanca fluorescente de 360 µE·m⁻²·s⁻¹. Con los datos de incidencia y severidad se estableció un Índice de intensidad de enfermedad (IIE). PI = Periodo de incubación, definido como el tiempo transcurrido hasta el inicio de síntomas; IIE_{final} = IIE al final del experimento; ABCPIIEE = Área bajo la curva de progreso del IIE estandarizada por el tiempo de desarrollo de la reacción. Los valores corresponden a la media de cuatro macetas (con cuatro plantas por maceta).

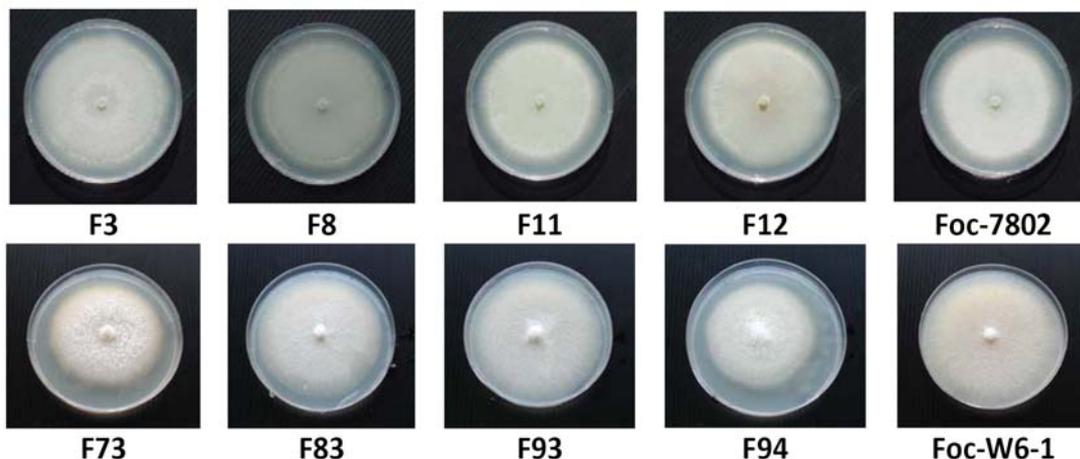


Figura V.1. Morfología de las colonias de distintos aislados de *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* transformados con la proteína autofluorescente ZsGreen en comparación con los respectivos aislados silvestres. Los aislados F3, F8, F11 y F12 corresponden a aislados transformados derivados del aislado Foc-7802 de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* raza 0, mientras que los aislados F73, F83, F93 y F94 lo son del aislado Foc-W6-1 de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* raza 5. Las colonias crecieron durante 9 días a $25\pm 1^\circ\text{C}$ con un fotoperiodo de 12-h de una mezcla de luz blanca fluorescente y cercana al ultravioleta de $36 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$.

V.4.2. Procesos de infección y colonización de cultivares de garbanzo con resistencia diferencial a las razas 0 y 5 de *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*

La dinámica espacial y temporal de los procesos de infección y colonización de las plantas de garbanzo por *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* varió considerablemente entre las diferentes combinaciones experimentales de raza/cultivar (Figs. V.2 y V.3).

Así, la raza 0 de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris*, la menos virulenta, durante el período transcurrido entre 1 y 6 ddi, coloniza extensamente la superficie de la raíz principal, incluyendo la zona meristemática que aparece como zona preferente de infección de las plántulas en los tres cultivares de garbanzo en el estudio, independientemente de su reacción de resistencia (cvs. JG-62 y WR-315) o de susceptibilidad (cv. P-2245) a dicha raza del patógeno (Fig. V.2A, V.2B y V.2C). Posteriormente, a los 8 ddi, en el cv. P-2245, se observa la colonización extensa de los espacios intercelulares del córtex de la zona inferior de la raíz cercana al meristemo radical, siendo patente además la invasión de los vasos del xilema por hifas del hongo en esa misma zona de la raíz (Fig. V.2D), sin embargo, en los otros dos cultivares, descritos como resistentes, únicamente se observan los primeros

indicios de invasión de los vasos del xilema en el cv. JG-62 (Fig. V.2E), y sólo hay colonización superficial de la raíz en el cv. WR-315 (Fig. V.2F). En el cv. P-2245 el patógeno avanza internamente en el xilema hasta alcanzar el hipocotilo y epicotilo, llegando hasta la parte inferior del tallo (primer entrenudo situado justo por encima del epicotilo) a los 10 ddi (Fig. V.2G) coincidiendo con la expresión de los síntomas iniciales de la enfermedad en las plantas analizadas, que consistieron en el amarillamiento de la parte inferior de la planta, característica del síndrome de Amarillez Vascular. Por otro lado, en el cv. JG-62 el avance del patógeno en el eje vertical de la planta fue más lento, ya que el micelio del patógeno progresa sólo hasta los vasos del xilema de la zona intermedia de la raíz en ese mismo tiempo de muestreo (Fig. V.2H), sin que además haya expresión de síntomas de enfermedad; mientras que en el cv. WR-315 el patógeno permanece confinado a los espacios intercelulares del córtex de la zona inferior de la raíz (Fig. V.2I), sin que se observe crecimiento en el interior de los vasos del xilema ni síntomas de la enfermedad. A los 12 ddi, el patógeno finalmente alcanzó los vasos del xilema del tallo del cv. JG-62 (Fig. V.2K), llegando hasta el cuarto entrenudo y presentando un nivel de colonización similar al observado en esos mismos tejidos en el cv. P-2245 (Fig. V.2J), donde las hifas del hongo se observan también en el quinto entrenudo, sin embargo, la profusa colonización de los vasos xilemáticos del cv. JG-62 por esta raza no conllevó la expresión de síntomas de la enfermedad; quedando asimismo restringido el patógeno a los espacios intercelulares del córtex de la zona media de la raíz en 'WR-315' (Fig. V.2L). La situación descrita para esta última fecha de muestreo se mantuvo en las siguientes fechas de observación tras 14 y 16 ddi.

Es de destacar, que tanto en las combinaciones compatibles como incompatibles, la colonización intercelular del córtex se produjo únicamente en la raíz, no observándose en el hipocotilo o zonas situadas más arriba en el eje vertical de la planta. Por otro lado, la profusa y extensa colonización del tejido vascular acompañada de síntomas severos (3,5 en la escala 0-4) en las plantas de 'P-2245' provocaron la invasión y degeneración de la estructura de los tejidos de la parte aérea de la planta.

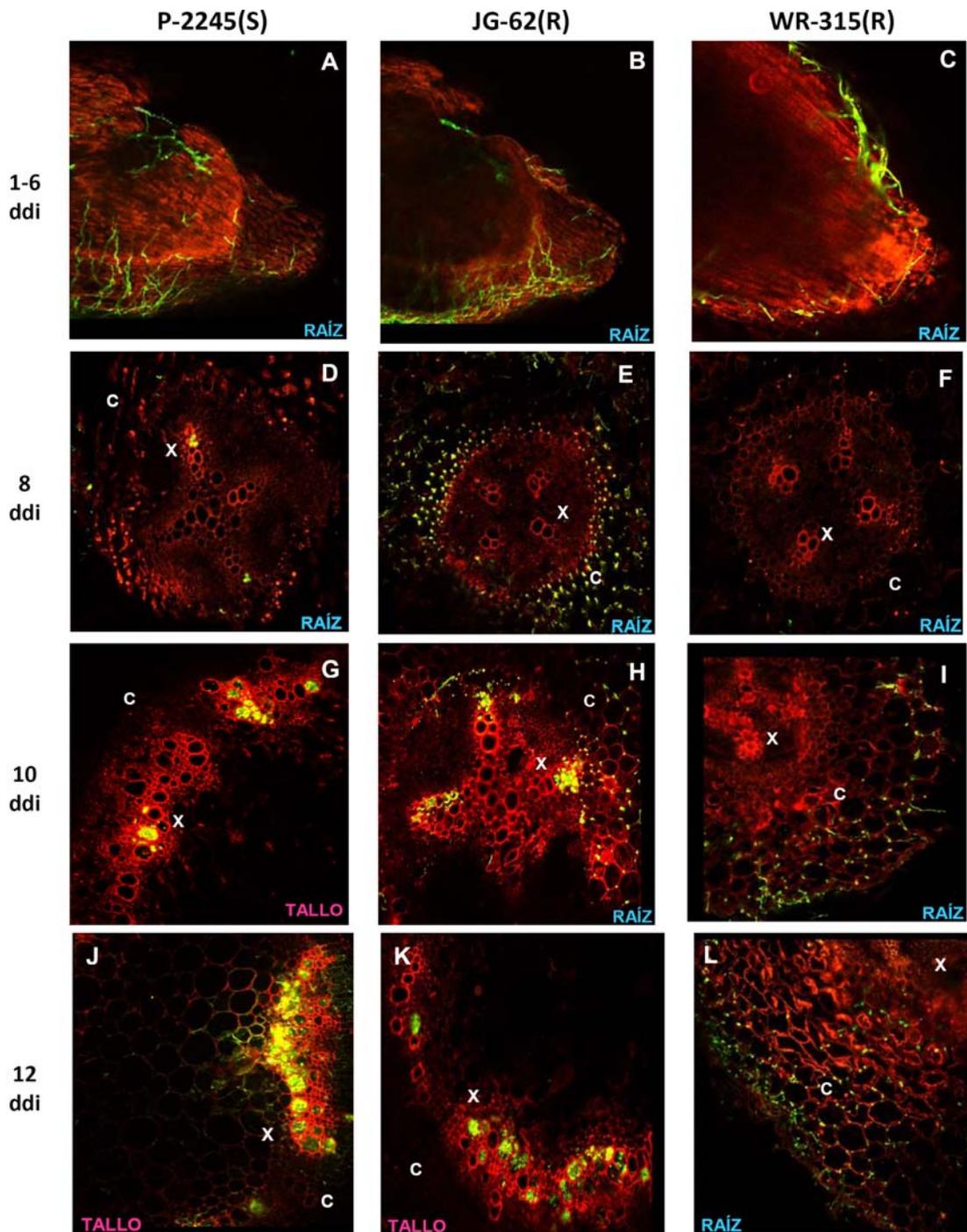


Figura V.2. Dinámica temporal y espacial de infección y colonización del aislado F11 de *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* raza 0, transformado con la proteína autofluorescente ZsGreen, en los cultivares de garbanzo P-2245 (susceptible, S), JG-62 (resistente, R) y WR-315 (R) utilizando microscopia láser confocal. **c:** Córtex, **x:** Xilema, **ddi:** días después de la inoculación. Paneles **A-C:** ápice radical; **D-F:** zona inferior de la raíz; **G:** primer entrenudo del tallo; **H:** zona media de la raíz; **I:** zona inferior de la raíz; **J:** quinto entrenudo del tallo; **K:** cuarto entrenudo del tallo; **L:** zona media de la raíz.

La raza 5 de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris*, de mayor virulencia a la raza 0, presentó en los primeros 4 días de incubación, y para los tres cultivares analizados, un comportamiento similar al descrito para la raza 0 del patógeno a los 6 ddi, es decir, el hongo colonizó extensamente la superficie de la raíz, con el meristemo radical como zona preferente de infección (Fig. V.3A, V.3B y V.3C). La colonización de los vasos xilemáticos de la zona inferior de la raíz se inicia a los 6 ddi en el cv. P-2245, altamente susceptible, 2 días antes de lo observado para la raza 0, lo cual va precedido de una extensa colonización intercelular del córtex (Fig. V.3D). En cambio, no se observa infección del córtex o xilema en los cvs. JG-62 y WR-315 en esa misma fecha de muestreo (Fig. V.3E y V.3F). No obstante, la presencia del patógeno en el tallo se hace patente a los 8 ddi tanto en el cv. P-2245 (Fig. V.3G) como en el cv. JG-62 (Fig. V.3H), extendiéndose hasta el segundo entrenudo del tallo y epicotilo, respectivamente; no obstante en este momento la presencia del patógeno no conlleva la expresión de los síntomas de Fusariosis Vascular. En el cv. resistente WR-315 no se apreció invasión del córtex ni del xilema a lo largo de todo el eje principal de la raíz o tallo (Fig. V.3I). Finalmente, la extensa colonización de raíz y tallo de los cvs. P-2245 y JG-62 va unida a la expresión de síntomas típicos de Marchitez Vascular a los 9 ddi (Fig. V.3J y V.3K) observándose hifas del hongo en los haces del xilema hasta el cuarto, y tercer entrenudo respectivamente. En este momento, se observó el avance intercelular de las hifas del patógeno a través del córtex en el cv. WR-315, así como la penetración de los haces xilemáticos de la zona inferior de la raíz (Fig. V.3L).

En fechas de muestreo posteriores, se continua observando la presencia extensa del patógeno en los haces vasculares de la parte aérea a medida que avanza el desarrollo de síntomas de Marchitez Vascular en los cvs. P-2245 y JG-62 hasta producirse la muerte de las plantas tras 14 ddi. En las plantas del cv. WR-315 que permanecieron asintomáticas se prolongaron las observaciones hasta los 18 ddi, en que las hifas del patógeno infectaron los haces del xilema de la raíz e hipocotilo, pero en ningún caso el epicotilo ni la parte aérea. Por último indicar que en las interacciones compatibles, mientras que en el cv. JG-62 rara vez tiene lugar la colonización del córtex del hipocotilo a lo largo de todo el período de observación, en el cv. P-2245 sí es más frecuente dicha colonización coincidiendo además con el momento de expresión de síntomas de Marchitez Vascular.

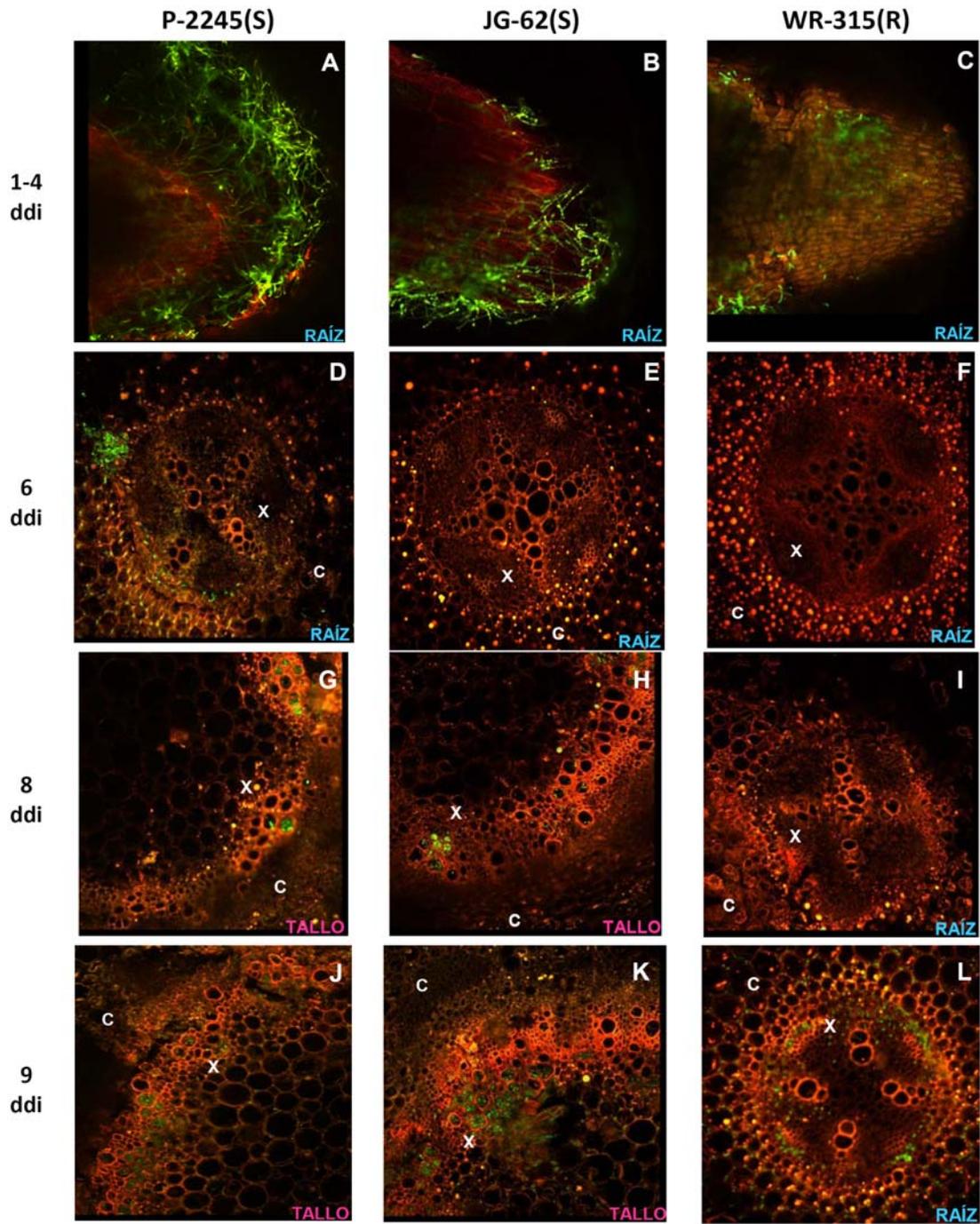


Figura V.3. Dinámica temporal y espacial de infección y colonización del aislado F93 de *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* raza 5, transformado con la proteína autofluorescente ZsGreen, en los cultivares de garbanzo P-2245 (susceptible, S), JG-62 (S) y WR-315 (resistente, R) utilizando microscopia láser confocal. c: Córtex, x: Xilema, ddi: días después de la inoculación. Paneles A-C: ápice radical; D-F: zona inferior de la raíz; G: segundo entrenudo del tallo; H: epicotilo; I: zona inferior de la raíz; J: cuarto entrenudo del tallo; K: tercer entrenudo del tallo; L: zona inferior de la raíz.

V.4.3. Cuantificación de la colonización vascular de cultivares de garbanzo con resistencia diferencial a las razas 0 y 5 de *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*

El nivel de colonización de los vasos del xilema de plantas infectadas se evaluó por el número de vasos colonizados (Incidencia) y el porcentaje del lumen de éstos ocupado por hifas del hongo (Intensidad de Colonización vascular, *ItCv*). Ambas variables estuvieron altamente correlacionadas ($r=0,7936$, $P<0,0001$) por lo que sólo se presentarán los valores y resultados de los análisis de datos correspondientes a la Intensidad de Colonización vascular, en adelante *ItCv*. La *ItCv* estuvo influida significativamente ($P<0,05$) por las distintas combinaciones experimentales y sus interacciones. No obstante los factores principales que explicaron en mayor medida la variación del nivel de colonización vascular fueron la raza del patógeno ($F=500,81$, $P<0,0001$, 46,16% Cuadrado Medio del Error (CME)) y cultivar de garbanzo ($F=279,16$, $P<0,0001$, 25,73% CME), y en menor medida el tiempo de muestreo ($F=75,13$, $P<0,0001$, 6,93% CME) y la zona de la planta muestreada ($F=16,88$, $P<0,0001$, 1,56% CME). Las interacciones entre los factores principales, aunque en muchos casos resultaron significativas ($P<0,05$) representaron un bajo porcentaje de la variación, que osciló entre 5,59 y 0,67% del CME.

