

IV

REUNIÓN DEL GRUPO ESPECIALIZADO EN DETECCIÓN, DIAGNÓSTICO E IDENTIFICACIÓN DE LA SOCIEDAD ESPAÑOLA DE FITOPATOLOGÍA (GEDDI-SEF)

Pontevedra, del 22 al 24 octubre de 2019



**DEPUTACIÓN
PONTEVEDRA**
ESTACIÓN FITOPATOLÓGICA AREEIRO



Organiza:



Colaboran:



IV REUNIÓN DEL GRUPO ESPECIALIZADO EN DETECCIÓN, DIAGNÓSTICO E IDENTIFICACIÓN (GEDDI) de la Sociedad Española de Fitopatología

Publicado: Deputación de Pontevedra (Estación Fitopatológica Areeiro)

Imprime: Imprenta Provincial

Depósito Legal: PO 591-2019

Pontevedra, octubre 2019

ÍNDICE

- 1ª Sesión: Hongos y Oomicetos I
- 2ª Sesión: Hongos y Oomicetos II
- 3ª Sesión: Hongos y Oomicetos III
- 4ª Sesión: Nematodos
- 5ª Sesión: Bacterias y Fitoplasmas
- 6ª Sesión: Virus y Viroides I
- 7ª Sesión: Virus y Viroides II
- 8ª Sesión: Temas generales

COMITÉ ORGANIZADOR

Adela Abelleira Argibay. Estación Fitopatológica Areeiro, Deputación Pontevedra.

Cristina Pintos Varela. Estación Fitopatológica Areeiro, Deputación Pontevedra

Olga Aguin Casal. Estación Fitopatológica Areeiro, Deputación Pontevedra.

Carmen Salinero Corral. Estación Fitopatológica Areeiro, Deputación Pontevedra.

José Luis Palomo Gómez. Centro Regional de Diagnóstico. Junta de Castilla y León.
Salamanca

PROGRAMA

Martes 22 de Octubre

08:30-10:45 Visita opcional:

«Laboratorio de la Estación Fitopatológica Areeiro»

11:00-14:00 Actividad opcional:

«Jornada sobre Acreditación en Laboratorios de Sanidad Vegetal»

Ester Torres Güell

Salón de Actos Edif. Adm.
Diputación

11:00	La EPPO como referente para la acreditación de laboratorios de Sanidad Vegetal (Ester Torres)
11:15	Experiencias para la implantación de la ISO para ensayos morfológicos, microbiológicos, inmunoenzimáticos y moleculares.
	Antonio Olmos (Coordinador Responsable de la Acreditación de los LNR del IVIA).
	Ester Marco (Responsable Técnico del LNR de Bacteriología, IVIA).
	Adela Abelleira (Jefe de la Unidad de virus, bacterias y nematodos. EF Areeiro, Pontevedra).
	Cristina Pintos (Jefe de la Sección de Hongos. EF Areeiro, Pontevedra).
	Adela Monterde (Responsable de Calidad de la Acreditación de los LNR del IVIA).
12:30	ISO 17025:2017: introducción a la Norma y beneficios de la acreditación
	Verónica Miján (Técnico del Área de Laboratorios de Ensayo Agroalimentarios, ENAC).
	Juan Ángel García (Jefe del Área de Laboratorios Agroalimentarios, ENAC)
13:00	Pausa
13:15	MESA REDONDA con todos los participantes (Moderador: Jose Luis Palomo)
14:00	Clausura de la Jornada

16:30-17:00 Inauguración de la Reunión

- M^a del Carmen Silva Rego (Presidenta de la Diputación de Pontevedra, DEPO)
- Manuel González Martínez (Diputado Delegado para Centros de Investigación, DEPO)
- Nieves Capote Maínez (Junta Directiva de la Sociedad Española de Fitopatología, SEF)
- Jose Luis Palomo Gómez (Presidente del Grupo Especializado en Diagnóstico de la SEF)
- Carmen Salinero Corral (Jefa de Servicio de la Estación Fitopatológica Areeiro, DEPO)

17:00-18:00 1ª Sesión: Hongos y Oomicetos I

Moderadores: Elena Landeras Rodríguez
Cristina Pintos Varela

COD	TEMA	PONENTE
H-1	Especies de <i>Phytophthora</i> detectadas en los frambuesos de Huelva	Juana I. Páez Sánchez
H-2	Detección de <i>Phytophthora cinnamomi</i> en arándanos cultivados en macetones en Gran Canaria.	Purificación Benito Hernández
H-3	Desarrollo de una metodología para la detección en material vegetal de <i>Phytophthora cinnamomi</i> mediante PCR en tiempo real	Salud Orta Cordero
H-4	Diagnóstico de los agentes implicados en el decaimiento del roble en Galicia	Cristina Rial Martínez

18:00 Pausa

18:30-19:30 2ª Sesión: Hongos y Oomicetos II

Moderadores: Nieves Capote
Olga Aquin Casal

COD	TEMA	PONENTE
H-5	Detección y diagnóstico de <i>Phytophthora vexans</i> en sustrato y raíces de aguacate en Viveros	Ana I. Espino de Paz
H-6	Banda marrón en <i>Pinus radiata</i>	Elena Landeras Rodríguez
H-7	Detección de <i>Sydowia polyspora</i> en semillas de <i>Pinus</i> spp.	Cristina Pintos Varela
H-8	Daños en la madera en vivero de castaños	Jesús Collar Urquijo

Miércoles 23 de Octubre

9:30-11:30 3ª Sesión: Hongos y Oomicetos III

Moderadores: Juana I. Páez Sanchez
Diego Olmo García

COD	TEMA	PONENTE
H-9	Hongos implicados en enfermedades de madera	Vanessa Redondo Fernández
H-10	Análisis de la comunidad fúngica de muestras de vid	Jaume Almacellas Gort
H-11	Diagnóstico de <i>Plenodomus tracheiphilus</i> en cítricos afectados de seca	M. Isabel Aguilar Pérez
H-12	Estado fitosanitario de patrones de almendro en viveros: caracterización de especies fúngicas relacionadas con enfermedades de la madera	Nieves Capote
H-13	Nuevas detecciones de hongos en frutales con decaimiento	M. Isabel Aguilar Pérez
H-14	Daños de <i>Curvularia lunata</i> en césped deportivo	Jesús Collar Urquijo

11:15 Pausa – Café

12:00-12:30 4ª Sesión: Nematodos

Moderadores: Remedios Santiago Merino
Rosa Sancho Gómez

COD	TEMA	PONENTE
N-1	Detección de <i>Bursaphelenchus xylophilus</i> en <i>Monochamus galloprovincialis</i>	Adela Abelleira Argibay
N-2	Detección de <i>Anguina tritici</i> raza cebada mediante PCR-RFLP	Lee Robertson

12:45 Ponencia:
«El Diagnóstico en la Estación Fitopatológica Areeiro»

Pedro Mansilla Vázquez

14:00 Almuerzo

16:30-18:00 5ª Sesión: Bacterias y Fitoplasmas

Moderadores: Raquel Marquín
M. Belén Álvarez Ortega

COD	TEMA	PONENTE
B-1	Evaluación de métodos de detección de <i>Candidatus Liberibacter</i> causantes de Huanglongbing en cítricos	Jaime Cubero Dabrio
B-2	Nuevos hospedadores de <i>Xylella fastidiosa</i> detectados en Alicante	Montserrat Roselló Pérez
B-3	Mejorando las prospecciones y análisis de <i>Xylella fastidiosa</i>	Diego Olmo García
B-4	Comparación de protocolos de PCR en tiempo real para la detección de <i>Xylella fastidiosa</i> en diferentes especies y variedades vegetales.	Silvia Barbé Martínez
B-5	Diferentes enfoques para la detección de <i>Xylella fastidiosa</i> mediante técnicas moleculares	Ester Marco Noales
B-6	Aplicación de la genómica en la detección de bacterias fitopatógenas	Jaime Cubero Dabrio
B-7	Decaimiento y muerte de almendros en primavera	Ramona Mª Muñoz Gomez

18:15 Pausa

18:45-19:30 6ª Sesión: Virus y Viroides I

Moderadores: Milagros Marín Terrazas
Jesús A. Sánchez Navarro

COD	TEMA	PONENTE
V-1	Detección de <i>Grapevine Pinot gris virus</i> mediante PCR a tiempo real	Ana Belén Ruiz García
V-2	Estudios agronómicos y virus en variedades de vid Ideal y Aledo saneadas: una perspectiva de siete años en campo	Félix Morán Villamizar
V-3	El indexage biológico en la certificación sanitaria de virus de vid.	Carlos V. Padilla Martínez

Jueves 24 de Octubre

9:30-10:30 7ª Sesión: Virus y Viroides II

Moderadores: Antonio Olmos Castelló
Carlos V. Padilla Martínez

COD	TEMA	PONENTE
V-4	Detección en semilla de los principales virus que afectan a cucurbitáceas mediante ELISA e hibridación molecular	Jesús Angel Sánchez Navarro
V-5	Síntomas de PEMV (<i>Pea enation mosaic enamovirus</i>) en guisante.	Jesús Collar Urquijo
V-6	Técnicas de detección del WDV en planta de trigo y su vector.	Manuel J. Martín Robles

10:30 Pausa – Café

11:15-13:30 8ª Sesión: Temas generales

Moderadores: Jaime Cubero Dabrio
Carmen Salinero Corral

COD	TEMA	PONENTE
G-1	Síntomas desconocidos en camelia.	Jesús Collar Urquijo
G-2	Control de calidad de los medios de cultivo	Elena Landeras Rodríguez
G-3	Parámetros de gestión de un laboratorio de Sanidad Vegetal	Jaume Almacellas Gort
G-4	Método de Validación desarrollado por el Laboratorio Regional para ensayos inmunológicos (ELISA)	Milagros Marín Terrazas
G-5	Validación de la técnica de identificación de <i>Bursaphelenchus xylophilus</i> mediante observación de sus caracteres morfológicos por microscopía.	Rosa Sancho Gómez
G-6	Situación de los trabajos de la Comisión de Léxico fitopatológico	Juana I. Páez Sanchez
G-7	Situación de los trabajos de la Comisión de la galería fotográfica fitopatológica	Diego Olmo García
G-8	El Grupo Especializado en Detección, Diagnóstico e Identificación: evolución y perspectivas	Jose Luis Palomo Gómez

13:30 Clausura

13:45 Almuerzo

IV REUNIÓN DEL GRUPO ESPECIALIZADO EN DETECCIÓN, DIAGNÓSTICO E IDENTIFICACIÓN DE LA SOCIEDAD ESPAÑOLA DE FITOPATOLOGÍA (GEDDI-SEF)

Pontevedra, del 22 al 24 octubre de 2019

1ª Sesión: Hongos y Oomicetos I

Moderan:

Elena Landeras Rodríguez
Cristina Pintos Varela



ESPECIES DE *Phytophthora* AISLADAS DE LOS FRAMBUESOS DE HUELVA

Páez Sánchez, J. I.¹; Orta Cordero, S²

Laboratorio de Producción de Sanidad Vegetal de Sevilla¹ y Huelva².
Agencia de Gestión Agraria y Pesquera de Andalucía

La podredumbre radical ocasionada por especies del género *Phytophthora* es una de las principales enfermedades que afectan al frambueso en el mundo. Las plantas muestran un menor vigor con una disminución en el número de tallos y brotes; las hojas se vuelven cloróticas y / o presentan necrosis de los bordes y a veces terminan cayendo. Las raíces están oscuras desprendiéndose fácilmente la epidermis y en algunos casos se observan chancros en el cuello.

De plantas con síntomas se han aislado tanto en medio de cultivo V8-PARPH como en trampas vegetales, cuatro especies distintas de *Phytophthora* que se identificaron por sus características morfológicas. Los resultados se confirmaron mediante secuenciación de la región ITS del ADNr con los cebadores universales ITS4 y ITS6. En todos los casos las secuencias mostraron 99,5-100% de similitud con las depositadas en GenBank.

P. bishii (sin: *P. bisheria*) se aisló de cultivos hidropónicos de frambuesa de Lucena y Moguer. Está incluida en el clade 2. Se caracteriza por la formación de esporangios persistentes, semipapilados y anteridios paraginos con una unión ancha a la pared del oogonio; las oosporas son apleróticas y algunas con formas distorsionadas.

P. citricola, clade 2, se detectó en una plantación de Lucena, tiene esporangios semipapilados, persistentes, ovoides, limoniformes, ovopiriformes, algunos distorsionados, otros curvados en el ápice, a veces con dos y hasta tres papilas. Es homotática con anteridio paragino.

P. rosacearum, clade 6, presenta esporangios no papilados e hinchamientos hifales y forma órganos sexuales con anteridio preferentemente paragino. Forma parte del complejo de "megasperma", se diferencia dentro del mismo por su menor tamaño del oogonio y su mayor temperatura de crecimiento. Se aisló de una parcela de Moguer.

P. rubi (sin: *P. fragariae* var *rubi*), clade 7, se encontró en distintas explotaciones de Lucena y Bonares. Se caracteriza por producir en medio líquido, esporangios no papilados, ovoides o ovopiriformes generalmente con proliferación interna en nido o extendida. Forma órganos sexuales con anteridios generalmente anfiginos, las oosporas son apléroticas. Se encuentra en la lista A2 de la EPPO.

