

UNIVERSIDAD DE CORDOBA

FACULTAD DE CIENCIAS, SECCION BIOLOGICAS

TESIS DOCTORAL

DENSIDAD DE INOCULO Y ESTRUCTURA
DE VIRULENCIA DE POBLACIONES DE
FUSARIUM OXYSPORUM SCHLECHT. Y
FUSARIUM SOLANI (MART.) APPL. ET WR.
QUE INFECTAN GARBANZO EN ANDALUCIA
OCCIDENTAL

DIRECTOR DE TESIS:

PROF. DR. RAFAEL M. JIMENEZ DIAZ

PONENTE DE TESIS:

PROF. DR. EUGENIO DOMINGUEZ VILCHES

DOCTORANDO:

LDO. RAFAEL GONZALEZ TORRES

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y TECNOLOGÍA
AGROALIMENTARIA DE ARAGÓN**
UNIDAD DE SANIDAD VEGETAL
Teléfono: 976 71 63 23
Fax: 976 71 63 35
Avda. Montañana, 930
50059 ZARAGOZA

UNIVERSIDAD DE CORDOBA

FACULTAD DE CIENCIAS, SECCION BIOLOGICAS

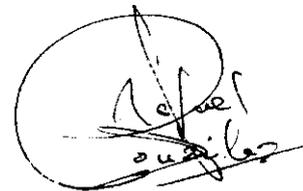
DENSIDAD DE INOCULO Y ESTRUCTURA
DE VIRULENCIA DE POBLACIONES DE
FUSARIUM OXYSPORUM SCHLECHT. Y
FUSARIUM SOLANI (MART.) APPL. ET WR.
QUE INFECTAN GARBANZO EN ANDALUCIA
OCCIDENTAL

Tesis para optar al grado
de Doctor en
Ciencias Biológicas

Rafael González Torres

Vº Bº

EL DIRECTOR DE LA TESIS



Córdoba, Marzo 1985

Prof. Dr. Rafael M. Jiménez Díaz
Catedrático de Patología Vegetal
E.T.S.I.A., Universidad de Córdoba

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y TECNOLOGÍA
AGROALIMENTARIA DE ARAGÓN**
UNIDAD DE SANIDAD VEGETAL
Teléfono: 976 71 63 23
Fax: 976 71 63 35
Avda. Montañana, 930
50059 ZARAGOZA



DEPARTAMENTO DE BOTÁNICA

Teléfono 957 - 23 95 68

FACULTAD DE CIENCIAS

UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA

C/Avda de Medina Azahara, s/n.º

ESPAÑA - SPAIN

EUGENIO DOMINGUEZ VILCHES, Catedrático Numerario de Botánica de la Facultad de Ciencias, Sección Biológicas, Universidad de Córdoba.

AUTORIZA como Ponente de la Tesis Doctoral "Densidad de inóculo y estructura de virulencia de poblaciones de Fusarium oxysporum y Fusarium solani que infectan garbanzo en Andalucía Occidental", su presentación y defensa en la Facultad de Ciencias de esta Universidad.

Córdoba, 12 de Marzo de 1985

Fdo. Prof. Dr. Eugenio Dominguez Vilches

RESUMEN

Los cultivos de garbanzo en el Valle del Guadalquivir son severamente afectados por un complejo de enfermedades (Marchitez y Podredumbre de Raíz, MPR). Los principales agentes de MPR son Fusarium oxysporum y F. solani (sensu lato). Ambas especies fúngicas sobreviven en el suelo y la densidad de sus propágulos en éste determina la incidencia y severidad de los ataques en plantas susceptibles. Los objetivos de esta investigación fueron evaluar la eficacia de medios de cultivo selectivos en el aislamiento y cuantificación de F. oxysporum y F. solani (sensu lato) en suelos cultivados del Valle del Guadalquivir, estimar la densidad de propágulos viables de dichas especies en los suelos mencionados, y determinar las frecuencias con que existen en los mismos aislamientos de ambas especies fúngicas patogénicas sobre garbanzo.

Se han evaluado comparativamente los medios de cultivo agar-peptona-PCNB, agar-jugo V-8-oxgall-PCNB, Komada y agar Czapeck-Dox-verde malaquita-captán, sobre la facilidad con que permitían distinguir y aislar dichas especies, así como cuantificar su densidad de población en el suelo. Se empleó el método de dilución en placa con muestras de suelos con o sin historia de ataques de MPR en garbanzo.

Con dos medios seleccionados por su mayor eficacia, se determinó la densidad de propágulos viables de F. oxysporum y F. solani (sensu lato) en los 5.0, 17.5 y 30.0 cm de profundidad de 17 campos con historia de MPR en las provincias de Córdoba, Jaén y Sevilla, y en el nivel 5.0-17.5 cm de 47 campos en las provincias citadas y Cádiz.

La patogenicidad sobre garbanzo de 155 aislamientos de F. oxysporum y 135 aislamientos de F. solani (sensu lato) obteni

dos de suelos con o sin historia de MPR, se determinó en inoculaciones artificiales en las que las plantas crecieron en suelos infestados con inóculo, en un medio líquido que contenía inóculo, o en vermiculita estéril pero inoculada con trozos de agar conteniendo micelio del hongo correspondiente.

Los medios agar-peptona-PCNB, agar-jugo V-8-oxgall-PCNB y Komada resultaron igualmente eficaces en el aislamiento y cuantificación de propágulos viables de F. oxysporum. Sin embargo, el medio de Komada fue menos eficaz que los otros dos en la cuantificación de F. solani (sensu lato). El medio agar Czapek-Dox-verde malaquita-captán resultó ineficaz para el aislamiento y cuantificación de propágulos de F. oxysporum y F. solani (sensu lato).

La densidad de propágulos viables de F. oxysporum y F. solani (sensu lato) osciló entre 167-6467 propágulos/g de suelo seco en 64 campos muestreados del Valle del Guadalquivir y fué más alta en los suelos con historia de cultivo de garbanzo que en los utilizados con otro cultivos. F. oxysporum predominó en suelos arcillosos y F. solani (sensu lato) tanto en estos como en suelos franco arcillosos. Ambas especies fueron más abundantes en la zona más superficial de la capa arable del suelo y sus poblaciones disminuyeron con la profundidad.

Todos los aislamientos de F. oxysporum y F. solani (sensu lato) utilizados en inoculaciones artificiales resultaron patogénicos sobre garbanzo pero variaron en virulencia. En base al tipo y severidad de las reacciones inducidas fueron clasificados en dos grupos para cada especie. Los aislamientos más virulentos de F. oxysporum (6.5%) causaron infecciones vasculares y amarillez foliar y los menos virulentos (94.5%) indujeron necrosis restringidas en cuello y raíces y amarillez foliar. Los aislamientos más virulentos de F. solani (sensu lato) (27%) causaron podredumbre negra extensa de cuello y raíces que ocasionó fla

cidez y amarillez foliar y posteriormente muerte de la planta y -
los menos virulentos indujeron necrosis de cuello y raíces y -
amarillez foliar pero no muerte de las plantas; 12 de los aisla--
mientos de F. solani (sensu lato) fueron identificados como
F. eumartii.

AGRADECIMIENTOS

Desco expresar mi agradecimiento al Prof. Dr. Rafael Jiménez Díaz Jefe del Departamento de Patología Vegetal de la E.T.S.I.A. de Córdoba, Director de esta Tesis, por su ayuda, orientación, valiosos consejos y continuo estímulo.

Igualmente agradezco al Prof. Dr. Eugenio Domínguez Vilches Jefe del Departamento de Botánica de la Facultad de Ciencias, Sección Biológicas, de la Universidad de Córdoba, Ponente de esta Tesis, la ayuda prestada en todo momento.

También agradezco al Dr. Luis García Torres Jefe del Servicio de Investigación Agraria de la Junta de Andalucía su continuo estímulo para la finalización de esta Tesis.

A los compañeros Dr. Antonio Trapero Casas, Dr. Julio Mesa García, Dña. Milagros Saavedra, Dña. Ma José Basallote, D. Javier Cabrera y D. Tomás Cabello por su constante colaboración y estímulo.

A D. Ildefonso Díaz Canalejo por su labor en los trabajos de mecanografía.

Por último, quiero expresar mi agradecimiento a la Dirección General de la Producción Agraria y a la Comisión Asesora de Investigación Científica y Técnica que financiaron parte de la realización de mi investigación en el marco de los proyectos DGPA/82 "Epidemiología y Control de las micosis: Verticilosis del olivo y algodonero y Fusariosis del garbanzo", y CAICYT Nº 0238/81 "Lucha contra la Rabia, Marchitez y Podredumbre de Raíz del garbanzo mediante el desarrollo de cultivares resistentes".

INDICE GENERAL

	Página
INTRODUCCION	1
REVISION DE LITERATURA	4
CAPITULO I. Puesta a punto de una metodología para el aislamiento selectivo y cuantificación de <u>Fusarium oxysporum</u> Schlecht. y <u>Fusarium solani</u> (Mart.) Appl. et Wr. de suelos cultivados del Valle del Guadalquivir	12
INTRODUCCION	13
MATERIALES Y METODOS	15
RESULTADOS	20
DISCUSION	33
CAPITULO II. Densidad de propágulos y distribución vertical de <u>Fusarium oxysporum</u> Schlecht. y <u>Fusarium solani</u> (Mart.) Appl. et Wr. en suelos cultivados de Andalucía Occidental	38
INTRODUCCION	39
MATERIALES Y METODOS	40
RESULTADOS	43
DISCUSION	51

	Página
CAPITULO III. Patogenicidad de aislamientos de <u>Fusarium oxysporum</u> Schlecht. y <u>Fusarium solani</u> (Mart.) Appl. et Wr. en suelos cultivados del Valle del Guadalquivir	54
INTRODUCCION	55
MATERIALES Y METODOS	57
RESULTADOS	67
DISCUSION	84
CONCLUSIONES	88
LITERATURA CITADA	90

INDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Niveles de población de <u>Fusarium oxysporum</u> y <u>Fusarium solani</u> encontrados por diferentes autores en suelos cultivados	11
2	Composición (g o ml/litro) de los medios de cultivo selectivos para <u>Fusarium</u> spp. usados en los experimentos preliminares	18
3	Densidad de propágulos de <u>Fusarium</u> spp. en suelos cultivados y no cultivados de la provincia de Córdoba	22
4	Eficacia de tres medios de cultivo selectivo para la detección del número de propágulos viables de <u>Fusarium oxysporum</u> de suelos cultivados del Valle del Guadalquivir	24
5	Eficacia de tres medios de cultivo selectivos para la detección del número de propágulos viables de <u>Fusarium solani</u> de suelos cultivados del Valle del Guadalquivir	26
6	Eficacia de tres medios de cultivo selectivos para la detección del número de propágulos viables de <u>Fusarium oxysporum</u> y <u>Fusarium solani</u> de suelos cultivados del Valle del Guadalquivir	27
7	Influencia de la desecación del suelo sobre el número de propágulos viables de <u>Fusarium oxysporum</u> detectados con los los medios de cultivo agar-jugo V-8-oxgall-PCNB y agar-peptona-PCNB en seis suelos de diferente textura	31

Cuadro	Página
8 Influencia de la desecación del suelo sobre el número de propágulos viables de <u>Fusarium solani</u> detectado con los medios de cultivo agar-jugo V-8-oxgall-PCNB y agar-peptona-PCNB en seis suelos de diferente textura	32
9 Influencia de la desecación del suelo sobre el número de propágulos viables de <u>Fusarium oxysporum</u> y <u>Fusarium solani</u> detectados con los medios de cultivo agar-jugo V-8-oxgall-PCNB y agar-peptona-PCNB en suelos cultivados del Valle del Guadalquivir	34
10 Características edafológicas de los suelos muestreados en el Valle del Guadalquivir sobre el contenido de <u>Fusarium oxysporum</u> y <u>Fusarium solani</u>	45
11 Densidad de propágulos viables (Número/g de suelo seco) de <u>Fusarium oxysporum</u> en suelos cultivados del Valle del Guadalquivir según textura y plantas cultivadas en ellos	46
12 Densidad de propágulos viables (Número/g de suelo seco) de <u>Fusarium solani</u> en suelos cultivados del Valle del Guadalquivir según textura y plantas cultivadas en ellos	47
13 Densidad de propágulos viables (Número/g de suelo seco) de <u>Fusarium oxysporum</u> en la capa arable de 17 campos cultivados en el Valle del Guadalquivir	48
14 Densidad de propágulos viables (Número/g de suelo	

Cuadro		Página
14	Densidad de propágulos viables (Número/g de suelo seco de <u>Fusarium solani</u> en la capa arable de 17 campos cultivados de garbanzo en el Valle del Guadalquivir	49
15	Escala de severidad de la reacción en la parte aérea del garbanzo a la inoculación con aislamientos de <u>Fusarium oxysporum</u> y <u>F. solani</u> (<u>sensu lato</u>)	62
16	Escala de severidad de la reacción en la parte subterránea del garbanzo a la inoculación con aislamientos de <u>Fusarium oxysporum</u>	63
17	Escala de severidad de la reacción en la parte subterránea del garbanzo a la inoculación con aislamientos de <u>Fusarium solani</u>	64
18	Reacción del cultivar de garbanzo PV-24 a la inoculación con aislamientos de <u>Fusarium oxysporum</u> obtenidos de suelos de 15 campos del Valle del Guadalquivir con historia de severos ataques de Marchitez y Podredumbre de Raíz (Experimento 1)	68
19	Reacción del cultivar de garbanzo PV-24 a la inoculación con aislamientos de <u>Fusarium oxysporum</u> y <u>F. solani</u> (<u>sensu lato</u>) obtenidos de suelos de 26 campos del Valle del Guadalquivir con o sin historia de severos ataques de Marchitez y Podredumbre de Raíz (Experimento 2)	69

Cuadro		Página
20	Reacción del cultivar de garbanzo P-2245 a la <u>inoculación</u> por cultivo en agua con aislamientos de <u>Fusarium oxysporum</u> obtenidos de suelo de un campo con historia de severos ataques de Marchitez y Podredumbre de Raíz en Montilla (Córdoba) (Experimento 3)	72
21	Reacción del cultivar de garbanzo P-2245 a la <u>inoculación</u> por cultivo en agua con aislamientos de <u>Fusarium oxysporum</u> obtenidos de suelo de un campo con historia de severos ataques de Marchitez y Podredumbre de Raíz en Santaella (Córdoba) (Experimento 4)	73
22	Reacción del cultivar de garbanzo P-2245 a la <u>inoculación</u> por cultivo en agua con aislamientos de <u>Fusarium oxysporum</u> obtenidos de suelo de un campo con historia de severos ataques de Marchitez y Podredumbre de Raíz en Cortijo de los Montecitos (Córdoba) (Experimento 5)	74
23	Reacción del cultivar de garbanzo P 2245 a la <u>inoculación</u> por cultivo en agua con aislamientos de <u>Fusarium oxysporum</u> obtenidos de suelo de un campo con historia de severos ataques de Marchitez y Podredumbre de Raíz en Bujalance (Córdoba) (Experimento 6)	75

Cuadro		Página
24	Reacción del cultivar de garbanzo PV-25 a la <u>inoculación</u> por cultivo en vermiculita con aislamientos de <u>Fusarium solani</u> (<u>sensu lato</u>) obtenidos de suelo de un campo con historia de severos ataques de Marchitez y Podredumbre de Raíz en Montilla (Córdoba) (Experimento 7)	79
25	Reacción del cultivar de garbanzo PV-25 a la <u>inoculación</u> por cultivo en vermiculita con aislamientos de <u>Fusarium solani</u> (<u>sensu lato</u>) obtenidos de suelo de un campo con historia de severos ataques de Marchitez y Podredumbre de Raíz en Cortijo de los Montecitos (Córdoba) (Experimento 8)	80
26	Reacción del cultivar de garbanzo PV-25 a la <u>inoculación</u> por cultivo en vermiculita con aislamientos de <u>Fusarium solani</u> (<u>sensu lato</u>) obtenidos de suelo de un campo con historia de severos ataques de Marchitez y Podredumbre de Raíz en Santaella (Córdoba) (Experimento 9)	81
27	Reacción del cultivar de garbanzo PV-25 a la <u>inoculación</u> por cultivo en vermiculita con aislamientos de <u>Fusarium solani</u> (<u>sensu lato</u>) obtenidos de suelo de un campo con historia de severos ataques de Marchitez y Podredumbre de Raíz en Bujalance (Córdoba) (Experimento 10)	82