La *ItCv* en la planta de garbanzo tendió a incrementarse en el tiempo, alcanzando los mayores niveles de colonización tras 14 ddi, a excepción de la combinación cv. JG-62/*F. oxysporum* f. sp. *ciceris* raza 5 en que las plantas evaluadas en la última fecha de muestreo (14 ddi) mostraron un descenso en la *ItCv* motivado por la degeneración de los tejidos de la planta por el avanzado estado de desarrollo de la enfermedad (i.e., nivel de severidad 4) (Fig. V.4). Asimismo, en aquellas combinaciones experimentales en que hubo desarrollo de síntomas de Fusariosis Vascular, el nivel medio de *ItCv* fue significativamente superior ($F=170,94$, $P<0,0001$) en aquellas fechas de muestreo en que las plantas mostraron síntomas de la enfermedad. Además, la *ItCv* estuvo positiva y significativamente correlacionado con el nivel de severidad de Fusariosis Vascular ($r=0,5777$, $P=0,0120$).

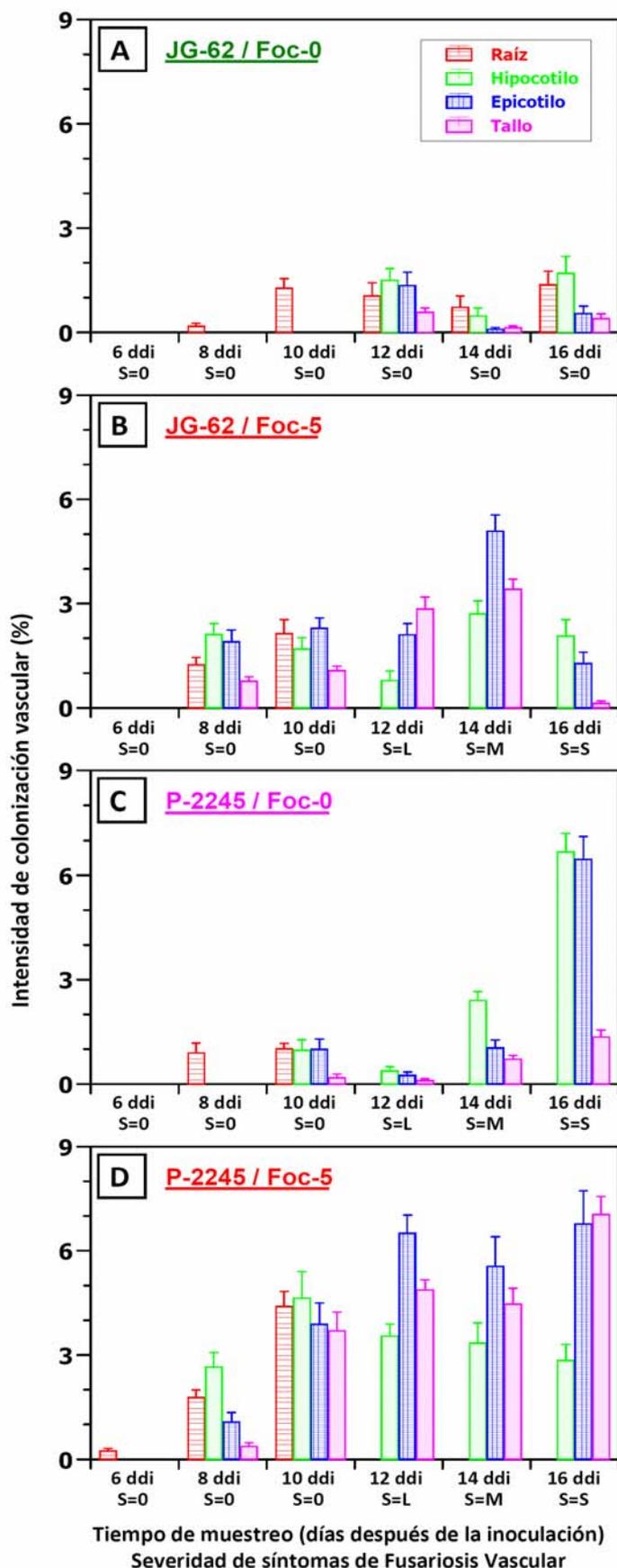


Figura V.4. Intensidad de Colonización vascular en cultivares de garbanzo infectados por las razas 0 y 5 de *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* transformados con la proteína autofluorescente ZsGreen en diferentes fechas de muestreo y zonas de la planta. Las plantas inoculadas crecieron en cultivo hidropónico en agitación a 110 rpm, $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ y un fotoperiodo de 14-h de luz blanca fluorescente de $360 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$ y se muestrearon a intervalos de 1 día desde los 6 a los 16 días después de la inoculación. En cada planta se muestrearon la raíz (parte inferior y media de la raíz principal), hipocotilo, epicotilo y tallo (tres primeros entrenudos del tallo principal). Los valores de severidad indican el nivel de severidad de síntomas foliares estimados visualmente en el momento del muestreo mediante una escala (0-4), donde S=0: ausencia de síntomas; S=L: síntomas ligeros, valores de severidad >0 y <2 ; S=M: síntomas moderados, valores de severidad ≥ 2 y <3 ; S=S: síntomas severos, valores de severidad ≥ 3 . Cada barra es la media de dos plantas, en la que cuantificaron cuatro bloques, con 20 vasos xilemáticos por bloque. Las líneas verticales indican el error estándar de la media.

Globalmente, y para las diferentes fechas de muestreo y zonas de la planta, la *ItCv* fue significativamente superior ($F=728,94$, $P<0,0001$) en la combinación 'P-2245'/*F. oxysporum f. sp. ciceris* raza 5 con un nivel medio de colonización vascular del $3,23\pm 0,12\%$, descendiendo significativamente ($F=277,14$, $P<0,0001$) en el cv. JG-62 infectado por esta misma raza del patógeno hasta el $1,60\pm 0,07\%$. Además, estas dos combinaciones experimentales que incluyen plantas infectadas por la raza 5 de *F. oxysporum f. sp. ciceris* alcanzaron mayores niveles ($F=546,93$, $P<0,0001$) de *ItCv* comparados a los alcanzados por la raza 0 del patógeno en ambos cultivares. Para esta última raza de *F. oxysporum f. sp. ciceris*, la *ItCv* se estimó en $1,12\pm 0,07\%$ para el cv. P-2245 y fue muy inferior ($F=58,62$, $P<0,0001$) en el cv. JG-62 en que alcanzó el $0,47\pm 0,04\%$ (Fig. V.4). Es de destacar, que esta última combinación experimental 'JG-62'/*F. oxysporum f. sp. ciceris* raza 0 no mostró síntomas de Fusariosis Vascular en ninguna de las fechas de muestreo y es considerada como resistente a esta raza. Finalmente, en el cultivar WR-315, considerado igualmente resistente a las dos razas de *F. oxysporum f. sp. ciceris* evaluadas, únicamente se observó colonización vascular en la zona media de la raíz a los 10 ddi y el hipocotilo a los 14 ddi en las plantas infectadas por la raza 5 del patógeno, alcanzando un nivel de colonización vascular medio en dichas zonas de la planta de $1,17\pm 0,16\%$. En cambio, para esas mismas fechas de muestreo y esta misma raza de *F. oxysporum f. sp. ciceris*, la *ItCv* en los cvs. JG-62 y P-2245 fue significativamente superior ($F=123,72$, $P<0,0001$) a la observada en 'WR-315', y se estimó en $2,77\pm 0,18$ y $4,31\pm 0,18\%$, respectivamente.

La *ItCv* a lo largo del eje principal de la planta varió en las distintas combinaciones experimentales de cultivar y raza del patógeno, así como con el tiempo de muestreo y con el nivel de síntomas de Fusariosis Vascular. Así, en la combinación 'JG-62'/*F. oxysporum f. sp. ciceris* raza 0, únicamente se observó colonización vascular en la parte inferior y media de la raíz en los muestreos realizados a los 8 y 10 ddi. En los muestreos posteriores realizados a los 12, 14 y 16 ddi, la *ItCv* fue significativamente superior en la parte subterránea de la planta ($F=14,15$, $P=0,0002$), decreciendo significativamente en el epicotilo ($F=6,77$, $P=0,0095$), mientras que no existieron diferencias significativas en los niveles de colonización vascular alcanzados en el epicotilo y el tallo ($F=1,72$, $P=0,1900$) (Fig. V.4A, Tabla V.2). En este mismo cultivar, las plantas infectadas por la raza 5, pero aún asintomáticas, no mostraron diferencias significativas ($F<2,21$, $P>0,1385$) en los niveles de *ItCv* alcanzados en las diferentes zonas de la planta, a excepción de

una mayor ($F=18,05$, $P<0,0001$) intensidad de colonización en el epicotilo comparada a la alcanzada en el tallo (Fig. V.4B, Tabla V.2). En cambio, en fases más avanzadas, en plantas que ya mostraban síntomas de Fusariosis Vascular, la *ItCv* progresó acrópetamente en la planta, observándose la mayor intensidad de colonización en la parte aérea ($F=6,43$, $P=0,0144$) y en particular en el epicotilo y el tallo, en este orden ($F<11,70$, $P<0,0148$) (Fig. V.4B, Tabla V.2). De este patrón de colonización hay que excluir las plantas observadas tras 16 ddi en que el avanzado estado de desarrollo de la enfermedad provocó el colapso generalizado de la planta y degeneración del xilema, particularmente de la parte aérea, que determinó la presencia de una menor intensidad de colonización por el patógeno (Fig. V.4B). En el cv. P-2245, en plantas asintomáticas, ambas razas de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* presentan un patrón similar de colonización, mostrando una mayor intensidad en la parte subterránea de la planta ($F>10,06$, $P<0,0017$) (Fig. V.4C y V.4D, Tabla V.2), aunque se alcanzaron valores significativamente mayores en la raza 5, respecto a la raza 0 ($F=171,31$, $P<0,0001$) (Fig. V.4C y V.4D). En cambio en plantas con síntomas existió un patrón diferencial de colonización (Fig. V.4C y V.4D). Así, en la raza 0 y de forma similar a lo descrito para el cv. JG-62 infectado por esta misma raza, la *ItCv* fue significativamente superior ($F=44,53$, $P<0,0001$) en la parte subterránea (Fig. V.4C, Tabla V.2), aunque en plantas en avanzado desarrollo de síntomas se observaron elevados niveles de *ItCv* en el epicotilo (Fig. V.4C). Por el contrario, en este mismo cv. P-2245 pero infectado por la raza 5 del patógeno, los mayores niveles ($F=39,71$, $P<0,0001$) de *ItCv* se alcanzaron en la parte aérea, siendo similares los valores observados en el epicotilo y resto del tallo de la planta ($F=2,83$, $P=0,0928$) (Fig. V.4D, Tabla V.2).

Tabla V.2. Efecto de la fecha y zona de muestreo de la planta en la intensidad de colonización vascular de razas 0 y 5 de *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* (Foc) en cultivares de garbanzo con resistencia diferencial

Fuente de variación ^a	Cv. JG-62						Cv. P-2245					
	Foc-0			Foc-5			Foc-0			Foc-5		
	F	P > F	F	P > F	F	P > F	F	P > F	F	P > F	F	P > F
Fecha de muestreo	15,96	<0,0001	30,20	<0,0001	165,68	<0,0001	30,72	<0,0001	30,72	<0,0001	30,72	<0,0001
Zona de la planta	9,22	<0,0001	7,10	<0,0001	37,00	<0,0001	5,60	0,0008	5,60	0,0008	5,60	0,0008
Fecha x Zona	2,57	0,0022	7,69	<0,0001	20,77	<0,0001	6,47	<0,0001	6,47	<0,0001	6,47	<0,0001
Contrastes para plantas asintomáticas (Muestreros 8 y 10 ddi)^b												
Parte subterránea vs. aérea	---	---	2,20	0,1386	10,07	0,0016	11,56	0,0007	11,56	0,0007	11,56	0,0007
Raíz vs. Hipocotilo	---	---	<u>0,55^d</u>	0,4578	6,09	0,0139	<u>1,45</u>	0,2283	<u>1,45</u>	0,2283	<u>1,45</u>	0,2283
Hipocotilo vs. Epicotilo	---	---	<u>0,50</u>	0,4816	<0,01	0,9525	6,37	0,0118	6,37	0,0118	6,37	0,0118
Epicotilo vs. Tallo	---	---	18,05	<0,0001	4,58	0,0328	0,93	0,3347	0,93	0,3347	0,93	0,3347
Contrastes para plantas con síntomas (Muestreros 12 a 16 ddi)^e												
Parte subterránea vs. aérea	14,15	0,0002	<u>6,43</u>	0,0114	44,53	<0,0001	<u>39,71</u>	<0,0001	<u>39,71</u>	<0,0001	<u>39,71</u>	<0,0001
Hipocotilo vs. Epicotilo	6,77	0,0095	<u>11,69</u>	0,0007	4,78	0,0291	<u>39,67</u>	<0,0001	<u>39,67</u>	<0,0001	<u>39,67</u>	<0,0001
Epicotilo vs. Tallo	1,72	0,1900	5,99	0,0147	51,61	<0,0001	2,83	0,0928	2,83	0,0928	2,83	0,0928

^a Las plantas inoculadas crecieron en cultivo hidropónico en agitación a 110 rpm, 25±1°C y un fotoperíodo de 14-h de luz blanca fluorescente de 360 µE m⁻²s⁻¹ y se muestrearon a intervalos de 2 días desde los 6 a los 16 días después de la inoculación. En cada planta se muestrearon la raíz (parte inferior y media de la raíz principal), hipocotilo, epicotilo y tallo (tres primeros entrenudos del tallo principal). Para cada combinación experimental de cultivar de garbanzo/raza de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* los valores de Intensidad de Colonización vascular se analizaron mediante análisis de varianza siguiendo un modelo factorial en el que la fecha y zona de muestreo fueron los factores principales.

^b Se realizaron contrastes de un grado de libertad entre combinaciones de tratamientos de interés a P<0,05.

^c Combinaciones experimentales en que sólo hubo colonización vascular en la parte inferior y media de la raíz por lo que no pudieron incluirse en las comparaciones.

^d Los valores del estadístico F subrayados indican que los valores estimados para el primer término del contraste son inferiores a los del segundo.

^e La combinación cv. JG-62/Foc-0 no presentó síntomas de Fusariosis Vascular a lo largo del experimento, sin embargo se incluyeron en los análisis para poder comparar los valores de intensidad de colonización vascular con el resto de combinaciones experimentales.

V.5. DISCUSIÓN

El presente Capítulo de la Tesis Doctoral se centró en caracterizar cualitativa y cuantitativamente el proceso de infección de aislados de las razas 0 y 5 representativas de los dos patotipos de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* en interacciones compatibles e incompatibles aprovechando las ventajas inherentes de la microscopía láser confocal con el objetivo de determinar la dinámica espacio-temporal de los procesos de infección y colonización del patógeno. El sistema experimental utilizado, basado en inoculación en cultivo hidropónico ha sido frecuentemente utilizado para estudios similares (e.g., Nahalkova y Fatehi, 2003; Nahalkova et al., 2008; Paparu et al., 2009; Olivain et al., 1999, 2006; Ramírez-Suero et al., 2010; Xu et al., 2006) y presenta importantes ventajas, ya que es metodológicamente simple, facilita la manipulación del material vegetal necesaria para llevar a cabo las distintas fases de los experimentos y permite obtener muestras limpias libres de artefactos como partículas de suelo u otros sustratos que puedan interferir con la observación microscópica al incidir negativamente en la emisión de autofluorescencia (Lagopodi et al., 2002). Pero más importante aún, las reacciones de enfermedad observadas en las diferentes combinaciones experimentales corresponden en cuanto a interacción diferencial y sintomatología con las observadas para el patosistema *F. oxysporum* f. sp. *ciceris*/garbanzo ya sea para este mismo sistema experimental (Cachinero et al., 2002; Jorge et al., 2006; Trapero Casas y Jiménez-Díaz, 1985) u otros que incluyen siembra en suelo infestado (e.g., Landa et al., 2004; Navas-Cortés et al., 2000, 2007; Trapero Casas y Jiménez-Díaz, 1985). Además, el cultivo hidropónico ha sido utilizado con éxito en otros patosistemas que implican diversas *formae speciales* de *F. oxysporum* como *F. oxysporum* f. sp. *medicaginis*/*M. truncatula* (Ramírez-Suero et al., 2010), *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*/tomate (Nahalkova y Fatehi, 2003; Nahalkova et al., 2008; Olivain et al., 1999, 2006) o *F. oxysporum* f. sp. *lini* W. C. Snyder & H. N. Hans./lino (*Linum usitatissimum* L.) (Olivain et al., 2003).

La utilización de organismos transformados genéticamente para estudios biológicos requiere de manera ineludible constatar que los transformantes no hayan visto alteradas ninguna de sus propiedades biológicas. En particular, en el caso de estudios de interacción planta/patógeno ha de asegurarse que los transformantes no presentan modificaciones en cuanto a sus características de

crecimiento, patogenicidad o virulencia, ya que las conclusiones de estos estudios serán asignadas al aislado silvestre del que derivan. Sin embargo, en la literatura fitopatológica son frecuentes los trabajos en los que estas cautelas no se tienen en cuenta o al menos no se indica de forma explícita. En este sentido, en esta Tesis Doctoral se ha llevado a cabo una exhaustiva y precisa caracterización de la capacidad de crecimiento, patogénica, de virulencia e identidad racial de los distintos aislados transformados de ambos patotipos de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* con respecto a sus aislados silvestres, en base a la cual se basó la elección para el estudio de los aislados transformados F11 y F93 derivados de los aislados silvestres Foc-7802 (raza 0) y Foc-W6-1 (raza 5), respectivamente.

Existen trabajos en la literatura fitopatológica en los que se utilizan en la inoculación de la planta huésped aislados transformados sin que se indique una caracterización morfológica y/o patogénica previa de los mismos (Nahalkova et al., 2008; Olivain et al., 2006; Ramírez-Suero et al., 2010; Shan y Goodwin, 2004). En otros trabajos se hace referencia a una caracterización de los aislados transformados pero no aparece explícito el resultado de la misma en el trabajo, ya sea morfométrica (Eynch et al., 2007), patogénica (Bolwerk et al., 2003; Cohen et al., 2002; Czymmek et al., 2007; Duyvesteijn et al., 2010; Jansen et al., 2005; Lagopodi et al., 2002; Martín-Rodrigues et al., 2007; Van der Goes et al., 2008; Xu et al., 2006) o de tasa de crecimiento y patogénica (Bolwerk et al., 2005). En cambio, existen estudios en los que si se realiza una caracterización explícita de esta caracterización, ya sea morfométrica (Paparú et al., 2009), molecular y de germinación de esporas (Nizam et al., 2010), patogénica (Vallad y Subbarao, 2008) o morfométrica y patogénica (Nahalkova y Fatehi, 2003) de los aislados transformados. Michielse et al. (2009) también caracterizaron exhaustivamente aislados transformados de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* respecto al genotipo silvestre, en aspectos como morfología de micro y macroconidias, penetración de celofán, asimilación de fuente de carbono y colonización de la superficie radical.

En nuestro estudio, la utilización de aislados transformados del patógeno en combinación con la microscopía láser confocal ha posibilitado abordar el estudio de la interacción de las razas 0 y 5 de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* en todas sus fases, desde los primeros estadios de adhesión y colonización de la superficie radical hasta la colonización vascular extensa del tallo. Sin embargo, en la mayoría de los casos el estudio de la interacción de *formae speciales* de *F. oxysporum* y sus

plantas huésped se limita a los tejidos subterráneos (Bolwerk et al., 2005, 2003; Duyvesteijn et al., 2005; Czymmek et al., 2007; Michielse et al., 2009; Olivain et al., 2006; Ramírez-Suero et al., 2010; Van der Does et al., 2008). Una excepción supone el trabajo de Martín-Rodrigues et al. (2007) quienes llevaron a cabo un abordaje similar al del presente trabajo en el patosistema *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli*/judía.