P. bishii y *P. rubi* no se habían citado anteriormente en España.

DETECCIÓN DE *Phytophthora cinnamomi* EN ARÁNDANO CULTIVADO EN MACETONES EN GRAN CANARIA

Benito, P.¹

¹Laboratorio de Fitopatología de la Consejería de Sector Primario y Soberanía Alimentaria del Cabildo de Gran Canaria. (puribh@grancanaria.com)

Phytophthora cinnamomi es el agente causal de la podredumbre radical del arándano y es la principal enfermedad de este frutal.

El cultivo del arándano está en expansión en España. Huelva es la principal productora europea de cosecha temprana, donde ya se ha detectado esta enfermedad.

En Gran Canaria con el objetivo de diversificar la producción tanto para consumo local como de exportación, una importante empresa hortofrutícola ha establecido una plantación de arándanos. Las variedades cultivadas son Ventura y Biloxi de bajas exigencias en frío, que se han plantado en macetones de 30 l. La plantación es bajo invernadero y se localiza en el Sureste de Gran Canaria y a una cota de 2 m.s.n.m.

Un alto porcentaje de arándanos presentaron síntomas de coloraciones rojizas en hojas, defoliaciones, y un decaimiento generalizado.

El patógeno *P.cinnamomi* se aisló consistentemente de las muestras recibidas en el laboratorio.

El protocolo seguido para el diagnóstico fue trampeo vegetal con claveles y frutos de manzana de tierra de la rizosfera de las plantas afectadas. Pase a medios de cultivo semiselectivos (PDA-P10ARPBH). Los micelios y esporangios observados al microscopio, directamente de los trampeos con pétalos de clavel o de los desarrollados en los medios de cultivo, permitieron una aproximación a la identificación morfológica de *P. cinnamomi*.

La confirmación del patógeno se realizó mediante la técnica q-PCR y el uso de los primers LPV3F y LPV3R, previa extracción de ADN.

La confirmación definitiva se efectuó con una amplificación de la región ITS (ITS4/ITS6) por PCR convencional y el envío para su secuenciación. Las secuencias obtenidas presentaron una homología del 99-100% al compararlas con las secuencias depositadas en la base de datos del NCBI (<http://ncbi.nlm.nih.gov/>).

Las pruebas de laboratorio realizadas permiten afirmar que el patógeno causante del decaimiento o muerte de los arándanos es *Phytophthora cinnamomi*.

DESARROLLO DE UNA METODOLOGÍA PARA LA DETECCIÓN EN MATERIAL VEGETAL DE *Phytophthora cinnamomi* MEDIANTE PCR EN TIEMPO REAL

Orta, M.S.¹ y Páez, J.²

¹Laboratorio de Producción y Sanidad Vegetal de Huelva.

²Laboratorio de Producción y Sanidad Vegetal de Sevilla.

Agencia de Gestión Agraria y Pesquera de Andalucía. Consejería Agricultura y Pesca Junta de Andalucía.

Phytophthora cinnamomi es un patógeno que causa la muerte masiva de las raíces absorbentes de las plantas, las encargadas de tomar el agua y los nutrientes del suelo. En la península ibérica la determinación de este patógeno de la encina y el alcornoque, se conoce desde los años 90. Las zonas afectadas comprenden el sur de Portugal, Extremadura y Andalucía occidental, siendo este problema especialmente devastador en la sierra y el andévalo de Huelva. Pensamos que la PCR en tiempo real hecha sobre el material vegetal directamente, constituiría una herramienta muy útil para el diagnóstico de la enfermedad, dada su sensibilidad y la rapidez del diagnóstico. Enmarcados en un proyecto LIFE denominado Prodehesa-montado, se está realizando este trabajo.

Siguiendo el protocolo de Mora-Sala et al. (2018) se ha trabajado en el cóctel de trabajo para el análisis de micelio y sus diluciones dando muy buenos resultados. Una vez puesto a punto el protocolo se han ido haciendo extracciones de ADN a las muestras de Quercus que han ido llegando al laboratorio durante el año, a la par que se utilizaba el método clásico de detección.

Se ha analizado el ADN de la raíz y del suelo. Dado lo complicado de la extracción a la raíz de estos árboles por su dureza, se ha trabajado en otro soporte vegetal, infectado indirectamente, las trampas vegetales. Creemos que tanto por la fragilidad del tejido como por ser aglutinadoras de la infección existente en el suelo podrían ser una buena opción. Al material vegetal se le ha realizado la extracción por el método CTAB y al suelo se le ha hecho con un kit específico.

El método se ha mostrado coherente en los casos de las muestras que previamente habían sido diagnosticadas como positivas y se observan curvas de amplificación bastante consistentes. Sin embargo hay que seguir trabajando para afinar algunas curvas que no nos salen tan claras para confirmar si se tratan de falsos positivos o pudiera tratarse de amplificaciones de otras especies del género *Phytophthora*. Asimismo hay que afinar el protocolo previo a la extracción, especialmente de las trampas vegetales.

DIAGNÓSTICO DE LOS AGENTES IMPLICADOS EN EL DECAIMIENTO DEL ROBLE EN GALICIA

Rial, C.; Pintos, C.; Redondo, V.; Aguín, O.; Pérez-Otero, R.; Abelleira, A.; Ferreiroa, V.; Salinero, C.

Estación Fitopatológica Areeiro. Deputación Pontevedra.
(cristina.rial@depo.es)

En las últimas décadas se han llevado a cabo numerosos trabajos para estudiar el decaimiento de *Quercus* spp. en España, resultando en la propuesta de diversas hipótesis sobre el origen de este complejo.

En Galicia, en primavera de 2019 se observaron diferentes grados de decaimiento en distintas formaciones de *Quercus robur*. En la mayoría de los casos se trataba de zonas con presencia de árboles decaídos, defoliación, puntiseado, exudados en tronco, galerías de insectos y presencia de algún ejemplar muerto. Los síntomas hacían sospechar de la implicación de un agente patógeno concreto y común a todos ellos, pero tras su análisis se detectaron multitud de agentes implicados.

Dentro de este complejo se detectó la presencia de 20 especies de hongos, 2 oomicetos, una bacteria y un coleóptero perforador que bien de manera simultánea o secuencial parecen estar implicados en el progresivo decaimiento de los robles. Los diferentes organismos fueron identificados por técnicas morfológicas y/o moleculares dependiendo del caso.

Los hongos identificados fueron: *Armillaria mellea*, *Coryneum* sp., *Cytospora* sp., *Dendrostoma leiphaemia*, *Diaporthe* sp., *Diplodia sapinea* y *D. seriata*, *Discula quercina*, *Fusarium solani*, *Ilyonectria* sp., *Neonectria* sp., *Peniophora quercina*, *Pestalotiopsis* sp., *Phaeoacremonium fraxinopennsylvanicum* y *P. viticola*, *Rutstroemia firma*, *Stereum* sp., *Tremella fuscossuccinea*, *Tubakia dryina* y *Xenoacremonium* sp.

También se detectaron los oomicetos *Phytophthora cinnamomi* y *Pythium* sp. Se aisló e identificó la bacteria *Gibbsiella quercinecans* también implicada en el decaimiento de *Quercus* y el coleóptero xilófago *Coroebus florentinus*, cuya presencia en esta primavera se ha incrementado sensiblemente frente a años anteriores, en que únicamente se detectaba muy puntualmente.

Phytophthora cinnamomi, *Armillaria mellea*, *Cytospora* sp., *Coryneum* sp. y *Tubakia dryina* fueron las especies predominantes, aunque el coleóptero también se encontró en buena parte de las muestras analizadas.

IV REUNIÓN DEL GRUPO ESPECIALIZADO EN DETECCIÓN, DIAGNÓSTICO E IDENTIFICACIÓN DE LA SOCIEDAD ESPAÑOLA DE FITOPATOLOGÍA (GEDDI-SEF)

Pontevedra, del 22 al 24 octubre de 2019

2ª Sesión: Hongos y Oomicetos II

Moderan:

Nieves Capote
Olga Aguíñ Casal



DETECCIÓN Y DIAGNÓSTICO DE *PHYTOPYTHIUM VEXANS* EN SUSTRATO Y RAÍCES DE AGUACATE EN VIVEROS DE CANARIAS

Espino de Paz, A.I.; Botella-Guillén, M.; Fernández-Acosta, D. y Ochoa-Vigo, F.

Laboratorio de Sanidad Vegetal. Dirección General de Agricultura. Consejería de Agricultura Ganadería Pesca y Aguas del Gobierno de Canarias

En los últimos años se ha incrementado en Canarias el cultivo de aguacate y la demanda tanto del mercado local como del exterior es cada vez mayor. La orden del MAPA de 1987 determina la prohibición de introducir plantas del género *Persea* en las islas Canarias (B.O.E. nº72), así que las plantaciones nuevas de aguacate deben ser originarias y producidas localmente en Viveros autorizados.

Según el Reglamento técnico de control y certificación en plantas de vivero de frutales (Real Decreto 929/1995, B.O.E. nº141) el material estándar de plantas de aguacate debe estar libre de *Phytophthora cinnamomi* y *Rosellinia necatrix*. Este año hemos recibido en el Laboratorio a través de la empresa GMR 38 lotes con un total de 84 muestras de 9 Viveros (5 de Tenerife, 2 de La Palma y 2 de Gran Canaria). Las plantas de aguacate vienen enraizadas en bolsas o en maceta e injertadas sobre patrón antillano, siendo la púa del injerto de la variedad Hass en la mayoría de los casos.

Los análisis se realizaron mediante: las técnicas clásicas de aislamiento de raíces en medio de cultivo específico para el género *Phytophthora* PARPH y sustrato en trampas con hojas de aguacate seguida de aislamiento en PARPH y moleculares PCR con cebadores generales ITS1 e ITS4 y cebadores específicos LPV3 para *P. cinnamomi*. Los amplificados de la PCR se secuenciaron y se compararon con las existentes en la base de datos Gen Bank para su identificación mediante la aplicación BLAST (Servicio de Genómica de La Universidad de La Laguna)

Hasta el momento *P. cinnamomi* no ha sido detectado en ninguna de las muestras analizadas, ni tampoco otras especies de *Phytophthora* como en años anteriores, sin embargo en la mayoría de las muestras analizadas ha sido detectado *Phytophythium vexans* tanto en raíces como en sustrato (también en años anteriores)

A nivel mundial este hongo se encuentra citado en Viveros de ornamentales en la Península, en diferentes cultivos (ornamentales, frutales y hortícolas) en Argentina, en cultivos de aguacate en México.... En Canarias se ha detectado en zonas forestales de Laurisilva y en Viveros y cultivos de aguacate. En las pruebas de patogenicidad realizadas en diferentes lugares del mundo, se ha demostrado como patógeno en algunos casos y en otros casos no está tan claro.

¿*Pp. vexans* sería un nuevo candidato a tener en cuenta, así como otras especies de *Phytophthora* detectadas en años anteriores en el Reglamento de Viveros de aguacate?

BANDA MARRÓN EN *Pinus radiata*

Landeras, E.¹; García-Vázquez, P.¹

¹Laboratorio de Sanidad Vegetal del Principado de Asturias (elena.landeras.rodriquez@asturias.org)

Existen varios hongos del género *Mycosphaerella* que causan enfermedad en muchas especies de coníferas ocasionando defoliaciones de distinta gravedad en función del hongo concreto, la especie vegetal y las condiciones ambientales.

En Europa están descritas tres especies: *Dothistroma septosporum* (anteriormente *Mycosphaerella pini*), ampliamente distribuida por toda Europa; *Lecanosticta acicola* (anteriormente *M. dearnessii*) presente en determinadas regiones (Lista A2 de la EPPO); y *D. pini* detectada en los últimos años, pero de forma puntual. La enfermedad producida por las especies de *Dothistroma* se conoce con el nombre de “banda roja” y “banda marrón” cuando el agente causal es *L. acicola*.

En España *D. septosporum* está ampliamente distribuido y se ha detectado en varias especies de pino y *Pseudotsuga menziesii*, causando daños poco relevantes. Sin embargo, *L. acicola* se ha manifestado recientemente en pinares de la cornisa cantábrica causando daños de importancia en masas de *Pinus radiata*. En Asturias, se ha constatado que está distribuido por toda la región, causando daños severos en las masas de *P. radiata* de la zona occidental.

Los primeros síntomas de la enfermedad consisten en la aparición de bandas amarillentas en las acículas que van virando a un color pardo-rojizo, síntoma que da el nombre a la enfermedad: banda marrón o banda roja, según cuál sea el hongo responsable. Con el tiempo, sobre las lesiones se desarrollan los cuerpos de fructificación del hongo que se observan como pequeños puntos negros. Es común observar totalmente necrosada la parte distal de las acículas, permaneciendo verde su base durante más tiempo. Finalmente toda la acícula se seca y cae en los meses de otoño.

La infección es típicamente más severa en las partes bajas de la copa donde la humedad ambiental es mayor. Al principio se observa un amarronamiento de la copa en la parte inferior que va avanzando en sentido ascendente y en el año siguiente se produce la defoliación de la parte afectada.

La dispersión de la enfermedad dentro del cultivo tiene lugar por contacto directo de unas plantas con otras, viento, acículas del suelo, salpicaduras de lluvia, insectos, etc. Mientras que a largas distancias se produce principalmente por el movimiento de planta infectada desde el vivero y la maquinaria utilizada en las labores selvícolas.

DETECCIÓN DE *Sydowia polyspora* EN SEMILLAS DE *Pinus* spp.

Pintos, C.; Redondo, V.; Aguín, O.; Salinero, C.

Estación Fitopatológica Areeiro. Deputación Pontevedra.
(cristina.pintos@depo.es)

En febrero de 2019 se recibieron en el laboratorio de la Estación Fitopatológica Areeiro 4 lotes de piñas procedentes de 3 especies de *Pinus*: *P. nigra*, *P. silvestris* y *P. uncinata* cuyas semillas presentaban una muy baja tasa de germinación.