Cuadro	Página
28 Tipo y frecuencia de aislamientos de <u>Fusarium</u> spp. patogénicos de garbanzo obtenidos de cuatro campos cultivados con historia de severos ataques de Marchitez y Podredumbre de Raíz en la provincia de Córdoba	87

INDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Calicata abierta en el suelo para la toma de muestras a distintas profundidades	16
2	Medios de cultivo selectivos para <u>Fusarium</u> spp. -agar-peptona-PCNB (APP), agar-jugo V-8-oxgall-PCNB (AVOP), Komada (K) y agar-Czapek-Dox-verde malaquita-captán (ACD)- conteniendo 1 ml de suspensión de suelo (dilución 1/100, g suelo seco/ml AA al 0.1% tomado a 5, 17.5 y 30 cm de profundidad en un encinar cercano a Santa María de Trassierra (Córdoba), después de 5 días de incubación	23
3	Colonias de <u>Fusarium oxysporum</u> y <u>F. solani</u> de 3 días de crecimiento sobre los medios agar-jugo V-8-oxgall-PCNB (AVOP), agar-peptona-PCNB (APP) y Komada (K)	28
4	Colonias de <u>Fusarium oxysporum</u> y <u>F. solani</u> sobre agar-peptona-PCNB	29
5	Colonias de <u>Fusarium oxysporum</u> y <u>F. solani</u> sobre agar-jugo V-8-oxgall-PCNB	30
6	Variación de la densidad de propágulos viables de <u>Fusarium oxysporum</u> y <u>Fusarium solani</u> detectados en suelos cultivados y el tiempo de desecación del suelo a 28 ± 3 C	35

Figura		Página
7	Distribución de campos cultivados muestreados sobre el contenido de <u>Fusarium oxysporum</u> y <u>F. solani</u> en el suelo en 1983 y 1984	41
8	Densidad de población de <u>Fusarium oxysporum</u> y <u>F. solani</u> en 64 suelos cultivados del Valle del Guadalquivir	44
9	Distribución vertical promedio de <u>Fusarium oxysporum</u> y <u>F. solani</u> en 17 campos con historia de cultivo de garbanzo en el Valle del Guadalquivir	50
10	Variación estacional de la densidad de propágulos viables (Número/g de suelo) de <u>Fusarium oxysporum</u> y <u>F. solani</u> en el perfil 5-17.5 cm de un campo con historia de severa Marchitez y Podredumbre de Raíz del garbanzo en Montilla (Córdoba)	52
11	Aislamientos de <u>Fusarium oxysporum</u> y <u>F. solani</u> del suelo mediante la técnica de dilución en placa	58

INTRODUCCION

El garbanzo (Cicer arietinum L.) ha sido alimento principal de los españoles durante años. Actualmente se siembra en todo el territorio nacional, siendo Andalucía la región donde se cultiva en mayor extensión, sobre una superficie de 51.268 ha que representa más del 60% de la total nacional de dicho cultivo (ANONIMO, 1982).

Las enfermedades constituyen una de las limitaciones más serias del cultivo del garbanzo, tanto por las pérdidas de producción que ocasiona, como por las restricciones que imponen sobre su extensión a nuevas áreas e incluso su mantenimiento en aquéllas en que es tradicional.

La situación fitopatológica del garbanzo en Andalucía ha sido estudiada por TRAPERO CASAS y JIMENEZ DIAZ (1983), quienes han puesto de manifiesto que el cultivo es severamente afectado por un complejo de enfermedades que denominaron Marchitez y Podredumbre de Raíz (MPR) y que incluye Marchitez o Amarillez Vascular inducidas por diferentes biotipos de Fusarium oxysporum Schlecht. emend. Snyder. et Hans. f. sp. cicerei (Padwick) Snyder. et Hans., Amarillez No Vascular y Necrosis Cortical de Cuello y Raíz inducida por F. oxysporum Schlecht. emend. Snyder. et Hans., Amarillez No Vascular y Podredumbre de Raíz y Cuello inducida por F. solani (Mart.) Appl. et Wr. y F. eumartii Carpenter, Podredumbre Seca de Raíz inducida por Macrophomina phaseolina (Tassi) Goid., Enanismo amarillento (de etiología incierta pero probablemente viral), y Clorosis férrica.

De las enfermedades citadas, las debidas a infecciones por Fusarium spp. son las más severas y ampliamente distribuidas de las que integran el complejo MPR.

El suelo es fuente de inóculo de F. oxysporum,

F. eumartii y F. solani. En él dichas especies sobreviven como conidias, clamidosporas o trozos de micelio, constituyendo poblaciones de hasta varios miles de propágulos por gramo de suelo. La densidad de propágulos de las especies fúngicas mencionadas depende de muchos factores entre los que destacan la microflora y propiedades físicas y químicas así como la alternativa de cultivos y vegetación del suelo adventicia en este.

Los niveles de densidad de propágulos de especies fúngicas fitopatógenas en el suelo son determinantes de la incidencia y severidad de las enfermedades inducidas por patógenos de suelo en plantas susceptibles. Por ello, para un adecuado planteamiento de estrategias de lucha contra dicho tipo de enfermedades es necesario conocer los niveles de densidad de propágulos disponibles en las poblaciones de los patógenos para iniciar las epidemias, así como evaluar la eficacia de los medios de lucha disponibles sobre la reducción que ocasionan en dichas poblaciones iniciales, en relación a los umbrales de densidad de inóculo que resultan en epidemias severas.

Durante los últimos 20 años diversos autores han desarrollado medios de cultivo selectivos para el aislamiento y cuantificación de Fusarium spp. en suelos cultivados (BOUHOT y ROUXEL, 1971, KOMADA, 1977; NASH y SNYDER, 1962; PAPAIVIZAS, 1967; SINGH y CHAUBE, 1970). La posibilidad de que algunos o varios de dichos medios sean de utilidad en la cuantificación de poblaciones de F. oxysporum, F. solani (sensu lato) que infectan garbanzo en Andalucía resulta de gran interés por su aplicación inmediata para la valoración de estrategias y medios de lucha. Sin embargo, la eficacia de dichos medios en el aislamiento selectivo del suelo de los citados patógenos es desconocida para nosotros.

En esta Tesis hemos evaluado la utilidad de los medios selectivos agar-jugo V-8-oxgall-PCNB (BOUHOT y ROUXEL, 1971; PAPAIVIZAS, 1967), agar-peptona-PCNB (NASH y SNYDER, 1962; PAPAIVIZAS, 1967), agar de Komada (KOMADA, 1977) y agar-Czapek-Dox-verde malaquita-captan (SINGH y CHAUBE, 1970) para el aislamiento y cuantificación de F. oxysporum y F. solani (sensu lato) en suelos cultivados del Valle del Guadalquivir. Los medios selectivos más eficaces se han empleado posteriormente para:

- 1.- Estimar la densidad de propágulos de F. oxysporum y F. solani que infestan los suelos cultivados del Valle del Guadalquivir.
- 2.- Determinar la frecuencia con que existen en dichos suelos cultivados aislamientos de F. oxysporum y F. solani (sensu lato) patogénicos sobre garbanzo.

REVISION DE LITERATURA

En Andalucía, el cultivo del garbanzo (Cicer arietinum L.) es afectado severamente por un complejo de enfermedades que TRAPERO CASAS y JIMENEZ DIAZ (1983) han denominado Marchitez y Podredumbre de Raíz (MPR). Según dichos autores este complejo constituye actualmente el factor limitante más importante para el desarrollo del garbanzo de siembra primaveral en España.

La MPR del garbanzo incluye como componentes principales una Marchitez o una Amarillez de naturaleza vascular que son inducidas por biotipos de Fusarium oxysporum Schlcht. emend. Snyd et Hans. f.sp. Ciceri (Padwick) Snyd. et Hans., y una Amarillez no vascular asociada a necrosis cortical o podredumbre negra de raíz y cuello, que son inducidas respectivamente por F. oxysporum schlcht., o por F. solani (Mart.) Appl. et Wr. y F. eumartii Carpenter. F. solani y F. eumartii son especies morfológicamente muy similares, distinguiéndose entre sí particularmente por la morfología y tamaño de las macroconidias. En F. solani las macroconidias son de 20-50 x 4-5.5 μ m y tienen tres paredes transversales, mientras que F. eumartii tiene macroconidias de 30-60 x 3.5 - 5 μ m y 5 paredes transversales (TRAPERO CASAS y JIMENEZ DIAZ, 1983). La separación de F. solani y F. eumartii como especies distintas ha sido propuesta recientemente (BOOTH, 1977; GERLACH, 1977, 1981) y no es aún aceptada por todos los autores. Por ello, en lo que sigue, y a menos que se explicita expresamente, utilizaremos la denominación F. solani (sensu lato) para incluir a F. solani (Mart) Appl. et Wr. y F. eumartii Carpenter.

Los ataques de MPR han reducido seriamente la superficie dedicada al cultivo del garbanzo en Andalucía. Hasta el momento no se han realizado evaluaciones precisas sobre las pér

didadas de cosecha que ocasiona. Sin embargo TRAPERO CASAS y JIMENEZ DIAZ (1983) han estimado aquellas en un 12-15% en base a las incidencias de las enfermedades componentes del complejo observadas durante prospecciones sistemáticas en cultivos del Valle del Guadalquivir. En la India se han estimado en un 10% las pérdidas media de rendimiento causadas por F. oxysporum f. sp. ciceri (ALLEN, 1983).

Los ataques de F. oxysporum f.sp. ciceri y F. solani en cultivos de garbanzo están ampliamente distribuidos en el mundo, habiendo sido citados por diversos autores en Birmania, EE.UU., Etiopía, India, Malawi, Méjico, Paquistán, Perú, Túnez y URRS (ALLEN, 1983).

Las actividades biológicas de F. oxysporum y F. solani se desarrollan en el marco ecológico de la rizosfera. En dicho microhábitat estos hongos interaccionan no solo con la planta sino también con otros microorganismos bajo la influencia de factores físicos y químicos del suelo.

Las raíces de las plantas proveen de una fuente de nutrientes localizada y continua a estos hongos patógenos en el suelo, en forma de tejidos vivos, exudados radiculares y células muertas desprendidas (ALLEN, 1983; KRAFT et al, 1981; NASH SMITH, 1970). El efecto combinado, directo o indirecto, de los exudados radiculares sobre las actividades de F. oxysporum y F. solani (efecto rizósférico) puede ser analizado considerando tres de las fases que componen su ciclo vital: formación de clamidosporas (o esporas típicas de resistencia), persistencia de las mismas en el suelo y su posterior germinación (GRIFFIN, 1981; SCHIPPERS y VAN ECK, 1981).

Las clamidosporas pueden formarse por modificación de células de las hifas o de las macroconidias. La formación en -

las hifas tiene lugar en tejidos infectados y necróticos de plantas susceptibles; mientras que la formación en las macroconidias ocurre tras la germinación de éstas en el suelo, al que llegan procedentes de los esporodocios formados en los tejidos afectados (ALLEN, 1983; GRIFFIN, 1981; KRAFT et al., 1981; NASH SMITH, 1970; SCHIPPERS y VAN ECK, 1981).

Las clamidosporas de F. oxysporum y F. solani pueden sobrevivir hasta 30 años en suelos cultivados con plantas no susceptibles (KRAFT et al., 1981; NASH SMITH, 1970). Ello puede tener lugar gracias al mantenimiento de un estado hipometabólico (latencia) continuado, o por germinación repetida y formación de nuevas clamidosporas. Ambos procesos no son excluyentes y probablemente tienen lugar en el suelo contribuyendo a tan significativa capacidad de sobrevivir por parte de dichos hongos. Existe referencia de que las microconidias de F. oxysporum pueden persistir en el suelo durante más de un mes (TELLO, 1984) pudiendo jugar un papel activo en las infecciones de plantas susceptibles. No se tiene referencia sobre el crecimiento y el mantenimiento activo en el suelo como saprotrofos de F. oxysporum y F. solani, ni sobre la supervivencia diferencial de estas especies.

La capacidad potencial de las clamidosporas para establecer infecciones (potencial de inóculo) depende de su número sobre la zona de penetración, y de las reservas nutritivas disponibles tanto endógenas como exógenamente dentro y fuera de la rizosfera (BAKER, 1965; 1981; GRIFFIN, 1981).

La germinación de las clamidosporas de Fusarium spp. es estimulada por los exudados radiculares de las semillas y del hipocotilo de las plantas susceptibles y no susceptibles, y en ausencia de éstas, por sustancias producidas durante la descomposición de restos de cultivos anteriores (ALLEN, 1983;

KOMMEDAHL, 1966; KRAFT et al., 1981; SCHROTH y SNYDER, 1961; SMITH y SNYDER, 1972). En respuesta a los nutrientes las clamidosporas emiten un tubo que puede dar lugar a la penetración de los tejidos radiculares o a la formación de nuevas clamidosporas. La posibilidad de formar nuevas clamidosporas hace que estos hongos puedan sobrevivir prolongadamente en el suelo e incluso que sus poblaciones puedan aumentar con los años (SCHIPPERS y VAN ECK, 1981).

La naturaleza de los exudados radiculares que inducen la germinación de las clamidosporas en el suelo es relativamente bien conocida, ya que ha sido objeto de numerosos trabajos (GRIFFIN, 1981; SCHIPPERS y VAN ECK, 1981). Entre los diversos tipos de sustancias estimulantes de la germinación identificados destacan: ácidos orgánicos, derivados de los ácidos nucleicos, alcoholes, aldehidos, aminoácidos, auxinas, cumarinas, enzimas, etileno, flavonas, glucósidos, hidratos de carbono, propileno, saponinas, vitaminas, etc. (VANCURA y STOTZKY, 1976). Estas sustancias modifican las condiciones del suelo en la rizosfera, denominándose a este hecho efecto rizosférico.

Además de los exudados de origen vegetal, existen numerosos factores ambientales que influyen sobre las poblaciones de F. oxysporum y F. solani en el suelo, y pueden incidir sobre la ocurrencia y severidad de las infecciones de estos patógenos.

La temperatura del suelo influye notablemente en la producción, supervivencia y germinación de las clamidosporas (MENZIES, 1970). La temperatura óptima para el desarrollo de F. oxysporum y F. solani es de 25 - 28 C (ALLEN, 1983; GRIFFIN, 1981), y las temperaturas letales son relativamente moderadas. Un tratamiento calorífico húmedo del suelo a 50-60 C durante 30 min reduce ampliamente las poblaciones de dichos patógenos (MENZIES, 1970). La temperatura del suelo influye también sobre la distribución geográfica de F. oxysporum y F. solani, que

han sido citados desde las áreas templadas a las tropicales y zonas climáticas frías (STONER, 1981).

La cantidad de agua en el suelo influye sobre la germinación de las clamidosporas de F. oxysporum y F. solani, ya que con ella se difunden los exudados radiculares que la induce y permite el posterior crecimiento de las hifas (COOK, 1981). En general, las especies de Fusarium se muestran más activas y sobreviven mejor en hábitats con limitaciones de agua (COOK, 1981; SMITH y SNYDER, 1971). Sin embargo, F. solani se cita siempre como muy común en áreas cálidas de alta pluviosidad o en suelos de regadíos (STONER, 1981). Algunos autores sugieren que el crecimiento y la supervivencia de F. oxysporum es favorecido por condiciones de sequía por ser menor el efecto de microorganismos antagonistas (COOK, 1981).

Una pobre aireación del suelo repercute generalmente de forma negativa en las poblaciones de los patógenos del suelo, debido a que va asociada con un alto contenido en agua, alto contenido en CO₂ y bajo contenido en O₂. Este compuesto estimula la germinación de las clamidosporas de F. solani en presencia de glucosa y amoníaco en suelos estériles (GRIFFING, 1981). F. oxysporum se desarrolla bien a concentraciones muy bajas de O₂ (0.01%), y son capaces de crecer bajo condiciones anaeróbicas en presencia de extracto de levadura, MnO₂, nitrato, selenito o iones férricos (GRIFFIN, 1981).

El intervalo de pH tolerado por las poblaciones de F. oxysporum y F. solani es amplio, ya que va desde niveles ácidos (pH 2.4) a alcalino (pH 9) (GRIFFIN, 1981); sin embargo, suelen predominar en suelos ácidos (ALLEN, 1983; GRIFFIN, 1981; STONER, 1981) debido a que en ellos se reduce la competición bacteriana (STONER, 1981).