La penetración de las *formae speciales* de *F. oxysporum* en sus plantas huésped tiene lugar directamente o a través de heridas (Jiménez-Díaz, 1996; Nelson, 1981). En nuestro estudio, la penetración de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* tiene lugar por tejidos intactos de la plántula de garbanzo, lo que se corresponde con lo observado para este mismo patosistema por Basallote Ureba (1987) y ocurre en la mayoría de las Fusariosis Vasculares (Chi et al., 1964; Nelson, 1981; Nyvall y Haglund, 1972; Rodríguez-Gálvez y Mendgen, 1995; Virgin y Walker, 1940); no obstante aunque menos frecuente las heridas son un requisito para la infección de otras *formae speciales* como *F. oxysporum* Schlechtend.:Fr. f. sp. *batatas* (Wollenweb.) W.C. Snyder & H.N. Hans. en batata (*Ipomea batatas* L.) y *F. oxysporum* Schlechtend.:Fr. f. sp. *cubense* (E.F. Sm) W.C. Snyder & H.N. Hans. en platanera (*Musa sapientum* L.) (Jiménez-Díaz, 1996).

En ausencia de heridas, son varias las vías y modos de penetración de las plantas huésped por las *formae speciales* de *F. oxysporum*, incluyendo el meristemo radical, pelos radicales, y diversas áreas de la raíz y de la semilla (Jiménez-Díaz, 1996; Nelson, 1981); o en otras carecen de un punto preferente de penetración como *F. oxysporum* f. sp. *pisi* (J.C. Hall) W.C. Snyder & H.N. Hans. en guisante, en el que ésta puede tener lugar por los cotiledones, nudo cotiledonario y sus zonas próximas, o por zonas de la raíz incluyendo el ápice radical (Kraft, 1994). De acuerdo a nuestros resultados, el proceso de infección de garbanzo por *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* se inicia con la adhesión y colonización superficial de la epidermis de gran parte del sistema radical incluido el ápice que se identifica como punto preferente de infección. Este proceso es además común para las diferentes interacciones tanto compatibles como incompatibles. Nuestras observaciones coinciden con lo descrito para *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* en tomate por Nahalkova et al. (2008) y Olivain y Alabouvette (1997, 1999) en investigaciones en las que las plantas crecieron al igual que en nuestro estudio en cultivo hidropónico, o en otros sistemas experimentales, como los descritos por

Czymmek et al. (2007) para un aislado de *F. oxysporum* del que no se especifica *forma specialis* en *A. thaliana*, o entre otras las *formae speciales* *F. oxysporum* Schlechtend.:Fr. f. sp. *vasinfectum* (Atk.) W.C. Snyder & H.N. Hans., *lini*, *lycopersici* y *pisi* en algodónero (*Gossypium hirsutum* L.) (Rodríguez-Gálvez y Mendgen, 1995), lino (Turlier et al., 1994), tomate (Olivain y Alabouvette, 1999) y guisante (Kraft, 1994), respectivamente. Sin embargo las observaciones del presente Capítulo contradicen investigaciones previas en el patosistema *F. oxysporum* f. sp. *ciceris*/garbanzo (Basallote Ureba, 1987; Jiménez-Díaz et al., 1989; Stevenson et al., 1997), en las que la zona de inserción de los cotiledones y zonas próximas del hipo- y epicotilo constituyeron las principales vías de ingreso del patógeno en el tejido radical de la planta de garbanzo. No obstante, el tipo de inoculación y sustrato sobre el que ésta se realice puede determinar la ausencia de colonización y por tanto de penetración en esta zona de la planta, tal y como indican los resultados de Basallote Ureba (1987) en plántulas de garbanzo que crecieron en suelo infestado por *F. oxysporum* f. sp. *ciceris*, y los de Olivain et al. (2006) para la interacción *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*/tomate. Este hecho puede estar relacionado con la mayor disponibilidad de inóculo en el cultivo hidropónico, lo que facilita el contacto directo con la raíz, unido a la menor tasa de germinación de las conidias y crecimiento micelial del patógeno en el suelo infestado con menor disponibilidad de nutrientes (Nahalkova et al., 2008). Por otro lado no se observaron estructuras especializadas de penetración por *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* en el proceso de infección de la planta de garbanzo, lo cual coincide con lo observado en otras *formae speciales* (Czymmek et al., 2007; Olivain y Alabouvette, 1999; Ramírez-Suero et al., 2010). El determinar el(los) punto(s) preferente(s) de penetración puede ser de gran relevancia para poder diseñar medidas de control de cualquier naturaleza que vayan dirigidas a proteger de forma preferente dichas zonas de la raíz a la invasión por el patógeno.

Una vez que *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* penetra la planta de garbanzo, el patógeno coloniza los espacios intercelulares del córtex hasta alcanzar el cilindro central de forma análoga a lo descrito para este mismo patosistema por Stevenson et al. (1997), aunque esto no fue observado por Basallote Ureba (1987), y es común en otras *formae speciales* de esta especie como *pisi*, *lycopersici* (Bishop y Cooper, 1983) y *medicaginis* (Ramírez-Suero et al., 2010) en guisante, tomate y *M. truncatula*, respectivamente, u otros hongos de suelo causantes de Marchiteces Vasculares como *V. dahliae* en lechuga (*Lactuca sativa* L.) (Vallad y

Subbarao, 2008) y olivo (Prieto et al., 2009). Posteriormente, cuando alcanza el cilindro vascular *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* penetra en los vasos xilemáticos de la raíz y en combinaciones compatibles utiliza este tejido conductor como “avenidas” para colonizar extensa e intensamente el eje vertical del huésped hasta provocar la muerte de la planta, en parte debido a la oclusión y colapso del xilema. Este patrón de colonización vascular de los tejidos subterráneos es similar al observado en tomate y guisante por *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* y *pisi*, respectivamente (Bishop y Cooper, 1983; Kraft, 1994) pero difiere del observado para *F. oxysporum* f. sp. *medicaginis* en *M. truncatula* (Ramírez-Suero et al., 2010), donde tiene lugar un crecimiento intra- e intercelular del córtex junto con una profusa colonización del cilindro vascular.

Una vez alcanzado el xilema en los tejidos subterráneos el patógeno progresa hacia la parte aérea colonizando los vasos xilemáticos en un grado de rapidez e intensidad directamente relacionado al nivel de compatibilidad de la interacción. Así, para las tres interacciones compatibles y tanto en raíz como en tallo, la más rápida y mayor *ItCv* se alcanzó para la interacción altamente compatible cv. P-2245/*F. oxysporum* f. sp. *ciceris* raza 5, seguida de la alcanzada en el cv. JG-62 infectada por esta misma raza, disminuyendo marcadamente para ‘P-2245’ infectado por la raza 0 del patógeno de menor virulencia (Fig. V.4). Esta dinámica temporal y de intensidad de colonización también fue observada por Basallote Ureba (1987) en este mismo patosistema, pero sólo en el cv. P-2245; así como por Martín-Rodríguez et al. (2007) en plantas de judía, donde el aislado más virulento de *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli* colonizaba con mayor rapidez los haces xilemáticos que el menos virulento; y en investigaciones con diferentes niveles de compatibilidad entre aislados de *V. dahliae* y cultivares de olivo, en los que la biomasa del patotipo defoliante fue superior a la del no defoliante menos virulento, en los tejidos infectados de raíz y tallo (Rodríguez-Jurado, 1993). Por otro lado, nuestros resultados refrendan la mayor virulencia de la raza 5 de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* respecto a la raza 0 corroborando además los resultados obtenidos en el Capítulo IV de la presente Tesis Doctoral mediante el empleo de la tecnología qPCR en los que para estos mismos cultivares de garbanzo la cantidad de ADN estimada para la raza 5 del patógeno en diferentes órganos de la planta fue significativamente superior al estimado para la raza 0, y están en consonancia con los resultados de estudios de epidemiología cuantitativa en los que se indican valores umbrales de inóculo muy inferiores para la raza 5 respecto a la raza 0

necesarios para causar una cantidad similar de enfermedad en cultivares susceptibles (Navas-Cortés et al., 2000, 2007).

De especial interés son asimismo los resultados obtenidos para las interacciones incompatibles. En las enfermedades causadas por patógenos de suelo vasculares la resistencia en la planta puede operar, al menos, a tres niveles: (i) impidiendo la penetración; (ii) evitando el acceso del patógeno al sistema vascular de la planta; y (iii) restringiendo la colonización posterior de éste (Talboys, 1972). De acuerdo a nuestras observaciones, en garbanzo la resistencia operaría en el segundo nivel para la interacción cv. WR-315/*F. oxysporum* f. sp. *ciceris* raza 0, y en el tercer nivel para este mismo cultivar infectado por la raza 5 del patógeno ya que el patógeno accede y coloniza el sistema vascular de la parte inferior y media de la raíz. De la misma forma, la resistencia operaría en el tercer nivel en la interacción cv. JG-62/*F. oxysporum* f. sp. *ciceris* raza 0 en la que, aunque con menor intensidad que la raza 5, el patógeno coloniza los haces del xilema en el eje vertical de la planta desde la zona inferior de la raíz hasta la zona inferior del tallo. Sorprendentemente no se desarrollan síntomas de la enfermedad ni aparentemente la planta se vea afectada en su crecimiento. Conviene destacar que este cultivar está considerado como el susceptible universal a las razas del patógeno causantes del síndrome de Marchitez Vascular pero muestra una reacción moderadamente susceptible a la raza 1B/C, que al igual que la raza 0 induce el síndrome de Amarillez Vascular (Maya-Bolívar, 2002). Todo ello puede estar indicando que o bien la masa fúngica no ha alcanzado el umbral necesario para desencadenar los procesos en la planta que conducen a la expresión de síntomas o más plausiblemente sean otros mecanismos junto a la presencia física del patógeno en la planta los que ocasionen la expresión de enfermedad. En cualquier caso, nuestros resultados coinciden con los obtenidos en otras Marchiteces Vasculares donde la resistencia se manifiesta por una colonización restringida en el sistema vascular de la raíz y de la base del tallo, que se asocia al desarrollo de mecanismos como la oclusión de los vasos por tilosas, gomas o geles, acompañada o no por acumulación de productos antifúngicos (Bishop y Cooper, 1984; Jiménez-Díaz, 1996).

No obstante, la ocurrencia de colonización vascular en cultivares resistentes no ha sido observada en la Fusariosis Vascular del garbanzo por otros autores, tal y como indican las observaciones de Stevenson et al. (1997), quienes

empleando microscopia en campo claro no observaron la presencia del hongo en el xilema de los cultivares resistentes WR-315 y CPS-1 a las razas 1A y 2, que al igual que la raza 5 pertenecen al patotipo de Marchitez de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris*. Gupta et al. (2010) mediante microscopía electrónica de barrido constataron la presencia de conidias de la raza 1A en los vasos xilemáticos de la raíz del cv. WR-315 resistente a dicha raza. Similarmente, Basallote Ureba (1987), utilizando microscopia en campo claro para las mismas interacciones incluidas en nuestro estudio, concluyó que las reacciones asintomáticas en las interacciones incompatibles se asociaban con la ausencia de colonización vascular. Sin embargo, sí que observaron crecimiento fúngico en aislamientos en medios de cultivo en frecuencia similar y en los mismos tejidos que en las plantas en interacciones compatibles concluyendo que en interacciones incompatibles las plantas son invadidas restringidamente en las células más externas de los tejidos del hipo y epicotilo próximos a la inserción de los cotiledones, aunque por la metodología empleada no les fue posible identificar de que tejidos concretos se originaba dicho crecimiento fúngico. A pesar de ello, estos resultados estarían en mayor consonancia con lo observado en nuestro estudio, lo que demuestra la mayor potencialidad de la microscopia láser confocal para el estudio de interacciones huésped/patógeno.

Los resultados de nuestro estudio tienen asimismo importantes repercusiones para el control de la enfermedad, ya que el empleo de cultivares resistentes constituye la medida de lucha más práctica, económicamente eficiente y ambientalmente respetuosa para controlar la Fusariosis Vascular del garbanzo; sin embargo la amplia variabilidad patogénica en *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* hace necesaria la caracterización adecuada de la reacción de resistencia de los cultivares utilizados para que la aplicación de esta medida sea eficiente. Además de acuerdo a nuestros resultados esta caracterización de resistencia no debe ser meramente fenotípica sino que idealmente debería incluir un mejor conocimiento de la interacción del patógeno en cada genotipo de la planta. La microscopía láser confocal junto a la disponibilidad de aislados del patógeno genéticamente transformados se presenta por tanto como una herramienta muy adecuada para el estudio de la interacción planta/patógeno y abre las vías para obtener una más adecuada caracterización de la reacción de los cultivares y líneas de garbanzo disponibles para su empleo comercial, ya sea de forma individual o mejor aún en combinación con técnicas basadas en qPCR como las desarrolladas en el Capítulo

IV de esta Tesis Doctoral. Ello conduciría además a poder discriminar de manera más adecuada reacciones de resistencia, tolerancia fisiológica, resistencia parcial, etc., o poder discriminar entre reacciones resistentes a la infección vascular o a la expresión fenotípica de síntomas debidos a ésta. Todo ello tendría importantes implicaciones para estudios epidemiológicos y para el control de la enfermedad, en particular en programas de Mejora genética, al poder determinar el modo de acción y nivel de eficacia de medidas de control de naturaleza química o biológica.

En conclusión, los resultados obtenidos en el presente capítulo de la Tesis Doctoral muestran la idoneidad de esta herramienta biotecnológica para el estudio de la Epidemiología de la Fusariosis Vascular del garbanzo y el manejo de la misma en base a una más adecuada caracterización de las interacciones planta/patógeno, la mejor selección de germoplasma de garbanzo resistente, así como al estudio de la Biología y Ecología de las distintas razas patogénicas de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris*. Todo ello alienta a la aplicación de la microscopía láser confocal a otros patosistemas de los que formen parte patógenos vasculares de plantas de interés agronómico, para completar y caracterizar cualitativa y cuantitativamente el proceso de patogénesis, lo que contribuiría a un mejor conocimiento de las interacciones con la planta huésped de otras *formae speciales* de *F. oxysporum*, u otros patógenos de suelo causantes de Marchiteces Vasculares.

V.6. LITERATURA CITADA

Basallote Ureba, M. J. 1987. Relaciones huésped-parásito en la Marchitez del garbanzo causada por *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceri*. Tesis Doctoral, Universidad de Córdoba, 239 pp.

Baumgartner, K., Bhat, R. y Fujiyoshi, P. 2010. A rapid infection assay for *Armillaria* and real-time PCR quantitation of the fungal biomass in planta. *Fungal Biol.* 114:107-119.

Bishop, C. D. y Cooper, R. M. 1983. An ultrastructural study of root invasion in three vascular wilt diseases. *Physiol. Plant Pathol.* 22:15-27.

Bishop, C. D. y Cooper, R. M. 1984. Ultrastructure of vascular colonization by fungal wilt pathogens. II. Invasion of resistant cultivars. *Physiol. Plant Pathol.* 24:277-289.

Bolwerk, A., Lagopodi, A.L., Lugtenberg, B.J.J. y Bloemberg, G.V. 2005. Visualization of interactions between a pathogenic and a beneficial *Fusarium* strain during biocontrol of tomato foot and root rot. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 18:710-721.

Bolwerk, A., Lagopodi, A. L., Wijfjes, A. H. M., Lamers, G. E. M., Chin-A-Woeng, T. F. C., Lugtenberg, B. J. J. y Bloemberg, G. V. 2003. Interactions in the tomato rhizosphere of two

Pseudomonas biocontrol strains with the phytopathogenic fungus *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*. Mol. Plant-Microbe Interact. 11:983-993.

Cachinero, J.M., Hervás, A., Jiménez-Díaz, R.M. y Tena, M. 2002. Plant defense reactions against *Fusarium* wilt in chickpea induced by incompatible race 0 of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* and nonhost isolates of *F. oxysporum*. Plant Pathol. 51:765-776.

Chi, C.C., Childers, W.R. y Hanson, E. W. 1964. Penetration and subsequent development of three *Fusarium* species in alfalfa and red clover. Phytopathology 54:434-437.

Cohen, B.A., Amsellem, Z., Lev-Yadun, S. y Gressel, J. 2002. Infection of tubercles of the parasitic weed *Orobancha aegyptiaca* by mycoherbicide *Fusarium* species. Ann. Bot. 90:567-578.

Czymmek, K.J., Fogg, M., Powell, D.H., Sweigard, J., Park, S.-Y. y Kang, S. 2007. In vivo time-lapse documentation using confocal and multi-photon microscopy reveals the mechanisms of invasion into the *Arabidopsis* root vascular system by *Fusarium oxysporum*. Fungal Genet. Biol. 44:1011-1023.

Czymmek, K.J., Whallon, J.H. y Klomparens, K.L. 1994. Confocal microscopy in mycological research. Exp. Mycol. 18:275-293.

Dolar, F. S. 1997. Determination of the races of *Fusarium oxysporum* f.sp. *ciceris* in Ankara province. Turkey. J. Turk. Phytopath. 26:11-15.

Duyvesteijn, R.G.E., Van Wijk, R., Boer, Y., Rep, M., Cornelissen, B.J.C. y Haring, M.A. 2005. Frp1 is a *Fusarium oxysporum* F-box protein required for pathogenicity on tomato. Mol. Microbiol. 57:1051-1063.

Eynck, C., Koopmann, B., Grunewaldt-Stoeker, G., Karlovsky, P. y von Tiedemann, A. 2007. Differential interactions of *Verticillium longisporum* and *V. dahliae* with *Brassica napus* detected with molecular and histological techniques. Eur. J. Plant Pathol. 118:259-274.

Food and Agriculture Organization of the United Nations Statistical Database (FAOSTAT). 2009. FAOSTAT production statistics of crops. Available online at <http://faostat.fao.org/site/567/default.aspx#ancor>.

Gupta, S., Chakraborti, D., Rangi, R.K., Basu, D. y Das, S. 2009. A Molecular insight into the early events of Chickpea (*Cicer arietinum*) and *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceri* (race 1) interaction through cDNA-AFLP analysis. Phytopathology 99:1245-1257.

Gupta, S., Chakraborti, D., Sengupta, A., Basu, D. y Das, S. 2010. Primary metabolism of chickpea is the initial target of wound inducing early sensed *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceri* race I. PLoS ONE 5, art. n°. e9030.

Halila, M. H. y Strange, R. N. 1996. Identification of the causal agent of wilt of chickpea in Tunisia as *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceri* race 0. Phytopathol. Mediterr. 35:67-74.

Haware, M. P. y Nene. Y. L. 1982. Races of *Fusarium oxysporum*. Plant Dis. 66:809-810.

Heath, M.C. 2000. Advances in imaging the cell biology of plant-microbe interactions. Annu. Rev. Phytopathol. 38:443-459.

Hoagland, D.R. y Arnon, D.I. 1950. The water culture method for growing plants without soil. California Experimental Station. Circular N° 347.

Jansen, C., Von Wettstein, D., Schäfer, W., Kogel, K.-H., Felk, A. y Maier, F.J. 2005. Infection pattern in barley and wheat spikes inoculated with wild-type and trichodiene synthase gene disrupted *Fusarium graminearum*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 102:16892-16897.