Se realizaron los análisis para determinar la posible presencia de *Fusarium circinatum* por técnicas morfológicas y/o moleculares siguiendo el protocolo especificado en el anexo III del Real Decreto 637/2006 del 26 de mayo (texto consolidado) siendo su detección negativa en las semillas y brácteas de las piñas. Paralelamente tanto piñas como semillas fueron sembradas en medio Agar Malta con estreptomicina. Los aislados fúngicos fueron identificados por técnicas morfológicas y moleculares.

Se aislaron e identificaron los siguientes hongos: *Alternaria alternata*, *Alternaria atra*, *Artrinium* sp., *Aspergillus* sp., *Aureobasidium pullulans*, *Ceratobasidium* sp., *Epicoccum nigrum*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani*, *Microsphaeropsis olivacea*, *Penicillium* sp., *Pestalotiopsis monochaeta*, *Phlebiopsis* sp., *Rhizopus* sp., *Sydowia polyspora* y *Trichoderma* sp.

De todos estos, *Sydowia polyspora* fue la especie que se detectó en mayor medida (del 72,5 al 87% de las semillas analizadas), seguido de *Microsphaeropsis olivacea* y *Alternaria alternata*.

Hormonema dematioides, anamorfo de *Sydowia polyspora*, es un epífito o endófito común de coníferas de distribución cosmopolita y recientemente ha demostrado ser también un patógeno de preemergencia en *Pinus ponderosa*. Con la intención de demostrar que es *Sydowia polyspora* el hongo responsable de la baja germinación de los lotes de semillas, se llevaron a cabo las pruebas de patogenicidad pertinentes.

DAÑOS EN MADERA EN VIVERO DE CASTAÑOS

Collar Urquijo, J.¹; Ascasíbar Errasti, J.¹

¹Laboratorio Agrario y Fitopatológico de Galicia (Xunta de Galicia) (jesus.collar.urquijo@xunta.es).

A finales de febrero en un vivero de castaños de la provincia de A Coruña, en uno de los clones de castaños híbridos aparecieron una gran cantidad de plantones con la guía principal totalmente seca y crecimiento de carpóforos en algunos de ellos; además la zona central de la médula presentaba una podredumbre blanca de la madera que aparentemente desciende por el tallo.

Se sembraron en medio PDA los bordes de la zona medular afectada de podredumbre blanca y se aisló de forma consistente un hongo basidiomiceto, con buen crecimiento en el medio.

Así mismo para determinar el género de los carpóforos presentes en la muestra se empleó el Wood Decay Diagnostic System (Guglielmo et al, 2007 y posteriores) basado en varias PCR multiplex que permiten determinar un total de 9 géneros y otros 10 grupos de especies de basidiomicetos productores de pudrición de la madera.

Así los carpóforos tras la segunda PCR multiplex (M1 + M3) quedaron encuadrados en el género *Trametes*; sin embargo, en el caso del hongo aislado de los daños medulares, la PCR multiplex M1 amplifica un basidiomiceto, pero M2 y M3 no amplificaron nada.

Los carpóforos por características morfológicas claramente pertenecen a la especie *Trametes versicolor* (L.) Lloyd de la familia *Polyporaceae* (*Polyporales*).

En el caso del hongo aislado de la médula, se remitió al servicio de secuenciación de la Universidad de A Coruña, y fue identificado como *Bjerkandera adusta* (Willd.) P.Karst. de la familia *Meruliaceae* (*Polyporales*).

Ambos son saprófitos y patógenos, produciendo podredumbre blanca de la madera; normalmente sólo afectan a maderas muertas, pero en algunos casos afectan a ramas vivas penetrando por cortes de poda, heridas, daños de frío o quemaduras solares.

IV REUNIÓN DEL GRUPO ESPECIALIZADO EN DETECCIÓN, DIAGNÓSTICO E IDENTIFICACIÓN DE LA SOCIEDAD ESPAÑOLA DE FITOPATOLOGÍA (GEDDI-SEF)

Pontevedra, del 22 al 24 octubre de 2019

3ª Sesión: Hongos y Oomicetos III

Moderan:

Juana I. Páez Sánchez
Diego Olmo García



HONGOS IMPLICADOS EN ENFERMEDADES DE MADERA

Redondo, V.; Pintos, C.; Aguín, O.; Piñón, P.; Salinero, C.

Estación Fitopatológica Areeiro. Deputación Pontevedra.
(vanesa.redondo@depo.es)

Las enfermedades de madera de viña (EMVs) son una patología causada por varios grupos de hongos de muy diversa naturaleza. Alguno de estos patógenos, asociados a las EMVs, también han sido detectados en diferentes huéspedes leñosos con síntomas de decaimiento, sin embargo, el conocimiento de los mismos no es tan profundo como en viña.

Por tanto, el objetivo de este trabajo fue recopilar el número de especies identificadas en el laboratorio de la Estación Fitopatológica Areeiro durante los años 2015-2019 relacionadas con enfermedades de madera en otros huéspedes, incluyendo frutales, forestales y ornamentales.

Se identificaron un total de 36 especies distribuidas en 9 grupos patógenos: 14 en *Botryosphaeriaceae*, 2 en *Cadophora*, 1 en *Calosphaeria*, 1 en *Collophora*, 1 en *Coniochaeta*, 1 en *Cryptosporiopsis*, 10 en *Diaporthe*, 2 en *Diatrypidae*, y 4 en *Phaeoacremonium*.

Las especies de la familia *Botryosphaeriaceae* fueron las que se detectaron con mayor frecuencia en las muestras analizadas, independientemente de la naturaleza del huésped. Se identificaron un total de 14 especies en 5 géneros: *Botryosphaeria*, *Diplodia*, *Dothiorella*, *Lasiodiplodia* y *Neofusicoccum*.

Neofusicoccum parvum, considerado el patógeno más agresivo relacionado con las EMVs, fue la especie que se registró con mayor frecuencia, detectándose en un total de 24 huéspedes, 10 forestales, 9 ornamentales y 5 frutales.

ANÁLISIS DE LA COMUNIDAD FÚNGICA DE MUESTRAS DE VID

Almacellas, J.¹; Monné, D.¹; Del cueto, A.I.¹; Oliva, J.²; Sobreper, M.¹; Aresté, M.¹; Ramos, V.¹; Paniello, M.N.¹, Borrell, A., Lumbierres, A.B¹ y Giné, J.A.

¹Laboratorio de Agricultura y Sanidad Vegetal de Cataluña (DARP) (jalmacellas@gencat.cat);

²Laboratorio de Microbiómica (UdL).

Existe una preocupación en algunas zonas vitivinícolas de Cataluña por la muerte de cepas de vid causadas por un síndrome complejo de apoplejía y colapso, asociadas a necrosis de los tejidos leñosos internos, normalmente de la parte basal de la planta. Este síndrome se hace muy evidente en nuevas plantaciones de la comarca de Terra Alta.

Los análisis clásicos mediante cultivo microbiológico o por técnicas moleculares de PCR no fueron concluyentes sobre las causas de este síndrome. Por ello, el Laboratorio de Agricultura y Sanidad Vegetal de Cataluña propuso al Laboratorio de Microbiómica de la Universidad de Lleida el análisis de la comunidad fúngica de 90 muestras de vid.

Las muestras se correspondieron a extracciones de ADN de tejidos sintomáticos de la enfermedad (n=45), causados entre otros por hongos de los géneros *Phaeoacremonium*, *Phaeomoniella* y *Cadophora*. También se analizaron muestras asintomáticas de tejidos próximos a los infectados (n=45) para comparación.

El análisis de las muestras mediante secuenciación masiva permitió un diagnóstico no de hongos individuales, sino del conjunto de hongos asociados a los síntomas. Las muestras sintomáticas mostraron una comunidad diferente respecto de las asintomáticas y un mayor número de especies (34 vs. 27 especies). *Phaeoacremonium* sp. destacó claramente como la especie asociada a los síntomas de enfermedad (13 veces más abundante en tejido sintomático que en tejido asintomático). Este hongo se encontró en mayor proporción en tejido sintomático (27% vs. 4% de las muestras). *Phaeomoniella* y *Cadophora* predominaron en muestras sintomáticas (1.5 y 2.2 veces más abundantes) pero con un patrón menos claro que *Phaeoacremonium* sp. Estas dos especies aparecieron de manera abundante en tejido asintomático y se detectaron en todas las muestras.

Se confirmó que el síndrome está asociado a un conjunto de hongos. Los resultados indican que *Phaeoacremonium* sp. tendría un papel primario y no se puede concluir aún sobre el papel de *Phaeomoniella* y *Cadophora*, aunque se sospecha que la primera también puede ser importante. Sería interesante explorar la posible distribución espacial irregular de *Phaeoacremonium* sp. La información generada manifiesta que la secuenciación masiva es una herramienta adecuada para diagnosticar y estudiar enfermedades de etiología compleja que incluyan diferentes patógenos.

DIAGNOSTICO DE *Plenodomus tracheiphilus* EN CÍTRICOS AFECTADOS DE SECA

Gómez, R.M.¹; Urrutia, M.T.¹; Lirola, F.¹; Larrayoz, C.I.²; Garcia, E.²;
Cano, E.M.¹; Silvestre, A.M.¹; Aguilar, M.I.¹

¹ Laboratorio de Producción y Sanidad Vegetal de Almería
(misabel.aguilar@juntadeandalucia.es);

² Departamento de Sanidad Vegetal de Málaga

Plenodomus tracheiphilus es un patógeno de cuarentena que ocasiona una destructiva enfermedad vascular llamada “Mal seco” en limonero y otros cítricos en la mayoría de países de la Cuenca Mediterránea.

La primera detección en España se realizó en 2015 en el Laboratorio de Almería en una muestra de limonero enviada por el Departamento de Sanidad vegetal de Málaga. Desde entonces se han aplicado diversas técnicas de detección, como el análisis del sistema vascular por siembra y aislamiento en medios de cultivo, así como la técnica PCR, tanto convencional como en tiempo real, siguiendo en ambos casos el protocolo de diagnóstico de *Plenodomus tracheiphilus* descrito en el documento EPPO 7/48 (Incluido en la lista A2 de organismos de cuarentena de EPPO).

Desde su detección se ha venido realizando el diagnóstico de esta enfermedad, por medio de prospecciones en las diversas áreas afectadas realizadas por el Departamento de Sanidad Vegetal de Málaga, siguiendo el Programa oficial de erradicación de dicho organismo, en el que además se dictan una serie de medidas fitosanitarias obligatorias. Los técnicos del citado departamento han observado diferencias en cuanto a aparición de síntomas y gravedad de estos en función de los patrones utilizados.

En todo este periodo, se ha comprobado que la técnica PCR puede ser una herramienta muy útil y sensible para la detección de este patógeno en muestras vegetales, tanto con síntomas muy evidentes, como con síntomas leves o inapreciables. Por otra parte, hasta el momento el éxito en el aislamiento de *P. tracheiphila* resultó ser inferior a la detección por PCR, en muchos casos por la presencia frecuente de hongos de crecimiento más rápido en medio de cultivo, u otras causas.

ESTADO FITOSANITARIO DE PATRONES DE ALMENDRO EN VIVEROS: CARACTERIZACIÓN DE ESPECIES FÚNGICAS RELACIONADAS CON ENFERMEDADES DE LA MADERA

Capote, N.; Del Río, M. A.; Sánchez, M. C.

Instituto de Investigación y Formación Agraria y Pesquera de Andalucía
(IFAPA) Centro Las Torres. Alcalá del Río, Sevilla.
marian.capote@juntadeandalucia.es

El complejo de hongos anamorfos de *Cylindrocarpon* es capaz de infectar a plantas herbáceas y leñosas de interés en agricultura. En este estudio se han caracterizado molecular y patogénicamente 32 aislados de anamorfos de *Cylindrocarpon* obtenidos a partir de distintos patrones de almendro de vivero (GxN-15, Nemaguard, Rootpac-40 y Rootpac-20). Para la caracterización molecular, se secuenciaron la región ITS del ADNr y un fragmento del gen de la histona H3 de cada uno de los aislados, y se llevó a cabo un análisis filogenético. Se identificaron las especies *Dactylonectria torresensis*, *D. novozelandica*, *D. macrodidyma*, *Ilyonectria liriodendri* y *Cylindrocarpon* sp. El patrón en el que se detectó un mayor número de aislados de anamorfos de *Cylindrocarpon* fue GxN-15, seguido de Nemaguard y Rootpac-R. No se aislaron anamorfos de *Cylindrocarpon* del patrón Rootpac-40. Los aislados se detectaron mayoritariamente en la raíz principal de los patrones analizados. El test de patogenicidad reveló que *D. novozelandica* y *Cylindrocarpon* sp. pueden causar podredumbre de madera en varetas de patrones de almendro inoculados, pero *D. torresensis* no mostró patogenicidad. Este es el primer estudio de caracterización de hongos anamorfos similares a *Cylindrocarpon* que afectan al nudo y las raíces de patrones de almendros en España.

NUEVAS DETECCIONES DE HONGOS EN FRUTALES CON DECAIMIENTO

Gómez, R.M.; Lirola, F.; Urrutia, M.T.; Cano, E.M.; Silvestre, A.M.; Aguilar, M.I.