El contenido en nutrientes en el suelo afecta a la patogénesis de F. oxysporum (WOLTZ y JONES, 1981) y F. solani (KAUFMAN y WILLIAMS, 1965). Niveles altos de nitrógeno y bajos de potasio incrementa la germinación de las clamidosporas y la severidad de los ataques de estos patógenos; mientras que un alto contenido en potasio y bajo en nitrógeno, la reduce (ALLEN, 1983; KAUFMAN y WILLIAMS, 1965; WOLTZ y JONES, 1981). Una deficiencia en calcio y boro en la planta huésped también puede incrementar la severidad de la marchitez causada por F. oxysporum (WOLTZ y JONES, 1981).

La tasa de propagación de la Marchitez causada por F. oxysporum parece no estar correlacionado con las propiedades físicas y químicas de los suelos; sin embargo, sí existe una alta correlación entre la tasa de propagación de esta enfermedad y la mineralogía de las arcillas del suelo (LOUVET et al, 1981). Los suelos arcillosos ricos en montmorillonita incrementa la propagación de F. oxysporum; mientras que los suelos arcillosos pobres en este mineral la disminuye (LOUVET et al, 1981).

Uno de los avances más significativos en el estudio de la ecología de F. oxysporum y F. solani en el suelo, ha sido el desarrollo de un medio de cultivo selectivo para el aislamiento y enumeración de propágulos existente en aquellos realizado por NASH y SNYDER (1962). Dicho medio permite la diferenciación específica de ambos organismos así como de otras especies de Fusarium. La modificación de este medio de cultivo (PAPAVIZAS, 1967) y la creación de otros nuevos (BOUHOT y ROUXEL, 1971; KOMADA, 1977; PAPAVIZAS, 1967; SINGH y CHAUBE, 1970), junto con la utilización de la técnica de dilución en placa (ABAWI y LORBEER, 1971; NASH y SNYDER, 1962; Mc MULLEN y STACK, 1982; SMITH y SNYDER, 1975), ofrece la posibilidad de estudiar la distribución de F. oxysporum y F. solani en los suelos cultivados de garbanzo del Valle del Guadalquivir, así como el rango

de densidad de propágulos existente en dichos suelos. La utilización de dichos medios en suelos cultivados ha puesto de manifiesto la posibilidad de estimar densidades de población superiores a los 5000 propágulos por gramo de suelo (CUADRO 1), número suficiente para ocasionar infecciones severas en cultivos susceptibles (SMITH y SNYDER, 1971).

CUADRO 1. Niveles de población de Fusarium oxysporum y Fusarium solani encontrados por diferentes autores en suelos cultivados.

Organismo	Medio de Cultivo	Propágulos/g suelo	Referencia
<u>F. oxysporum</u> f. sp. <u>cepac</u>	Martin-rosa bengala-PCNB	300 - 6500	ABAWI y LORBEER, 1971
<u>F. oxysporum</u> f. sp. <u>melonis</u>	Agar-jugo V-8-oxgall-PCNB	358 - 3953	BOUHOT y ROUXEL, 1971
<u>F. oxysporum</u> f. sp. <u>melonis</u>	Agar-peptona-PCNB	- - 3300	NASH SMITH, 1970
<u>F. oxysporum</u> f. sp. <u>melonis</u>	Komada	4000 - 8000	MARQUIS et al, 1983
<u>F. oxysporum</u>	Czapeck-Dox y otros	298 - 4048	TAMIMI y HADWAN, 1980
<u>F. solani</u> f. sp. <u>phaseoli</u>	Agar-peptona-PCNB	1000 - 3000	NASH y SNYDER, 1966
<u>F. solani</u> f. sp. <u>phaseoli</u>	Agar-peptona-PCNB	20 - 1546	BURKE et al, 1972
<u>F. solani</u> f. sp. <u>phaseoli</u>	Agar-peptona-PCNB	1 - 1112	DRYDEN et al, 1981
<u>F. solani</u> f. sp. <u>phaseoli</u>	Agar-peptona-PCNB	1000 - 4000	NASH SMITH, 1980
<u>F. solani</u>	Czapek-Dox y otros	150 - 4538	TAMIMI y HADWAN, 1980

CAPITULO I

PUESTA A PUNTO DE UNA METODOLOGIA PARA EL AISLAMIENTO SELECTIVO Y CUANTIFICACION DE FUSARIUM OXYSPORUM SCHLECHT. Y FUSARIUM SOLANI (MART.) APPL. ET WR. DE SUELOS CULTIVADOS DEL VALLE DEL GUADALQUIVIR

INTRODUCCION

El garbanzo (Cicer arietinum L.) se cultiva extensamente en el Valle del Guadalquivir (TRAPERO CASAS y JIMENEZ DIAZ, - 1983) donde es afectado severamente por la Marchitez y Podredumbre de Raíz (MPR) (TRAPERO CASAS y JIMENEZ DIAZ, 1983). La MPR es un complejo de enfermedades, de las cuales son de primera importancia la Marchitez y Amarillez Vasculares inducidas por diferentes biotipos de F. oxysporum f. sp. ciceri, y la Podredumbre Negra de Raíz y Cuello inducidas por F. solani o F. eumartii - (F. solani sensu lato)(TRAPERO CASAS y JIMENEZ DIAZ, 1985). - F. oxysporum induce asimismo una Amarillez No Vascular asociada con necrosis cortical de raíz y cuello (TRAPERO CASAS y JIMENEZ DIAZ, 1985).

Las especies de Fusarium citadas son hongos de suelos, en el que sobreviven prolongadamente y en el que desarrollan - las primeras etapas de la patogénesis en las enfermedades que - causan.

La relación entre la densidad de inóculo en el suelo y la incidencia y severidad de los ataques de F. oxysporum y - F. solani en plantas susceptibles, ha llevado a muchos investigadores a tratar de estimar la densidad de propágulos de dichos - hongos en los suelos cultivados. Para ello, se ha utilizado generalmente la técnica de dilución de muestras de suelo en - placas con medios de cultivo selectivos (ABAWI y LORBEER, 1971; BOUHOT y ROUXEL, 1971; BURKE et al., 1972; DRYDEN et al., 1984;

MAROIS et al., 1983; NASH y SNYDER, 1962; TAMIMI y HADWAN, 1980).

El primer medio de cultivo para el aislamiento selectivo de Fusarium spp. de suelos cultivados, fué desarrollado por NASH y SNYDER (1962) al objeto de estimar cuantitativamente las poblaciones de F. solani f. sp. phaseoli, causante de la Podredumbre de Raíz de la judía (Phaseolus vulgaris L.). El medio de NASH y SNYDER fue modificado por PAPAIVIZAS (1967) mediante la incorporación de varios agentes antimicrobianos tolerados por F. oxysporum y F. solani, al objeto de evitar en lo posible el desarrollo de microorganismos contaminantes que dificultaran la enumeración y aislamiento de las colonias de Fusarium spp. PAPAIVIZAS, y posteriormente BOUHOT y ROUXEL (1971), desarrollaron otro medio selectivo a base de jugo de vegetales V-8, dextrosa, extracto de levadura y de los mismos agentes antimicrobianos que el anterior. Recientemente, KOMADA (1977) ha desarrollado otro medio selectivo para el aislamiento de Fusarium spp. del suelo, supuestamente más efectivo que los anteriores.

Según nuestro conocimiento, el contenido de Fusarium spp. en suelos cultivados del Valle del Guadalquivir no ha sido estudiado. Por ello, la validez de los medios de cultivo selectivos antes citados para el aislamiento selectivo y cuantificación de F. oxysporum y F. solani de dichos suelos no puede asegurarse a priori, y debe ser contrastada experimentalmente. A tal efecto, hemos realizado una valoración comparativa de la eficacia de varios medios selectivos descritos en la literatura para el aislamiento de Fusarium de suelos del Valle del Guadalquivir, cuyos resultados se presentan en este Capítulo I. La selección del medio o medios más eficaces permitirá estimar cuantitativamente las poblaciones de F. oxysporum y F. solani en dichos suelos.

MATERIALES Y METODOS

Se han tomado muestras de suelo del Valle del Guadalquivir, que se han utilizado posteriormente para aislamientos de Fusarium con los medios selectivos objeto de estudio.

Muestreos de suelos

En el mes de Febrero de 1983 se tomaron muestras de suelos en un encinar cercano a Santa María de Trassierra (Córdoba) y en dos parcelas con historia de severos ataques del complejo MPR ubicadas en los términos de Montilla y Santaella (Córdoba), respectivamente (TRAPERO CASAS y JIMENEZ DIAZ, 1983). La parcela de Montilla había sido sembrada de garbanzo durante los tres últimos años anteriores al muestreo, y en 1981 tuvo una incidencia final del 100% de muerte de plantas susceptibles. Los aislamientos de plantas afectadas indican la existencia del biotipo de F. oxysporum f. sp. cicerei causante de la Amarillez Vascular, así como de F. solani (TRAPERO CASAS y JIMENEZ DIAZ, 1983). La parcela de Santaella tuvo una incidencia del 80% de plantas muertas en 1982, causada fundamentalmente por el biotipo de F. oxysporum f. sp. cicerei que induce la Marchitez Vascular, y en menor grado por F. solani (TRAPERO CASAS y JIMENEZ DIAZ, 1983).

Las muestras de suelo se tomaron de cinco puntos en cada parcela distribuidos en zig-zag (HAU et al, 1982), en cada uno de los cuales se abrió una calicata (Fig. 1). En el perfil de las calicatas se muestreó el suelo a 5, 17.5 y 30 cm mediante un tubo metálico hueco de 28 mm de diámetro, previamente esterilizado, que se introdujo horizontalmente en el perfil. Las muestras de la misma profundidad de cada suelo se mezclaron en una bolsa de plástico y se transportaron al laboratorio, donde se mantuvieron a 3 C en un frigorífico hasta su posterior ma

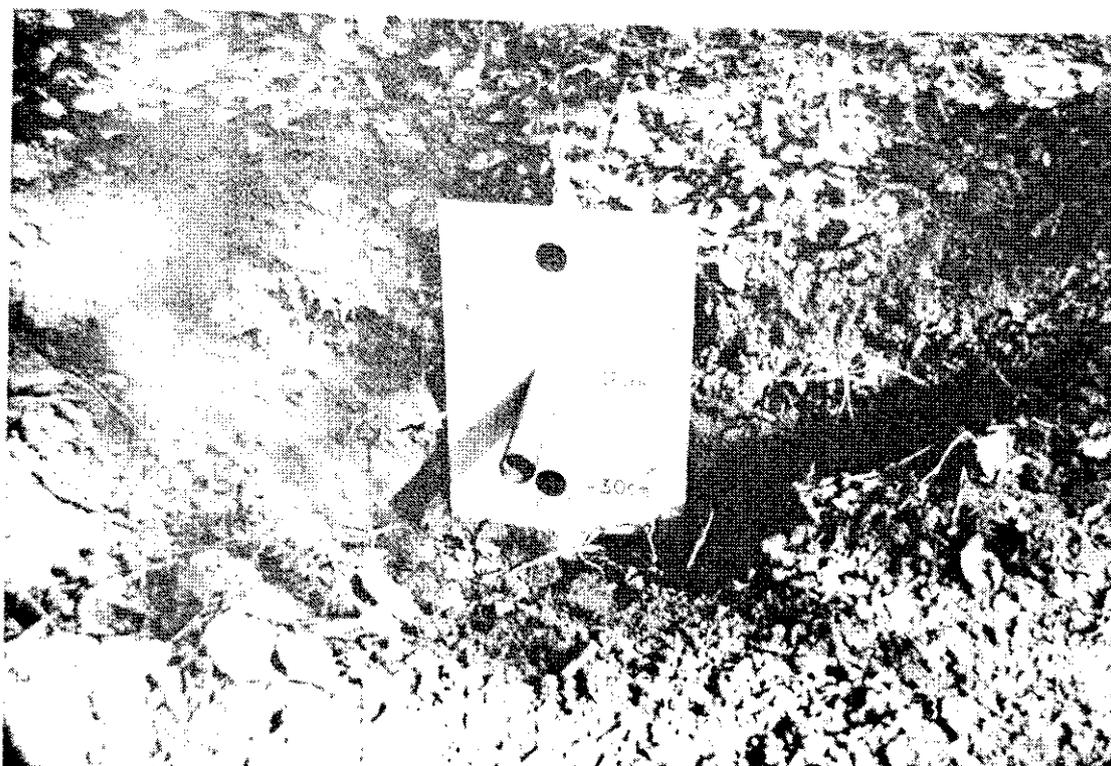


Fig. 1. Calicata abierta en el suelo para la toma de muestras a distintas profundidades

nipulación, que tuvo lugar no más tarde de 2 semanas después del muestreo.

En un experimento posterior se tomaron muestras de suelo del perfil 5-17.5 cm en 14 campos elegidos al azar de la margen izquierda del Guadalquivir, entre Córdoba, Palma del Río y Ecija, cuya historia de cultivo y enfermedad no era conocida. Dichos campos estaban sembrados de diferentes cultivos (algodón, girasol, habas, maíz, remolacha o trigo), y eran de variada textura (arcillosa, franco arcillosa, franca, franco-arcillo-arenosa, franco-arcillo-limosa o arcillo-limosa).

Aislamiento de *Fusarium* spp. del suelo

Las muestras de suelo se sometieron a diferentes tratamientos para facilitar su manejo durante el proceso de aislamiento: i) desecación a 28 ± 3 C durante 24 hr en cámara con circulación de aire; ii) desecación a 28 ± 2 C durante 24 hr en estufa sin aireación; iii) no desecación. El suelo tratado (seco o no), cubierto de papel de filtro limpio, se homogeneizó con un mazo y rodillo de madera y se tamizó a través de una malla de 0.5 mm de luz para la eliminación de guijarros y fracciones groseras. Después, las muestras de cada profundidad de suelo se suspendieron en agar-agua (AA) al 0.1% en las proporciones de 10.0, 6.7 y 5.0 mg de suelo seco por ml de AA, y se homogeneizaron en una batidora Osterizer ("Dual Range Pulsematic 16") a alta velocidad durante 2 min.

Cada suspensión de suelo se testó sobre los medios de cultivo selectivos agar-jugo V-8-oxgall-PCNB, agar-peptona-PCNB, Komada y agar-Czapek-Dox-verde malaquita-Captan (Cuadro 2). De cada suspensión de suelo se tomó asépticamente 1 ml que se depositó sobre la superficie del medio selectivo correspondiente en placa petri, agitándose la placa con movimiento rotatorio

CUADRO 2. Composición (g o ml/litro) de los medios de cultivo selectivos para *Fusarium* spp. usados en los experimentos preliminares

Agar-peptona-PCNB ^a		Agar-jugo V-8-oxgall-PCNB ^b		Komada ^c		Agar Czapek-Dox-verde malaquita-captan ^d	
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.5 g	Jugo V-8	200 ml	MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.5 g	MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.5 g
KH ₂ PO ₄	1 g	CO ₃ Ca	3 g	K ₂ HPO ₄	1 g	K ₂ HPO ₄	1 g
PCNB	0.5 g	PCNB	0.5 g	PCNB	1 g	PCNB	0.5 g
Oxgall	0.5 g	Oxgall	5 g	Oxgall	0.5 g	SO ₄ Fe	0.01 g
Agar	20 g	Agar	20 g	Fe-Na-EDTA	0.01 g	CIK	0.5 g
Peptona	15 g	D-Glucosa	5 g	CIK	0.5 g	NO ₃ Na	2 g
Sulfato de estreptomycin	300 mg	Extracto de levadura	2 g	Na ₂ B ₄ O ₇ · 10H ₂ O	1 g	Agar	20 g
Clorotetraciclina	100 mg	Sulfato de estreptomycin	300 mg	Agar	15 g	Sacarosa	30 g
Agua destilada	1000 ml	Clorotetraciclina	100 mg	D-galactosa	20 g	Extracto de levadura	?
		Agua destilada	800 ml	Sulfato de estreptomycin	300 mg	Estrepto-penicilina	750 mg
				L-asparagina	2 g	Verde malaquita	20 mg
				Agua destilada	1000 ml	Captan	100 mg
						Agua destilada	1000 ml

^a NASH y SNYDER, 1962; PAPAIVIZAS, 1967

^b BOUHOT y ROUXEL, 1971; PAPAIVIZAS, 1967

^c KOMADA, 1977

^d SIHG y CHAUBE, 1970

a fin de facilitar la dispersión homogénea de la suspensión. -
 Para cada medio selectivo y suspensión de suelo se utilizaron -
 3-5 placas petri.

Identificación de Fusarium spp.