Jiménez-Díaz, R. M. 1996. Micosis vasculares. En: Patología Vegetal, Tomo II. G. Llácer, M. M. López, A. Trapero y A. Bello, eds. Sociedad Española de Fitopatología y M. V. Phytoma-España, Valencia, pp. 913-937.

Jiménez-Díaz, R. M., Alcalá-Jiménez, A. R., Hervás, A. y Trapero-Casas, J. L. 1993. Pathogenic variability and hosts resistance in the *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* / *Cicer arietinum* pathosystem. En: Proc. Eur. Semin. Fusarium Mycotoxins, Taxonomy, Pathogenicity and Host Resistance, 3rd Ed. pp. 87-94.

Jiménez-Díaz, R. M., Basallote Ureba, M. J. y Rapoport, H. 1989. Colonization and pathogenesis in chickpea infected by races of *Fusarium oxysporum* f.sp. *ciceri*. En: Vascular Wilt Diseases of Plants. E. C. Tjamos and C. H. Beckman, eds. NATO ASI Series, Springer-Verlag, Berlin. H 28, pp. 113-121.

Jiménez-Gasco, M.M. y Jiménez Díaz, R.M. 2003. Development of a specific polymerase chain reaction based-assay for the identification of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* and its pathogenic races 0, 1A, 5 and 6. Phytopathology 93:200-209.

Jiménez-Gasco, M. M., Milgroom, M. G. y Jiménez-Díaz, R. M. 2002. Gene genealogies support *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* as a monophyletic group. Plant Pathol. 51:72-77.

Jiménez-Gasco, M. M., Pérez-Artés, E. y Jiménez-Díaz, R. M. 2001. Identification of pathogenic races 0, 1B/C, 5, and 6 of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* with random amplified polymorphic DNA (RAPD). Eur. J. Plant Pathol. 107:237-248.

Jorge, I., Navas-Cortés, J.A., Jiménez-Díaz, R.M. y Tena, M. 2006. Cell wall degrading enzymes in Fusarium wilt of chickpea: Correlation between pectinase and xylanase activities and disease development in plants infected with two pathogenic races of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*. Can. J. Bot. 84:1395-1404.

Khang, C., Park, S., Rho, H., Lee, Y., y Kang, S. 2006. Agrobacterium tumefaciens-mediated transformation and mutagenesis of filamentous fungi *Magnaporthe grisea* and *Fusarium oxysporum*. En: Agrobacterium Protocols. K. Wang, ed. Humana Press, Totowa. pp. 403-420.

Klee, H. 2000. A guide to Agrobacterium binary Ti vectors. Trends Plant Sci. 5:446-451.

Kraft, J. M. 1994. Fusarium wilt of peas (a review). Agronomie 14:561-567.

Lagopodi, A.L., Ram, A.F.J., Lamers, G.E.M., Punt, P.J., Van den Hondel, C.A.M.J.J., Lugtenberg, B.J.J. y Bloemberg, G.V. 2002. Novel aspects of tomato root colonization and infection by *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* revealed by confocal laser scanning microscopic analysis using the green fluorescent protein as a marker. Mol. Plant-Microbe Interact. 15:172-179.

Landa, B. B., Navas-Cortés, J. A. y Jiménez-Díaz, R. M. 2004. Influence of temperature on plant-rhizobacteria interactions related to biocontrol potential for suppression of Fusarium wilt of chickpea. Plant Pathol. 53:341-352.

Madden, L. V., Hughes, G. y van den Bosch, F. 2007. The Study of Plant Disease Epidemics. The American Phytopathological Society, St. Paul, MN, EEUU. 421 pp.

Martín-Rodríguez, M., García-Sánchez, M.A., Ramos, B., De Vega-Bartol, J.J., Eslava, A.E. y Díaz-Mínguez, J.M. 2007. Estudio mediante microscopía confocal de la infección de judía por *Fusarium oxysporum*. Boletín SEF n° 59.

Maya Bolívar, S.M. 2002. Influencia de factores edáficos y de los componentes del patosistema *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* / *Cicer arietinum* en el desarrollo de la Fusariosis Vascular del garbanzo. Tesis Doctoral, Universidad de Córdoba, 327 pp.

Michielse, C.B., Van Wijk, R., Reijnen, L., Manders, E.M.M., Boas, S., Olivain, C., Alabouvette, C. y Rep, M. 2009. The nuclear protein Sge1 of *Fusarium oxysporum* is required for parasitic growth. PLoS Pathogens 5, art. n° e1000637.

Mullins, E.D., Chen, X., Romaine, P., Raina, R., Geiser, D.M. y Kang, S. 2001. Agrobacterium-mediated transformation of *Fusarium oxysporum*: An efficient tool for insertional mutagenesis and gene transfer. Phytopathology 91:173-180.

Nahalkova, J. y Fatehi, J. 2003. Red fluorescent protein (DsRed2) as a novel reporter in *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*. FEMS Microbiol. Lett. 225:305-309.

Nahalkova, J., Fatehi, J., Olivain, C. y Alabouvette, C. 2008. Tomato root colonization by fluorescent-tagged pathogenic and protective strains of *Fusarium oxysporum* in hydroponic culture differs from root colonization in soil. FEMS Microbiol. Lett. 286:152-157.

Navas-Cortés, J. A., Alcalá-Jiménez, A. R., Hau, B. y Jiménez-Díaz, R. M. 2000. Influence of inoculum density of races 0 and 5 of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* on development of Fusarium wilt in chickpea cultivars. Eur. J. Plant Pathol. 106:135-146.

Navas-Cortés, J. A., Landa, B. B., Méndez-Rodríguez, M. A. y Jiménez-Díaz, R. M. 2007. Quantitative modeling of the effects of temperature and inoculum density of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* races 0 and 5 on the development of Fusarium wilt in chickpea cultivars. Phytopathology 97:564-573.

Nelson, P. E. 1981. Life cycle and epidemiology of *Fusarium oxysporum*. En: Fungal Wilt Diseases of Plants. M. E. Mace, A. A. Bell y C. H. Beckman, eds. Academic Press, NY, EEUU. pp. 51-80.

Nene Y.L. y Reddy, M.V. 1987. Chickpeas diseases and their control. En: The Chickpea. M.C. Saxena y K.B Singh, eds. Oxford, C.A.B International. pp. 223-270.

Nene, Y.L, Sheila, V.K. y Sharma, S.B. 1996. A World List of Chickpea and Pigeon Pea Pathogens. ICRISAT Pulse Pathology Progress Report. Patancheru, India. 27 pp.

Nyvall, R.F. y Haglund, W.A. 1972 Sites of infection of *Fusarium oxysporum* f sp *pisi* race 5 on peas. Phytopathology 62:1419-1424

Nizam, S., Singh, K. y Verma, P.K. 2010. Expression of the fluorescent proteins DsRed and EGFP to visualize early events of colonization of the chickpea blight fungus *Ascochyta rabiei*. Curr. Genet. 56:391-399.

Olivain, C. y Alabouvette, C. 1997. Colonization of tomato root by a non-pathogenic strain of *Fusarium oxysporum*. New Phytol. 137:481-494.

Olivain, C. y Alabouvette, C. 1999. Process of tomato colonization by a pathogenic strain of *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*. New Phytol. 141:497-510.

Olivain, C., Humbert, C., Nahalkova, J., Fatehi, J., L'Haridon, F. y Alabouvette, C. 2006. Colonization of tomato root by pathogenic and nonpathogenic *Fusarium oxysporum* strains inoculated together and separately into the soil. Appl. Environ. Microbiol. 72:1523-1531.

- Olivain, C., Trouvelot, S., Binet, M. L., Cordier, C., Pugin, A. y Alabouvette, C. 2003.** Colonization of flax roots and early physiological responses of flax cells inoculated with pathogenic and nonpathogenic strains of *Fusarium oxysporum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 69:5453-5462.
- Paparu, P., Macleod, A., Dubois, T., Coyne, D. y Viljoen, A. 2009.** Efficacy of chemical and fluorescent protein markers in studying plant colonization by endophytic non-pathogenic *Fusarium oxysporum* isolates. *BioControl* 54:709-722.
- Prieto, P., Navarro-Raya, C., Valverde-Corredor, A., Amyotte, S. G., Dobinson, K. F. y Mercado-Blanco, J. 2009.** Colonization process of olive tissues by *Verticillium dahliae* and its in planta interaction with the biocontrol root endophyte *Pseudomonas fluorescens* PICF7. *Microbial Biotech.* 2:499-511.
- Proctor, R.H., Desjardins, A.E., Plattner, R.D. y Hohn, T.M. 1999.** A polyketide synthase gene required for biosynthesis of fumonisin mycotoxins in *Gibberella fujikuroi* mating population A. *Fungal Genet. Biol.* 27:100-112.
- Puhalla, J.E. 1985.** Classification of strains of *Fusarium oxysporum* on the basis of vegetative compatibility. *Can. J. Phytopathol.* 63:179-183.
- Ramírez-Suero, M., Khanshour, A., Martínez, Y. y Rickauer, M. 2010.** A study on the susceptibility of the model legume plant *Medicago truncatula* to the soil-borne pathogen *Fusarium oxysporum*. *Eur. J. Plant Pathol.* 126:517-530.
- Rodríguez-Gálvez, E. y Mendgen, K. 1995.** The infection process of *Fusarium oxysporum* in cotton root tips. *Protoplasma* 189:61-72.
- Rodríguez Jurado, D. 1993.** Interacciones huésped-parásito en la marchitez del olivo (*Olea europaea* L.) inducida por *Verticillium dahliae* Kleb. Tesis Doctoral, Universidad de Córdoba, 324 pp.
- Shan, X. C. y Goodwin, P. H. 2004.** Monitoring host nuclear migration and degradation with green fluorescent protein during compatible and incompatible interactions of *Nicotiana tabacum* with *Colletotrichum* species. *J. Phytopathol.* 152:454-560.
- Shehabu, M., Ahmed, S. y Sakhuja, K. 2008.** Pathogenic variability in Ethiopian isolates of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* and reaction of chickpea improved varieties to the isolates. *Int. J. Pest Manag.* 54:143-149.
- Stevenson, P. C., Turner, H. C., y Haware, M. P. 1997.** Phytoalexin accumulation in the roots of chickpea (*Cicer arietinum* L.) seedlings associated with resistance to Fusarium wilt (*Fusarium oxysporum* f.sp. *ciceris*). *Physiol. Mol. Plant. Pathol.* 50:167-178.
- Talboys, P. W. 1972.** Resistance to vascular wilt fungi. *Proc. Roy. Soc. London Ser. B.* 181:319-332.
- Thatcher, L.F., Manners, J.M. y Kazan, K. 2009.** *Fusarium oxysporum* hijacks COI1-mediated jasmonate signaling to promote disease development in *Arabidopsis*. *Plant J.* 58:927-939.
- Trapero Casas, A. y Jiménez Díaz, R.M. 1985.** Fungal wilt and root rot diseases of chickpea in southern Spain. *Phytopathology* 75:1146-1151.
- Turlier, M.-F., Eparvier, A. y Alabouvette, C., 1994.** Early dynamic interactions between *Fusarium oxysporum* f. sp. *lini* and the roots of *Linum usitatissimum* as revealed by transgenic GUS-marked hyphae. *Can. J. Bot.* 72:1605-1612.

Vallad, G.E. y Subbarao, K.V. 2008. Colonization of resistant and susceptible lettuce cultivars by a green fluorescent protein-tagged isolate of *Verticillium dahliae*. *Phytopathology* 98:871-885.

Van der Does, H.C., Duyvesteijn, R.G.E., Goltstein, P.M., van Schie, C.C.N., Manders, E.M.M., Cornelissen, B.J.C. y Rep, M. 2008. Expression of effector gene SIX1 of *Fusarium oxysporum* requires living plant cells. *Fungal Genet. Biol.* 45:1257-1264.

Virgin, W.J. y Walker, J.C. 1940. Relation of the near wilt fungus to the pea plant. *J. Agric. Res.* 60:241-248.

Xu, L., Nonomura, T., Suzuki, S., Kitagawa, Y., Tajima, H., Okada, K., Kusakari, S., Matsuda, Y. y Toyoda, H. 2006. Symptomatic evidence for differential root invasion by *Fusarium* crown and root rot pathogens between common tomato *Lycopersicon esculentum* and its varieties. *J. Phytopathol.* 154:577-586.

CAPITULO VI

DISCUSIÓN GENERAL Y CONCLUSIONES

VI.1. DISCUSIÓN GENERAL

El cultivo del garbanzo puede verse afectado por gran número de enfermedades de diversa etiología, destacando entre las originadas por patógenos de suelo, las causadas por varias especies patogénicas pertenecientes al género *Fusarium*. Algunas de estas especies son difíciles de distinguir en base a sus características morfológicas exclusivamente, pudiendo conducir a una caracterización errónea de los diversos patógenos, con la consiguiente posibilidad de aplicar estrategias de manejo de las enfermedades inadecuadas, en caso de que éstas estén disponibles. Por ello, es de gran importancia la identificación correcta no sólo a nivel de especie, sino de *forma specialis*, e incluso patotipo y raza dentro de una *forma specialis*, de los patógenos que afectan a los cultivos agrícolas en general, y al cultivo del garbanzo en particular.

Las tecnologías basadas en el ADN como la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) ha solventado, en cierta medida, esta problemática, ya que se han desarrollado protocolos de PCR específicos que permiten la identificación inequívoca de la especie y ciertas *formae speciales* dentro de ésta, como es el caso de *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*, el hongo de suelo causante de la Fusariosis Vascular, la enfermedad causada por un hongo de suelo con un mayor impacto en el rendimiento del cultivo del garbanzo en el mundo, así como de sus patotipos (Amarillez o Marchitez) e incluso de algunas de sus razas patogénicas (García-Pedrajas et al., 1999; Jiménez-Gasco y Jiménez-Díaz, 2003; Kelly et al., 1998).

En relación a las especies patogénicas del género *Fusarium* sobre garbanzo, en el Capítulo II de la presente Tesis Doctoral se describe, por primera vez en la literatura fitopatológica, a *F. redolens* como un nuevo agente patógeno del cultivo de garbanzo causante de la enfermedad que hemos denominado “Fusarium yellows” y que se caracteriza por ocasionar síntomas de amarillamiento similares a los originados por las razas 0 y 1B/C de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* causantes del síndrome de Amarillez Vascular, aunque con ausencia de colonización vascular de la planta de garbanzo. Su caracterización ha sido posible gracias, en gran medida, al empleo de distintas metodologías basadas en el ADN que han posibilitado su identificación inequívoca. Además, en este Capítulo II se demostró su patogenicidad sobre tres cultivares de garbanzo susceptibles y se

evaluó la virulencia diferencial de siete aislados de este nuevo patógeno de tres países distintos. El empleo de diversas herramientas biotecnológicas basadas en el ADN permitió la identificación y diferenciación clara y precisa de los distintos aislados pertenecientes a *F. oxysporum* y *F. redolens* obtenidos de plantas de garbanzo mostrando síntomas similares de Amarillez Vascular, las cuales constituyen dos especies muy parecidas morfológicamente (Fravel et al., 2003) y, por tanto, muy difíciles de diferenciar en base únicamente a sus características morfológicas. Así, la técnica RFLP-IGS nos permitió distinguir claramente los aislados de estas dos especies, ya que distintos aislados presentaron un mismo perfil RFLP-IGS dentro de cada especie que, a su vez, era diferente entre especies. Este hecho se corroboró con la secuenciación y análisis filogenético del gen TEF-1 α , que tipificó con exactitud los distintos aislados dentro de cada especie y englobó en grupos independientes a los aislados de *F. oxysporum* respecto a los de *F. redolens*, en consonancia con los resultados obtenidos en trabajos anteriores por otros autores (Baayen et al., 2001; Nitschke et al., 2009; O'Donnell et al., 1998a). Por último, la PCR específica de la especie *F. redolens* confirmó la caracterización basada en la secuencia del gen TEF-1 α de los aislados asignados a esta especie.

Como se ha comentado anteriormente la diferenciación entre *F. oxysporum* y *F. redolens* ha sido históricamente problemática, ya que además de compartir una gran homología en sus rasgos morfológicos, inducen enfermedades de sintomatología similar, lo cual les hace propensas a una identificación incorrecta y, por tanto, a un diagnóstico erróneo de la enfermedad que causan en distintas plantas huésped. Este hecho ha ocurrido en clavel (Bogale et al., 2007), haba y lino (Baayen et al., 2001), y posiblemente en garbanzo. Así, Trapero-Casas y Jiménez-Díaz (1985a) describieron la ocurrencia de aislados de *F. oxysporum* procedentes de plantas de garbanzo en el sur de España mostrando síntomas similares a los observados en plantas inoculadas con aislados de *F. redolens* en el Capítulo II de esta Tesis Doctoral, y además los aislados de ambas especies compartían la característica de formar colonias con micelio de color rojizo, a diferencia del color crema-salmón típico de las colonias de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris*. Lo anteriormente mencionado nos puede llevar a concluir que los aislados analizados por Trapero-Casas y Jiménez-Díaz (1985a) en realidad pertenecían a *F. redolens*, conclusión que además se ve reforzada por el hecho de que en ambos trabajos el nivel de síntomas de enfermedad inducido era similar, sin llegar en

ningún caso a ocasionar la muerte del huésped susceptible, lo que conlleva a catalogarlo como un patógeno débil sobre la planta de garbanzo; a diferencia de los aislados de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* causantes del síndrome de Amarillez Vascular que son capaces de ocasionar la muerte de la misma. Este hecho se vio apoyado por la confirmación en el Capítulo II de la existencia de un aislado originalmente tipificado como perteneciente al patotipo de Amarillez de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* (aislado 7982) cuando, en realidad, pertenece a la especie *F. redolens*. Además, al igual que los resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral en garbanzo, *F. redolens* se ha considerado habitualmente como un patógeno débil en diferentes cultivos de leguminosas (Bienapfl et al., 2010; Clarkson, 1978); sin embargo recientemente ha sido descrito como un patógeno altamente virulento en lenteja (Riccioni et al., 2008).

Por otra parte, las distintas herramientas biotecnológicas utilizadas en el Capítulo II de este trabajo de investigación nos han facultado para caracterizar correctamente a distintos aislados de *Fusarium* spp. obtenidos de plantas de garbanzo mostrando síntomas similares a los de Fusariosis Vascular procedentes de distintos laboratorios de otros países del mundo identificados originalmente como *F. oxysporum* f. sp. *ciceris*, pero que no amplificaron el marcador específico de 1,5-kb de esta *forma specialis* (Jiménez-Gasco y Jiménez-Díaz, 2003). Estas aproximaciones metodológicas nos permitieron tipificarlos adecuadamente como pertenecientes a las especies *F. redolens*, *F. oxysporum*-complex, *Fusarium solani*-complex, *Fusarium proliferatum*, *Neocosmospora vasinfecta* y un *Fusarium* sp. sin identificar. Los resultados obtenidos en el Capítulo II de la presente Tesis Doctoral muestran la importancia de emplear distintas aproximaciones moleculares para la identificación y diferenciación rápida y precisa de distintas especies patógenas de *Fusarium* spp. que pueden causar síntomas similares en el mismo huésped, y pueden coexistir en el mismo área geográfica como pueden ser *F. oxysporum* y *F. redolens* en cultivos tales como espárrago (Wong y Jeffries, 2006), y garbanzo (presente Tesis Doctoral), guisante y haba (Booth, 1971) o lenteja (Riccioni et al., 2008), entre otros. Esto permitiría una mejor selección de germoplasma resistente y facilitaría una mejor comprensión de la Etiología y Epidemiología de las enfermedades causadas por ambas especies de hongos fitopatógenos.