Laboratorio de Producción y Sanidad Vegetal de Almería
(misabel.aguilar@juntadeandalucia.es);

El decaimiento puede ocasionar pérdidas importantes en diversas especies de frutales. Queremos destacar algunas detecciones puntuales de hongos efectuadas en diversos frutales con decaimiento en el Laboratorio de Almería. En 2017, detectamos *Neofusicoccum* sp. (*Neofusicoccum australe*/*Neofusicoccum luteum*) en una muestra de mango con síntomas de decaimiento y chancros en ramas, procedente de una finca de Málaga. La detección se realizó por aislamiento en medios de cultivo, cámara húmeda y métodos moleculares. En los últimos años se ha tenido noticia de la detección en España de *N. australe* en algunos frutales como almendro o vid, aunque en mango parece ser la primera vez que se detecta.

También durante 2017 realizamos la detección de *Phaeoacremonium parasiticum* en almendros con decaimiento y necrosis internas en ramas de la provincia de Málaga. La identificación se realizó mediante aislamiento y posterior secuenciación.

En almendro han sido detectados en España otras especies de *Phaeoacremonium*, sin embargo, *Phaeoacremonium parasiticum* esta citada afectando a otras especies de *Prunus* en diversas partes del mundo. Por otra parte, en la misma muestra se observaron además necrosis en raíces y en ellas se aisló *Cylindrocarpon* sp.

Este último hongo se ha detectado en varias ocasiones a lo largo de los últimos años en almendros con decaimiento de la provincia de Almería, y en los cuales no se detecta otro posible agente causal de la enfermedad.

Desconocemos si podría ser el causante *Cylindrocarpon* spp., que está siendo a veces relacionado con seca de frutales en otras partes del mundo. Por último, en 2018 se detectó *Phaeoacremonium* sp. en olivos de Málaga afectados de decaimiento, necrosis de las puntas de las hojas y seca de ramas, mostrando necrosis internas. Se realizó el aislamiento del hongo consistentemente en las necrosis internas de las ramitas y se identificó mediante secuenciación. Algunas especies se han asociado en otros países a decaimiento en olivos con los mismos síntomas.

En todos los casos expuestos se descartó la presencia de la bacteria *Xylella fastidiosa*, así como otros hongos fitopatógenos.

DAÑOS DE *Curvularia lunata* EN CÉSPED DEPORTIVO

Collar Urquijo, J.; Ascasíbar Errasti, J.

Laboratorio Agrario y Fitopatológico de Galicia (Xunta de Galicia)
(jesus.collar.urquijo@xunta.es).

En agosto de 2018 se recibieron muestras de tepes de un césped deportivo de la provincia de Lugo, compuesto mayoritariamente por la mezcla *Festuca*, *Lolium* y *Poa*; y que presentaban gran cantidad de las plantas secas en su totalidad o por lo menos en sus zonas más viejas; mientras que las raíces se mantenían aparentemente sanas.

La distribución en el césped era uniforme, sin rodales y con zonas más afectadas, pero con los bordes difusos.

Se sembraron porciones afectadas en medio PDA, y plantas parcialmente afectadas se dispusieron en cámaras húmedas. A los 5 días, tanto en PDA, como en la cámara húmeda, ya se observaron las fructificaciones del deuteromiceto (*Hyphomycetes*) que según las características morfológicas y siguiendo la publicación de A. Sivanesan (1987) coincide con la especie *Curvularia lunata* (Wakk.) Boedijn cuyo teleomorfo (no observado) es *Cochliobolus lunatus* R.R. Nelson & F.A. Haasis.

El aislamiento de este hongo fue muy consistente, aislándose en el 83% de los trozos de césped sembrados. En una menor medida (25%), también se aisló el ascomiceto *Leptosphaerulina* sp. (posiblemente *Leptosphaerulina australis* McAlpine o *Leptosphaerulina trifolii* (Rostr.) Petr.).

Curvularia lunata es un patógeno esporádico en los céspedes, que afecta principalmente a monocotiledóneas; y que en el caso de céspedes puede causar importantes daños en periodos con temperaturas superiores a los 30°C y elevadas humedades.

IV REUNIÓN DEL GRUPO ESPECIALIZADO EN DETECCIÓN, DIAGNÓSTICO E IDENTIFICACIÓN DE LA SOCIEDAD ESPAÑOLA DE FITOPATOLOGÍA (GEDDI-SEF)

Pontevedra, del 22 al 24 octubre de 2019

4ª Sesión: Nematodos

Moderan:

Remedios Santiago Merino
Rosa Sancho Gómez



DETECCIÓN DE *Bursaphelenchus xylophilus* EN *Monochamus galloprovincialis*

Abelleira, A., Pérez-Otero, R., Aguín, O. y Salinero, C.

Estación Fitopatológica Areeiro – Deputación de Pontevedra
(adela.abelleira@depo.es)

El nematodo de la madera del pino, *Bursaphelenchus xylophilus* (Bx) es un organismo de cuarentena que causa importantes daños en coníferas, especialmente en especies del género *Pinus*. La transmisión del nematodo de un árbol a otro se realiza, foréticamente, por medio de insectos vectores del género *Monochamus*. En Europa, la especie citada hasta la fecha como transmisora es *M. galloprovincialis* (Mg), detectada en la península ibérica.

Para determinar la distribución de vector, maximizar su captura y detectar la posible presencia del nematodo, se instalan trampas (multi-embudos o de vanos cruzados) cebadas con feromona sexual y de agregación en las masas forestales. Las trampas se colocan de mayo a octubre. Se revisan semanalmente, recogiendo los insectos capturados en ellas y llevándolos al laboratorio para su identificación y determinación de la presencia de Bx. La detección del nematodo se puede hacer directamente del insecto por técnicas moleculares o realizar una extracción previa del nematodo y proceder a su identificación morfológica y/o molecular. Este último método es el que vamos a describir.

Cada insecto que es identificado como Mg se coloca individualmente en una placa Petri, se corta con un bisturí en pequeños trozos, se le añade un poco de agua y se deja incubar a temperatura ambiente durante 24 horas. Posteriormente en la lupa se observa la presencia o ausencia de nematodos. Si se detecta Bx, generalmente se encuentra en el estado juvenil infectivo “dauer”. También pueden aparecer otros nematodos sin interés fitopatológico.

Las características morfológicas de los dauer son: cabeza en forma de cúpula- redondeada, débil estilete, bulbo medio poco definido y cola cónica alargada con una pequeña proyección o mucrón. No obstante, la identificación morfológica de Bx tendría que realizarse a partir de los adultos. Para obtenerlos se deben criar los dauer en placas de PDA con *Botrytis cinera* durante 15 días a 25° C. Para la identificación molecular el ADN se puede extraer, tanto de los dauer como de adultos, usando el kit QIAamp DNA Micro Kit (Qiagen, Germany). Para la amplificación del ADN extraído existen diferentes metodologías disponibles como PCR específica, PCR-RFLP, Real-Time y DNA barcoding.

DETECCIÓN DE *Anguina tritici* RAZA CEBADA MEDIANTE PCR-RFLP

Robertson, L.¹; Arcos, S.C.²; Navas, A.².

¹Grupo de Nematología, Dpto. Protección Vegetal, Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA) (robertson.lee@inia.es); ²Laboratorio Nacional de Referencia de Nematodos Fitopatógenos, Dpto. Biodiversidad y Biología Evolutiva, Museo de Ciencias Naturales, CSIC, Madrid.

Anguina tritici fue el primer nematodo que se describió en la literatura en 1749, y causa “anguilulosis” o “falso tizón del trigo”. Como problema, ha sido erradicado en el hemisferio occidental tras la segunda Guerra Mundial, a través de prácticas culturales y limpieza selectiva de semillas mediante técnicas automáticas de cribado. Sin embargo, en 2009, se confirma la presencia en España de *Anguina tritici* en cebada, un cultivo considerado en estudios previos, como un huésped poco frecuente para este nematodo.

En 2001, se llevó a cabo un estudio basado en PCR-RFLP en los EE. UU. para identificar las especies de *Anguina* de interés “regulatorio”, dado que *Clavibacter tritici* y *Rathayibacteria spp* se encuentran asociados a la presencia de este nematodo.

Uno de los principales problemas en el diagnóstico morfológico de los Anguinidos es que normalmente sólo se encuentran fases juveniles en las agallas de las semillas; los adultos generalmente mueren y se degradan. En este estudio, agallas secas de las espigas de cebada infectadas y juveniles en fase 2 fueron utilizadas para extraer el ADN genómico. Como control se usaron juveniles de agallas de trigo. El ADN fue utilizado para amplificar el ITS1 de nematodos con los cebadores adecuados. El producto amplificado se sometió a análisis de RFLP con 12 enzimas de restricción incluyendo aquellas utilizadas en el estudio de los EE.UU.

Por último, en este trabajo describimos el patrón PCR-RFLP para *Anguina tritici* en cebada y lo comparamos con otros especies de *Anguina* de interés “regulatorio”, demostrando que *Anguina tritici* procedente de cebada tiene un patrón único.

IV REUNIÓN DEL GRUPO ESPECIALIZADO EN DETECCIÓN, DIAGNÓSTICO E IDENTIFICACIÓN DE LA SOCIEDAD ESPAÑOLA DE FITOPATOLOGÍA (GEDDI-SEF)

Pontevedra, del 22 al 24 octubre de 2019

5ª Sesión: Bacterias y Fitoplasmas

Moderan:

Raquel Marquínez
M. Belén Álvarez Ortega



EVALUACIÓN DE MÉTODOS DE DETECCIÓN DE CANDIDATUS LIBERIBACTER CAUSANTES DE HUANGLONGBING EN CÍTRICOS

Cellier G.¹, Redondo C.², Cubero J.², Roselló M.³, de Andrade E.⁴, Cruz L.⁴, Ince E.⁵, Yildiz H. N.⁵, Güler P. K.⁵, D'Onghia, A. M.⁶, Yaseen, T.⁶, Djelouah, K.⁶, Metz-Verschure E.⁷, Gaffuri F.⁸, Gottsberger R. A.⁹, Giovani B.¹⁰

¹Anses, National Plant Health Laboratory, Tropical Pests and Diseases unit, Reunion Island, Francia. ²National Institute for Agricultural and Food Research and Technology (INIA), España (cubero@inia.es). ³Phytopathological Diagnostic Laboratory, Security and Control of Agricultural Production Service, Valencian Government, España. ⁴National Institute for Agricultural and Veterinarian Research (INIAV), Portugal. ⁵Biological Control Research Institute (BMAE-BCRI), Turquía. ⁶CIHEAM-Istituto Agronomico Mediterraneo of Bari, Italia. ⁷Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority, Países Bajos. ⁸Servizio Fitosanitario Regione Lombardia Laboratorio Fitopatologico c/o Fondazione Minoprio, Italia. ⁹Austrian Agency for Health and Food Safety (AGES), Austria. ¹⁰European and Mediterranean Plant Protection Organization (EPPO)-Euphresco, Paris, Francia

El Huanglongbing (HLB), considerado como uno de los mayores riesgos para la industria cítrica mundial, está asociado a tres especies de bacterias del género *Candidatus Liberibacter*: *C. Liberibacter asiaticus* (CLas), *africanus* (CLaf) y *americanus* (CLam). El diagnóstico visual de la enfermedad no es fácil puesto que su sintomatología puede confundirse con algunas deficiencias nutricionales o con otras enfermedades. Además, la detección de la bacteria puede ser dificultosa debido a su bajo nivel de inóculo y su distribución irregular en la planta.

En la actualidad se están utilizando protocolos de PCR para la detección de la bacteria que incluyen tanto técnicas convencionales como a tiempo real. En este trabajo, y dentro del proyecto EUPHRESCO 2016-A-232, se han evaluado comparativamente las estrategias de detección basadas en la amplificación de ADN recogidas en los protocolos de la EPPO y la FAO. En primer lugar se determinaron parámetros como la especificidad y sensibilidad analítica a partir de una colección de muestras infectadas y no infectadas tomadas en diversas zonas cítricas del mundo. Posteriormente realizaron ensayos interlaboratorio en ocho laboratorios de distintos países, para establecer la repetibilidad y reproducibilidad de los protocolos valorados.

Los resultados han evidenciado claras diferencias entre los protocolos evaluados en los diferentes parámetros, no apreciándose sin embargo grandes discrepancias entre los laboratorios participantes, lo cual demuestra una aceptable reproducibilidad de las técnicas seleccionadas así como una alta fiabilidad de las pruebas realizadas y de las conclusiones obtenidas.

Este trabajo ha sido financiado en España por el INIA con la AT2016-007.

NUEVOS HOSPEDADORES DE *Xylella fastidiosa* DETECTADOS EN ALICANTE

Montserrat Roselló Pérez

MEJORANDO LAS PROSPECCIONES Y ANÁLISIS DE *Xylella fastidiosa*

Marc, S.¹, Nieto, A.¹, Borràs, D.¹, Adrover, F.¹, Gost, P. A.², Montesinos, M.³, Moralejo, E.³, Landa, B. B.⁴, Beidas, O.⁵, Juan, A.⁵, Olmo, D.¹

¹ Serveis de Millora Agrària i Pesquera (dolmo@semilla-caib.es); ² Universitat de les Illes Balears; ³ TRAGSA; ⁴ IAS-CSIC; ⁵ Conselleria d'Agricultura i Pesca, Govern Balear

Xylella fastidiosa se detectó en Mallorca a finales de 2016. Desde entonces, cumpliendo la normativa, se ha analizado una gran cantidad de muestras. En particular, el brote de Mallorca es diferente a otros casos en Europa, debido a la coexistencia de la subespecie *multiplex* (ST81, ST7) en almendros, olivos y otras especies, y la subespecie *fastidiosa* (ST1) en almendros y plantas de vid, entre otros.