Las placas con las suspensiones de suelo se incubaron en oscuridad en estufa a 26 ± 2 C durante 48 hr, y posteriormente bajo luz fluorescente a 2000 lux con un fotoperíodo de - 12 hr durante 2-6 días. Después se procedió al aislamiento - del 30% de las colonias fúngicas desarrolladas sobre cada medio de cultivo, mediante transferencia masal a agar-patata-dextrosa (PDA) en placas petri, y a su posterior identificación mediante observación de los caracteres morfológicos de valor taxonómico de ambas especies en los montajes microscópicos realizados. - Los aislamientos para la identificación específica se realizaron de colonias de 4-5 días de crecimiento sobre agar-peptona-PCNB y agar-jugo V-8-oxgall-PCNB, y de las colonias de 7-8 - días de crecimiento sobre los medios de Komada y agar-Czapeck-Dox-verde malaquita-captan. F. oxysporum se caracteriza por i) macroconidias generalmente abundantes, fusiformes, poco curvadas, agudas en los dos extremos, con 3-5 septas y dimensiones comprendidas entre $20-50 \times 2-4 \mu\text{m}$; ii) por microconidias tam- - bién abundantes, de forma elipsoidal-oval, oblonga, rectas o - curvadas, aseptadas y de tamaño comprendido entre $4-12 \times 1.5-4 \mu\text{m}$; iii) por fiálidas cortas, generalmente abombadas en parte - central o a veces curvadas, situadas en un conidióforo nada o - poco ramificado y de dimensiones comprendidas entre $4-2\frac{1}{4} \times 1.5-4 \mu\text{m}$; y iv) por clamidosporas terminales o intercalares en - las hifas, de paredes lisas o rugosas, esféricas o piriformes - las terminales y esféricas-ovales las intercalares, y de diámetro comprendido entre $5-16 \mu\text{m}$. F. solani se caracteriza i) - por macroconidias generalmente abundantes, fusiformes, con los extremos más redondeados que los de las macroconidias de -

F. oxysporum, frecuentemente con tres septas, aunque puede tener de 1-7, de tamaño variable (20-50 x 4-5.5 μm); ii) por microconidias abundantes, ovales-elipsoidales o reniformes, con paredes bien marcadas y generalmente aseptadas, de tamaño comprendido entre 6-20 x 2-4 μm ; iii) por fiálidas largas, frecuentemente septadas y de tamaño comprendido entre 45-100 x 2-4 μm situadas sobre conidióforos poco ramificados; iv) por clamidosporas formadas terminalmente en rama laterales o intercalaramente, de forma oval-esférica o aperada, con paredes lisas o rugosas y de 6-12 μm de diámetro (TRAPERO CASAS y JIMENEZ DIAZ, 1983).

En base a las identificaciones realizadas fue posible clasificar las colonias desarrolladas sobre los medios selectivos, según su morfología, como pertenecientes a F. oxysporum o F. solani. Posteriormente se contabilizó el número de colonias de cada especie fúngica desarrollada sobre cada placa, y asumiendo que cada una se había originado de un propágulo viable, se calculó el número de propágulos por gramo de suelo para cada muestra procesada. Dichos datos se sometieron a análisis de varianza posterior y comparación de medias en caso de significación.

RESULTADOS

El medio agar-Czapek-Dox-verde malaquita-captán se mostró ineficaz para el aislamiento de Fusarium spp. de las muestras de suelos tomadas en 1983 en un encinar sin historia de MPR (Santa María de Trasierra) y en dos parcelas con historia de severos ataques del Complejo MPR (Campaña de Córdoba), al no desarrollarse en él ninguna colonia de Fusarium spp. tras 5 días de incubación y sólo en muy escaso número en los días su

cesivos. Los restantes medios contrastados dieron resultados positivos, y las especies de Fusarium identificadas fueron F. oxysporum, F. solani y F. equiseti (Cuadro 3). De los tres medios contrastados, el agar-jugo V-8-oxgall-PCNB fue el que permitió la mejor distinción morfológica de las colonias de Fusarium spp. desarrolladas (Fig. 2).

F. oxysporum se aisló consistentemente en los medios agar-jugo V-8-oxgall-PCNB, agar-peptona-PCNB y Komada de los tres suelos muestreados, resultando el número de propágulos viables de esta especie obtenidos en cada uno de los suelos cultivados de la campiña, superior al detectado en el suelo de encinar de la Sierra Morena.

F. solani solo fue aislado de las muestras de suelo de la Campiña y no de las del encinar, y únicamente con los medios agar-jugo V-8-oxgall-PCNB y agar-peptona-PCNB.

F. equiseti se aisló consistentemente de las muestras de suelo de la campiña con los tres medios de cultivo contrastados, pero no se aisló de la muestra de suelo del encinar.

En un experimento posterior se reevaluó la eficacia de los medios de cultivo agar-jugo V-8-oxgal-PCNB, agar-peptona-PCNB y Komada para el aislamiento de F. oxysporum y F. solani de suelos cultivados. Los resultados sobre la densidad de propágulos viables de F. oxysporum se muestran en el Cuadro 4. Los tres medios son similarmente eficaces para la determinación de la densidad de propágulos viables de F. oxysporum, ya que el número medio de propágulos detectados no difirió significativamente ($P=0.01$) entre ellos. Para el mismo nivel de probabilidad, el número de propágulos de F. solani detectado con el medio de Komada fue significativamente inferior al obtenido con agar-jugo V-8-oxgall-PCNB y agar-peptona-PCNB, que a su

CUADRO 3. Densidad de propágulos de Fusarium spp. en suelos cultivados y no cultivados de la provincia de Córdoba

Localidad	Profundidad	Dilución de la muestra mg/ml	Fusarium spp y medio de cultivo ^y								
			<u>F. oxysporum</u>			<u>F. solani</u>					
			AVOP	APP	K	AVOP	APP	K	AVOP	APP	K
Montilla	5	5/1	1800 ^x	1900	2100	1350	1400	0	1140	1200	1800
	17.5	6.67/1	1800	1800	1875	1500	1425	0	2100	2250	1750
	30	10/1	1100	1200	1150	1700	1500	0	1030	1150	1550
Santaealla	5	10/1	2400	2550	2300	2000	1900	0	2750	2700	2900
	17.5	10/1	1150	1200	1200	1750	1800	0	1500	1550	1700
	30	10/1	1100	1050	900	1300	1650	0	1300	900	1200
Sta. Ma de Trassierra	5	5/1	140	140	340	0	0	0	0	0	0
	17.5	6.67/1	75	75	75	0	0	0	0	0	0
	30	10/1	0	0	0	0	0	0	0	0	0

^x Los valores se refieren a propágulos/g de suelo seco y se expresan como media resultante de conteos en tres placas petri

^y Medios de cultivo utilizados: agar-jugo V-8-oxgall-PCNB (AVOP), agar-peptona-PCNB (APP) y Komada (K)

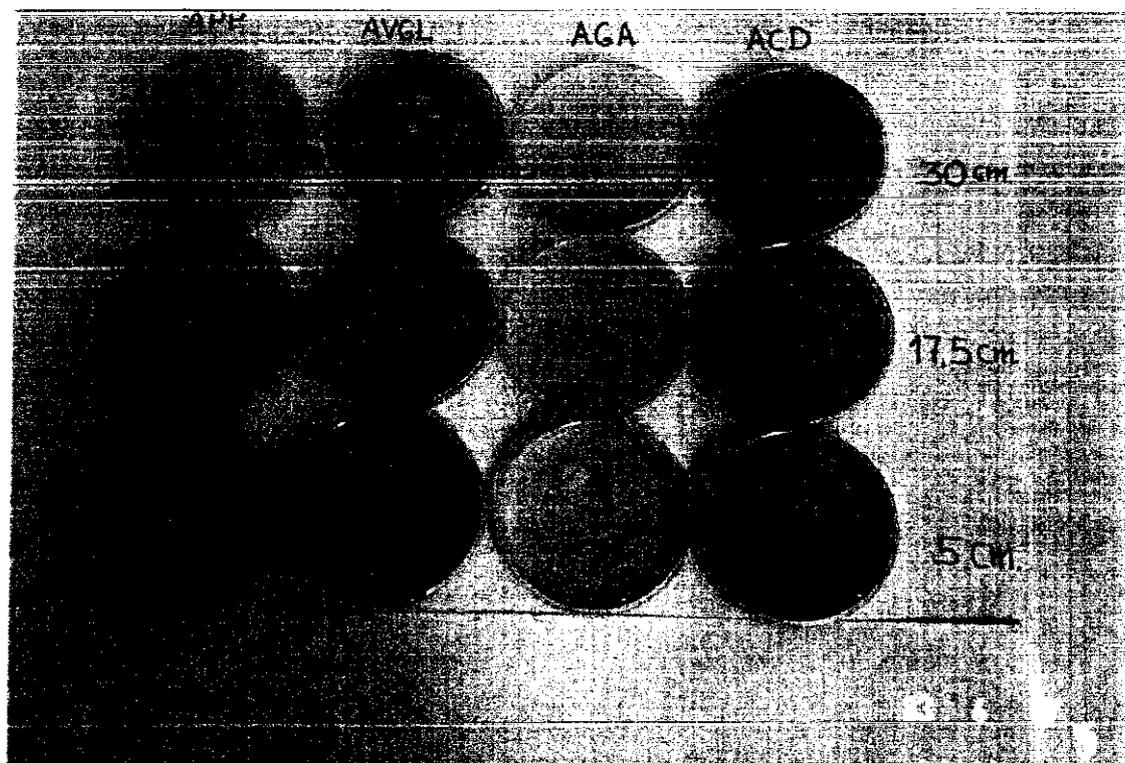


Fig. 2. Medios de cultivo selectivos para *Fusarium* spp. -agar-peptona-PCNB (APP), agar-jugo V-8-oxgall-PCNB (AVOP), Komada (K) y agar-Czapek-Dox-verde malaquita-captán (ACD)-conteniendo 1 ml de suspensión de suelo (dilución 1/100, g suelo seco/ml AA al 0.1%) tomado a 5, 17.5 y 30 cm de profundidad en un encinar cercano a Santa María de Trassie rra (Córdoba), después de 5 días de incubación

CUADRO 4. Eficacia de tres medios de cultivo selectivos para la detección del número de propágulos viables de Fusarium oxysporum de suelos cultivados del Valle del Guadalquivir

Suelo	Textura	Medio de cultivo			Komada
		Agar-jugo V-8-oxgall-PCNB	Agar-peptona-PCNB	Agar-peptona-PCNB	
1	Arcillosa (Arc.)	867 ^x ± 153	867 ± 153	867 ± 153	900 ± 100
2	Franca (Frc.)	667 ± 115	633 ± 58	633 ± 58	700 ± 100
3	Frc.Arc.Limosa	900 ± 100	967 ± 58	967 ± 58	1000 ± 100
4	Franca	1067 ± 58	1000 ± 100	1000 ± 100	1100 ± 100
5	Arcillosa	900 ± 100	967 ± 58	967 ± 58	1000 ± 100
6	Frc.Arc.	2133 ± 379	2100 ± 100	2100 ± 100	2167 ± 208
7	Frc.Arc.Arenosa	567 ± 58	500 ± 100	500 ± 100	667 ± 58
8	Arcillosa	600 ± 100	600 ± 100	600 ± 100	633 ± 58

^x Los valores se refieren a propágulos/g de suelo seco y se expresan como resultante de conteos en cinco placas petri seguidas de su desviación típica.

vez no difirieron entre sí (Cuadro 5). Estos resultados fueron consistentes en todas las muestras de suelo procesadas, independientemente de la diferente textura de los mismos (Cuadro 5, 6). Los medios agar-jugo V-8-oxgall-PCNB y agar-peptona-PCNB permitieron la identificación de las colonias de F. oxysporum y F. solani a los 3 días de crecimiento (Fig. 3), distinguiéndose las de F. oxysporum por su color rosáceo y micelio rasante de las de F. solani, de micelio aéreo y coloración blanquecina (Fig. 4, 5).

En los Cuadro 7, 8 y 9 se presentan los datos relativos al efecto de la desecación del suelo sobre el número de propágulos viables de F. oxysporum y F. solani, respectivamente, detectados con los medios de cultivo agar-jugo V-8-oxgall-PCNB y agar-peptona-PCNB en seis muestras de suelos cultivados, de diferente textura.

Los resultados obtenidos son de difícil interpretación ya que la densidad de propágulos viables detectada varía sin un patrón de comportamiento consistente según los tratamientos de desecación efectuados. Así, en suelos con la misma textura, en unos casos el número de propágulos de F. oxysporum contabilizados fue significativamente mayor cuando la muestra se procesó sin desecación previa que cuando se desecó, mientras que en otros ocurrió la relación opuesta, o no existió diferencia significativa (Cuadro 7). No obstante, en general, parece que irrespectivo de la textura la no desecación previa de la muestra arrojó densidades de propágulos superiores.

Similarmente, la influencia del tratamiento de desecación sobre la densidad de propágulos viables de F. solani detectada es errática, variando según la textura del suelo, y en este caso, las mayores densidades de propágulos se detectaron en igual proporción de muestras desecadas como no desecadas (Cuadro 8).

CUADRO 5. Eficacia de tres medios de cultivo selectivos para la detección del número de propágulos viables de Fusarium solani de suelos cultivados del Valle del Guadalquivir

Suelo	Textura	Medio de cultivo			Komada
		Agar-jugo V-8-oxgall-PCNB	Agar-peptona-PCNB	Agar-peptona-PCNB	
1	Arcillosa (Arc.)	1433 ^x ± 208	1467 ± 115	1467 ± 115	633 ± 153
2	Franca (Frc.)	800 ± 173	967 ± 153	967 ± 153	533 ± 153
3	Frc.Arc.Lim.	3767 ± 321	4033 ± 208	4033 ± 208	2067 ± 115
4	Franca	1533 ± 115	1567 ± 58	1567 ± 58	567 ± 58
5	Arcillosa	1600 ± 100	1600 ± 173	1600 ± 173	700 ± 100
6	Frc.Arc.	1600 ± 200	1533 ± 208	1533 ± 208	633 ± 58
7	Frc.Arc.Aren.	1200 ± 265	1233 ± 58	1233 ± 58	600 ± 100
8	Arcillosa	1967 ± 153	1533 ± 115	1533 ± 115	567 ± 58

x Los valores se refieren a propágulos/g de suelo seco y se expresan como medias resultante de conteos en cinco placas petri seguidas de su desviación típica.

y Valores de una misma fila con una letra común no difieren significativamente (P=0.01) según el contraste de diferencia significativa mínima (LSD).

CUADRO 6. Eficacia de tres medios de cultivo selectivos para la detección de número de propágulos viables de Fusarium oxysporum y Fusarium solani de suelos cultivados del Valle del Guadalquivir.

<u>Fusarium</u> spp.	Medio de cultivo		
	Agar-jugo V-8-oxgall-PCNB	Agar-peptona-PCNB	Komada
<u>F. oxysporum</u>	991 ^x ± 133 a ^y	975 ± 91 a	1050 ± 103 a
<u>F. solani</u>	1675 ± 192 b	1742 ± 136 b	788 ± 99 c

x Los valores se refieren a propágulos/g de suelo seco y se expresan como media de ocho muestras de suelo (Cuadro 4,5) seguida de su desviación típica.

y Valores de la misma fila con una letra común no difieren significativamente (P=0.01) según el contraste de diferencia significativa mínima (LSD).