Como se ha comentado anteriormente la tipificación morfológica de los aislados de ciertos *Fusarium* spp. conlleva gran dificultad y se requiere una gran

experiencia en taxonomía de *Fusarium* spp. Por tanto, estudios que pretendan analizar las poblaciones de *F. oxysporum* en suelos y en la rizosfera de plantas, así como sus interacciones con la microflora del suelo, medioambiente y genotipos de plantas huésped, demandan el desarrollo de nuevas herramientas biotecnológicas que posibiliten la correcta identificación de los aislados de esta especie. Mishra et al. (2003) desarrollaron un protocolo de PCR que permite la identificación de "*F. oxysporum sensu lato*" respecto a otros *Fusarium* spp., pero falló en la amplificación cruzada de aislados pertenecientes a 17 especies de *Fusarium* spp. En el Capítulo III de esta Tesis Doctoral se mejoró el protocolo desarrollado por Mishra et al. (2003) aumentando la especificidad del mismo, de manera que no tuvo lugar la amplificación de forma cruzada de ninguna de las 17 especies anteriormente referidas, posibilitando así la identificación inequívoca de "*F. oxysporum sensu lato*", sin afectar el aumento en la astringencia de la reacción de amplificación al límite de detección, ya que fuimos capaces de detectar hasta 0,01 ng de ADN de *F. oxysporum*.

Una vez optimizado el protocolo se buscó su aplicación a estudios de Ecología Microbiana de poblaciones de *F. oxysporum* implementándolo para ser cuantitativo, ya que, de acuerdo a nuestro conocimiento, los protocolos existentes hasta la fecha para la detección de "*F. oxysporum sensu lato*" (Edel et al., 2000; Mishra et al., 2003) no son de naturaleza cuantitativa. De esta forma se podrían solventar los problemas inherentes a la técnica de dilución en placa en medios de cultivo semiselectivos empleada habitualmente en los laboratorios de Fitopatología para determinar la densidad de población de *F. oxysporum* en muestras de plantas o suelo, la cual es prolongada en el tiempo y requiere de tediosas observaciones microscópicas para poder discriminar los distintos *Fusarium* spp. presentes en las muestras analizadas. El protocolo de PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR) específico de *F. oxysporum* desarrollado permitió la cuantificación de tres aislados pertenecientes a tres *formae speciales* de *F. oxysporum* (i.e., *ciceris*, *melonis* y *pisi*) en muestras complejas de raíces y tallos de garbanzo, melón y guisante, así como en suelo. Además, no se vio afectada la eficiencia de amplificación, sensibilidad y reproducibilidad del ensayo de qPCR por la presencia de ADN no diana de diferentes fuentes (ADN procedente de suelo o diferentes órganos de plantas), al igual que en otros protocolos de qPCR específicos de otros patógenos de suelo disponibles hasta ahora en la literatura (Atallah et al., 2007; Lievens et al., 2006; Valsesia et al., 2005).

Asimismo, el límite de detección de la técnica de qPCR desarrollada fue de 1 pg de ADN patógeno, similar al obtenido en otros protocolos de otras especies de *Fusarium* o *formae speciales* de *F. oxysporum* cuando se aplicaron a muestras de suelo o planta (Filion et al., 2003; Pasquali et al., 2006; Zambounis et al., 2007).

El protocolo de qPCR desarrollado mostró además su validez para la cuantificación de ADN de *F. oxysporum* de suelo natural y artificialmente infestado, existiendo una alta correlación entre la concentración de ADN molde cuantificada mediante qPCR y los recuentos de colonias obtenidos por la técnica de dilución en placa, así como con la densidad de inóculo establecida y los recuentos de colonias, respectivamente, siendo además capaces de cuantificar hasta aproximadamente 10^4 microconidias/g de suelo en el suelo artificialmente infestado. Asimismo se demostró la utilidad del protocolo de qPCR desarrollado para cuantificar ADN de *F. oxysporum* en raíces de cultivares de garbanzo asintomáticos que crecieron en condiciones naturales de campo en un suelo infestado con aislados patogénicos y no patogénicos de *F. oxysporum*, los cuales presentaron niveles de colonización diferentes.

Fusarium oxysporum se considera un habitante cosmopolita del suelo, así como un habitante común de las comunidades fúngicas de la rizosfera de plantas, de ahí que la aplicación conjunta del protocolo de qPCR específico de *F. oxysporum* recién desarrollado junto con protocolos de qPCR que permitan la cuantificación específica de las distintas *formae speciales* de esta especie facilitaría la comprensión de la Ecología Microbiana subyacente a las poblaciones de *F. oxysporum* patogénicas y no patogénicas y la influencia en la misma de las condiciones medioambientales, la microflora del suelo y/o la especie cultivada o cultivar de ésta, así como de la Epidemiología de las enfermedades de sus especies huésped susceptibles.

En el caso concreto de la planta de garbanzo, el desarrollo y aplicación conjunta de un protocolo de qPCR específico de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* con el protocolo específico de especie nos proporcionaría una mejor comprensión de la Epidemiología de la Fusariosis Vascular del garbanzo, así como del papel que puedan jugar los aislados no patogénicos de *F. oxysporum* como agentes de biocontrol de la enfermedad. Asimismo, el disponer de esta técnica nos facilitaría un manejo más apropiado de la enfermedad por la exclusión del patógeno, predicción del riesgo de enfermedad y programas de mejora de resistencia a la

misma. Así, en el Capítulo IV de la presente Tesis Doctoral se desarrolló un protocolo de qPCR utilizando cualesquiera de dos parejas de iniciadores FOCP1 y FOCP2 capaces de diferenciar inequívocamente todas las razas patogénicas de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* en suelo y en tejidos vegetales de otras *formae speciales*, aislados no patogénicos de *F. oxysporum* y otros *Fusarium* spp. Al igual que el protocolo de qPCR de *F. oxysporum* desarrollado en el capítulo III de este trabajo de investigación, la eficiencia de amplificación, sensibilidad y reproducibilidad del protocolo de qPCR de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* no se vieron influidos por la presencia de otras fuentes de ADN no diana al igual que en los protocolos de qPCR utilizados para la detección y cuantificación tanto en planta como en suelo de otros hongos patógenos vasculares, incluyendo otras *formae speciales* de *F. oxysporum* (Atallah et al., 2007; Lievens et al., 2007; Valsesia et al., 2005; Zhang et al., 2005), los cuales presentan un límite de detección similar al del protocolo aquí desarrollado (1 pg de ADN de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* procedente tanto de suelo como de tejidos vegetales).

En relación con la aplicabilidad del protocolo de qPCR específico de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* desarrollado al estudio de poblaciones del patógeno, éste permite la detección de una cantidad de ADN patógeno equivalente a 45 unidades formadoras de colonias (ufc) del patógeno/g de suelo, una densidad de inóculo con potencial suficiente para causar una incidencia de plantas muertas del 100% en cultivares de garbanzo altamente susceptibles a la Fusariosis Vasculosa (Landa et al., 2009). Por otra parte, el protocolo de qPCR demostró su idoneidad para su aplicación en programas de mejora de resistencia a la Fusariosis Vasculosa al permitir diferenciar claramente reacciones altamente susceptibles de resistentes en 12 cultivares de garbanzo que permanecieron asintomáticos creciendo en una parcela experimental en condiciones naturales de campo, en base a la cantidad de ADN patógeno en las raíces del huésped; existiendo además una correlación significativa y positiva entre la cantidad de ADN del patógeno en los órganos del huésped y la incidencia de plantas muertas por la enfermedad. Asimismo, el protocolo de qPCR desarrollado posibilitó la detección de diferencias significativas en la cantidad de ADN cuantificada entre dos razas de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* que presentan distinto nivel de virulencia, siendo la cantidad de ADN de la raza más virulenta (raza 5, patotipo de Marchitez) tanto en raíz como en tallo de la planta de garbanzo más alta que la de la menos virulenta (raza 0, patotipo de Amarillez).

Puesto que actualmente la utilización de cultivares resistentes constituye la medida más eficiente y económicamente rentable para el manejo de la Fusariosis Vascular (Jiménez-Díaz et al., 1993b, 1991), la posibilidad que nos ofrece la metodología recién desarrollada de cuantificar con exactitud la cantidad de ADN existente en raíces y tallos de plantas asintomáticas de garbanzo infectadas por *F. oxysporum* f. sp. *ciceris*, permitirá la caracterización rápida y precisa de las reacciones de resistencia de genotipos de garbanzo a las razas del patógeno, evitando la necesidad de recurrir necesariamente a los tradicionales ensayos de patogenicidad en los que, además de ser costosos en tiempo, recursos e instalaciones, la reacción de resistencia puede verse influida por factores medioambientales que pueden conducir a una caracterización errónea de resistencia del cultivar y/o virulencia del aislado de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* (Jiménez-Díaz et al., 1993b, 1991; Landa et al., 2001, 2006; Navas-Cortés et al., 2000, 2007; Sharma et al., 2005).

A pesar de la importancia de la Fusariosis Vascular del garbanzo en la pérdida de rendimiento del cultivo, en el mundo, existe poca información en la literatura fitopatológica acerca del estudio del proceso de patogénesis en el patosistema *F. oxysporum* f. sp. *ciceris*/garbanzo y la que existe aborda la interacción de manera parcial y presenta ciertas lagunas en aspectos relevantes del mismo. Mejorar el conocimiento existente de los procesos de patogénesis, i.e., infección, penetración y colonización de este patógeno vascular de su planta huésped contribuiría a una más completa comprensión de la Epidemiología de la enfermedad. De ahí que el Capítulo V de esta Tesis Doctoral se ha centrado en caracterizar cualitativa y cuantitativamente el proceso de infección de aislados representativos de los dos patotipos de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* en interacciones compatibles e incompatibles aprovechando las ventajas inherentes a nuevas metodologías como la microscopía de barrido láser confocal. Para ello, se transformaron dichos aislados del patógeno con la proteína autofluorescente de coral ZsGreen. Los aislados transformados seleccionados, mantuvieron intactas sus características morfológicas, de crecimiento, patogenicidad y virulencia respecto a los aislados silvestres no transformados.

Para obtener un mayor rendimiento de las ventajas que proporciona esta herramienta biotecnológica se utilizó como medio de inoculación un sistema de cultivo hidropónico que además de simple metodológicamente, permite

minimizar los daños sufridos por la planta huésped, pudiendo así completar el estudio en todas las fases de la patogénesis, sin que pudiese modificarse la naturaleza patogénica de los aislados transformados ni las reacciones de resistencia/susceptibilidad de los cultivares de garbanzo.

Los estudios de microscopía láser confocal nos permitieron analizar el proceso completo de infección del patógeno en la planta de garbanzo, desde sus primeros estadios hasta la colonización de los vasos xilemáticos de raíz y parte aérea del huésped. Un abordaje similar únicamente fue realizado por Martín-Rodrigues et al. (2007) en el patosistema *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli*/judía, mientras que el resto de trabajos que trataron el proceso de infección de otras *formae speciales* de *F. oxysporum* se centraron en el estudio de la colonización de la raíz del huésped. De acuerdo a nuestros resultados, en garbanzo, el proceso de infección por *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* se inicia con la colonización por el patógeno de la superficie radical, incluido el ápice radical, que actúa como punto de primera penetración, lo cual está de acuerdo con lo observado para otras *formae speciales* de esta especie en las mismas condiciones experimentales a las utilizadas en nuestro trabajo (Nahalkova et al. 2008; Olivain y Alabouvette, 1997, 1999) y en contra de lo observado para las mismas en inoculaciones con suelo infestado (Jiménez-Díaz et al., 1989a; Olivain et al., 2006) donde no se ha observado la colonización e infección del ápice radical por el patógeno.

Una vez establecido el hongo en el ápice radical y epidemis de la raíz de garbanzo, *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* prosigue el proceso infectivo con la colonización extensa del córtex de la zona meristemática de la raíz tanto en las interacciones compatibles como incompatibles, hecho que no coincide con lo observado en anteriores trabajos en este patosistema utilizando métodos histológicos clásicos en los que la zona preferente de penetración la constituían la zona de inserción de los cotiledones y el hipo- y epicotilo (Jiménez-Díaz et al., 1989a; Stevenson et al., 1997). Posteriormente, el patógeno avanza intercelularmente en el córtex radical, como había descrito anteriormente Stevenson et al. (1997), hasta alcanzar el cilindro vascular, donde tiene lugar la colonización intracelular de los vasos xilemáticos, a través de cuyo lumen prosigue su crecimiento hasta colonizar el resto del eje principal de la planta, de forma similar a lo descrito para otras *formae speciales* de *F. oxysporum* (Bishop y Cooper, 1983; Kraft, 1994).

Asimismo los resultados obtenidos en el capítulo V de la presente Tesis Doctoral nos han permitido constatar la existencia de colonización vascular del patógeno en interacciones incompatibles de este patosistema, contrariamente a lo observado en trabajos previos (Jiménez-Díaz et al., 1989a; Stevenson et al., 1997). La presencia del patógeno en los vasos xilemáticos de cultivares asintomáticos supone un paso más en la valoración de las reacciones de resistencia al patógeno ya que hasta el momento, aunque se había descrito la infección por el patógeno de cultivares resistentes, no se había cualificado los tejidos de la planta en los que el patógeno quedaba confinado tras la infección. Este hecho será de gran importancia para una correcta cualificación de las reacciones de resistencia de cultivares y líneas de garbanzo en programas de mejora para el desarrollo de germoplasma resistente a las diferentes razas del patógeno. Además nos permitieron corroborar los resultados obtenidos por Jiménez-Díaz et al. (1985a) y en el Capítulo IV de esta Tesis Doctoral referentes a la mayor virulencia de la raza causante del síndrome de Marchitez Vascular (raza 5) respecto a la que origina el síndrome de Amarillez Vascular (raza 0), en términos de una mayor rapidez, extensión y capacidad de colonización en todos los cultivares inoculados, así como determinar la existencia de un patrón de colonización vascular diferencial de ambas razas a partir del momento del desarrollo de síntomas de enfermedad en combinaciones compatibles e incompatibles para ambos cultivares. Así, mientras que la raza 0 presenta mayor intensidad de colonización vascular en la parte alta de la raíz y el hipocotilo subterráneo comparada a la alcanzada en el epicotilo y tallo, la raza 5 presenta mayor intensidad de colonización vascular en el epicotilo y tallo, lo cual podría estar relacionado con la virulencia diferencial inherente a ambas razas patogénicas y/o capacidad de la planta de restringir diferencialmente el proceso de crecimiento de las mismas. Asimismo, de los resultados obtenidos en el Capítulo V de esta Tesis Doctoral podemos concluir que la reacción de resistencia observada en combinaciones incompatibles, valoradas por la ausencia de síntomas de la enfermedad, no están asociadas necesariamente a la ausencia de infección ni colonización vascular de la planta, aunque sí a una menor intensidad de colonización vascular (i.e., cv. JG-62/raza 0 de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris*) aunque sí a un confinamiento del patógeno a los tejidos subterráneos, vasculares o no, de la planta (i.e., cv. WR-315/raza 5 de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris*).

Por último destacar que el trabajo desarrollado en el Capítulo V de la presente Tesis Doctoral demuestra la utilidad de la microscopía láser confocal para el estudio de la Epidemiología de la Fusariosis Vascular del garbanzo, en programas de Mejora genética para el desarrollo de germoplasma de garbanzo y en el estudio de la Biología de las distintas razas de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris*, así como anima a su aplicación a la caracterización cualitativa y cuantitativa del proceso de infección de otras *formae speciales* de *F. oxysporum*, otras especies de *Fusarium* e incluso otros hongos patógenos vasculares de su planta huésped.

VI.2. CONCLUSIONES

- 1.** Se ha descrito por primera vez a *Fusarium redolens* como un nuevo agente causal de “Fusarium yellows” en el cultivo del garbanzo en distintas regiones del mundo; la sintomatología de esta nueva enfermedad se podría confundir con la originada por el patotipo de Amarillez de *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*, agente causal de la Fusariosis Vascular. La moderada virulencia sobre cultivares de garbanzo y escasa diversidad molecular de aislados de *F. redolens* de diverso origen geográfico podría apoyar la hipótesis de que *F. redolens* ha adquirido la patogenicidad sobre garbanzo recientemente.
- 2.** Las utilización de herramientas biotecnológicas basadas en el ADN (PCRs específicas, RFLP-IGS, y secuenciación y análisis filogenético del gen TEF-1 α) han posibilitado la identificación y diferenciación clara y precisa de aislados de *F. oxysporum* y *F. redolens* procedentes de plantas de garbanzo, dos especies morfológicamente muy similares e históricamente muy difíciles de diferenciar.
- 3.** El protocolo de PCR específica de “*F. oxysporum sensu lato*” mejorado en esta Tesis Doctoral permite la detección e identificación precisa e inequívoca de los aislados de esta especie sin afectar el aumento de astringencia de las condiciones de reacción al nivel de sensibilidad del mismo.
- 4.** El protocolo de qPCR específico de “*F. oxysporum sensu lato*” desarrollado en esta Tesis Doctoral posibilitó la identificación y cuantificación precisa de la especie en muestras complejas de diferentes órganos de diversas plantas huésped y de suelo natural y artificialmente infectadas e infestadas respectivamente, validando así su aplicación a estudios de Ecología Microbiana de poblaciones de este complejo de especies.
- 5.** El protocolo de qPCR específico de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* desarrollado en esta Tesis Doctoral nos permitió la distinción de este patógeno de otras *formae speciales* de la especie, aislados no patogénicos de *F. oxysporum* y otros *Fusarium*

spp., así como la detección y cuantificación inequívoca de todas las razas patogénicas de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* en suelo y en distintos tejidos de la planta de garbanzo.

6. La capacidad del protocolo de qPCR específico de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* de diferenciar reacciones susceptibles de resistentes a la Fusariosis Vascular en plantas asintomáticas de garbanzo, así como de discernir entre el nivel de virulencia de las razas del patógeno en plantas infectadas, posibilita su empleo en programas de Mejora de germoplasma de garbanzo, así como en estudios encaminados a una mejor comprensión de la Epidemiología de la Fusariosis Vascular y de la Biología de las distintas razas de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris*.

7. La microscopía láser confocal nos ha permitido determinar que la mayor virulencia de la raza 5 (patotipo de Marchitez) del patógeno está relacionada con la mayor rapidez, extensión y capacidad de colonización en cultivares susceptibles respecto de la raza 0, menos virulenta (patotipo de Amarillez), las cuales a su vez, pueden estar determinadas por el patrón espacial de colonización vascular diferencial que presentan ambas razas.

8. La reacción de resistencia observada en combinaciones incompatibles, valorada por la ausencia de síntomas de la enfermedad, no está asociada necesariamente a la ausencia de infección ni de colonización vascular de la planta, aunque si a una menor intensidad de colonización vascular (cv. JG-62/raza 0) o a un confinamiento del patógeno a los tejidos subterráneos vasculares o no de la misma (cv. WR-315/raza 5).