Al igual que ocurre en muchos otros organismos fitopatógenos, los análisis para la detección de *X. fastidiosa* están condicionadas por la fecha de muestreo. Sin embargo, no se sabe con certeza si la época óptima es la misma en todas las especies hospedadoras. Tampoco si es viable agrupar varias muestras o incluso si la bacteria puede detectarse en muestras de madera vieja.

En este trabajo, nos hemos centrado en los datos de los muestreos y análisis de *X. fastidiosa* en almendros, vides y olivos en Mallorca. Se compararon los porcentajes mensuales de positivos y el valor de Ct promedio en las qPCR de más de 2.000 análisis de cada uno de estos cultivos.

En general, observamos que para los almendros los mejores resultados se obtuvieron con muestras tomadas de junio a agosto, mientras que en la vid el período óptimo fue de agosto a octubre. En los olivos, el comienzo de la primavera resultó en el momento más favorable para la detección, mientras que en verano se observaba con un aumento de Ct y una disminución de las detecciones de positivos.

También se realizaron ensayos con muestras agrupadas de peciolo. En almendro, mezclar una planta infectada con hasta 4 negativas a partes iguales, mostró un aumento promedio de Ct de 2.7 ciclos, mientras que para las muestras de olivo y vid el aumento de Ct fue mayor de 4 ciclos.

Por defecto, *X. fastidiosa* se analiza normalmente en nervaduras centrales y peciolo, aunque se ha visto que puede analizarse también en madera. En este sentido, hemos probado el uso potencial de muestras de madera de troncos, incluso tomándolas de los diferentes anillos de crecimiento. Aunque este procedimiento de muestreo no sirva para prospecciones de rutina, nos puede permitir establecer una posible cronología en las infecciones por *X. fastidiosa* en las Islas Baleares.

COMPARACIÓN DE PROTOCOLOS DE PCR EN TIEMPO REAL PARA LA DETECCIÓN DE *Xylella fastidiosa* EN DIFERENTES ESPECIES Y VARIEDADES VEGETALES

Barbé, S.¹, Llobregat, B.², Navarro, I.¹, Lozano, I.¹, Monterde, A.¹, Figás-Segura, A.², Biosca, E.G.², Marco-Noales, E.¹

¹ Bacterias Fitopatógenas, Centro de Protección Vegetal y Biotecnología, Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA);

² Bacteriología de plantas. Aplicaciones Biotecnológicas – BACPLANT, Departamento de Microbiología y Ecología, Universitat de València.

La detección es uno de los primeros pasos para prevenir y evitar la introducción y dispersión de *Xylella fastidiosa*. En los estándares de diagnóstico recomendados por la *European and Mediterranean Plant Protection Organization* [EPPO, 2019 PM 7/24 (4)] se incluyen diferentes protocolos de PCR en tiempo real dirigidos a diferentes zonas del genoma de *X. fastidiosa*. La detección molecular puede estar influida por varios factores, entre ellos la concentración de la bacteria diana en la muestra y la especie de planta hospedadora analizada. Por ello, el objetivo de este trabajo fue evaluar la sensibilidad de los protocolos de PCR en tiempo real descritos en estos estándares, usando extractos de material vegetal de cinco variedades de almendro (Marcona, Marta, Avijor, Belona, Constantí) y ocho variedades de olivo (Alfajara, Arbequina, Blanqueta, Cornicabra, Frantoio, Hojiblanca, Manzanilla, Picual), inoculados con diferentes concentraciones de las cepas inactivadas IVIA 5901 de *X. fastidiosa* subsp. *multiplex* ST6, aislada de almendro en el foco de Alicante y CFBP 8402, subsp. *pauca* ST53, aislada de olivo en la región de Apulia (Italia). En todos los casos se realizó la extracción de ADN siguiendo el método basado en el CTAB.

Los resultados revelan ligeras diferencias entre protocolos y entre especies y variedades vegetales, y en algunos casos las diferencias parecen atribuibles a problemas de inhibición de la amplificación. La integración de todos estos datos puede contribuir a optimizar la detección de *X. fastidiosa* mediante la selección del protocolo más adecuado, en función del origen de la muestra y las características de la misma.

Este trabajo ha sido parcialmente financiado por el proyecto E-RTA 2017-00004-C06-01 FEDER INIA-AEI, el Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades y la Organización Interprofesional del Aceite de Oliva Español. Los autores agradecen al Ministerio de Agricultura y al Servicio de Sanidad Vegetal de la Comunidad Valenciana.

DIFERENTES ENFOQUES PARA LA DETECCIÓN DE *Xylella fastidiosa* MEDIANTE TÉCNICAS MOLECULARES

Barbé, S.¹, Navarro, I.¹, Amato, M.², Li, R.², de Gea, A.³, López, A.B.³, Ruiz, E.⁴, Sánchez, C.³, Torrecillas, F.⁴, Arcoleo, G.⁵, Totta, C.⁵, Marco-Noales, E.¹

¹ Bacterias Fitopatógenas, Centro de Protección Vegetal y Biotecnología, Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA);

² Agdia EMEA (Francia) y Agdia Inc. (EEUU);

³ Microgaia Biotech (España);

⁴ Promega Biotech Ibérica S.L (España);

⁵ Enbiotech S.R.L. (Italia).

Los diversos focos de *Xylella fastidiosa* en diferentes países europeos y en muchas especies de plantas hospedadoras distintas hace necesario disponer de métodos rápidos, sensibles y específicos que permitan realizar análisis a gran escala en áreas amplias, con el fin de conocer el grado de dispersión de esta bacteria de cuarentena. Para ello, se han desarrollado diferentes técnicas moleculares, que requieren o no purificación del ADN, y que actualmente se comercializan como estuches de diagnóstico por diferentes empresas.

En este trabajo, se ha realizado un estudio comparativo de algunos de estos estuches, analizando un conjunto de muestras de almendros infectados por *X. fastidiosa* en la zona demarcada del foco de Alicante. El protocolo de referencia utilizado para comparar las diferentes aproximaciones fueron las PCRs en tiempo real de Harper *et al.* (2010, *erratum* 2013) y Francis *et al.* (2006), previa extracción manual de ADN mediante CTAB según EPPO 2018 PM 7/24 (3) (ahora EPPO 2019 PM 7/24 (4)).

En primer lugar se probaron cuatro *master mix* diferentes para PCR y se seleccionó aquella con la que se obtuvieron mejores resultados. En segundo lugar se ensayaron las siguientes metodologías: i) extracción automatizada con el equipo *Maxwell® RSC instrument* (Promega), comparando dos kits de extracción; ii) detección mediante un kit basado en la tecnología LAMP con un lector integrado ICGENE (Enbiotech); iii) detección mediante un kit basado en una amplificación por recombinasa y polimerasa (RPA) con un lector de fluorescencia acoplado (Agdia); iv) y utilización de un kit de extracción de ADN y posterior PCR en tiempo real con tres dianas simultáneamente (Microgaia Biotech).

Las diferencias observadas entre los protocolos fueron mínimas, a pesar de que las medidas de concentración y calidad del ADN purificado eran muy distintas. La elección de cada procedimiento probablemente debería basarse en el tamaño muestral y en los recursos económicos y humanos de cada laboratorio. En general, una prueba sin extracción de ADN podría usarse en las zonas infectadas para un primer cribado, haciéndose extracción de ADN solo a partir de las muestras negativas.

Este trabajo ha sido parcialmente financiado por el proyecto E-RTA 2017-00004-C06-01 FEDER INIA-AEI. Los autores agradecen al Ministerio de Agricultura y al Servicio de Sanidad Vegetal de la Comunidad Valenciana.

APLICACIÓN DE LA GENÓMICA EN LA DETECCIÓN DE BACTERIAS FITOPATÓGENAS

Cubero, J.¹, Palacio-Bielsa, A.², Garita-Cambronero, J.³

¹Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA), Madrid (cubero@inia.es);

²Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria de Aragón (CITA). ³Centro de Investigación de Biocombustibles y Bioproductos, Instituto Tecnológico Agrario de Castilla y León (ITACyL), Villarejo de Órbigo, León

La llegada de la era de las “ciencias ómicas” no solo ha facilitado la realización de estudios dirigidos a profundizar sobre los mecanismos de infección de los patógenos de plantas, sino que han supuesto también herramientas útiles en el diagnóstico de enfermedades. Mediante el análisis de los genomas completos de los agentes causales de enfermedad se pueden determinar qué elementos de los mismos están involucrados en los procesos de patogénesis, y a partir de ellos diseñar estrategias de detección específicas de patógenos. En esta comunicación se resumen los trabajos realizados en *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni* (*Xap*), causante de la mancha bacteriana de los frutales de hueso y el almendro.

Como ocurre en otros modelos de xanthomonads, *Xap* puede coexistir en *Prunus* spp. con bacterias no patógenas de la misma especie. El análisis genómico comparativo entre cepas patógenas y no patógenas ha permitido determinar los genes que posiblemente, y a la espera de una confirmación funcional, participan en la virulencia de esta bacteria. Uno de estos genes, que aparece de forma específica en *Xap*, se ha seleccionado para el desarrollo de un nuevo método de PCR en tiempo real dirigido al diagnóstico de la mancha bacteriana de los frutales de hueso y el almendro. Además, el mismo tipo de análisis se ha realizado con los patovares *juglandis* y *corylina* de *X. arboricola*, considerados junto a *pruni* como los más virulentos de la especie, identificando así posibles dianas para protocolos más precisos de detección de estas bacterias en nogal y avellano.

Por último, hay que destacar que el mismo plan de trabajo puede ser aplicado a modelos como el de *Liberibacter*, donde las estrategias de diagnóstico se basan actualmente en secuencias de genes que se encuentran de forma generalizada en las bacterias y no están relacionadas con patogenicidad.

Este trabajo ha sido financiado por el Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades así como por el INIA con los proyectos RTA2014-0018, RTI2018-096018-R-C31 (cofinanciados con FEDER) y AT2016-007.

DECAIMIENTO Y MUERTE DE ALMENDROS EN PRIMAVERA

Muñoz, R. M.¹; Castillo, P.¹; Lerma, M. L.¹; Monterde, A.²; Marco-Noales, E.²

¹ Instituto Técnico Agronómico Provincial de Albacete (ITAP) (rmg.itap@dipualba.es);

² Bacterias Fitopatógenas, Centro de Protección Vegetal y Biotecnología, Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA)

A partir de marzo de 2019, en el Servicio de Diagnóstico y Asistencia Fitosanitaria (SEDAF) del ITAP, se han recibido muestras de almendro procedentes de parcelas donde se había detectado decaimiento de árboles y, en general, posterior muerte de los mismos.

Los árboles afectados tenían entre 2 y 6 años de edad, siendo la mayoría de 3 años. La variedad más frecuente es Guara, pero también se han observado daños en otras variedades. Las parcelas afectadas son en su mayoría de secano. En total, se han contabilizado más de 2500 árboles enfermos o muertos, observándose incidencias de hasta el 40% en algunas parcelas.

Internamente, los troncos presentan una zona de avance subepidérmica, que en la parte superior puede alcanzar a las ramas mientras que en la parte inferior llega, en algunos casos, a las raíces.

A partir de la zona de avance se ha llevado a cabo aislamiento de hongos en PDAS y CMA-PARPBH, así como de bacterias en LPGA. La identificación de bacterias se llevó a cabo en el Laboratorio Nacional de Referencia de Bacterias Fitopatógenas.

Aunque se han aislado diversas especies bacterianas y fúngicas, hasta la fecha no se ha podido asociar la sintomatología detectada con un agente biótico patógeno. Es posible que los daños se desencadenen a consecuencia de lluvias y/o heladas en otoño o invierno, manifestándose los síntomas externos a finales de invierno o posteriormente en primavera.

Asimismo, se sospecha que los daños pueden estar relacionados con lesiones en el tronco; aparte de otras causas, la acción antrópica puede también favorecer lesiones en el tronco, ya que en varias muestras se ha constatado presencia de protectores plásticos bastante ajustados que podrían estar relacionados con los daños.

Aún está por dilucidar si estos factores físicos son los únicos responsables de la patología que se observa o si la causa podría ser una conjunción de factores bióticos y abióticos.