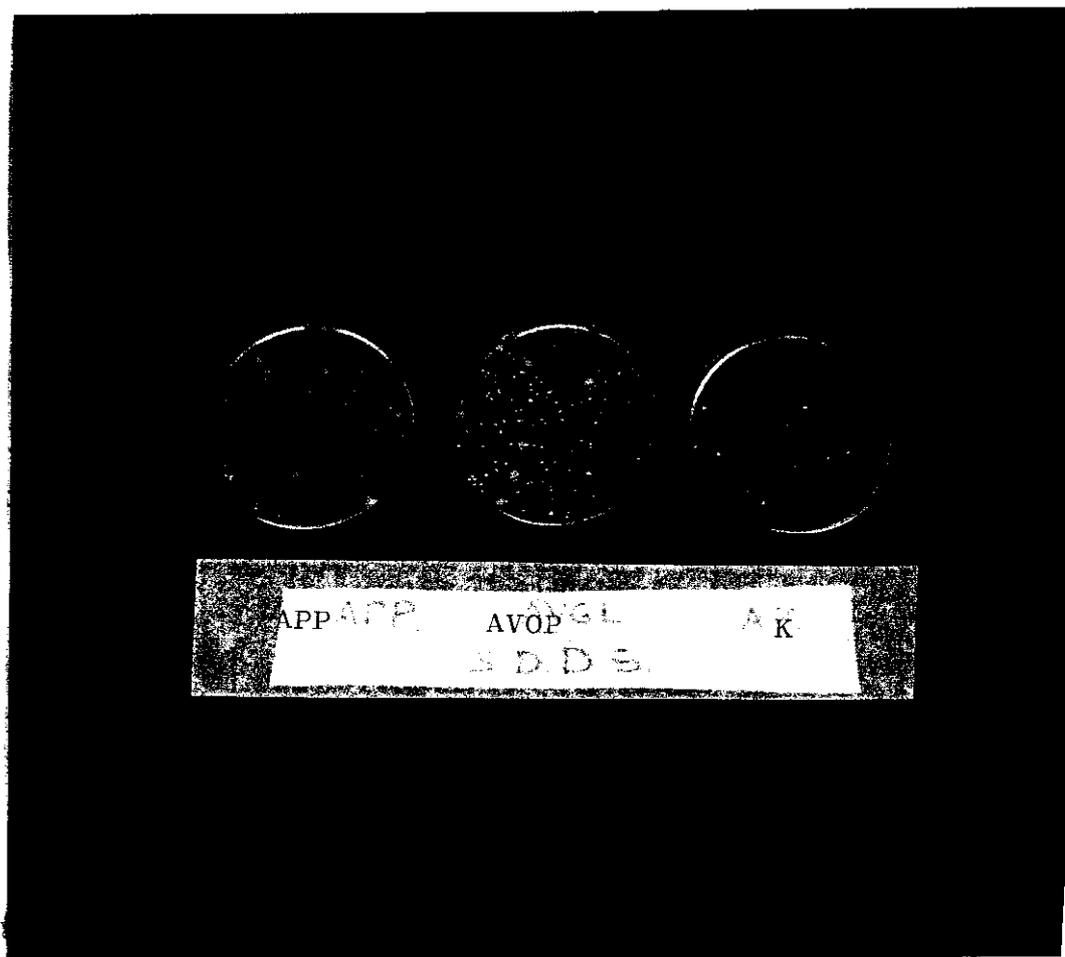


Fig. 3. Colonias de Fusarium oxysporum y F. solani de 3 días de crecimiento sobre los medios agar-jugo V-8-oxgall-PCNB (AVOP), agar-peptona-PCNB (APP) y Komada (K)

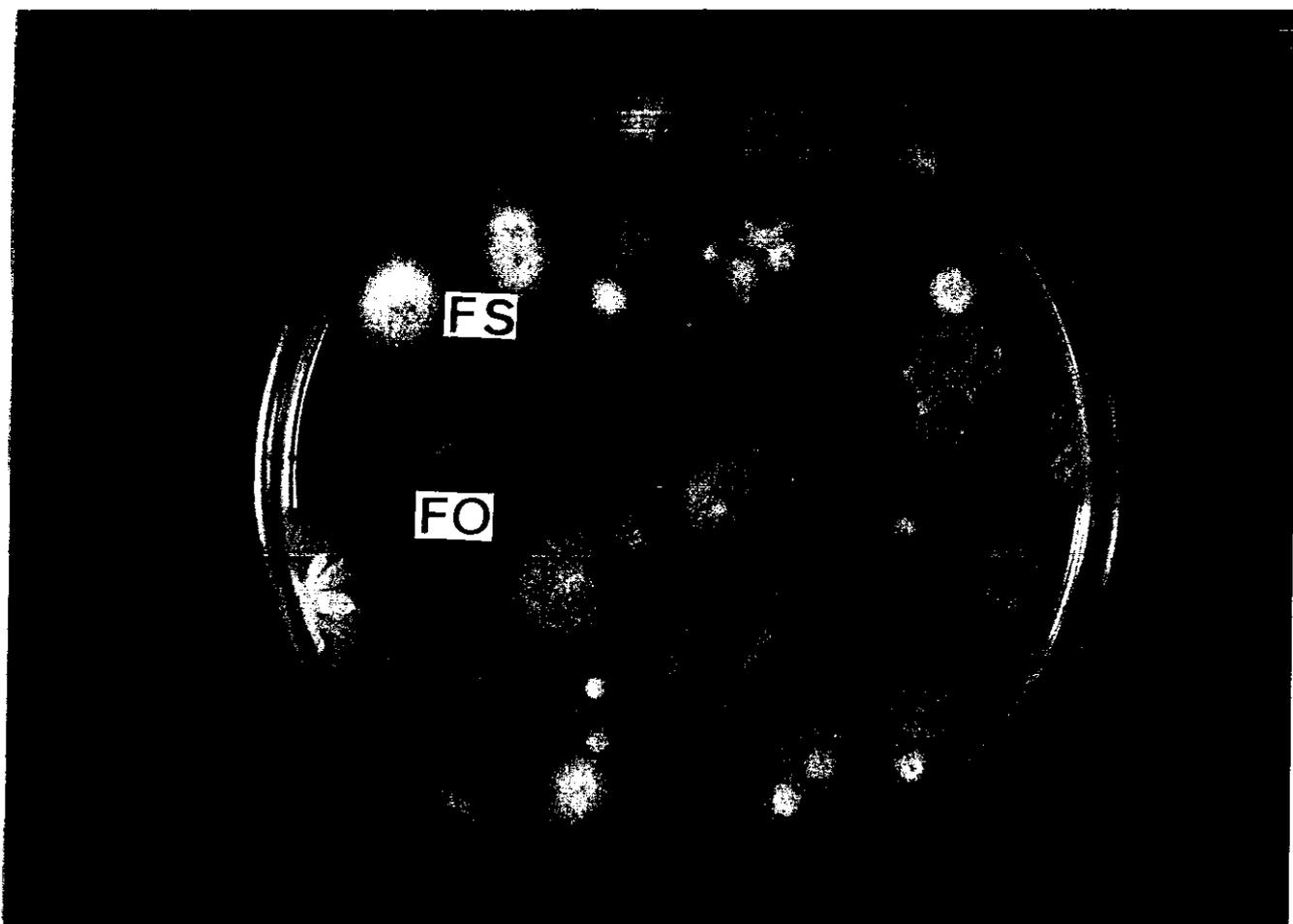


Fig. 4. Colonias de Fusarium oxysporum (FO) y F. solani (FS) sobre agar-peptona-PCNB

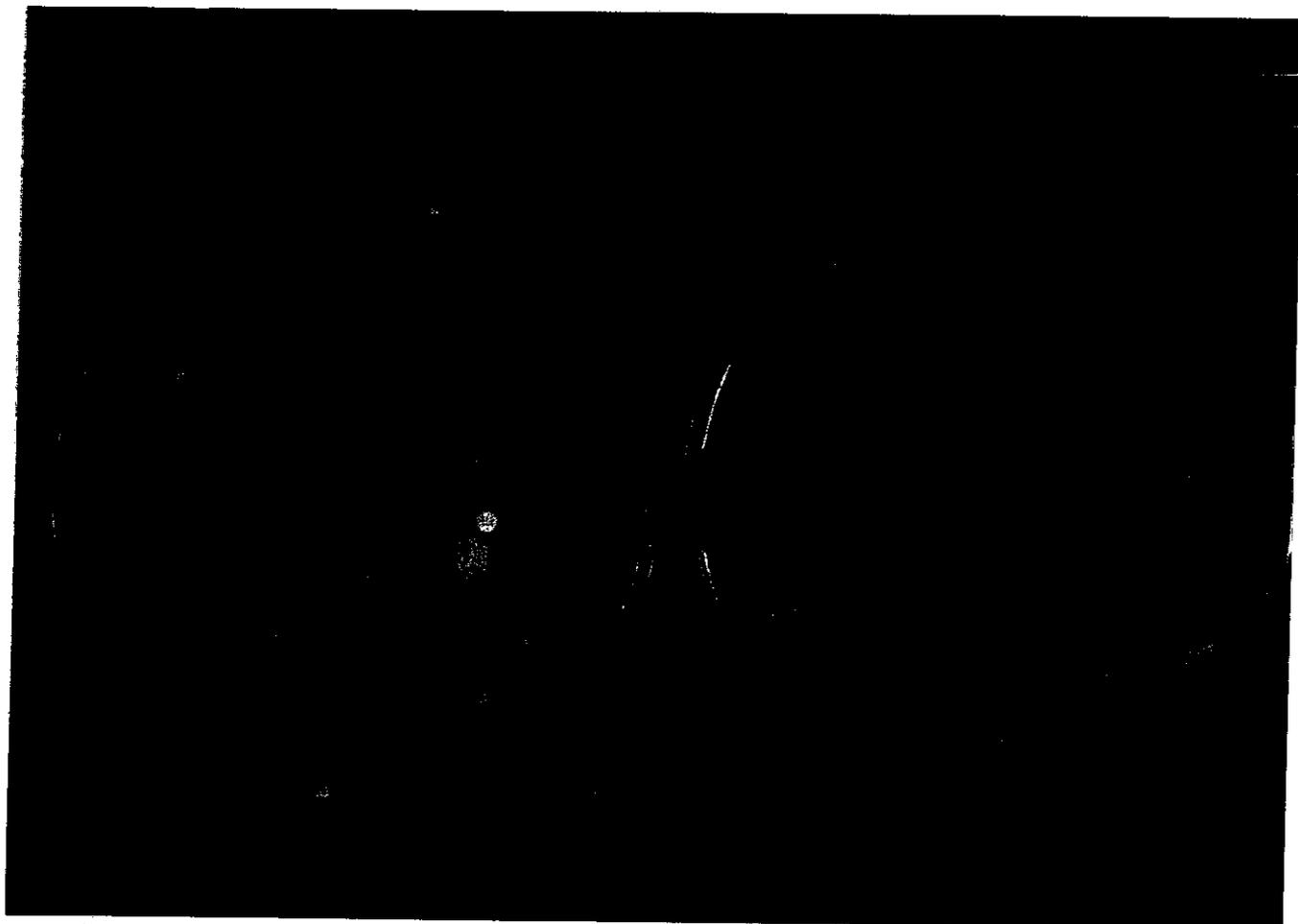


Fig. 5. Colonias de Fusarium oxysporum (FO) y F. solani (FS) sobre agar-jugo V-8-oxgall-PCNB

CUADRO 7. Influencia de la desecación del suelo sobre el número de propágulos viables de Fusarium oxysporum detectados con los medios de cultivo agar-jugo V-8-oxgall-PCNB y agar-peptona-PCNB en seis suelos de diferente textura

Suelo	Textura	Con desecación			
		Sin desecación	Con ventilación	Sin ventilación	
1	Arcillosa (Arc.)	1406 ^x ± 83	767 ± 150	767 ± 320	b
2	Arcillosa	1744 ± 209	1533 ± 350	1667 ± 326	a
3	Franca (Frc.)	1421 ± 166	1300 ± 210	900 ± 168	a
4	Frc. Arc.	1312 ± 143	1800 ± 334	833 ± 196	a
5	Arcillosa	703 ± 78	900 ± 110	633 ± 196	b
6	Arc. Limosa	1307 ± 110	867 ± 104	933 ± 302	b

^x Los valores se refieren a propágulos/g de suelo seco, y se expresan como media seguida de su desviación típica resultante de conteos en tres placas de agar-jugo V-8-oxgall-PCNB y tres de agar-peptona-PCNB.

^y Valores de una misma fila con una letra común no difieren significativamente (P=0.01) según el contraste de diferencia mínima significativa (LSD).

CUADRO 8. Influencia de la desecación del suelo sobre el número de propágulos viables de Fusarium solani Ceteo-
tados con los medios de cultivo agar-jugo V-8-oxgall-PCNB y agar-peptona-PCNB en seis suelos de diferente tex-
tura

Suelo	Textura	Con desecación		Con desecación	
		Sin desecación	Con ventilación	Con ventilación	Sin ventilación
1	Arcillosa (Arc.)	1241 ^x ± 126	1800 ± 334	1067 ± 162	a
2	Arcillosa	2325 ± 346	1200 ± 282	1567 ± 82	b
3	Franca (frc.)	1060 ± 107	1434 ± 294	1300 ± 210	a
4	Frc. Arc.	3683 ± 407	2333 ± 294	1867 ± 242	b
5	Arcillosa	1458 ± 217	1033 ± 266	1033 ± 150	b
6	Arc. Limosa	1680 ± 153	2067 ± 372	1033 ± 234	a

x Los valores se refieren a propágulos/g de suelo seco, y se expresan como media seguida de su desviación tí-
pica resultante de conteos en tres placas de agar-jugo V-8-oxgall-PCNB y tres de agar-peptona-PCNB.

y Valores de una misma fila con una letra común no difirieron significativamente (P=0.01) según la prueba de
diferencia significativa mínima (LSD).

Sin embargo, cuando los resultados se analizan globalmente, irrespectivo del tipo de suelo, la desecación previa al procesado de las muestras parece disminuir la densidad de propágulos viables de F. oxysporum y F. solani detectada, particularmente si la desecación tiene lugar en ausencia de ventilación - (Cuadro 9).

Cuando la desecación a 28 ± 3 C de las muestras de los seis suelos se mantuvo durante 4 días, la densidad de propágulos viables de ambas especies fúngicas decreció similarmente y de forma exponencial con el tiempo de desecado, obteniéndose en la correlación coeficientes de $R = -0.98$ y $R = -0.94$, respectivamente, para F. oxysporum y F. solani (Fig.6).

DISCUSION

Los medios agar-jugo V-8-oxgall-PCNB, agar-peptona-PCNB y Komada resultaron útiles para el aislamiento y cuantificación de propágulos viables de F. oxysporum y F. solani de suelos cultivados del Valle del Guadalquivir (Cuadro 3, 4, 5, 6). El medio agar-Czapeck-Dox-verde malaquita-captán resultó ineficaz y fue desestimado tras los primeros experimentos. Este medio fue utilizado por SINGH y CHAUBE (1970) para estimar el contenido de propágulos hifales de Fusarium spp. en suelos infestados artificialmente. La razón del fracaso de dicho medio en nuestros experimentos no fue investigada posteriormente.

Aunque los tres medios anteriormente citados como útiles resultaron similarmente eficaces para la determinación de la densidad de propágulos viables de F. oxysporum (Cuadro 4, 6), el medio de Komada fue consistentemente menos eficaz -

CUADRO 9. Influencia de la desecación del suelo sobre el número de propágulos viables de Fusarium oxysporum y Fusarium solani detectados con los medios de cultivo agar-Jugo-V-8 oxgall-F, NB y agar-peptona-PCNB en suelos cultivados del Valle del Guadaluquivir.

<u>Fusarium spp.</u>	Con desecación					
	Sin desecación		Con desecación			
	Con ventilación	Sin ventilación	Con ventilación	Sin ventilación		
<u>F. oxysporum</u>	1316 ^x ± 132	a ^y	1195 ± 210	ab	956 ± 251	b
<u>F. solani</u>	1908 ± 226	c	1645 ± 300	cd	1311 ± 180	d

34

^x Los valores se refieren a propágulos/g suelo seco y se expresan como media de seis muestras de suelo (Cuadro 7,8) seguida de su desviación típica

^y Valores de una misma fila con una letra común no difieren significativamente (P=0.01) según el contraste de diferencia mínima significativa (LSD).