CAPITULO VII

BIBLIOGRAFÍA GENERAL

- Abdel-Fattah, G.M., Shabana, Y.M., Ismail, A.E. y Rashad, Y.M. 2007.** *Trichoderma harzianum*: A biocontrol agent against *Bipolaris oryzae*. Mycopathologia 164:81-89.
- Alabouvette, C., Olivain, C., L'Haridon, F., Aimé, S. y Steinberg, C. 2007.** Using strains of *Fusarium oxysporum* to control Fusarium wilts: Dream or reality?. En: Novel Biotechnologies for Biocontrol Agent Enhancement and Management, M. Vurro y J. Gressel, eds. Springer, Dordrecht, Países Bajos. pp. 157-177.
- Alcalá Jiménez, A. R. 1995.** Aspectos epidemiológicos en el patosistema *Fusarium oxysporum* Schlechtend.:Fr. f. sp. *ciceris* (Padwick) Matuo & K. Sato/*Cicer arietinum* L. Tesis Doctoral. Universidad de Córdoba, Córdoba. 284 pp.
- Alfaro-Fernández, A. y García-Luis, A. 2009.** Colonisation and histological changes in muskmelon and autumn squash tissues infected by *Acremonium cucurbitacearum* or *Monosporascus cannonballus*. Eur. J. Plant Pathol. 125:73-85.
- Allen, D.J. 1983.** The Pathology of Tropical Food Legumes. John Wiley and Sons, New York. 413 pp.
- Alves-Santos, F.M., Martínez-Bermejo, D., Rodríguez-Molina, M.C. y Díez, J.J. 2007.** Cultural characteristics, pathogenicity and genetic diversity of *Fusarium oxysporum* isolates from tobacco fields in Spain. Physiol. Mol. Plant. Pathol. 71:26-32.
- Appel, D.J. y Gordon, T.R. 1995.** Intraspecific variation within populations of *Fusarium oxysporum* based on RFLP analysis of the intergenic spacer region of the rDNA. Exp. Mycol. 19:120-128.
- Appel, D.J. y Gordon, T.R. 1996.** Relationships among pathogenic and nonpathogenic isolates of *Fusarium oxysporum* based on the partial sequence of the intergenic spacer region of the ribosomal DNA. Mol. Plant-Microbe Interact. 9:125-138.
- Arias, J.A., Peralta-Videa, J.R., Ellzey, J.T., Ren, M., Viveros, M.N. y Gardea-Torresdey, J.L. 2010.** Effects of *Glomus deserticola* inoculation on *Prosopis*: Enhancing chromium and lead uptake and translocation as confirmed by X-ray mapping, ICP-OES and TEM techniques. Environ. Exp. Bot. 68:139-148.
- Atallah, Z.K., Bae, J. Jansky, S.H. Rouse, D.I. y Stevenson, W.R. 2007.** Multiplex real-time quantitative PCR to detect and quantify *Verticillium dahliae* colonization in potato lines that differ in response to *Verticillium* wilt. Phytopathology 97:865-872.
- Baayen, R. B., O'Donnell, K., Bonants, P. J. M., Cigelnik, E., Kroon, L. P. N. M., Roebroek, J. A. y Waalwijk, C. 2000.** Gene genealogies and AFLP analyses in the *Fusarium oxysporum* complex identify monophyletic and nonmonophyletic *formae speciales* causing wilt and rot disease. Phytopathology 90:891-900.
- Baayen, R.P., O'Donnell, K., Breeuwsma, S., Geiser, D.M. y Waalwijk, C. 2001.** Molecular relationships of fungi within the *Fusarium redolens*-*F. hostae* clade. Phytopathology 91:1037-1044.
- Balmas, V., Migheli, Q., Scherm, B., Garau, P., O'Donnell, K., Ceccherelli, G., Kang, S. y Geiser, D.M. 2010.** Multilocus phylogenetics show high levels of endemic fusaria inhabiting Sardinian soils (Tyrrhenian Islands). Mycologia 102:803-812.
- Barrau, C. y Romero, F. 1996.** Mildius. En: Patología Vegetal, Tomo II. G. LLácer, M. M. López, A. Trapero y A. Bello, eds. SEF Phytoma, España. pp. 805-820.

Barve, M.P., Haware, M.P., Sainani, M.N., Ranjekar, P.K. y Gupta, V.S. 2001. Potential of microsatellites to distinguish four races of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceri* prevalent in India. Theor. Appl. Genet. 102:138-147.

Bayraktar, H., Dolar, F.S. y Maden, S. 2008. Use of RAPD and ISSR markers in detection of genetic variation and population structure among *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* isolates on chickpea in Turkey. J. Phytopathol. 156:146-154.

Benhamou, N. y Garand, C. 2001. Cytological analysis of defense-related mechanisms induced in pea root tissues in response to colonization by non-pathogenic *Fusarium oxysporum* Fo47. Phytopathology 91:730-740.

Bernard, P. S., Pritham, G. H. y Wittwer, C. T., 1999. Color multiplexing hybridization probes using the apolipoprotein E locus as a model system for genotyping. Anal. Biochem. 273:221-228.

Berry, S.D., Fargette, M., Spaul, V.W., Morand, S. y Cadet, P. 2008. Detection and quantification of root-knot nematode (*Meloidogyne javanica*), lesion nematode (*Pratylenchus zeae*) and dagger nematode (*Xiphinema elongatum*) parasites of sugarcane using real-time PCR. Mol. Cell. Probes 22:168-176.

Bhatti, M. A. y Kraft, J. M. 1992. Influence of Soil Moisture on Root Rot and Wilt of Chickpea. Plant Dis. 76:1259-1262.

Bienapfl, J. C., Malvick, D. K. y Percich, J. A. 2010. First report of *Fusarium redolens* causing root rot of soybean in Minnesota. Plant Dis. 94:1069.

Bishop, C.D. y Cooper, R.M. 1983. An ultrastructural study of vascular colonization in three vascular wilt diseases I. Colonization of susceptible cultivars. Physiol. Plant Pathol. 23:323-343.

Bogale, M., Wingfield, B. D., Wingfield, M. J. y Steenkamp, E. T. 2007. Species-specific primers for *Fusarium redolens* and a PCR-RFLP technique to distinguish among three clades of *Fusarium oxysporum*. FEMS Microbiol. Lett. 271:27-32.

Bogale, M., Wingfield, B.D., Wingfield, M.J. y Steenkamp, E.T. 2005. Simple sequence repeat markers for species in the *Fusarium oxysporum* complex. Mol. Ecol. Notes 5:622-624.

Bolwerk, A., Lagopodi, A.L., Lugtenberg, B.J.J. y Bloemberg, G.V. 2005. Visualization of interactions between a pathogenic and a beneficial *Fusarium* strain during biocontrol of tomato foot and root rot. Mol. Plant-Microbe Interact. 18:710-721.

Bolwerk, A., Lagopodi, A. L., Wijfjes, A. H. M., Lamers, G. E. M., Chin-A-Woeng, T. F. C., Lugtenberg, B. J. J. y Bloemberg, G. V. 2003. Interactions in the tomato rhizosphere of two *Pseudomonas* biocontrol strains with the phytopathogenic fungus *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*. Mol. Plant-Microbe Interact. 11:983-993.

Booth, C. 1971. The genus *Fusarium*. Commonwealth Mycological Institute, Kew, Reino Unido. 237 pp.

Bousslama, M. 1980. Chickpea improvement in Tunisia.. En: Proceedings of the International Workshop on Chickpea Improvement. ICRISAT, Hyderabad, India. pp. 277-280.

Brunner, K., Kovalsky Paris, M.P., Paolino, G., Bürstmayr, H., Lemmens, M., Berthiller, F., Schuhmacher, R., Krska, R. y Mach, R.L. 2009. A reference-gene-based quantitative PCR method as a tool to determine *Fusarium* resistance in wheat. Anal. Bioanal. Chem. 395:1385-1394.

Burgess, L. W. 1981. General ecology of *Fusaria*. En: *Fusarium, Diseases, Biology, and Taxonomy*. P. E. Nelson, T. A. Toussoun, and R. J. Cook, eds. Pennsylvania State University Press, University Park. pp. 225-235.

Caballero, J.L., Valpuesta, V. y Muñoz Blanco, J.M. 2001. Introducción a la Biotecnología Vegetal: Métodos y aplicaciones. Publicaciones CajaSur. Córdoba. 406 pp.

Cabrera de la Colina, J. 1986. Variación patogénica en *Fusarium oxysporum* Schlechtend. emend. Snyder & Hansen y *F. solani* (Mart.) Sacc. emend. Snyder & Hansen agentes de la Marchitez y Podredumbre de Raíz del garbanzo en Andalucía. Tesis Doctoral. Universidad de Córdoba. Córdoba. 237 pp.

Cabrera de la Colina, J., Trapero Casas, A., y Jiménez Díaz, R. M. 1985. Races of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceri* in Andalucía. Int. Chick. News. 13:24-26.

Cabrera de la Colina, J., Trapero Casas, A., y Jiménez Díaz, R. M. 1987. Host range and symptomless carriers of *Fusarium* spp. Infecting chickpeas in Andalucía. En: Proceedings of the 7th Congress of the Mediterranean Phytopathological Union. SEF/MPU, eds. pp. 20-26.

Cachinero, J.M., Hervás, A., Jiménez-Díaz, R.M. y Tena, M. 2002. Plant defense reactions against *Fusarium* wilt in chickpea induced by incompatible race 0 of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* and nonhost isolates of *F. oxysporum*. Plant Pathol. 51:765-776.

Catti, A., Pasquali, M., Ghiringhelli, D., Garibaldi, A. y Gullino, M.L. 2007. Analysis of vegetative compatibility groups of *Fusarium oxysporum* from *Eruca vesicaria* and *Diplotaxis tenuifolia*. J. Phytopathol. 155:61-64.

Clarkson, 1978. Pathogenicity of *Fusarium* spp. associated with foot-rots of peas and beans. Plant Pathol. 27:110-117.

Coddington, A. y Gould, D. S. 1992. Use of RFLPs to identify races of fungal pathogens. En: Techniques for the Rapid Detection of Plant Pathogens. J. M. Duncan y L. Torrance, eds. British Society for Plant Pathology. Blackwell Science Publications, Oxford, Gran Bretaña. pp. 162-176.

Cohen, B.A., Amsellem, Z., Lev-Yadun, S. y Gressel, J. 2002. Infection of tubercles of the parasitic weed *Orobancha aegyptiaca* by mycoherbicidal *Fusarium* species. Ann. Bot. 90:567-578.

Corpas-Hervías, C., Melero-Vara, J.M., Molinero-Ruiz, M.L., Zurera-Muñoz, C. y Basallote-Ureba, M.J. 2006. Characterization of isolates of *Fusarium* spp. obtained from asparagus in Spain. Plant Dis. 90:1441-1451.

Cramer, R.A., Byrne, P.F., Brick, M.A., Panella, L., Wickliffe, E. y Schwartz, H.F., 2003. Characterization of *Fusarium oxysporum* isolates from common bean and sugar beet using pathogenicity assays and random-amplified polymorphic DNA markers. J. Phytopathol. 151:352-360.

Cullen, D.W., Toth, I.K., Pitkin, Y., Boonham, N., Walsh, K., Barker, I. y Lees, A.K. 2005. Use of quantitative molecular diagnostic assays to investigate *Fusarium* dry rot in potato stocks and soil. Phytopathology 95:1462-1471.

Czymmek, K.J., Fogg, M., Powell, D.H., Sweigard, J., Park, S.-Y. y Kang, S. 2007. In vivo time-lapse documentation using confocal and multi-photon microscopy reveals the mechanisms of invasion into the *Arabidopsis* root vascular system by *Fusarium oxysporum*. Fungal Genet. Biol. 44:1011-1023.

DasGupta, S.M., Khan, N. y Nautiyal, C.S. 2006. Biologic control ability of plant growth-promoting *Paenibacillus lentimorbus* NRRL B-30488 isolated from milk. *Curr. Microbiol.* 53:502-505.

De Bellis, P., Schena, L. y Cariddi, C. 2007. Real-time Scorpion-PCR detection and quantification of *Erwinia amylovora* on pear leaves and flowers. *Eur. J. Plant Pathol.* 118:11-22

Deepak, S.A., Kottapalli, K.R., Rakwal, R., Oros, G., Rangappa, K.S., Iwahashi, H., Masuo, Y. y Agrawal, G.K. 2007. Real-time PCR: Revolutionizing detection and expression analysis of genes. *Curr. Genomics* 8:234-251.

Demeke, T., Clear, R.M., Patrick, S.K. y Gaba, D. 2005. Species-specific PCR-based assays for the detection of *Fusarium* species and a comparison with the whole seed agar plate method and trichothecene analysis. *Int. J. Food Microbiol.* 103:271-284.

Di Pietro, A., García-Maceira, F.I., Méglecz, E. y Roncero, M.I.G. 2001. A MAP kinase of the vascular wilt fungus *Fusarium oxysporum* is essential for root penetration and pathogenesis. *Mol. Microbiol.* 39:1140-1152.

Dissanayake, M.L.M.C., Kashima, R., Tanaka, S. e Ito, S.-I. 2009a. Pathogenic variation and molecular characterization of *Fusarium* species isolated from wilted Welsh onion in Japan. *J. Gen. Plant Pathol.* 75:37-45.

Dissanayake, M.L.M.C., Kashima, R., Tanaka, S. e Ito, S.-I. 2009b. Genetic diversity and pathogenicity of *Fusarium oxysporum* isolated from wilted Welsh onion in Japan. *J. Gen. Plant Pathol.* 75:125-130.

Dolar, F. S. 1997. Determination of the races of *Fusarium oxysporum* f.sp. *ciceris* in Ankara province. Turkey. *J. Turk. Phytopathol.* 26:11-15.

Dubey, S.C. y Singh, S.R. 2008. Virulence analysis and oligonucleotide fingerprinting to detect diversity among Indian isolates of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* causing chickpea wilt. *Mycopathologia* 165:389-406.

Dubey, S.C., Singh, S.R. y Singh, B. 2010. Morphological and pathogenic variability of Indian isolates of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* causing chickpea wilt. *Arch. Phytopathol. Plant Prot.* 43:174-189.

Duggal, A., Dumas, M. T., Jeng, R. S. y Hubbes, M. 1997. Ribosomal variation in six species of *Fusarium*. *Mycopathologia* 140:35-49.

Duke, J.A. 1981. Handbook of legumes of world economic importance. Plenum Press, New York. 345 pp.

Duyvesteijn, R.G.E., Van Wijk, R., Boer, Y., Rep, M., Cornelissen, B.J.C. y Haring, M.A. 2005. Frp1 is a *Fusarium oxysporum* F-box protein required for pathogenicity on tomato. *Mol. Microbiol.* 57:1051-1063.

Edel, V., Steinberg, C., Gautheron, N. y Alabouvette, C., 2000. Ribosomal DNA-targeted oligonucleotide probe and PCR assay specific for *Fusarium oxysporum*. *Mycol. Res.* 104:518-526.

Edel, V., Steinberg, C., Gautheron, N., Recorbet, G. y Alabouvette, C., 2001. Genetic diversity of *Fusarium oxysporum* populations isolated from different soils in France. *FEMS Microbiol. Ecol.* 36:61-71.

Enya, J., Togawa, M., Takeuchi, T., Yoshida, S., Tsushima, S., Arie, T. y Sakai, T. 2008. Biological and phylogenetic characterization of *Fusarium oxysporum* complex, which causes

yellowings on *Brassica* spp., and proposal of *F. oxysporum* f. sp. *rapae*, a novel *forma specialis* pathogenic on *B. rapa* in Japan. *Phytopathology* 98:475-483.

Fauteux, F., Chain, F., Belzile, F., Menzies, J.G. y Bélanger, R.R. 2006. The protective role of silicon in the *Arabidopsis*-powdery mildew pathosystem. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103:17554-17559.

Filion, M., St-Arnaud, M. y Jabaji-Hare, S. H., 2003. Quantification of *Fusarium solani* f. sp. *phaseoli* in mycorrhizal bean plants and surrounding mycorrhizosphere soil using real-time polymerase chain reaction and direct isolations on selective media. *Phytopathology* 93:229-235.

Floch, G.L., Vallance, J., Benhamou, N. y Rey, P. 2009. Combining the oomycete *Pythium oligandrum* with two other antagonistic fungi: Root relationships and tomato grey mold biocontrol. *Biol. Control* 50:288-298.

Food and Agriculture Organization of the United Nations Statistical Database (FAOSTAT). 2009. FAOSTAT production statistics of crops. Available online at <http://faostat.fao.org/site/567/default.aspx#ancor>.

Fravel, D., Olivain, C. y Alabouvette, C., 2003. *Fusarium oxysporum* and its biocontrol. *21 New Phytol.* 157:493-502.

Galván, G.A., Koning-Boucoiran, C.F.S., Koopman, W.J.M., Burger-Meijer, K., González, P.H., Waalwijk, C., Kik, C. y Scholten, O.E. 2008. Genetic variation among *Fusarium* isolates from onion, and resistance to *Fusarium* basal rot in related *Allium* species. *Eur. J. Plant Pathol.* 121:499-512.

García-Limones, C., Dorado, G., Navas-Cortés, J.A., Jiménez-Díaz, R.M. y Tena, M. 2009. Changes in the redox status of chickpea roots in response to infection by *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*: Apoplastic antioxidant enzyme activities and expression of oxidative stress-related genes. *Plant Biol.* 11:194-203.

García-Limones, C., Hervás, A., Navas-Cortés, J.A., Jiménez-Díaz, R.M. y Tena, M. 2002. Induction of an antioxidant enzyme system and other oxidative stress markers associated with compatible and incompatible interactions between chickpea (*Cicer arietinum* L.) and *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 61:325-337.

García-Pedrajas, M.D., Bainbridge, B.W., Heale, J.B., Pérez-Artés, E. y Jiménez-Díaz, R.M. 1999. A simple PCR-based method for the detection of the chickpea-wilt pathogen *Fusarium oxysporum* f.sp. *ciceris* in artificial and natural soils. *Eur. J. Plant Pathol.* 105:251-259.

Gatel, F. y Champ, M. 1998. Grain legumes in human and animal nutrition- up to date results and question marks. En: 3rd European Conference on Grain Legumes. Opportunities for High Quality, Healthy and Added-Value Crops to Meet European Demands (European Association for Grain Legumes, ed.). 14-19 November, 1998, Valladolid. pp. 7-11.

Ghanmi, D., McNally, D.J., Benhamou, N., Menzies, J.G. y Bélanger, R.R. 2004. Powdery mildew of *Arabidopsis thaliana*: A pathosystem for exploring the role of silicon in plant-microbe interactions. *Physiol. Mol. Plant. Pathol.* 64:189-199.

Ginzinger, D. G. 2002. Gene quantification using real-time quantitative PCR: an emerging technology hits the mainstream. *Exp. Hematol.* 30:503-512.

Guadet, J., Julien, J., Lafay, J.F. y Brygoo, Y. 1989. Phylogeny of some *Fusarium* species, as determined by large-subunit rRNA sequence comparison. *Mol. Biol. Evol.* 6:227-242.

Guerrero, A. 1999. Garbanzos. En: Cultivos Herbáceos Extensivos. 6ª edición. Mundi-Prensa, Madrid. pp. 623-638.

Gurjar, G., Barve, M., Giri, A. y Gupta, V. 2009. Identification of Indian pathogenic races of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* with gene specific, ITS, and random markers. *Mycologia* 101:484-495.

Gupta, S., Chakraborti, D., Rangi, R.K., Basu, D. y Das, S. 2009. A Molecular insight into the early events of Chickpea (*Cicer arietinum*) and *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceri* (race 1) interaction through cDNA-AFLP analysis. *Phytopathology* 99:1245-1257.

Gupta, S., Chakraborti, D., Sengupta, A., Basu, D. y Das, S. 2010. Primary metabolism of chickpea is the initial target of wound inducing early sensed *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceri* race I. *PLoS ONE* 5, art. n°. e9030.