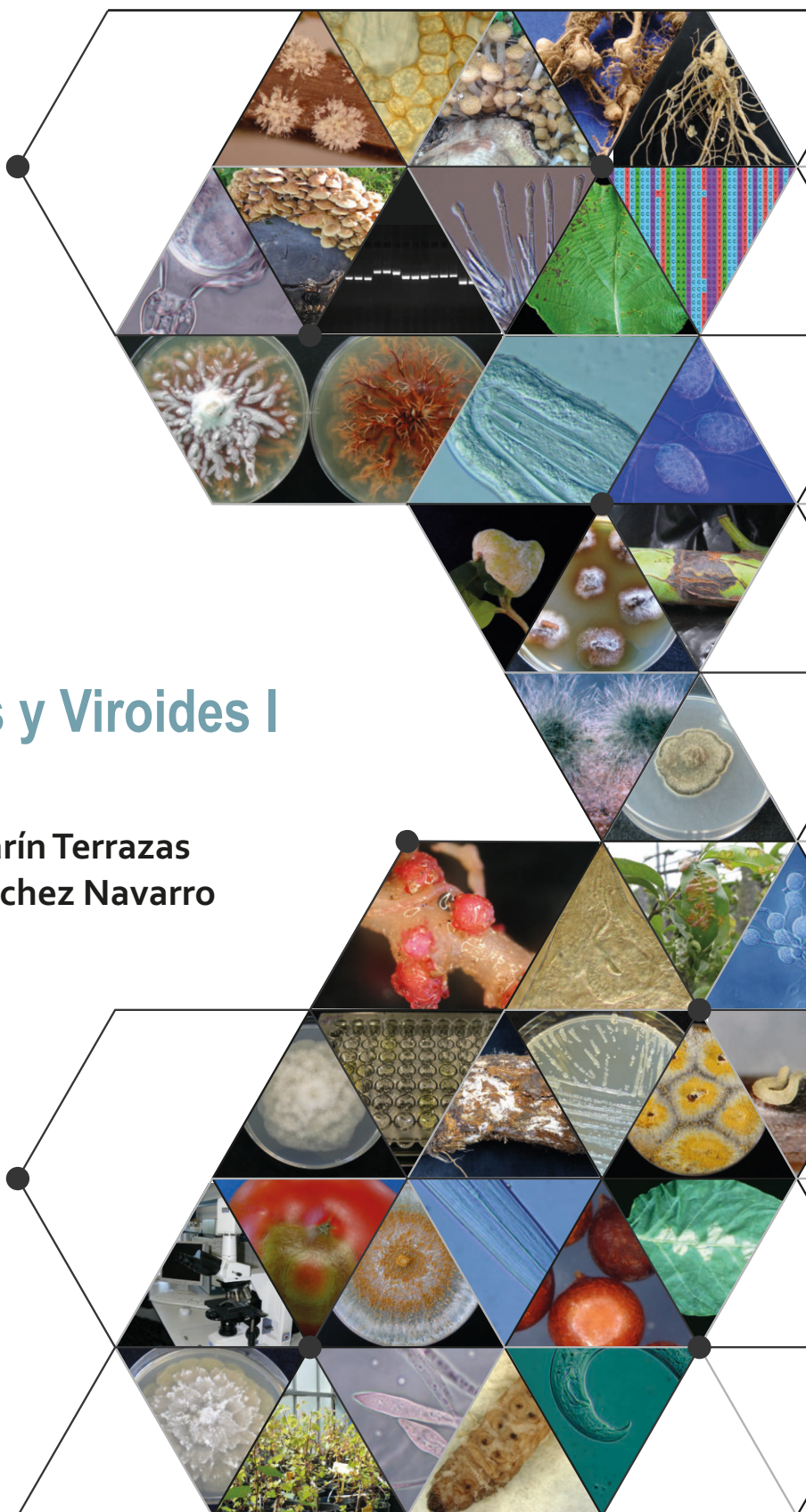
IV REUNIÓN DEL GRUPO ESPECIALIZADO EN DETECCIÓN, DIAGNÓSTICO E IDENTIFICACIÓN DE LA SOCIEDAD ESPAÑOLA DE FITOPATOLOGÍA (GEDDI-SEF)

Pontevedra, del 22 al 24 octubre de 2019

6ª Sesión: Virus y Viroides I

Moderan:

Milagros Marín Terrazas
Jesús A. Sánchez Navarro



DETECCIÓN DE GRAPEVINE PINOT GRIS VIRUS MEDIANTE PCR CUANTITATIVA A TIEMPO REAL

Ruiz-García, A. B.¹; Morán, F.¹; Olmos, A.¹

¹Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA)
(ana.belen.ruiz@uv.es)

Grapevine Pinot gris virus (GPGV) es un patógeno viral que ha sido asociado a la enfermedad del moteado y la deformación de la hoja de la vid. Se describió por primera vez en Italia en 2012 en la región de Trentino, donde se le han atribuido pérdidas importantes en la producción y calidad de la uva en los últimos años. Posteriormente se ha demostrado que el virus presenta una amplia distribución geográfica a nivel mundial. En España este virus emergente se detectó por primera vez en el año 2017.

En el presente trabajo se ha desarrollado un método de detección para GPGV mediante RT-PCR a tiempo real cuantitativa, capaz de detectar *in silico* todos los aislados descritos hasta el momento. De hecho, la técnica ha sido utilizada con éxito para la detección de aislados de GPGV de diferentes orígenes geográficos. El método presenta una elevada sensibilidad técnica, habiéndose estimado su límite de detección en torno a unas 70 copias de dianas virales en material vegetal. La comparación con otras técnicas de detección de GPGV muestra que el método desarrollado en nuestro laboratorio es por el momento el más sensible. Además, la RT-PCR diseñada es el primer método de detección de GPGV que contiene un control interno del huésped, lo que aumenta su sensibilidad diagnóstica. La técnica se ha empleado también con éxito en la detección de GPGV en ácaros pertenecientes a la especie *Colomerus vitis*, previamente identificados como vectores potenciales del virus. La detección ha resultado positiva incluso en aquellos casos en los que se ha realizado el ensayo en un único ácaro.

ESTUDIOS AGRONÓMICOS Y VÍRICOS EN VARIEDADES DE VID IDEAL Y ALEDO SANEADAS: UNA PERSPECTIVA DE SIETE AÑOS EN CAMPO

Morán, F.¹; Canales, C.¹; García, J.²; Olmos, A.¹; y Ruiz-García, A.¹

¹ Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (Moran_fel@gva.es)

² Conselleria de Agricultura de la Generalitat Valenciana

En la actualidad, se han descrito alrededor de 70 especies diferentes de virus infectando la vid (*Vitis vinífera*, L.), de los que 31 se asocian a los principales síndromes, la degeneración infecciosa, el enrollado, la madera rizada y el jaspeado. Entre ellos hay cinco que por su importancia se han incluido en la directiva europea 2002/11/CE (ArMV, GFLV, GFkV, GLRaV-1 y GLRaV-3) que no deben estar presentes en material certificado. En el marco de un proyecto INIA (RTA-2008-00064) se sanearon, mediante cultivo de ápices caulinares *in vitro*, diez cabezas de clon de la variedad Ideal y 9 de la variedad Aledo. Se confirmó la ausencia de los cinco virus contemplados en la legislación durante dos años consecutivos en dos periodos vegetativos diferentes (primavera e invierno), analizándose las plantas mediante PCR a tiempo real. Los clones saneados posteriormente se cultivaron en una parcela experimental localizada en el término municipal de Monforte del Cid (Alicante) en el año 2012, con el objetivo de comprobar sus características agronómicas. Las parcelas fueron monitorizadas durante 7 años, observando parámetros enológicos, de fertilidad, de vigor, de producción y los relacionados con la calidad de la uva, así como también la presencia de los virus antes mencionados.

Los resultados del seguimiento muestran que, respecto a variedades infectadas, la variedad saneada Ideal reduce su ciclo vegetativo, ya que inicia pronto la brotación y se le caen las hojas antes, a la vez que son más vigorosas y fértiles. Por otro lado, las variedades saneadas de Aledo son más productivas, proporcionan uvas con mayores contenidos en azúcares y presentan bayas con la piel de un color más verde en el momento de la recolección, lo que sugiere que alteraciones en el viroma de la planta pueden producir cambios fenotípicos de interés agronómico. Respecto al seguimiento de la presencia de los virus, los resultados muestran que en ambas variedades el saneamiento fue efectivo.

EL INDEXAGE BIOLÓGICO EN LA CERTIFICACIÓN SANITARIA DE VIRUS DE VID

Padilla Martínez C.V; Hita Gambín I.; Salmerón Gómez E; Hellín García P.
carlosv.padilla@carm.es

Instituto Murciano de Investigación y Desarrollo Agrario y Alimentario (IMIDA)

Para diagnóstico masivo de viñedos hay técnicas baratas, rápidas y bastante fiables como la inmunopresión, ELISA, PCR, drones... Sin embargo, en el caso de la vid los virus no están distribuidos homogéneamente en la planta, la carga vírica varía, de manera que hay zonas en la misma planta donde no hay virus y otras donde si hay virus. Cuando la concentración vírica es pequeña o latente y se dan las condiciones favorables, el virus puede expandirse por la planta y consecuentemente por el viñedo.

Nuestro equipo lleva más de 40 años certificando planta inicial de vid (cabeza de clon) para virus mediante indexage, ELISA y técnicas moleculares. Nuestro objetivo es minimizar las discrepancias o dudas que puedan surgir, combinando distintas técnicas de detección que nos permita un diagnóstico sólido y fiable.

Para análisis mediante ELISA y PCR, es muy importante minimizar el riesgo de que haya falsos negativos, para ello se debe seleccionar la muestra adecuada dentro de la planta así como la época del año y el huésped (variedad).

El indexage biológico, consiste en injertar una planta de vid problema sobre una planta indicadora sana. Si la planta en estudio tiene virus, el virus se transmite a la planta indicadora sana, se multiplica y manifestarán síntomas visuales, permitiendo así su diagnóstico. Los injertos se pueden realizar: en campo (indexage leñoso) sobre plantas indicadoras ya establecidas el año anterior; de taller con posterior trasplante al campo; o en verde (herbáceo) usando los pámpanos jóvenes en invernadero.

Mediante indexage se pueden detectar síntomas de virus que no se detectan por ELISA o PCR, y que pueden alertar de la aparición de otras enfermedades víricas (como variantes de enrollado) o identificar nuevas virosis emergentes que escapan a anticuerpos o *primers* y que podrían diagnosticarse mediante secuenciación. Por este motivo, desde nuestro equipo apoyamos el indexage como una técnica de diagnóstico indispensable para certificar material **inicial** de vid, de acuerdo con la legislación, protocolos y convenios de los programas de certificación tanto de la UE como internacionalmente reconocidos.

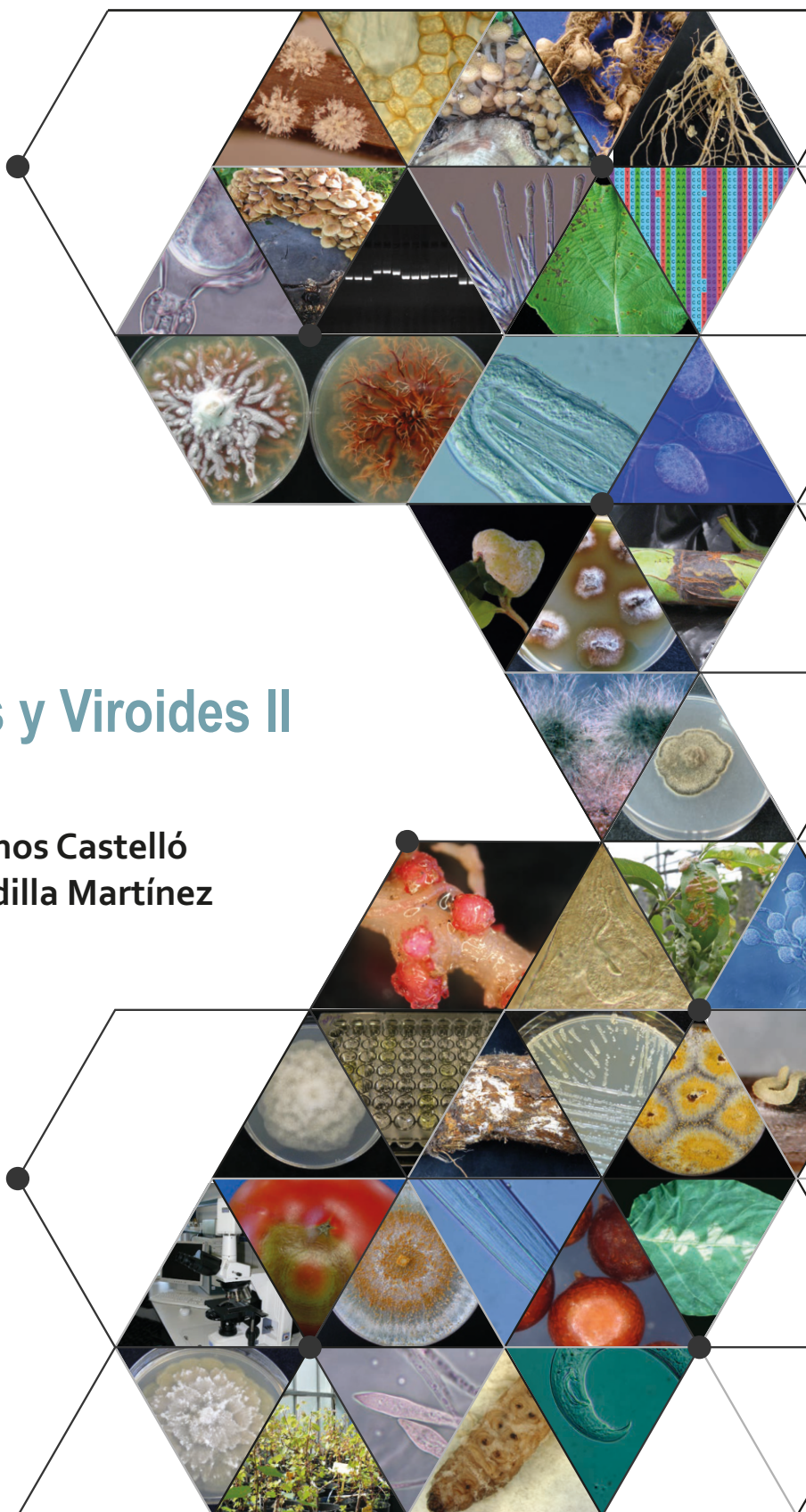
IV REUNIÓN DEL GRUPO ESPECIALIZADO EN DETECCIÓN, DIAGNÓSTICO E IDENTIFICACIÓN DE LA SOCIEDAD ESPAÑOLA DE FITOPATOLOGÍA (GEDDI-SEF)

Pontevedra, del 22 al 24 octubre de 2019

7ª Sesión: Virus y Viroides II

Moderan:

Antonio Olmos Castelló
Carlos V. Padilla Martínez



DETECCIÓN EN SEMILLA DE LOS PRINCIPALES VIRUS QUE AFECTAN A CUCURBITÁCEAS MEDIANTE ELISA, HIBRIDACIÓN MOLECULAR y RT-qPCR

De León, L.¹; Sánchez-Navarro, J.A.²

¹ Asociación Nacional De Obtentores Vegetales (A.N.O.V.E.) C/ Antonio Maura 7, 1º izda. 28014 Madrid; ² Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas, Ingeniero Fausto Elio s/n, 46022 Valencia (jesanche@ibmcp.upv.es)

Los virus Cucumber green mottle mosaic virus (CGMMV), Melon necrotic spot virus (MNSV) y Squash mosaic virus (SqMV) afectan a especies de la familia de las cucurbitáceas. Las plantas afectadas por estos virus reducen drásticamente su producción ocasionando considerables pérdidas económicas en las plantaciones. Los tres virus son transmisibles por semilla, por lo que el análisis de este material vegetal es fundamental para asegurar la calidad fitosanitaria de los lotes de semillas comercializados. En la actualidad, el método validado 'ISTA 7-026: Detection of squash mosaic virus, cucumber green mottle mosaic virus and melon necrotic spot virus in cucurbit seed', basado en test serológico ELISA, es el protocolo más utilizado para la detección de estos virus en semillas. Sin embargo, en estos análisis es frecuente la aparición de reacciones cruzadas que dificultan la interpretación de los resultados. Además, las pruebas ELISA son menos sensibles que las técnicas moleculares, lo que aumenta el riesgo de obtener resultados de falsos negativos a bajas concentraciones del virus.