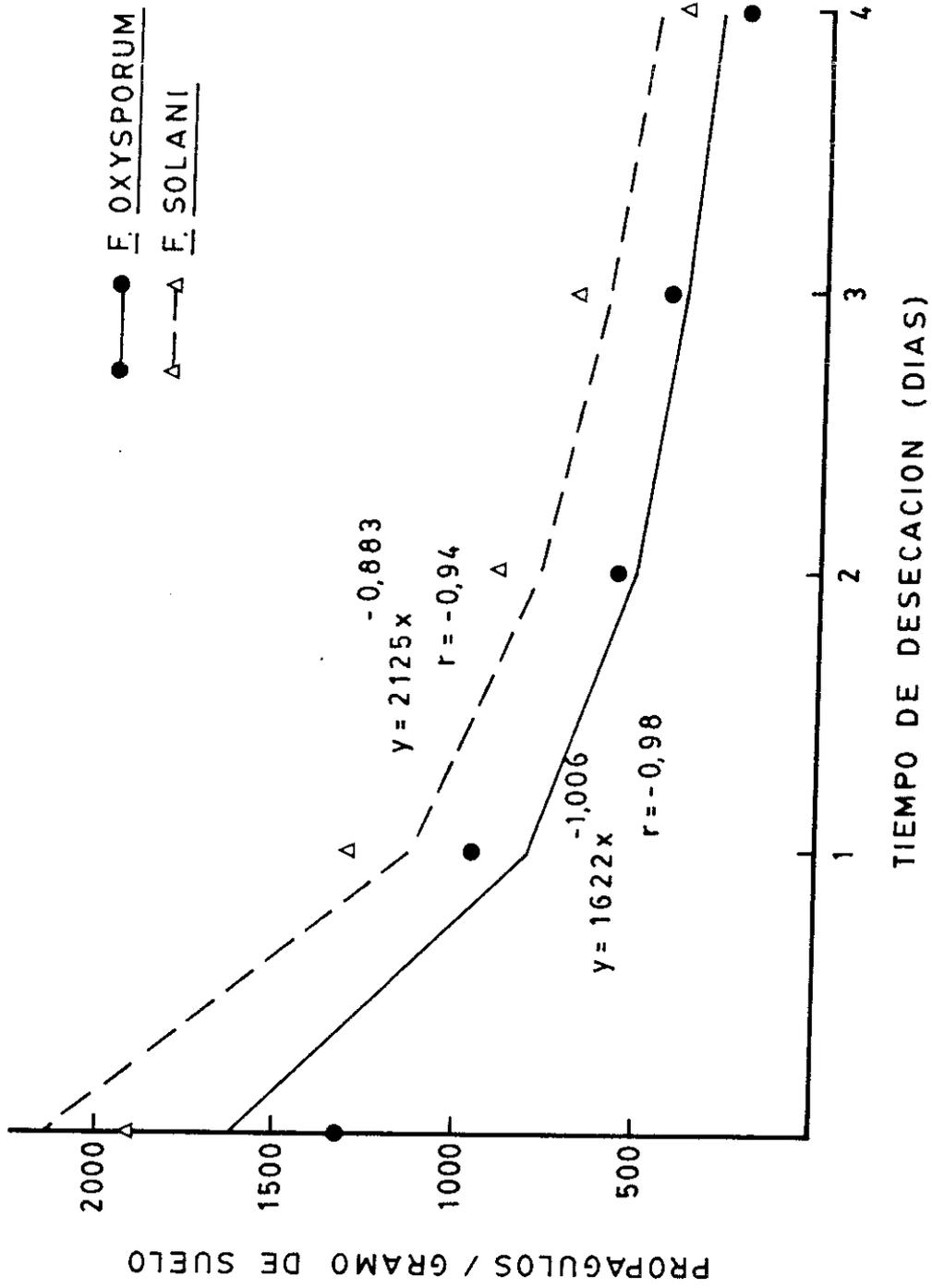


Fig. 6. Variación de la densidad de propágulos viables de Fusarium oxysporum y Fusarium solani detectados en suelos cultivados y el tiempo de desecación del suelo a 28±3 C

que el agar-jugo V-8-oxgal-PCNB y el agar-peptona-PCNB para estimar la densidad de propágulos viables de F. solani (Cuadro 5, 6). Nuestros resultados están en desacuerdo con los de KOMADA (1977), que concluyó que el medio por él desarrollado es ligeramente superior que el agar-peptona-PCNB para la cuantificación de F. oxysporum y F. solani en suelos naturales infestados artificialmente.

La densidad de propágulos viables de F. oxysporum y F. solani estimada en suelos cultivados con historia del Complejo MPR (Cuadro 3) está dentro del intervalo encontrado por otros autores para enfermedades del mismo tipo (Cuadro 1), y se corresponde con la severidad de los ataques de dicho complejo citada por TRAPERO CASAS y JIMENEZ DIAZ (1983). Asimismo, las densidades de propágulos de ambos hongos encontradas en suelos que han sostenido repetidos cultivos herbáceos, aún sin historia conocida del complejo MPR, están dentro de lo establecido (Cuadro 4, 5, 6). A este respecto, es interesante señalar la diferencia en cuanto a los niveles de población de Fusarium spp. encontrados en un suelo no cultivado (encinar en Santa María de Trassierra) (Cuadro 2) comparados con los propios suelos intensamente cultivados (Cuadros 2, 3, 4, 5, 6).

La práctica de la desecación o no desecación de las muestras de suelo, previa al procesado de éstas para el aislamiento y cuantificación de su contenido en propágulos viables de F. oxysporum y F. solani, tuvo una influencia errática, carente de patrón sistemático, cuando se consideraron los distintos tipos de suelos analizados (Cuadros 7, 8). En ocasiones, y fundamentalmente en el caso de F. oxysporum, el procesado sin desecación previa resultó en una densidad de propágulos viables ligeramente superior a la obtenida con la desecación, probablemente debido a la detección con la primera de estructuras fúngicas tales a trozos de hifas que son afectadas letal--

mente por la desecación prolongada.

La influencia errática de la desecación o no desecación previas resulta probablemente de factores edafológicos y biológicos de los suelos muestreados, incluyendo el nivel de infestación en ellos de F. oxysporum y F. solani. No obstante, cuando se considera la densidad media de propágulos viables para los varios suelos muestreados, los valores obtenidos con o sin desecación son aceptablemente próximos. En razón de ello, y dado que la desecación previa de las muestras de suelo facilita su manejo y permite una mejor homogeneización, resulta conveniente adoptar dicha práctica para realizar su análisis. Además, la reducción significativa de la densidad de propágulos de F. oxysporum y F. solani que hemos observado cuando las muestras se desecan durante 4 días, aconseja realizar el análisis tan pronto como las muestras puedan ser homogeneizadas adecuadamente, lo cual suele ocurrir tras 24 hr a 28 ± 3 C.

En conclusión, y dada la similar eficacia de los medios agar-jugo V-8-oxgal-PCNB y agar-peptona-PCNB para distinguir selectivamente las colonias de F. oxysporum y F. solani, así como para cuantificar la densidad de propágulos viables de ambos en suelos cultivados del Valle del Guadalquivir, resulta conveniente la utilización de ambos medios con muestras de suelos desecadas 24 hr a 28 ± 3 C en ambiente aireado, para investigar sistemática y cuantitativamente la distribución de ambos hongos en suelos cultivados de dicha zona.

CAPITULO II

DENSIDAD DE PROPAGULOS Y DISTRIBUCION VERTICAL DE
FUSARIUM OXYSPORUM SCHLECHT. Y FUSARIUM SOLANI (MART.) APPL. ET
WR. EN SUELOS CULTIVADOS DE ANDALUCIA OCCIDENTAL

INTRODUCCION

El cultivo del garbanzo (Cicer arietinum L.) es severa y extensamente afectado por el complejo de enfermedades Marchitez y Podredumbre de Raíz (MPR), que incluye como principales agentes biotipos de Fusarium oxysporum y F. solani (sensu lato) (TRAPERO CASAS y JIMENEZ DIAZ, 1983).

Ambas especies fúngicas son típicas componentes de la microflora del suelo e infectan garbanzo a través de las partes subterráneas de la planta. La severidad de los ataques está relacionada pues con la cantidad de propágulos capaces de actuar como inóculo que existen en el perfil del suelo que exploran las raíces del garbanzo.

La cantidad de propágulos viables de Fusarium spp. existentes en el suelo ha sido estimada generalmente de forma indirecta, enumerando las colonias desarrolladas en medios selectivos a partir de diluciones de un peso conocido de suelo (ABAWI y LORBEER, 1971; BOUHOT y ROUXEL, 1971; BURKE et al., 1972; DRYDEN et al., 1984; MAROIS et al., 1983; NASH y SNYDER, 1962; TAMIMI y HADWAN, 1980). En anteriores investigaciones (Capítulo I) hemos puesto de manifiesto la validez de los medios agar-peptona-PCNB (NASH y SNYDER, 1962; PAPAIVIZAS, 1967) y agar-jugo V-8-oxgall-PCNB (BOUHOT y ROUXEL, 1971; PAPAIVIZAS, 1967) para aislar F. oxysporum y F. solani de suelos cultivados del Valle del Guadalquivir, así como para estimar la densidad de propágulos viables de ambas especies en dichos suelos. Ambos medios selectivos han sido utilizados posteriormente para

determinar la densidad de propágulos viables de F. oxysporum y F. solani en una amplia gama de suelos cultivados o nó de garbanzo, representativos del Valle del Guadalquivir, así como la distribución de ambas especies en el perfil de la capa arable de los mismos. En este Capítulo II presentamos los resultados de dichas investigaciones, así como los de otras desarrollados para determinar la variación estacional de F. oxysporum y F. solani en una parcela con historia de severos ataques de MPR en el término de Montilla (Córdoba) (TRAPERO CASAS y JIMENEZ DIAZ, 1983).

MATERIALES Y METODOS

En Junio de 1983 se muestrearon 17 campos con historia de ataques de MPR (TRAPERO CASAS y JIMENEZ, 1983) distribuidos en las provincias de Córdoba, Jaén y Sevilla (Fig. 7). Posteriormente, en el período Marzo-Junio de 1984 se muestrearon 57 campos cultivados elegidos al azar y distribuidos en las provincias de Cádiz, Córdoba, Jaén y Sevilla (Fig. 7).

En cada campo se anotó el cultivo actual así como los anteriores y se tomaron muestras de suelos en 3-15 puntos según un recorrido del mismo en zig-zag (HAU et al., 1982), variando el número en función de la superficie de la parcela. En cada punto de muestreo se abrió una calicata de la que se tomaron las muestras con un tubo metálico hueco previamente esterilizado (Capítulo I), a 5, 17.5 y 30 cm de profundidad en 1983 y a 5-17.5 cm en 1984 (Fig. 1).

Las muestras de la misma profundidad de cada campo se mezclaron en una bolsa de plástico, y se transportaron al laboratorio donde se mantuvieron a 3 C en un frigorífico hasta ser convenientemente procesadas, no más tarde de 2 semanas des

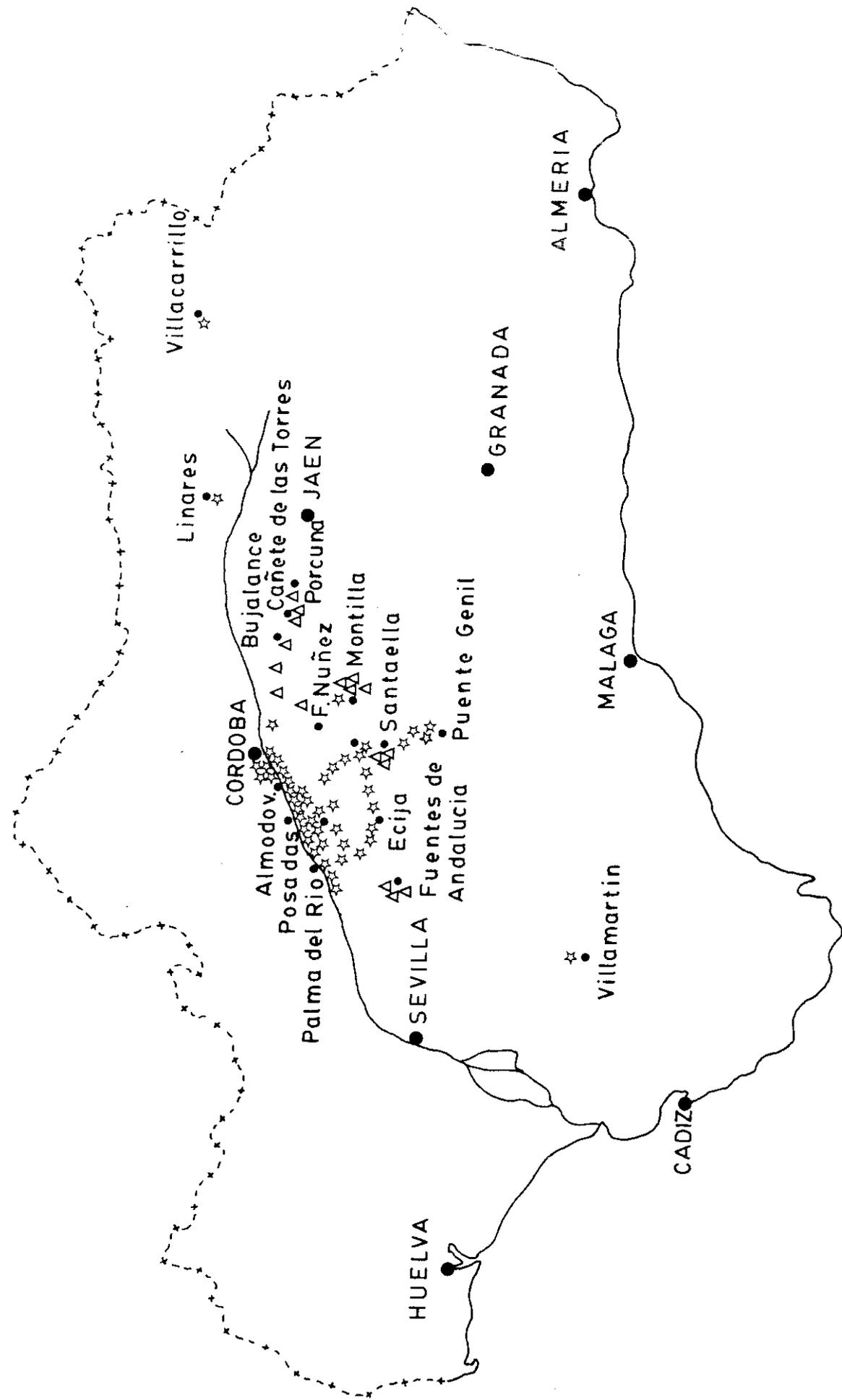


Fig. 7. Distribución de campos cultivados muestreados sobre el contenido de Fusarium solani en el suelo en 1983 (Δ) y 1984 (☆)

pués del muestreo. Una parte alícuota de la muestra total obtenida de cada campo se remitió al Laboratorio Regional Agrario de Córdoba (Carretera de Casillas s/n, Córdoba) para un análisis edafológico completo de las mismas.

Para el análisis sobre el contenido de F. oxysporum y F. solani, las muestras de suelo se desecaron al aire (28 \pm 3 C durante 24 hr), homogeneizaron y tamizaron apropiadamente (Capítulo I), y se suspendieron en AA al 0.1% en las proporciones (mg de suelo seco/ml) de 2.5 y 5, 6.6 y 10, para las muestras a 5, 17.5 y 30 cm, respectivamente (Capítulo I). El contenido en F. oxysporum y F. solani en cada suspensión de suelo se contrastó sobre agar-jugo V-8-oxgall-PCNB y agar-peptona-PCNB (Capítulo I).

La variación estacional de las poblaciones de F. oxysporum y F. solani se han investigado en una parcela con historia de severos ataques de MPR en el término de Montilla (Córdoba). Dicha parcela ha sido cultivada de garbanzo repetidamente y tuvo una incidencia de 100% de plantas muertas en cultivares susceptibles en 1981 (TRAPERO CASAS y JIMENEZ DIAZ, 1983). De dicha parcela se tomaron muestras de suelo a 5-17.5 cm en tres puntos de cada una de cinco zonas en que se dividió la misma, a intervalos de tiempo irregulares en el período Marzo 1983 - Enero 1985. Las muestras de suelo se procesaron para determinar la densidad de propágulos viables de F. oxysporum y F. solani, utilizando agar-peptona-PCNB y agar-jugo V-8-oxgall-PCNB según el método antes descrito.

Los datos sobre la densidad de propágulos viables obtenidos en el transcurso de los varios experimentos se analizaron estadísticamente según el contraste χ^2 o análisis de varianza y subsecuente comparación de medias.

RESULTADOS

Fusarium oxysporum y F. solani se aislaron de suelo de los 64 campos muestreados en el Valle del Guadalquivir en 1983 y 1984. La densidad de propágulos viables de ambas especies osciló entre 167 y 6467 propágulos/g de suelo seco, si bien el 84% de los campos muestreados contenía entre 500-2500 propágulos/g y el 16% restante tenía densidades superiores o inferiores a aquellas (Fig. 8).

Las características edafológicas de 47 de los 64 campos muestreados se presenta en el Cuadro 10.

La posible asociación de la densidad de población de F. oxysporum y F. solani con algunas características de los campos muestreados se recoge en los Cuadros 11, 12. La densidad de propágulos viables de F. oxysporum fué máxima en los suelos arcillosos que habían sido cultivados de garbanzo al menos una vez en los 3 últimos años. Dicha densidad fue significativamente mayor que la obtenida de suelos franco-arcillosos cultivados de garbanzo, o de suelos arcillosos ocupados por otros cultivos (Cuadro 11). Contrariamente, la densidad de población de F. solani no varió significativamente con la textura de suelo en suelos cultivados o no de garbanzo, y solo en suelos franco-arcillosos fue significativamente mayor en suelos con historia de garbanzo que en los usados con otros cultivos (Cuadro 12).