Halila, M.H. y Strange, R.N. 1996. Identification of the casual agent of wilt of chickpea in Tunisia as *Fusarium oxysporum* f.sp. *ciceri* race 0. *Phytopathol. Mediterr.* 35:67-74.

Haware, M.P. 1990. Fusarium wilt and other important diseases of chickpea in the Mediterranean area. *Options Méditerranéennes. Série Séminaires* 9:61-64.

Haware, M.P. y Nene Y.L. 1980. Influence of wilt at different stages on the yield loss in chickpea. *Trop. Grain Legume Bull.* 19:38-40.

Haware, M. P. y Nene, Y. L. 1982a. Symptomless carriers of the chickpea wilt *Fusarium*. *Plant Dis.* 66:250-251.

Haware, M. P. y Nene, Y. L. 1982b. Races of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*. *Plant Dis.* 66:809-810.

Haware, M. P., Nene, Y. L. y Mathur, S. B. 1986a. Seed-borne diseases of chickpea. En: *Technical Bulletin (Danish Government Institute of Seed Technology for Developing Countries, ed.)*. 1:32 pp.

Haware, M. P., Nene, Y. L. y Mathur, S. B. 1986b. Survival of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* in soil in absence of chickpea. En: *Management of Soilborne Diseases of Crop Plants: Proceedings of National Seminar*. pp. 8-10.

Haware, M. P., Nene, Y. L. y Rajeshwari, R. 1978. Eradication of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* transmitted in chickpea seed. *Phytopathology* 68:1364-1367.

Hawtin, G.C. y Chancellor, G.J. 1978. Food legume improvement and development. *Proceedings of Workshop held at the University of Aleppo, Siria, 2-7 Mayo, 1978. ICARDA e IDRC.* 216 pp.

Heid, C.A., Stevens, J., Livak, K.J. y Williams, P.M. 1996. Real time quantitative PCR. *Genome Res.* 6:986-994.

Hervas, A., Trapero-Casas, J.L. y Jmenez-Diaz, R.M. 1995. Induced resistance against fusarium wilt of chickpea by nonpathogenic races of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* and nonpathogenic isolates of *F. oxysporum*. *Plant Dis.* 79:1110-1116.

Hibar, K., Edel-Herman, V., Steinberg, Ch., Gautheron, N., Daami-Remadi, M., Alabouvette, C. y El Mahjoub, M. 2007. Genetic diversity of *Fusarium oxysporum* populations isolated from tomato plants in Tunisia. *J. Phytopathol.* 155:136-142.

Higuchi, R., Fockler, C., Dollinger, G. y Watson, R. 1993. Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology* 11:1026-1030.

Hirano, Y. y Arie, T. 2009. Variation and phylogeny of *Fusarium oxysporum* isolates based on nucleotide sequences of polygalacturonase genes. *Microbes Environ.* 24:113-120.

Hogg, A.C., Johnston, R.H. y Dyer, A.T. 2007. Applying real-time quantitative PCR to *Fusarium* crown rot of wheat. *Plant Dis.* 91:1021-1028.

Holub, E. B., Beynon, J. L. y Crute, I. R. 1994. Phenotypic and genotypic characterization of interactions between isolates of *Peronospora parasitica* and accessions of *Arabidopsis thaliana*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 7:223-239.

Huang, L., Ye, J.-R., Wu, X.-Q., Xu, X.-L., Sheng, J.-M. y Zhou, Q.-X. 2010. Detection of the pine wood nematode using a real-time PCR assay to target the DNA topoisomerase I gene. *Eur. J. Plant Pathol.* 127:89-98.

Huisman, J. y Van der Poel, A.F.B. 1994. Aspects of the nutritional quality and use of cool season food legumes in animal feed. En: *Proceedings of the Second International Food Legume Research Conference on pea, lentil, faba bean, chickpea, and grasspea.* F. J. Muehlbauer y W. J. Kaiser, eds. Cairo, Egipto, 12-16 April 1992. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Holanda. pp. 53-76.

Inami, K., Yoshioka, C., Hirano, Y., Kawabe, M., Tsushima, S., Teraoka, T. y Arie, T. 2010. Real-time PCR for differential determination of the tomato wilt fungus, *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*, and its races. *J. Gen. Plant Pathol.* 76:116-121.

Jalali, B. L. y Chand, H. 1992. Chickpea wilt. En: *Plant Diseases of International Importance. Vol. I. Diseases of Cereals and Pulses.* U. S. Singh, A. N. Mukhopadhyay, J. Kumar y H. S. Chaube, eds. Prentice Hall, Englewood Cliffs, NJ. pp. 429-444.

Jiménez-Díaz, R. M. 1994. La Fusariosis Vascular del garbanzo causada por *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*: 15 años de Investigación en España. *Investigación Agraria: Producción y Protección Vegetales. Fuera de Serie* 2:285-294.

Jiménez-Díaz, R. M., Alcalá-Jiménez, A. R., Hervás, A. y Trapero-Casas, J. L. 1993a. Pathogenic variability and hosts resistance in the *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris/Cicer arietinum* pathosystem. En: *Proc. Eur. Semin. Fusarium Mycotoxins, Taxonomy, Pathogenicity and Host Resistance*, 3rd E. pp. 87-94.

Jiménez-Díaz, R. M., Basallote Ureba, M. J. y Rapoport, H. 1989a. Colonization and pathogenesis in chickpea infected by races of *Fusarium oxysporum* f.sp. *ciceri*. En: *Vascular Wilt Diseases of Plants.* E. C. Tjamos and C. H. Beckman, eds. NATO ASI Series, Springer-Verlag, Berlin. H 28, pp. 113-121.

Jiménez-Díaz, R. M., Crinó, P., Halila, M. H., Mosconi, C. y Trapero-Casas, A. 1993b. Screening for resistance to *Fusarium* wilt and *Ascochyta* blight in chickpea. En: *Breeding for Stress Tolerance in Cool-Season Food Legumes.* K. B. Singh y M. C. Saxena, eds. John Wiley and Sons, Chichester, Inglaterra. pp. 77-96.

Jiménez-Díaz, R. M., Singh, K. B., Trapero Casas, A. y Trapero Casas, J. L. 1991. Resistance in kabuli chickpea to *Fusarium* wilt. *Plant Dis.* 75:914-918.

Jiménez-Díaz, R. M. y Trapero Casas, A. 1985. Use of fungicide treatments and host resistance to control the wilt and root rot complex of chickpeas. *Plant Dis.* 69:591-595.

Jiménez-Díaz, R. M., Trapero Casas, A. y Cabrera de la Colina, J. 1989b. Races of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceri* infecting chickpea in southern Spain. En: *Vascular Wilt Diseases of*

Plants. NATO ASI. Ser.. E. C. Tjamos y C. H. Beckman, eds. Springer-Verlag, Berlin. H 28, pp. 515-520.

Jiménez-Díaz, R.M., Trapero Casas, A. y Cubero, J.L. 1989c. Importance of chickpea soilborne diseases in the Mediterranean Basin. En: Proceedings of the Consultancy Meeting on Breeding for Disease Resistance in Kabuli Chickpeas. K.B. Singh y M. C. Saxena, eds. ICARDA, Aleppo, Siria. pp. 155-169.

Jiménez-Fernández, D., Montes-Borrego, M., Jiménez-Díaz, R. M., Navas-Cortés, J. A. y Landa, B. B. 2011. *In planta* and soil quantification of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* and evaluation of Fusarium wilt resistance in chickpea with a newly developed quantitative PCR assay. *Phytopathology* 101:250-262.

Jiménez-Fernández, D., Montes-Borrego, M., Navas-Cortés, J.A., Jiménez-Díaz, R.M. y Landa, B.B. 2010. Identification and quantification of *Fusarium oxysporum* *in planta* and soil by means of an improved specific and quantitative PCR assay. *Appl. Soil Ecol.* 46:372-382.

Jiménez-Gasco, M.M. y Jiménez Díaz, R.M. 2003. Development of a specific polymerase chain reaction based-assay for the identification of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* and its pathogenic races 0, 1A, 5 and 6. *Phytopathology* 93:200-209.

Jiménez-Gasco, M. M., Milgroom, M. G. y Jiménez-Díaz, R. M. 2002. Gene genealogies support *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* as a monophyletic group. *Plant Pathol.* 51:72-77.

Jiménez-Gasco, M.M., Milgroom, M. G. y Jiménez Díaz, R.M. 2004. Stepwise evolution of races in *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* inferred from fingerprinting with repetitive DNA sequences. *Pathopathology* 94:228-235.

Jiménez-Gasco, M. M., Pérez-Artés, E. y Jiménez-Díaz, R. M. 2001. Identification of pathogenic races 0, 1B/C, 5, and 6 of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* with random amplified polymorphic DNA (RAPD). *Eur. J. Plant Pathol.* 107:237-248.

Jorge, I., de la Rosa, O., Navas-Cortés, J.A., Jiménez-Díaz, R.M. y Tena, M. 2005. Extracellular xylanases from two pathogenic races of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*: Enzyme production in culture and purification and characterization of a major isoform as an alkaline endo- β -(1,4)-xylanase of low molecular weight. *Antonie van Leeuwenhoek* 88:49-59.

Jorge, I., Navas-Cortés, J.A., Jiménez-Díaz, R.M. y Tena, M. 2006. Cell wall degrading enzymes in fusarium wilt of chickpea: Correlation between pectinase and xylanase activities and disease development in plants infected with two pathogenic races of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*. *Can. J. Bot.* 84:1395-1404.

Kaiser, W. J., Alcalá Jiménez, A. R., Hervás Vargas, A., Trapero Casas, J. L. y Jiménez Díaz, R. M. 1994. Screening of wild *Cicer* species for resistance to race 0 and 5 of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*. *Plant Dis.* 78:962-967.

Kaiser, W. J. y Danesh, D. 1971. Etiology of virus-induced wilt of *Cicer arietinum*. *Phytopathology* 61:453-457.

Kang, Z., Buchenauer, H., Huang, L., Han, Q. y Zhang, H. 2008. Cytological and immunocytochemical studies on responses of wheat spikes of the resistant Chinese cv. Sumai 3 and the susceptible cv. Xiaoyan 22 to infection by *Fusarium graminearum*. *Eur. J. Plant Pathol.* 120:383-396.

- Kelly, A. G., Alcalá-Jiménez, A. R., Bainbridge, B. W., Heale, J. B., Pérez-Artés, E. y Jiménez-Díaz, R. M. 1994.** Use of genetic fingerprinting and random amplified polymorphic DNA to characterize pathotypes of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* infecting chickpea. *Phytopathology* 84:1293-1298.
- Kelly, A. G., Bainbridge, B. W., Heale, J. B., Pérez-Artés, E. y Jiménez-Díaz, R. M. 1998.** *In planta*-polymerase-chain-reaction detection of the wilt-inducing pathotype of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* in chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 52:397-409.
- Kianianmomeni, A., Schwarz, G., Felsenstein, F.G. y Wenzel, G. 2007.** Validation of a real-time PCR for the quantitative estimation of a G143A mutation in the cytochrome bc1 gene of *Pyrenophora teres*. *Pest Manag. Sci.* 63:219-224.
- Kim, H.-J., Choi, Y.-K. y Min, B.-R., 2001.** Variation of the Intergenic Spacer (IGS) Region of Ribosomal DNA among *Fusarium oxysporum* formae *speciales*. *J. Microbiol.* 39:265-272.
- Kistler, H. C. 1997.** Genetic diversity in the plant-pathogenic fungus *Fusarium oxysporum*. *Phytopathology* 87:474-479.
- Kistler, H.C., Alabouvette, C., Baayen, R.P., et al. 1998.** Systematic numbering of vegetative compatibility groups in the plant pathogenic fungus *Fusarium oxysporum*. *Phytopathology* 88:30-32.
- Knutsen, A.K., Torp, M. y Holst-Jensen, A. 2004.** Phylogenetic analyses of the *Fusarium poae*, *Fusarium sporotrichioides* and *Fusarium langsethiae* species complex based on partial sequences of the translation elongation factor-1 alpha gene. *Int. J. Food Microbiol.* 95:287-295.
- Konstantinova, P. y Yli-Mattila, T. 2004.** IGS-RFLP analysis and development of molecular markers for identification of *Fusarium poae*, *Fusarium langsethiae*, *Fusarium sporotrichioides* and *Fusarium kyushuense*. *Int. J. Food Microbiol.* 3:321-331.
- Kraft, J. M. 1994.** *Fusarium* wilt of peas (a review). *Agronomie* 14:561-567.
- Kraft, J.M., Haware, M.P., Jimenez-Diaz, R.M., Bayaa, B. y Harrab, M. 1994.** Screening techniques and sources of resistance to root rots and wilts in cool season food legumes. En: *Expanding the Production and Use of Cool Season Food Legumes*. Muehlbauer FJ, Kaiser WJ (eds), Dordrecht, Kluwer Academic Publ, Holanda. pp 268-289.
- Kristensen, R., Torp, M., Kosiak, B. y Holst-Jensen, A. 2005.** Phylogeny and toxigenic potential is correlated in *Fusarium* species as revealed by partial translation elongation factor 1 alpha gene sequences. *Mycol. Res.* 109:173-186.
- Kubista, M., Andrade, J. M., Bengtsson, M., Forootan, A., Jonák J., Lind K., Sindelka, R., Sjöback R., Sjögreen, B., Strömbom, L., Stahlberg, A. y Zoric, N. 2006.** The real-time polymerase chain reaction. *Mol. Aspects Med.* 27:95-125.
- Ladizinsky, G. 1975.** A new *Cicer* from Turkey. *Notes of the Royal Botanic Garden, Edinburgh* 34:201-202.
- Landa, B. B., Navas-Cortés, J. A., Hervás, A. y Jiménez-Díaz, R. M. 2001.** Influence of temperature and inoculum density of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* on suppression of *Fusarium* wilt of chickpea by rhizosphere bacteria. *Phytopathology* 91:807-816.
- Landa, B. B., Navas-Cortés, J. A. y Jiménez-Díaz, R. M. 2004.** Integrated management of *Fusarium* wilt of chickpea with sowing date, host resistance, and biological control. *Phytopathology* 94:946-960.

Landa, B. B., Navas-Cortés, J. A., Jiménez-Gasco, M. M., Katan, J., Retig, B. y Jiménez-Díaz, R. M. 2006. Temperature response of chickpea cultivars to races of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*, causal agent of Fusarium wilt. *Plant Dis.* 90:365-374.

Latiffah, Z., Nur Hayati, M.Z., Baharuddin, S. y Maziah, Z. 2009. Identification and pathogenicity of *Fusarium* species associated with root rot and stem rot of *Dendrobium*. *Asian J. Plant Pathol.* 3:14-21.

Lee, Y.-M., Choi, Y.-K. y Min, B.-R.. 2000. PCR-RFLP and sequence analysis of the rDNA ITS region in the *Fusarium* spp. *J. Microbiol.* 38:66-73.

Leslie, J.F. 1993. Fungal vegetative compatibility. *Annual Review of Phytopathology* 31:127-151.

Leslie, J. F. y Summerell, B. A. 2006. The *Fusarium* Laboratory Manual. Blackwell Publishing, Ames, IA, EEUU. 388 pp.

Leslie, J. F., Zeller, K. A. y Summerell, B. A. 2001. Icebergs and species in populations of *Fusarium*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 59:107-117.

Lievens, B., Brouwer, M. Vanachter, A.C.R.C. Cammue, B.P.A. y Thomma B.P.H.J. 2006. Real-time PCR for detection and quantification of fungal and oomycete tomato pathogens in plant and soil samples. *Plant Sci.* 171:155-165.

Lievens, B., Claes, L., Vakalounakis, D.J., Vanachter, A.C.R.C. y Thomma, B.P.H.J. 2007. A robust identification and detection assay to discriminate the cucumber pathogens *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum* and f. sp. *radicis-cucumerinum*. *Environ. Microbiol.* 9:2145-2161.

Lagopodi, A.L., Ram, A.F.J., Lamers, G.E.M., Punt, P.J., Van den Hondel, C.A.M.J.J., Lugtenberg, B.J.J. y Bloemberg, G.V. 2002. Novel aspects of tomato root colonization and infection by *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* revealed by confocal laser scanning microscopic analysis using the green fluorescent protein as a marker. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 15:172-179.

Lopez Bellido, L. 1998. Leguminosas y agricultura sostenible. En: *Agricultura Sostenible*. (R.M. Jiménez Díaz y J. Lamo de Espinosa, eds.). Ediciones Mundi Prensa, Madrid. pp. 401-428.

Llorens, A., Hinojo, M.J., Mateo, R., Medina, A., Valle-Algarra, F.M., González-Jaén, M.T. y Jiménez, M. 2006. Variability and characterization of mycotoxin-producing *Fusarium* spp. isolates by PCR-RFLP analysis of the IGS-rDNA region. *Antonie van Leeuwenhoek* 89:465-478.

Markakis, E.A., Tjamos, S.E., Antoniou, P.P., Paplomatas, E.J. y Tjamos, E.C. 2009. Symptom development, pathogen isolation and Real-Time qPCR quantification as factors for evaluating the resistance of olive cultivars to *Verticillium* pathotypes. *Eur. J. Plant Pathol.* 124:603-611.

Martín-Rodrigues, M., García-Sánchez, M.A., Ramos, B., De Vega-Bartol, J.J., Eslava, A.E. y Díaz-Mínguez, J.M. 2007. Estudio mediante microscopía confocal de la infección de judía por *Fusarium oxysporum*. *Boletín SEF* n° 59.

Mehli, L., Kjellsen, T.D., Dewey, F.M. y Hietala, A.M. 2005. A case study from the interaction of strawberry and *Botrytis cinerea* highlights the benefits of comonitoring both partners at genomic and mRNA level. *New Phytol.* 168:465-474.

Michielse, C. B. y Rep, M. 2009a. Pathogen profile update: *Fusarium oxysporum*. *Mol. Plant Pathol.* 10:311-324.

Michielse, C. B., Van Wijk, R., Reijnen, L., Manders, E.M.M., Boas, S., Olivain, C., Alabouvette, C. y Rep, M. 2009b. The nuclear protein Sge1 of *Fusarium oxysporum* is required for parasitic growth. PLoS Pathogens 5, art. n° e1000637.

Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino. 2008. Anuario de Estadística. 13. Superficies y producciones de cultivos. En:

<http://www.mapa.es/es/estadistica/pags/anuario/2008/indice.asp>.

Mirete, S., Patiño, B., Vázquez, C., Jiménez, M., Hinojo, M.J., Soldevilla, C. y González-Jaén, M.T. 2003. Fumonisin production by *Gibberella fujikuroi* strains from *Pinus* species. Int. J. Food Microbiol. 89:213-221.

Mishra, P.K., Fox, R.T.V. y Culham, A. 2003. Development of a PCR-based assay for rapid and reliable identification of pathogenic *Fusaria*. FEMS Microbiol. Lett. 213:329-332.

Montes-Borrego, M.M., Muñoz-Ledesma, F.J., Jiménez-Díaz, R.M. y Blanca, B.B. 2011. Real-time PCR quantification of *Peronospora arborescens*, the opium poppy downy mildew pathogen, in seed stocks and symptomless infected plants. Plant Dis. 95:143-152.

Mulè, G., Logrieco, A., Stea, G. y Bottalico, A. 1997. Clustering of trichothecene-producing *Fusarium* strains determined from 28S ribosomal DNA sequences. Appl. Environ. Microbiol. 63:1843-1846.