En el presente trabajo se ha evaluado la detección de CGMMV, MNSV y SqMV en semillas de cucurbitáceas, utilizando el test ELISA (Prime Diagnostics – WUR) y los test moleculares basados en hibridación molecular no radioactiva y RT-PCR a tiempo real. En el test basado en la hibridación molecular, hemos utilizado sondas individuales para cada virus, así como una polisonda con capacidad para detectar los tres virus simultáneamente (Poly3). Se han analizado un total de 26 lotes de semillas, natural o artificialmente infectadas con cada uno de los virus (8 lotes para CGMMV y SqMV y 10 para MNSV) y conteniendo diferente carga viral (diluciones realizadas con semillas sanas) para evaluar la sensibilidad de cada test. Los resultados obtenidos han puesto de manifiesto que el 100% (16 muestras) de los lotes de semillas infectados con CGMMV y SqMV fueron detectados con las técnicas moleculares mientras que el test ELISA detectó el 100% (8 muestras) o el 25% (2 muestras) de las semillas infectadas con CGMMV y SqMV, respectivamente. Las 9 muestras de semillas infectadas artificialmente con MNSV dieron negativo con el test ELISA e hibridación molecular y solo 2 muestras (22%) dieron positivo en el test RT-qPCR con valores cut-off (Ct) superiores a 30, indicando la presencia de una concentración muy baja de inóculo. En el test de hibridación molecular, todos los positivos obtenidos con las sondas individuales fueron detectados con la Poly3, tanto en extractos de RNA total como en protocolo rápido (tritución de tejido en tampón de extracción y aplicación directa en membrana), presentándose esta tecnología como una alternativa muy atractiva al análisis rutinario de virus y/o viroides en semillas de cucurbitáceas.

SÍNTOMAS DE PEMV (Pea enations mosaic enamovirus) EN GUISANTE

Collar Urquijo, J.¹; Ascasíbar Errasti, J.¹

¹Laboratorio Agrario y Fitopatológico de Galicia (Xunta de Galicia) (jesus.collar.urquijo@xunta.es).

A principios de mayo de 2017, procedentes de ensayos en un centro de formación y experimentación agroforestal (Guísamo – A Coruña) se recibieron muestras de guisante “tirabeque” con 2 tipos de daños, El primero eran unos claros síntomas de helada (en los registros la estación meteorológica se registraron -2,1°C 7 días antes y -1,8°C 6 días antes de recibir las muestras).

Pero además de los daños de frío se observaron mosaicos foliares de distribución irregular y gran cantidad de vainas verdes presentaban importantes excrescencias principalmente en la zona cercana al hilo, zona de la sutura en la que se insertan las semillas.

Las excrescencias eran abigarradas con crecimientos retorcidos, pero no asimilables a un “edema”.

En un principio se pensó en una fisiopatía, pero en una revisión bibliográfica no se encontró ninguna referencia; y únicamente síntomas similares, normalmente algo más ligeros, se describían para el virus PEMV (pea enation mosaic enamovirus).

Sin embargo, una diferencia sintomática, aunque si se observaron claramente mosaicos foliares, no se observaron “enations” en las hojas, que en realidad presentaban bastantes daños de las heladas. Pero se encontraron en las plantas individuos muertos de pulgones de la especie *Acyrtosiphon pisum*.

No disponemos de sueros comerciales de este virus por lo que no pudo confirmarse su presencia.

Sin embargo, la presencia de este virus ya fue detectada en los años 80 en nuestro Centro en ensayos de alfalfa.

TÉCNICAS DE DETECCIÓN DE Wheat Dwarf Virus EN PLANTA DE TRIGO Y SU VECTOR.

Martín-Robles, M.J.¹; Ciudad, F.J.²; Pérez-Martín, M.¹; Salinas, L.¹; Crespo, J.¹; Palomo, J.L.¹

¹ Centro Regional de Diagnóstico, (manueljesus.martin@jcyl.es); ² Instituto Tecnológico Agrario de Castilla y León.

El virus del enanismo del trigo (WDV) pertenece a la familia Geminiviridae, del género Mastrevirus. Puede afectar a plantas de trigo, cebada y avena, provocando un enanismo severo acompañado de amarillez. *Psammotettix alienus* es su único vector conocido, y no se transmite por inoculación mecánica ni por semilla.

Durante la pasada primavera se sucedieron múltiples avisos de enfermedad en la zona nordeste de Castilla y León, con síntomas de clorosis y enanismo en cultivos de trigo, que se manifestaban en rodales. Además se observaban manchas en las hojas con un posible origen fúngico. Se recibieron muestras con plantas de trigo sintomáticas y las correspondientes plantas asintomáticas asociadas de la misma parcela, procedentes de diferentes orígenes geográficos. También se capturaron cicadélidos para comprobar si podrían ser vectores de la enfermedad.

En los primeros análisis se detectaron diferentes especies fúngicas con distintos resultados en cada muestra, por lo que se descartó que fueran la causa de la sintomatología generalizada. La llegada de varias muestras y su importancia ante una posible epidemia, hizo que se plantearan diversas técnicas analíticas para detectar posibles virus. El resultado obtenido demostró la presencia de WDV en las muestras afectadas.

La comparación de estas técnicas analíticas arrojó una discrepancia. Por un lado se realizó test ELISA que fue capaz de detectar WDV tanto en las plantas sintomáticas, como en algunas de las asintomáticas. Por otro lado, la técnica de qPCR utilizada detectó WDV en todas las muestras sintomáticas, pero no así en las muestras asintomáticas. Esta situación sorprende al esperar más sensibilidad en la técnica qPCR que en ELISA, ya que se partió del mismo extracto para realizar ambas técnicas.

Asimismo, los posibles vectores, se analizaron individualmente mediante qPCR con resultado positivo a WDV. Su morfología es compatible con *Psammotettix alienus*, pero se confirmará mediante identificación por métodos moleculares.

IV REUNIÓN DEL GRUPO ESPECIALIZADO EN DETECCIÓN, DIAGNÓSTICO E IDENTIFICACIÓN DE LA SOCIEDAD ESPAÑOLA DE FITOPATOLOGÍA (GEDDI-SEF)

Pontevedra, del 22 al 24 octubre de 2019

8ª Sesión: Temas generales

Moderan:

Jaime Cubero Dabrio
Carmen Salinero Corral



SÍNTOMAS DESCONOCIDOS EN CAMELIA

Collar Urquijo, J.¹; Ascasíbar Errasti, J.¹

¹Laboratorio Agrario y Fitopatológico de Galicia (Xunta de Galicia) (jesus.collar.urquijo@xunta.es).

En julio de 2018 se recibió una muestra de camelia procedente de un vivero de la provincia de Pontevedra. Los daños solo afectaban al cultivar de camelia híbrida “High Fragrance”.

Las plantas en maceta presentaban unas manchas de forma irregular que podían ocupar más del 50% del limbo foliar, generalmente centradas y separadas del nervio principal. Por el haz tenían forma y tamaño muy irregular, con un color marrón claro y hundido, con un borde ligeramente más oscuro y aspecto abultado y un ligero halo clorótico; mientras que por el envés las manchas tomaban un aspecto marrón más oscuro con aspecto de epidermis seca, con bordes oscuros abultados y crecimiento oscuro de aspecto acuoso siguiendo las nerviaduras adyacentes.

El síntoma no se encontró en la bibliografía, y únicamente, la fisiopatía denominada “edema”, muy frecuente, causada por excesos de humedad en el sustrato durante periodos nublados y húmedos, podría tener un aspecto ligeramente similar pero con importantes diferencias, tanto por el tamaño de los daños, su aspecto y no producirse edemas (ampollas) en el envés que estallan y al secar dan aspecto de epidermis corchosas.

Se realizaron siembras de zonas afectadas en medio PDA y sus dilacerados en LPGA y medio King-B; pero únicamente se aisló en un 17% de los trozos sembrados *Phomopsis* sp. El hongo se ha considerado que se trata de un secundario oportunista que se establece de forma esporádica sobre el material vegetal dañado. En el caso de los medios bacterianos, no llegó a crecer casi ninguna bacteria.

Se realizó un análisis de residuos de productos fitosanitarios de la muestra con resultados negativos.

Por el aspecto y distribución de los daños, se sospecha de que se trate de una fisiopatía, pero se desconocen las causas de la misma.

CONTROL DE CALIDAD DE LOS MEDIOS DE CULTIVO

Landeras, E.¹

¹Laboratorio de Sanidad Vegetal del Principado de Asturias (elena.landeras.rodriguez@asturias.org)

El Reglamento (UE) 2017/625 del Parlamento Europeo y del Consejo de 15 de marzo de 2017, *relativo a los controles y otras actividades oficiales realizados para garantizar la aplicación de la legislación sobre alimentos y piensos, y de las normas sobre salud y bienestar de los animales, sanidad vegetal y productos fitosanitarios*, indica en el artículo 37 que las autoridades competentes solo podrán designar como laboratorio oficial un laboratorio que, entre otros requisitos, funcione de acuerdo con la norma UNE-EN ISO/IEC 17025:2017 *Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y calibración*, y esté acreditado de acuerdo con dicha norma por un organismo nacional de acreditación. También establece que en concreto, los Laboratorios de Sanidad Vegetal que realicen control oficial, podrán acogerse a un periodo de transición que finaliza el 29 de abril de 2022.

Un punto crítico a tener en cuenta a la hora de implementar la ISO 17025:2017 y acreditar el laboratorio es la preparación, esterilización y evaluación de la calidad de los medios de cultivo empleados para realizar los ensayos.

Esto implica una revisión de las prácticas cotidianas realizadas por el laboratorio para garantizar que los medios de cultivo utilizados son adecuados a la finalidad prevista.

Las recomendaciones internacionales de los organismos de acreditación para lograr este objetivo se basan fundamentalmente en la Norma ISO 11133 *Preparación, producción, conservación y ensayos de rendimiento de los medios de cultivo*, y de forma complementaria en la norma ISO 7218 *Microbiología de los alimentos para consumo humano y alimentación animal. Requisitos generales y guía para el examen microbiológico*, donde se abordan distintos aspectos relacionados con la composición, preparación, esterilización, conservación y caducidad, condiciones de incubación, requisitos de productividad, selectividad y especificidad, control de esterilidad, y cepas de referencia, entre otros, así como la elaboración de los correspondientes registros.

PARÁMETROS DE GESTIÓN DE UN LABORATORIO DE SANIDAD VEGETAL

Almacellas, J.¹; Monné, D.¹; Del cueto, A.I.¹; Sobreper, M.¹; Aresté, M.¹; Ramos, V.¹; Paniello, M.N.¹; Borrell, A.¹; Lumbierres, A.B.¹ y Giné, J.A.¹

¹Laboratorio de Agricultura y Sanidad Vegetal de Cataluña (DARP) (jalmacellas@gencat.cat).

Los laboratorios de sanidad vegetal en España tienen una actividad diversa y una organización que difiere según la estructura administrativa a la que pertenecen. A veces son exclusivos del ámbito de la sanidad y a veces comparten la gestión con otras estructuras laborales del ámbito agroalimentario o de la sanidad animal. Por ello, su gestión es heterogénea y diversa, incluso dentro del ámbito de la sanidad vegetal, sobre todo debido a las características del territorio al que pertenecen, lo cual hace difícil que sea parametrizable su funcionamiento y comparable respecto a otros laboratorios.

En principio, los laboratorios evalúan su actividad total por el número de muestras analizadas, si bien se hace evidente que este no es un parámetro tan objetivo como parece ni que permita comparaciones, ya que las cargas de trabajo dependen también de otros factores.

Un segundo parámetro que puede ser ya más objetivo de la carga de trabajo es el número de análisis, si bien los distintos ámbitos, secciones o métodos de análisis utilizados difieren a su vez en dificultad y tiempos invertidos.