La distribución vertical de F. oxysporum y F. solani en el perfil del suelo se estudió en 17 campos con historia de ataque de MPR (Cuadro 13, 14). La densidad de propágulos viables de ambas especies fúngicas varió con los campos y disminuyó en general con la profundidad de suelo muestreado, siendo para ambas especies más elevada a 5 cm que a 30 cm (Cuadro 13, 14; Fig. 9).

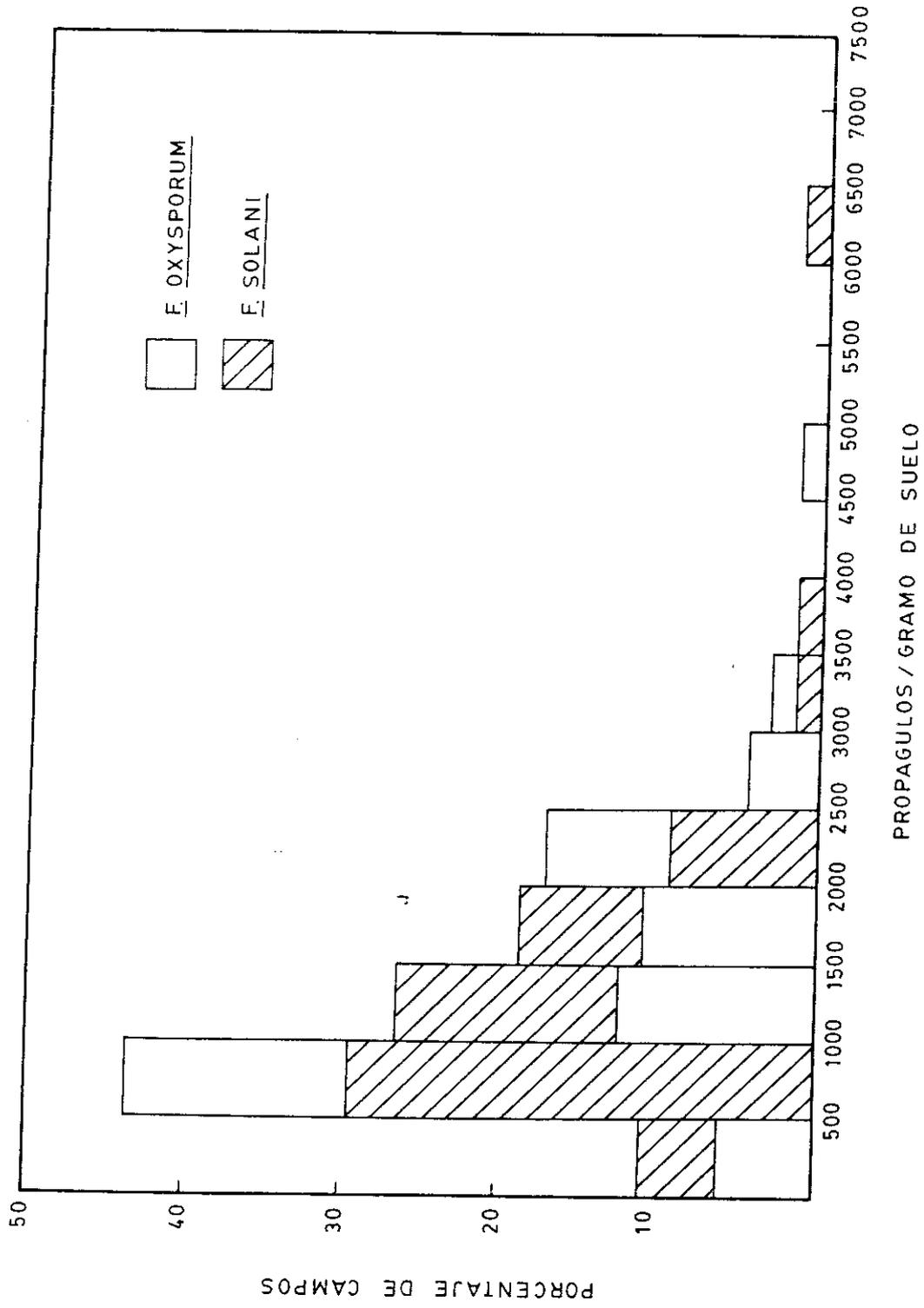


Fig. 8. Densidad de población de *Fusarium oxysporum* y *Fusarium solani* en 6/4 suelos cultivados del Valle del Guadalquivir

CUADRO 10. Características edafológicas de los suelos muestreados en el Valle del Guadalquivir sobre el contenido de Fusarium oxysporum y F. solani

Textura	Número de campos	Composición en			Materia orgánica (%)	pH	N (%)	P (ppm)	K (ppm)	Capacidad de cambio (mg/100 g)
		Arena (%)	Limo (%)	Arcilla (%)						
Arcillosa (arc.)	23	13.4	32.3	54.2	1.36	8.18	0.113	12.28	466	31.07
Franca. arcillosa	13	30.6	36.2	33.2	1.10	8.19	0.092	14.67	386	17.32
Franca (Frc.)	4	39.1	37.4	23.5	1.13	7.68	0.089	33.25	300	15.50
Arcillo. limosa	3	23.5	37.3	39.2	1.08	8.10	0.085	13.75	294	24.03
Frc. Arc. arenosa	4	55.2	20.1	24.7	1.39	7.63	0.093	25.53	278	13.30

a Los análisis se efectuaron por el Laboratorio Agrario Regional de Córdoba en muestras de suelo recogidas en Junio 1983 y Marzo-Junio 1984.

CUADRO 11. Densidad de propágulos viables (Número/g de suelo seco) de Fusarium oxysporum en suelos cultivados del Valle del Guadalquivir según la textura y plantas cultivadas en ellos

Cultivo	Número de campos	Textura		
		Arcillosa (Arc.)	Franca (Frc.)	Frc. arc. arenosa
Garbanzo ^x	17	2228 a ^z	1103 b	-
Otros ^y	30	1118 b	1057 b	1345 b
				1013 b
				1238 b

^x Campo que hasta el momento del muestreo había sido cultivado de garbanzo al menos una vez en los 3 últimos años.

^y Ajo, algodón, arena, girasol, habas, olivo, remolacha o trigo.

^z Valores de una misma fila o columna con una letra común no difieren significativamente (P=0.10) según el contraste)².

CUADRO 12. Densidad de propágulos viables (Número/g de suelo seco) de Fusarium solani en suelos cultivados del Valle del Guadalquivir según la textura y plantas cultivadas en ellos.

Cultivo	Número de campos	Arcillosa (Arc.)	Franca Arcillosa	Franca (Frc.)	Arcillo limosa	Frc. arc. arenosa
Garbanzo ^x	17	1772 a ^z	1732 a	-	-	-
Otros ^y	30	1229 ab	1033 b	1133 b	1208 b	794 b

^x Campo que hasta el momento del muestreo había sido cultivado de garbanzo al menos una vez en los 3 últimos años.

^y Ajo, algodón, arena, girasol, habas, olivo, remolacha o trigo.

^z Valores de una misma fila o columna con una letra común no difieren significativamente (P=0.10) según el contraste χ^2 .

CUADRO 13. Densidad de propágulos viables (Número/g de suelo seco) de Fusarium oxysporum en la capa arable de 17 campos cultivados de garbanzo en el Valle del Guadalquivir

Término municipal	Textura del suelo	Profundidad de suelo (cm)		
		5	17.5	30
Bujalance	Franca-arcillosa	934 ^x ± 158 ^y a	1075 ± 87 a	584 ± 79 b
Bujalance	Franca-arcillosa	767 ± 158 b	1275 ± 229 a	867 ± 106 b
Cañete de las Torres	Franca-arcillosa	2200 ± 231 a	1300 ± 190 b	600 ± 59 c
Cañete de las Torres	Arcillosa	800 ± 173 a	675 ± 205 a	267 ± 87 b
Cañete-Porcuna	Franca-arcillosa	867 ± 210 a	400 ± 265 b	450 ± 106 b
Fuentes de Andalucía	Arcillosa	467 ± 158 c	1500 ± 274 a	850 ± 106 b
Fuentes de Andalucía	Arcillosa	1100 ± 200 b	1875 ± 229 a	1300 ± 134 b
Haza de Alcántara	Arcillosa	4734 ± 645 a	1700 ± 119 b	634 ± 76 c
Córdoba	Arcillosa	2334 ± 307 a	1463 ± 168 b	1050 ± 106 c
Montilla	Arcillosa	2134 ± 231 a	2100 ± 303 a	1167 ± 106 c
Montilla	Arcillosa	3467 ± 253 a	1875 ± 225 b	1684 ± 297 b
Montilla	Arcillosa	2133 ± 361 a	1675 ± 338 b	767 ± 155 c
Santacruz	Arcillosa	2300 ± 365 b	2675 ± 158 a	1117 ± 202 c
Santaella	Arcillosa	2534 ± 216 a	2525 ± 231 a	1284 ± 108 b
Santaella	Arcillosa	3100 ± 200 a	1575 ± 260 b	467 ± 58 c
Santaella	Arcillosa	2533 ± 361 a	1925 ± 377 b	1450 ± 153 c
Santaella	Arcilloso	1734 ± 158 a	1500 ± 130 a	300 ± 106 b
MEDIA		2008 ± 1093 a	1592 ± 599 b	875 ± 405 c

x Valor medio y desviación típica resultante de conteos en tres placas de agar-peptona-PCNB y tres de agar-jugo V-8-oxgall-PCNB.

y Medias de una misma fila con una letra en común no difieren significativamente (P=0.01) según el contraste de diferencia significativa mínima (LSD).

CUADRO 14. Densidad de propágulos viables (Número/g de suelo seco) de Fusarium solani en la capa arable de los campos cultivados de garbanzo en el Valle del Guadalquivir

Término municipal	Textura del suelo	Profundidad de suelo (cm)		
		5	17.5	34
Bujalance	Franca-arcillosa	2367 ^x ± 616 a ^y	1817 ± 200 b	1400 ± 221 c
Bujalance	Franca-arcillosa	1067 ± 268 a	1250 ± 162 a	1317 ± 276 a
Cañete de las Torres	Franca-arcillosa	2267 ± 256 a	1725 ± 397 b	1400 ± 330 b
Cañete de las Torres	Arcillosa	1667 ± 353 a	925 ± 273 b	317 ± 29 c
Cañete-Porcuna	Franca-arcillosa	1787 ± 326 a	1575 ± 205 b	1300 ± 106 b
Fuentes de Andalucía	Arcillosa	1667 ± 268 a	800 ± 158 b	633 ± 87 b
Fuentes de Andalucía	Arcillosa	733 ± 322 a	875 ± 87 a	833 ± 162 a
Haza de Alcántara	Arcillosa	6467 ± 506 a	750 ± 150 b	283 ± 29 c
Córdoba	Arcillosa	1167 ± 115 a	775 ± 119 b	1417 ± 79 a
Montilla	Arcillosa	2433 ± 173 a	1275 ± 225 b	1117 ± 104 b
Montilla	Arcillosa	1933 ± 210 a	1025 ± 242 b	1050 ± 337 b
Montilla	Arcillosa	433 ± 253 b	975 ± 87 a	567 ± 58 b
Santacruz	Arcillosa	933 ± 266 a	750 ± 87 a	967 ± 133 a
Santaella	Arcillosa	3100 ± 532 a	2375 ± 377 b	1616 ± 127 c
Santaella	Arcillosa	1433 ± 361 a	1450 ± 458 a	667 ± 106 b
Santaella	Arcillosa	1734 ± 210 a	1075 ± 314 a	833 ± 285 a
MEDIA		1942 ± 1320 a	1248 ± 460 b	974 ± 189 b

^x Valor medio y desviación típica resultante de conteos en tres placas de agar-peptona-PCNB y tres de agar-jugo V-8-oxgall-PCNB.

^y Medias de una misma fila con una letra en común no difieren significativamente (P=0.01) según el contraste de diferencia significativa mínima (LSD).