Nahalkova, J., Fatehi, J., Olivain, C. y Alabouvette, C. 2008. Tomato root colonization by fluorescent-tagged pathogenic and protective strains of *Fusarium oxysporum* in hydroponic culture differs from root colonization in soil. FEMS Microbiol. Lett. 286:152-157.

Nautiyal, C.S., Johri, J.K. y Singh, H. B. 2002. Survival of rhizosphere competent biocontrol strain *Pseudomonas fluorescens* NBRI2650 in the soil and phytosphere. Can. J. Microbiol. 48:588-601.

Navas-Cortés, J. A., Alcalá-Jiménez, A. R., Hau, B. y Jiménez-Díaz, R. M. 2000. Influence of inoculum density of races 0 and 5 of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* on development of Fusarium wilt in chickpea cultivars. Eur. J. Plant Pathol. 106:135-146.

Navas-Cortés, J. A., Hau, B. y Jiménez-Díaz, R. M. 1998. Effect of sowing date, host cultivar, and race of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* on development of Fusarium wilt of chickpea. Phytopathology 88:1338-1346.

Navas-Cortés, J. A., Landa, B. B., Méndez-Rodríguez, M. A. y Jiménez-Díaz, R. M. 2007. Quantitative modeling of the effects of temperature and inoculum density of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* races 0 and 5 on the development of Fusarium wilt in chickpea cultivars. Phytopathology 97:564-573.

Navas-Cortés, J. A., Rodríguez Jurado, D., Trapero Casas, J. L. y Jiménez Díaz, R. M. 1994. Resistencia combinada a la raza 5 de *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* y a Rabia en garbanzo. En: Resúmenes, Congreso de la Sociedad Española de Fitopatología VII, Sitges. p. 52.

Nazarenko, I. A., Bhatnagar, S. K. y Hohman, R. J. 1997. A closed tube format for amplification and detection of DNA bases on energy transfer. Nucleic Acids Res. 25:2516-2521.

Nel, B., Steinberg, C., Labuschagne, N. y Viljoen, A. 2006. Isolation and characterization of nonpathogenic *Fusarium oxysporum* isolates from the rhizosphere of healthy banana plants. Plant Pathol. 55:207-216.

Nelson, P. E., Toussoun, T. A. y Marasas, W. F. O. 1983. *Fusarium* Species: An Illustrated Manual for Identification. Pennsylvania State University, University Park. 206 pp.

Nelson, P.E. 1991. History of *Fusarium* systematics. *Phytopatology* 81:1045-1048.

Nene, Y. L. y Haware, M. P. 1980. Screening for chickpea resistance to wilt. *Plant Dis.* 64:379-380.

Nene, Y. L., Haware, M. P. y Reddy, M.V. 1978. Diagnosis of some wilt disorders of chickpea (*Cicer arietinum* L.). ICRISAT Information Bulletin, Vol. 3. Hyderabad, India. 44 pp.

Nene, Y.L. y Reddy, M.V. 1987. Chickpeas diseases and their control. En: *The Chickpea* (M.C. Saxena y K.B Singh, eds.). Oxford, C.A.B International. pp. 223-270.

Nene, Y.L. y Sheila, V.K. 1989. Important problems of kabuli chickpea. En: *Proceedings of the Consultative Meeting on Breeding for Diseases Resistance in Kabuli Chickpea*. ICARDA, Aleppo, Siria., 196 pp.

Nene, Y.L, Sheila, V.K. y Sharma, S.B. 1996. A World List of Chickpea and Pigeon Pea Pathogens. ICRISAT Pulse Pathology Progress Report. Patancheru, India. 27 pp.

Nitschke, E., Nihlgard, M. y Varrelmann, M. 2009. Differentiation of eleven *Fusarium* spp. isolated from sugar beet, using restriction fragment analysis of a Polymerase Chain Reaction–Amplified Translation Elongation Factor 1 α Gene Fragment. *Phytopathology* 99:921-929.

Nogales Moncada, A.M., Jiménez Díaz, R.M. y Pérez Artés, E. 2009. Vegetative compatibility groups in *Fusarium oxysporum* f.sp. *ciceris* and *F. oxysporum* non-pathogenic to chickpea. *J. Phytopathol.* 157:729-735.

O'Donnell, K. y Cigelnik, E. 1999. A DNA sequence-based phylogenetic structure for the *Fusarium oxysporum* complex. *Phytoparasitica* 27 n^o 69.

O'Donnell, K., Cigelnik, E. y Nirenberg, H. I. 1998. Molecular systematics and phylogeography of the *Gibberella fujikuroi* species complex. *Mycologia* 90:465-493.

Olivain, C. y Alabouvette, C. 1997. Colonization of tomato root by a non-pathogenic strain of *Fusarium oxysporum*. *New Phytol.* 137:481-494.

Olivain, C. y Alabouvette, C. 1999. Process of tomato root colonization by a pathogenic strain of *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* in comparison with a non-pathogenic strain. *New Phytol.* 141:497-510.

Olivain, C., Humbert, C., Nahalkova, J., Fatehi, J., L'Haridon, F. y Alabouvette, C. 2006. Colonization of tomato root by pathogenic and nonpathogenic *Fusarium oxysporum* strains inoculated together and separately into the soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 72:1523-1531.

Olmos, A., Capote, N. y Candresse, T. 2006. Detection and characterization of *Plum pox virus*: Molecular methods. *EPPO Bull.* 36:262-266.

Palomares Rius, J.E. 2009. Estudio de los mecanismos de interacción entre *Meloidogyne artiellia* y *Fusarium oxysporum* f.sp. *ciceris* en genotipos de garbanzo. Tesis Doctoral. Universidad de Córdoba.

Pantelides, I.S., Tjamos, S.E., Striglis, I.A., Chatzipavlidis, I. y Paplomatias, E.J. 2009. Mode of action of a non-pathogenic *Fusarium oxysporum* strain against *Verticillium dahliae* using Real Time QPCR analysis and biomarker transformation. *Biol. Control* 50:30-36.

- Pasquali, M., Acquadro, A., Balmas, V., Migheli, Q., Garibaldi, A. y Gullino, M.L., 2003.** RAPD characterization of *Fusarium oxysporum* isolates pathogenic on *Argyranthemum frutescens* L. J. Phytopathology 151:30-35.
- Pasquali, M., Marena, L., Fiora, E., Piatti, P., Gullino, M.L. y Garibaldi, A. 2004.** Real-Time Polymerase Chain Reaction for identification of a highly pathogenic group of *Fusarium oxysporum* f.sp. *chrysanthemi* on *Argyranthemum frutescens* L. J. Plant Pathol. 86:53-59.
- Pasquali, M., Piatti, P., Gullino, M.L. y Garibaldi, A. 2006.** Development of a real-time polymerase chain reaction for the detection of *Fusarium oxysporum* f. sp. *basilici* from basil seed and roots. J. Phytopathol. 154:632-636.
- Pérez-Artés, E., Roncero, M.I.G. y Jiménez-Díaz, R. M. 1995.** Restriction Fragment Length Polymorphism analysis of the mitochondrial DNA of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*. J. Phytopathol. 143:105-109.
- Pérez-Artés, E. y Tena, M. 1989.** Pectic enzymes from two races of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceri*. Enzyme production in culture and enzymatic activity on isolated chickpea cell walls. J. Phytopathol. 124: 39-51.
- Pérez-Artés, E. y Tena, M. 1990.** Purification and characterization of pectic enzymes from two races of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceri* differing in virulence to chickpea (*Cicer arietinum* L.). Physiol. Mol. Plant Pathol. 37: 107-124.
- Ramírez-Suero, M., Khanshour, A., Martínez, Y. y Rickauer, M. 2010.** A study on the susceptibility of the model legume plant *Medicago truncatula* to the soil-borne pathogen *Fusarium oxysporum*. European J. Plant Pathol. 126:517-530.
- Riccioni, L., Haegi, A. y Valvassori, M. 2008.** First report of vascular wilt caused by *Fusarium redolens* on lentil in Italy. Plant Dis. 92:1132.
- Ririe, K. M., Rasmussen, R. P. y Wittwer, C. T. 1997.** Product differentiation by analysis of DNA melting curves during the polymerase chain reaction. Anal. Biochem. 245:154-160.
- Rodríguez, M. J., Laguna, R., González, R., Caminero, C., Martín, A. y Ramos, A. 1998.** Situación y perspectivas de las leguminosas grano. Vida Rural 76:29-33.
- Romero, D., de Vicente, A., Olmos, J.L., Dávila, J.C. y Pérez-García, A., 2007.** Effect of lipopeptides of antagonistic strains of *Bacillus subtilis* on the morphology and ultrastructure of the cucurbit fungal pathogen *Podosphaera fusca*. J. Appl. Microbiol. 103:969–976.
- Saharan, M.S. y Naef, A. 2008.** Detection of genetic variation among Indian wheat head scab pathogens (*Fusarium* spp./isolates) with microsatellite markers. Crop Prot. 27:1148-1154
- Saxena, M.C. 1990.** Problems and potential of chickpea production in the nineties. En: Chickpea in the Nineties: Proceedings of the Second International Workshop on Chickpea Improvement. ICRISAT ed., ICRISAT, Patancheru, India. pp. 13-27.
- Schaad, N. W. y Frederick, R. D. 2002.** Real-time PCR and its application for rapid plant disease diagnostics. Can. J. Plant Pathol. 24:250-258.
- Schaad, N.W., Frederick, R.D., Shaw, J., Schneider, W.L., Hickson, R., Petrillo, M.D. y Luster, D.G., 2003.** Advances in molecular-based diagnostics in meeting crop biosecurity and phytosanitary issues. Annu. Rev. Phytopathol. 41:305-324.

Schena, L., Nigro, F., Ippolito, A. y Gallitelli, D., 2004. Real-time quantitative PCR: a new technology to detect and study phytopathogenic and antagonistic fungi. *Eur. J. Plant Pathol.* 110:893-908.

Sharma, K. D., Chen, W. y Muehlbauer, F. J. 2005. Genetics of chickpea resistance to five races of *Fusarium* wilt and a concise set of race differentials for *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*. *Plant Dis.* 89:385-390.

Sharma, K. D. y Muehlbauer, F. J. 2007. *Fusarium* wilt of chickpea: Physiological specialization, genetics of resistance and resistance gene tagging. *Euphytica* 157:1-14.

Sharma, M., Varshney, R.K., Rao, J.N., Kannan, S., Hoisington, D. y Pande, S. 2009. Genetic diversity in Indian isolates of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*, chickpea wilt pathogen. *Afr. J. Biotechnol.* 8:1016-1023.

Shehabu, M., Ahmed, S. y Sakhuja, K. 2008. Pathogenic variability in Ethiopian isolates of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* and reaction of chickpea improved varieties to the isolates. *Int. J. Pest Manag.* 54:143-149.

Shishido, M., Sato, K., Yoshida, N., Tsukui, R. y Usami, T. 2010. PCR-based assays to detect and quantify *Phomopsis sclerotioides* in plants and soil. *J. Gen. Plant Pathol.* 76:21-30.

Singh, K. B. 1990. Prospects of developing new genetic material and breeding methodologies for chickpea improvement. En: Present status and future prospects of chickpea crop production and improvement in the Mediterranean countries. M. C. Saxena, J. I. Cubero y J. Wery, eds. CIHEAM, Zaragoza, España. pp. 43-50.

Singh, D.B. y Dahiya, B.S. 1973. Breeding for wilt resistance in chickpea. En: Symposium on Wilt Problem and Breeding for Wilt Resistance in Bengal Gram. Indian Agricultural Research Institute, New Delhi, India. pp. 13-14.

Singh, B.P., Saikia, R., Yadav, M., Singh, R., Chauhan, V.S. y Arora, D.K. 2006. Molecular characterization of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceri* causing wilt of chickpea. *Afr. J. Biotechnol.* 5:497-502.

Singh, K.B. y Saxena, M.C. 1996. Winter Chickpea in Mediterranean-type environments. A Technical Bull. ICARDA, Aleppo, Siria. 39 pp.

Singh, R., Sharma, P., Varshney, R. K., Sharma, S. K. y Singh N.K. 2008. Chickpea improvement: Role of wild species and genetic markers. *Biotechnol. Genet. Eng. Rev.* 25:267-314.

Singh, K.B. y Virmani, S.M 1996. Modeling Growth and yield of chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Field Crops Res.* 46:41-49.

Sivaramakrishnan, S., Kannan S. y Singh, S. D. 2002. Genetic variability of *Fusarium* wilt pathogen isolates of chickpea (*Cicer arietinum* L.) assessed by molecular markers. *Mycopathologia* 155:171-178.

Smithson, J. B., Thompson, J. A. y Summeffield, R.J. 1985. Chickpea (*Cicer arietinum* L.). En: Grain Legume Crops. R. J. Summerfield y E. H. Roberts, eds. Collins, London, Gran Bretaña. pp 312-390.

Soylu, E.M. y Soyly, S. 2003. Light and electron microscopy of the compatible interaction between *Arabidopsis* and the downy mildew pathogen *Peronospora parasitica*. *J. Phytopathol.* 151:300-306.

Stevenson, P. C., Turner, H. C., y Haware, M. P. 1997. Phytoalexin accumulation in the roots of chickpea (*Cicer arietinum* L.) seedlings associated with resistance to Fusarium wilt (*Fusarium oxysporum* f.sp. *ciceris*), *Physiol. Mol. Plant. Pathol.* 50:167-178.

Strausbaugh, C. A., Overturf, K. y Koehn, A. C. 2005. Pathogenicity and real-time PCR detection of *Fusarium* spp. in wheat and barley roots. *Can. J. Plant Pathol.* 27:430-438.

Summerell, B. A., Salleh, B. y Leslie, J. F. 2003. A utilitarian approach to *Fusarium* identification. *Plant Dis.* 87:117-128.

Taylor, E. J. A., Bates, J., Kenyon, D., Maccaferri, M. y Thomas, J. 2001. Modern molecular methods for characterization and diagnosis of seed-borne fungal pathogens. *J. Plant Pathol.* 83:75-81.

Thangavelu, R. y Jayanthi, A. 2009. RFLP analysis of rDNA-ITS regions of native non-pathogenic *Fusarium oxysporum* isolates and their field evaluation for the suppression of Fusarium wilt disease of banana. *Austral. Plant Pathol.* 38:13-21.

Thatcher, L.F., Manners, J.M. y Kazan, K. 2009. *Fusarium oxysporum* hijacks COI1-mediated jasmonate signaling to promote disease development in *Arabidopsis*. *Plant J.* 58:927-939.

Thrane, U. 1989. *Fusarium* species and their specific profiles of secondary metabolites. En: *Fusarium: Mycotoxins, Taxonomy and Pathogenicity*. J. Chelkowski, ed. Elsevier, Amsterdam. pp. 199-225.

Trapero Casas, A. 1983. La Marchitez y Podredumbre de Raíz del garbanzo en el Valle del Guadalquivir: Importancia, distribución, etiología, epidemiología y medios de lucha. Tesis doctoral, ETSIAM. Universidad de Córdoba, Córdoba. 295 pp.

Trapero Casas, A. y Jiménez Díaz, R.M. 1985a. Etiología, importancia y distribución de la Seca del garbanzo en el Valle del Guadalquivir. Publicaciones del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Madrid. 97 pp.

Trapero Casas, A. y Jiménez Díaz, R.M. 1985b. Fungal wilt and root rot diseases of chickpea in southern Spain. *Phytopathology* 75:1146-1151.

Valsesia, G., Gobbin D., Patocchi, A., Vecchione, A., Pertot, I. y Gessler, C., 2005. Development of a high-throughput method for quantification of *Plasmopara viticola* DNA in grapevine leaves by means of quantitative real-time polymerase chain reaction. *Phytopathology* 95:672-678.

Vandemark, G. J., Baerker, B. M., Gritsenko y M. A. 2002. Quantifying *Aphanomyces euteiches* in alfalfa with a fluorescent polymerase chain reaction assay. *Phytopathology* 92:265-272.

Van der Does, H. C., Duyvesteijn, R. G. E., Goltstein, P. M., van Schie, C. C. N., Manders, E. M. M., Cornelissen, B. J. C. y Rep, M. 2008. Expression of effector gene SIX1 of *Fusarium oxysporum* requires living plant cells. *Fungal Genet. Biol.* 45:1257-1264.

Waalwijk, C., de Koning, J. R. A. y Gams, W. 1996. Discordant groupings of *Fusarium* spp. from sections *Elegans*, *Liseola* and *Dlaminia* based on ribosomal ITS1 and ITS2 sequences. *Mycologia* 88:361-368.

Ward, E. 1994. Use of polymerase chain reaction for identifying plant pathogens. En: Ecology of Plant Pathogens. J. P. Blakeman y B. Williamson, eds. CAB International, Oxon, UK. pp. 143-160.

Wang, M. M., Ferrin, D. M. y Stanghellini, M. E. 2005. Colonization of cantaloupe roots by *Monosporascus cannonballus*. Mycol. Res. 109:1297-1301.

Wen, A., Mallik, I., Alvarado, V.Y., Pasche, J.S., Wang, X., Li, W., Levy, L., Lin, H., Scholthof, H. B., Mirkov, T. E., Rush, C. M. y Gudmestad, N.C. 2009. Detection, distribution, and genetic variability of '*Candidatus liberibacter*' species associated with zebra complex disease of potato in North America. Plant Dis. 93:1102-1115.

Wilhelm, J. y Pingoud, A. 2003. Real-Time Polymerase Chain Reaction. ChemBioChem 4:1120-1128.

Wong, M.L. y Medrano, J.F. 2005. Real-time PCR for mRNA quantitation. BioTechniques 39:75-85.

Wong, J. Y. y Jeffries, P. 2006. Diversity of pathogenic *Fusarium* populations associated with asparagus roots in decline soils in Spain and the UK. Plant Pathol. 55:331-342.

Xu, L., Nonomura, T., Suzuki, S., Kitagawa, Y., Tajima, H., Okada, K., Kusakari, S., Matsuda, Y. y Toyoda, H. 2006. Symptomatic evidence for differential root invasion by *Fusarium* crown and root rot pathogens between common tomato *Lycopersicon esculentum* and its varieties. J. Phytopathol. 154:577-586.

Yang, L., van der Lee, Yang, T. X., Yu, D. y Waalwijk C. 2008. *Fusarium* populations on Chinese barley show a dramatic gradient in mycotoxin profiles. Phytopathology 98:719-727.

Yokomi, R. K., Saponari, M. y Sieburth, P. J. 2010. Rapid differentiation and identification of potential severe strains of *Citrus tristeza virus* by real-time reverse transcription-polymerase chain reaction assays. Phytopathology 100:319-327.

Zambounis, A. G., Paplomatas, E. y Tsiftaris, A. S. 2007. Intergenic spacer-RFLP analysis and direct quantification of Australian *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* isolates from soil and infected cotton tissues. Plant Dis. 91:1564-1573.

Zhang, M., Duan, Y., Zhou, L., Turechek, W.W., Ed, S. y Powell, C. A. 2010. Screening molecules for control of citrus huanglongbing using an optimized regeneration system for '*Candidatus liberibacter asiaticus*' infected periwinkle (*Catharanthus roseus*) cuttings. Phytopathology 100:239-245.

Zhang, Z., Zhang, J., Wang, Y. y Zheng, X. 2005. Molecular detection of *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum* and *Mycosphaerella melonis* in infected plant tissues and soil. FEMS Microbiol. Lett. 249:39-47.