Por otra parte, para ser más objetivas y comparables, las cargas se deben asociar a los medios de producción que son, básicamente, las plantillas, sus funciones, las estructuras organizativas y los medios materiales disponibles. Así mismo, los factores intrínsecos a los análisis o externos a ellos, como el cumplimiento de normas de calidad, la exactitud en las determinaciones de los organismos y los tiempos invertidos en los análisis son otros parámetros a tener en cuenta en la valoración global de la actividad de un laboratorio.

Finalmente, otros parámetros como la diversidad de los organismos a determinar y la diversidad de los métodos a utilizar, son factores clave para evaluar la complejidad de un laboratorio que deba acometer sus funciones y cumplir sus objetivos de buenas prácticas de laboratorio.

MÉTODO DE VALIDACIÓN DESARROLLADO POR EL LABORATORIO REGIONAL PARA ENSAYOS INMUNOLÓGICOS (ELISA)

Marín Terrazas, M.¹

¹ Laboratorio Regional del Gobierno de La Rioja mmarint@larioja.org

El Reglamento europeo 2017/625, aprobado en marzo de 2017, establece un periodo de transición hasta abril de 2022 para que los laboratorios de control oficial de sanidad vegetal, entre otros, trabajen según las directrices marcadas por la norma EN ISO/IEC 17025 y estén acreditados por un organismo nacional de acreditación, ENAC en nuestro caso.

En el ámbito de sanidad vegetal, la EPPO ha desarrollado una serie de protocolos que marcan las directrices que deben seguir los laboratorios para cumplir con la 17025.

Uno de los requisitos de la acreditación para laboratorios de ensayo, es trabajar con métodos validados, y los parámetros a tener en cuenta en la validación de métodos están recogidos en el PM 7/98, *Requisitos específicos para laboratorios que preparan la acreditación para una actividad de diagnóstico de plagas de plantas*, concretamente en el Anexo 3, las Tablas 1-6 describen los distintos procedimientos a seguir teniendo en cuenta el tipo de patógeno a detectar y el tipo de técnica utilizada.

El objetivo de este trabajo es solo mostrar la experiencia del Laboratorio Regional en la validación como métodos internos de los ensayos para la detección de virus de vid por ELISA, que por extensión es válida para la detección de otros patógenos por ELISA.

Se presentan los parámetros analizados para llegar a la elaboración del informe de validación, parámetros con los que se establecen los requisitos a cumplir en cada ensayo, que quedan plasmados en el QC, Hoja de Control de calidad.

Una vez validado el método, es necesaria una evaluación periódica del mismo para un aseguramiento continuo de la calidad, que se traducirá en un informe de evaluación donde se recogen parámetros obtenidos tanto de una evaluación interna (reproducibilidad, repetibilidad, ...) como de una evaluación externa (interlaboratorios, pruebas de aptitud, ...)

VALIDACIÓN DE LA TÉCNICA “DETECCIÓN DE *Bursaphelenchus xylophilus* MEDIANTE EL ESTUDIO DE CARACTERES MORFOLÓGICOS POR MICROSCOPIA”

Sancho, R.¹; Santacruz F¹.

¹ Laboratorio Regional Agroalimentario y Ambiental de Castilla La Mancha (LARAGA).(rsancho@jccm.es).

En el año 2017 entró en vigor el nuevo Reglamento de Control Oficial (Reglamento (UE) 2017/625 sobre Controles Oficiales y otras actividades oficiales) que amplía su ámbito de aplicación a toda la cadena agroalimentaria, incluyendo a la protección contra las plagas de los vegetales. Su aplicación implica que los laboratorios designados como oficiales por las Comunidades Autónomas deben estar acreditados para las distintas técnicas que emplean en los análisis de las muestras de control, estableciendo como fecha límite para ello el 29 de abril de 2022.

El Laboratorio Agroalimentario y Ambiental de Castilla La Mancha (LARAGA), como laboratorio designado por la CCAA para la realización de los análisis derivados de las actividades de control en materia de plagas vegetales, ha iniciado en 2019 la preparación de acreditación de varias técnicas, siendo una de ellas la *Detección de Bursaphelenchus xylophilus mediante el estudio de caracteres morfológicos por microscopia*.

Tratándose de una prueba morfológica y morfométrica basada en la opinión del analista y no habiendo encontrado ejercicios de intercomparación, se diseñó una validación en la que se pudiera demostrar la capacidad de identificación de este nematodo por parte de los analistas. Para ello se prepararon muestras ciegas en las que se utilizaron nematodos de distintos géneros y tamaño similar y de distintas especies del género *Bursaphelenchus*, predominando la aditivación de *B. mucronatus* por las similitudes morfológicas que tienen ambas especies y por compartir el mismo vector de transmisión.

En este trabajo se expone un esquema de la validación realizada, así como una visión de la experiencia de cara a futuras validaciones de métodos similares.

SITUACIÓN DE LOS TRABAJOS DE LA COMISIÓN DEL GLOSARIO DE LÉXICO FITOPATOLÓGICO GEDDI: LA LETRA «A» COMO EJEMPLO

Páez, J. I.¹, Cambra, M.²; López, M.M.²; Montes, F.³ y Romero, J.⁴

¹ Laboratorio Producción y Sanidad Vegetal Sevilla. Agencia de Gestión Agraria y Pesquera de Andalucía,

²IVIA, Moncada, Valencia, jubilado,

³LPSV, Sevilla, jubilado,

⁴INIA, Madrid, jubilado.

El Glosario de Términos Fitopatológicos avanza según el plan previsto. Se sigue trabajando en la definición de los términos referentes a los agentes patógenos, y alteraciones no patológicas del ámbito GEDDI-SEF, labor ardua, y permanente por la inclusión de nuevos términos o entradas. El nuestro se ciñe a los relacionados con la detección, diagnóstico e identificación en Fitopatología, incluidos los referidos a la acreditación por la repercusión que tiene en los laboratorios de diagnóstico. También se han incluido algunos acrónimos relacionados con la Patología Vegetal como AESaVe, ALF, ATCC, etc. En un futuro se podrían incluir términos de epidemiología y control, para completar un glosario de términos fitopatológicos que incluiría todos los intereses de la SEF.

Para las definiciones de términos se han tenido en cuenta las de la RAE y las de diccionarios específicos españoles como el de la SECH y los de la APS, BSPP y otros. La actualización de las definiciones y la inclusión de nuevas, no debería ser problema, pues el glosario estará colgado en la página web, con la posibilidad de introducir, modificar o eliminar los términos que se consideren oportunos.

En esta ocasión se presenta como ejemplo la letra «a» que comprende actualmente unos 250 términos definidos en español y con traducción de la entrada en inglés. Se ha considerado oportuno definir síntomas (y los órganos de la planta afectados) y nombres comunes de enfermedades como, por ejemplo, albinismo, apoplejia, alternariosis, antracnosis, abolladura, etc. También se incluyen aparatos, materiales, reactivos y sustancias que tienen que ver con los laboratorios como autoclave, agitador, asa, agar, antisuero, anticuerpos, azul de Evans, etc. Se refieren términos específicos de algún grupo de patógenos, como acérvulo, anélida, anteridio, ambifenestrado, anfidio, anfitrica. Contiene además, términos fundamentales como ácido nucleico y todos los tipos de ADN y ARN, y otros relativos a la acreditación como auditoría, alcance de la acreditación, acción correctiva, etc.

Se solicita la opinión y colaboración de los miembros del GEDDI sobre esta selección de términos que ya ha sido examinada por algún revisor ajeno a los editores, al que oportunamente se hará figurar como colaborador.

Se considera que el glosario puede llegar a superar los 2000 términos, en su primera versión, estando ya definidos más del 75% de los mismos.

SITUACIÓN DE LOS TRABAJOS DE LA COMISIÓN DE LA GALERÍA FOTOGRAFICA FITOPATOLÓGICA

Diego Olmo García

EL GRUPO ESPECIALIZADO EN DETECCIÓN, DIAGNÓSTICO E IDENTIFICACIÓN: EVOLUCIÓN Y PERSPECTIVAS

Jose Luis Palomo Gómez

ÍNDICE DE AUTORES

Abelleira, A.	10	García-Vázquez, P.	13
Adrover, F.	29	Garita-Cambronero, J.	32
Aguilar, M.I.	19	Giné, J.A.	18
Aguín, O.	10, 14, 17, 24	Giovani B.	27
Almacellas, J.	18	Gómez, R.M.	19
Amato, M.	31	Gost, P. A.	29
Arcoleo, G.	31	Gottsberger, R. A.	27
Arcos, S.C.	25	Güler, P. K.	27
Aresté, M.	18	Hellín García, P.	37
Ascasíbar Errasti, J.	15, 22, 40, 43	Hita Gambín, I.	37
Barbé, S.	30, 31	Ince, E.	27
Beidas, O.	29	Juan, A.	29
Benito, P.	8	Landa, B. B.	29
Biosca, E.G.	30	Landeras, E.	13, 44
Borràs, D.	29	Larrayoz, C.I.	19
Borrell, A.	18	Lerma, M. L.	33
Botella-Guillén, M.	12	Li, R.	31
Cambra, M.	48	Lirola, F.	19, 21
Canales, C.	36	Llobregat, B.	30
Cano, E.M.	19	López, A.B.	31
Capote, N.	20	López, M.M.	48
Castillo, P.	33	Lozano, I.	30
Cellier, G.	27	Lumbierres, A.B.	18, 45
Ciudad, F.J.	41	Marc, S.	29
Collar Urquijo, J.	15, 22, 40, 43	Marco-Noales, E.	30, 31, 33
Crespo, J.	41	Marín Terrazas, M.	46
Cruz, L.	27	Martín-Robles, M.J.	41
Cubero, J.	27, 32	Metz-Verschure, E.	27
D'Onghia, A. M.	27	Monné, D.	18, 45
de Andrade, E.	27	Monterde, A.	30, 33
de Gea, A.	31	Montes, F.	36, 48
De León, L.	39	Montesinos, M.	29
Del Cueto, A.I.	18, 45	Moralejo, E.	29
Del Río, M. A.	20	Morán, F.	35
Djelouah, K.	27	Muñoz, R. M.	33
Espino de Paz, A.I.	12	Navarro, I.	30, 31
Fernández-Acosta, D.	12	Navas, A.	25
Ferreiroa, V.	10	Nieto, A.	29
Figás-Segura, A.	30	Ochoa-Vigo, F.	12
Gaffuri, F.	27	Oliva, J.	18
García, E.	19	Olmo, D.	29, 49
García, J.	36	Olmos, A.	35, 36

Orta Cordero, S.	7, 9
Padilla Martínez, C.V.	37
Páez Sánchez, J. I.	7, 9, 48
Palacio-Bielsa, A.	32
Palomo, J.L.	41, 50
Paniello, M.N.	18, 45
Pérez-Martín, M.	41
Pérez-Otero, R.	10, 24
Pintos, C.	10, 14, 17
Piñón, P.	17
Ramos, V.	18
Redondo, C.	27
Redondo, V.	10, 14, 17
Rial, C.	10
Robertson, L.	25
Romero, J.	48
Roselló, M.	27, 28
Ruiz, E.	31
Ruiz-García A. B.	35, 36
Salinas, L.	41
Salinero, C.	10, 14, 17, 24
Salmerón Gómez, E.	37
Sánchez, C.	31
Sánchez, M. C.	20
Sánchez-Navarro, J.A.	39
Sancho, R.	47
Santacruz, F.	47
Silvestre, A.M.	19, 21
Sobrepere, M.	18, 45
Torrecillas, F.	31
Totta, C.	31
Urrutia, M.T.	19, 21
Yaseen, T.	27
Yildiz, H. N.	27

IV REUNIÓN DEL GRUPO ESPECIALIZADO EN DETECCIÓN, DIAGNÓSTICO E IDENTIFICACIÓN DE LA SOCIEDAD ESPAÑOLA DE FITOPATOLOGÍA (GEDDI-SEF)

Pontevedra, del 22 al 24 octubre de 2019



NOTAS

IV REUNIÓN DEL GRUPO ESPECIALIZADO EN DETECCIÓN, DIAGNÓSTICO E IDENTIFICACIÓN DE LA SOCIEDAD ESPAÑOLA DE FITOPATOLOGÍA (GEDDI-SEF)

Pontevedra, del 22 al 24 octubre de 2019



NOTAS

IV REUNIÓN DEL GRUPO ESPECIALIZADO EN DETECCIÓN, DIAGNÓSTICO E IDENTIFICACIÓN DE LA SOCIEDAD ESPAÑOLA DE FITOPATOLOGÍA (GEDDI-SEF)

Pontevedra, del 22 al 24 octubre de 2019



NOTAS

IV REUNIÓN DEL GRUPO ESPECIALIZADO EN DETECCIÓN, DIAGNÓSTICO E IDENTIFICACIÓN DE LA SOCIEDAD ESPAÑOLA DE FITOPATOLOGÍA (GEDDI-SEF)

Pontevedra, del 22 al 24 octubre de 2019



NOTAS

IV REUNIÓN DEL GRUPO ESPECIALIZADO EN DETECCIÓN, DIAGNÓSTICO E IDENTIFICACIÓN DE LA SOCIEDAD ESPAÑOLA DE FITOPATOLOGÍA (GEDDI-SEF)

Pontevedra, del 22 al 24 octubre de 2019



NOTAS

IV REUNIÓN DEL GRUPO ESPECIALIZADO EN DETECCIÓN, DIAGNÓSTICO E IDENTIFICACIÓN DE LA SOCIEDAD ESPAÑOLA DE FITOPATOLOGÍA (GEDDI-SEF)

Pontevedra, del 22 al 24 octubre de 2019



NOTAS

Colaboran