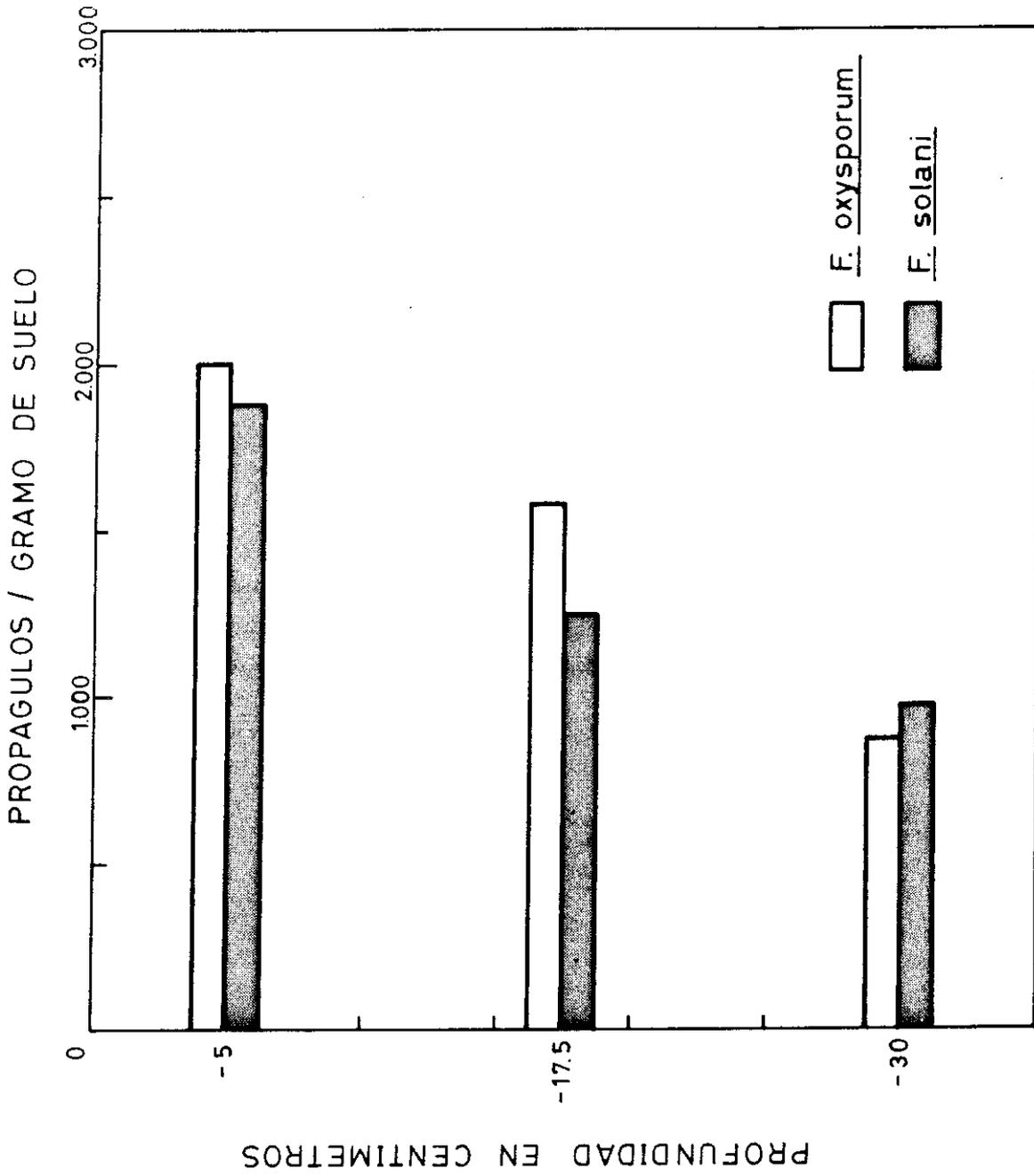


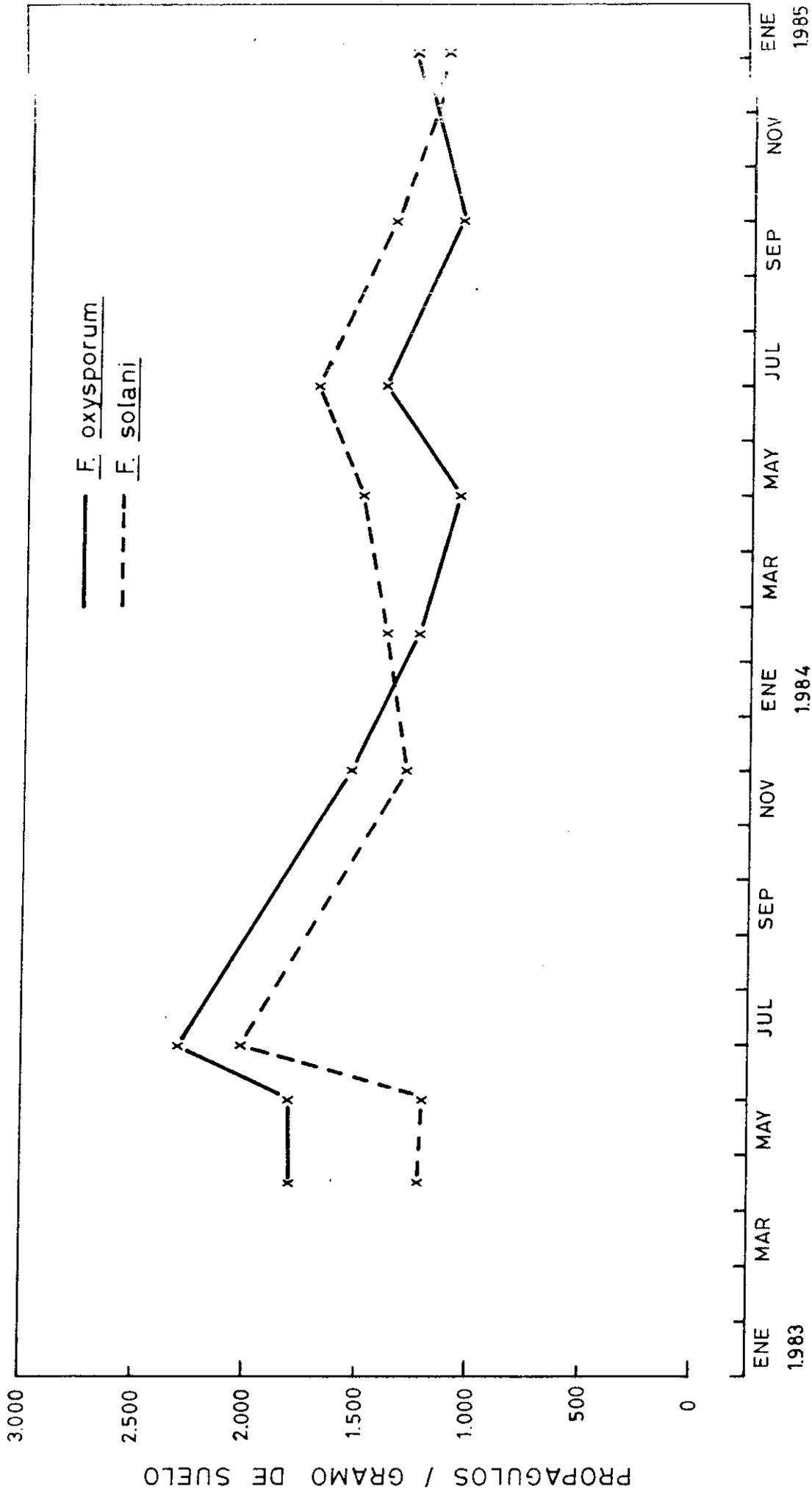
Fig. 9. Distribución vertical promedio de F. oxysporum y F. solani en 17 campos con historia de cultivo de garbanzo en el Valle del Guadalquivir

La variación estacional de la densidad de propágulos viables de F. oxysporum y F. solani a lo largo de 22 meses, en un campo con historia de ataques severos de MPR en Montilla, se presenta en la Fig. 10. En los años durante los cuales se realizó el muestreo la densidad de población de las dos especies fue máxima en los momentos próximos a la recolección del cultivo, a partir de los cuales disminuyó progresivamente. Mientras que la población de F. oxysporum disminuyó continuamente hasta el mes de Abril, la de solani lo hizo solo durante los meses de verano y principios de otoño.

DISCUSION

Nuestros resultados (Fig. 8, Cuadro 13, 14) indican que F. oxysporum y F. solani están ampliamente distribuidos en los suelos cultivados del Valle del Guadalquivir, con densidades medias de propágulos viables comprendidos en el intervalo señalado por diversos autores en otros países para sistemas huesped-parásitos similares a los estudiados por nosotros (BURKE et al., 1972; DRYDEN y VAN ALFEN, 1984; NASH y SNYDER, 1962; ROUXEL y BOUHOT, 1971; TAMIMI y HADWAN, 1980).

La densidad de población de F. oxysporum y F. solani fue más alta en suelos que habían sido cultivados de garbanzo que en los utilizados con otros cultivos, predominando la primera especie en suelos arcillosos y la segunda tanto en éstos como en los franco-arcillosos (Cuadro 11, 12). Además, en suelos cultivados de garbanzo y con historia de ataques de MPR, las poblaciones de ambas especies, aún siendo elevadas en el perfil 5-30 cm, son más numerosas en la capa más superficial del suelo y disminuyen con la profundidad. La disponibilidad de tan altas densidades de propágulos viables en el perfil del suelo, que obligadamente han de explorar las raíces del garbanzo en su crecimiento, deben favorecer la penetración de la



DATOS DE MUESTREOS

Fig. 10. Variación estacional de la densidad de propágulos viables (Número/g de suelo) de F. oxysporum y F. solani en el perfil 5-17.5 cm de un campo con historia de severa Marchitez y Podredumbre de Raíz del garbanzo en Montilla (Córdoba)

plántula durante las primeras fases de extensión radicular y emergencia del suelo. Otras investigaciones en nuestro Departamento (BASALLOTE UREBA y JIMENEZ DIAZ, 1984) sugieren que la invasión de la planta de garbanzo por F. oxysporum f. sp. ciceri tiene lugar preferentemente por el nudo cotiledonario hipogeo. Asimismo, la necrosis en dicha zona característica de infecciones por F. solani (TRAPERO CASAS y JIMENEZ DIAZ, 1983; CABRERA DE LA COLINA y JIMENEZ DIAZ, datos no publicados) también sugiere que puede ser zona de penetración preferente por el citado patógeno. Ambos casos no excluyen la posibilidad de penetraciones a través del joven ápice radicular, lo que en definitiva resalta la importancia de las elevadas densidades de propágulos de F. oxysporum y F. solani encontradas en la zona más superficial del perfil del suelo.

La asociación de elevadas densidades de propágulos viables de F. oxysporum y F. solani con el cultivo previo de garbanzo en la parcela (Cuadro 11, 12, 13, 14), y el mantenimiento de dichas densidades, aún con ligeras fluctuaciones entre cultivos sucesivos (Fig. 10), señalan la importancia de considerar la utilización de cultivos no susceptibles. Como medio de lucha contra el Complejo MPR. A tal efecto es necesario obtener información precisa sobre la tasa de mortalidad de propágulos de ambos hongos fitopatógenos en el suelo en ausencia de sus huéspedes, así como de los factores que la determinan. La información de dicha naturaleza debe ir acompañada de aquella que establezca umbrales de densidad de inóculo que resulten en una cantidad de enfermedad tolerable por su impacto económico. A este respecto es importante señalar que nuestros resultados sobre densidad de propágulos viables no son suficientes para inferir la capacidad de éstos de actuar como inóculo, y son necesarias posteriores investigaciones para determinar si todos ellos, o solo una fracción de los mismos, son patogénicos.

CAPITULO III

PATOGENICIDAD DE AISLAMIENTOS DE
FUSARIUM OXYSPORUM SCHLECHT. Y F. SOLANI (MART.) APPL. ET WR.
OBTENIDOS DE SUELOS DEL VALLE DEL GUADALQUIVIR

INTRODUCCION

En anteriores investigaciones (Capítulo II) hemos puesto de manifiesto que Fusarium oxysporum y F. solani (sensu lato) están ampliamente distribuidos en suelos cultivados del Valle del Guadalquivir, con densidades de población de propágulos viables comprendidas en el intervalo encontrado por otros autores para sistemas huésped-parásitos similares a los investigados por nosotros (BURKE et al., 1972; DRYDEN y VAN ALFEN, 1984; NASH y SNYDER, 1962; ROUXEL y BOUHOT, 1971; TAMIMI y HADWAN, 1980). Dicha densidad de población fue además más alta en suelos que habían sido cultivados anteriormente de garbanzo (Cicer arietinum L.), que en suelos similares cultivados de otras especies vegetales.

F. oxysporum y F. solani (sensu lato) son los principales agentes de enfermedades incluidas en el complejo Marchitez y Podredumbre de Raíz (MPR), que afecta al garbanzo extensa y severamente en el Valle del Guadalquivir (TRAPERO CASAS y JIMENEZ DIAZ, 1983). Biotipos de F. oxysporum f. sp. ciceri, que forman colonia de color salmón en agar patata-dextrosa (PDA) bajo luz próxima a la ultravioleta (NUV), inducen Marchitez o Amarillez Vasculares en ausencia de necrosis radiculares (TRAPERO CASAS y JIMENEZ DIAZ, 1983). Otros biotipos de F. oxysporum de especialización patogénica no contrastada, pero que forman colonias rojizas en PDA bajo luz NUV, inducen Amarillez No Vascular y necrosis cortical de raíz y cuello de la planta (TRAPERO CASAS y JIMENEZ DIAZ, 1983).

Los aislamientos de F. solani (sensu lato) obtenidos de garbanzos afectados de MPR inducen Podredumbre Negra de Raíz y Cuello, y una Amarillez No Vascular que resulta difícil de distinguir de la anterior en condiciones de campo (TRAPERO CASAS y JIMENEZ DIAZ, 1983). Un aislamiento de F. solani característico por poseer macroconidias más largas y delgadas que los normales de la especie, así como por formar microesclerocios y fiálidas - de microconidias de gran longitud, y más tarde identificados como F. eumartii Carpenter, fué significativamente más virulenta - que los típicos de F. solani en inoculaciones artificiales (TRAPERO CASAS y JIMENEZ DIAZ, 1983).

F. oxysporum y F. solani son típicos componentes de la microflora del suelo, cuyas poblaciones pueden incluir tanto aislamientos patogénicos como no-patogénicos. Por lo tanto, la información sobre la densidad de propágulos viables de ambas especies existentes en suelos cultivados, obtenida por procedimiento in vitro no es suficiente para inferir su capacidad como inóculo y por lo tanto para estimar el potencial de enfermedad en los mismos.

En este Capítulo III presentamos los resultados de investigaciones realizadas para determinar la capacidad patogénica sobre garbanzo, de aislamiento de F. oxysporum y F. solani obtenidos de muestras de suelos cultivados del Valle del Guadalquivir.

MATERIALES Y METODOS

La patogenicidad de 155 aislamientos de F. oxysporum y 135 de F. solani (sensu lato) obtenidos de la forma descrita en el Capítulo I (Pág.17) (Fig.11), de suelos muestreados durante 1983 y 1984 en diferentes zonas (Fig. 7) del Valle del Guadalquivir, se investigó en tres series de experimentos que difirieron en los materiales y métodos utilizados. Las variaciones experimentales en dichos experimentos, respecto a la metodología general que se describe a continuación, serán señaladas en los epígrafes correspondientes.

Los experimentos se efectuaron en una cámara de crecimiento de plantas Koxka (Ibérica del Frío, S.A., Polígono de Can dabeu s/n, Apartado 378, Pamplona) y en un invernadero de cristal, climatizado, del Departamento de Patología Vegetal, ETSIA, Universidad de Córdoba. En la cámara Koxka las plantas crecieron a 26 ± 2 C durante el día y a 20 ± 2 C durante la noche con una iluminación de 13.000 lux 14 h/día proporcionada por tubos fluorescentes suplementados con lámparas incandescentes.

En todos los experimentos se utilizaron semillas de garbanzo desinfestadas superficialmente durante 2 min en una solución acuosa al 50% de lejía blanca comercial que contenía 50 g/L de cloro activo. Tras ser desecadas al aire las semillas desinfestadas se dispusieron para germinar en oscuridad en cámaras húmedas a 28 ± 3 C en condiciones asépticas.

En los diferentes experimentos se utilizaron los cultivos PV-24 y PV-25 de semilla blanca, grande (peso medio 0.56g) y rugosa, ampliamente utilizados en la Campaña del Guadalquivir; el cv. P-2245 procedente del "International Crops Research Institute for the Semi-Arid Tropics" (ICRISAT), de semilla pequeña (peso medio 0.2 g o menos), color crema pálido y poco rugosa.

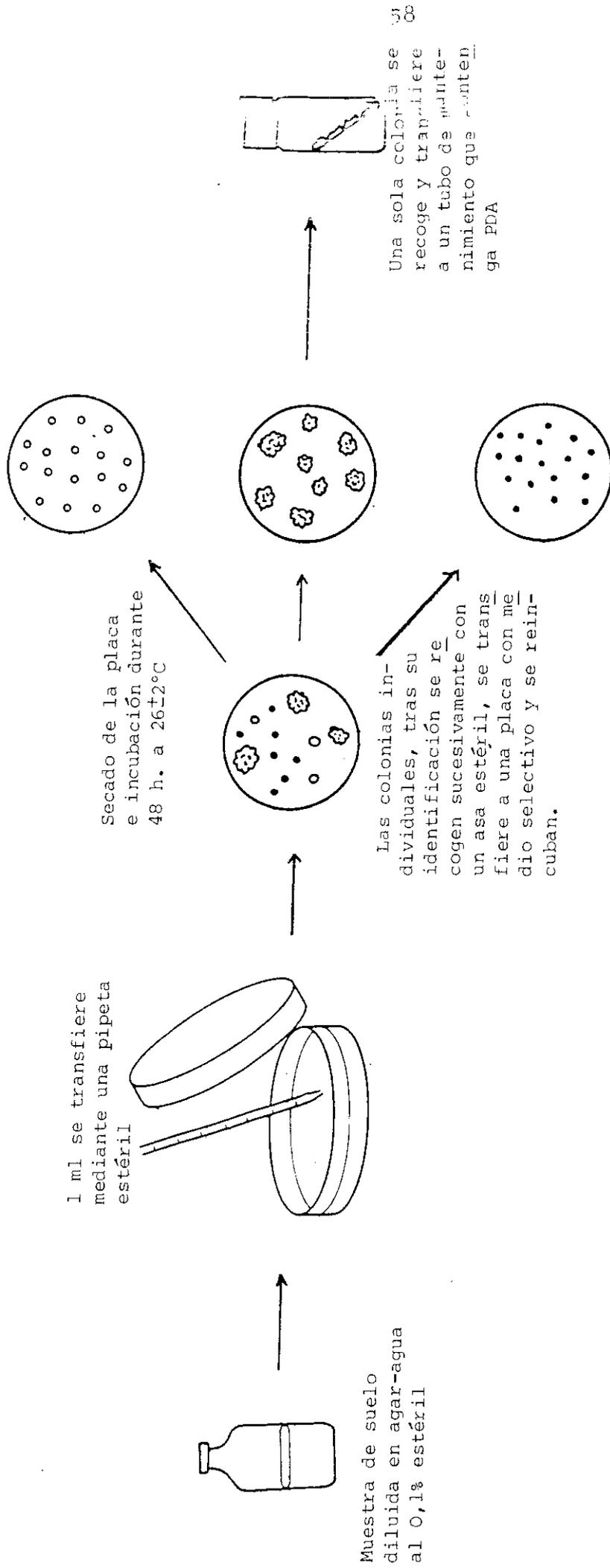


Fig. 11 Aislamiento de Fusarium oxysporum y Fusarium solani del suelo mediante la técnica de dilución en placa

En los experimentos que incluyeron aislamientos de F. oxysporum se utilizaron como referencias el aislamiento FO-8012 causante de Marchitez Vascular y el FO-7952 causante de Amarillez Vascular. Similarmente, en los experimentos que incluyeron F. solani se utilizó como referencia el aislamiento FS-8013 causante de Podredumbre Negra de Cuello y Raíz. Los aislamientos FO-8012 y FS-8013 fueron aislados en 1980 de plantas de garbanzo afectadas del Complejo sintomatológico Amarillez y Marchitez Severas (AM) en Bujalance (Córdoba); y el aislamiento FO-7952 fué aislado en 1979 de plantas afectadas del Complejo AM en Marchena (Sevilla). La patogenicidad de dichos aislamientos ha sido contrastada experimentalmente (TRAPERO CASAS y JIMENEZ DIAZ, 1983).

El cultivo e inoculación de las plantas con los varios aislamientos se realizó por uno de los tres métodos que se describen.

En un primer método (I), las plantas del cultivar PV-24 crecieron en macetas de arcilla de 13 cm de diámetro y 0.7 L de volúmen (3 plantas/maceta), conteniendo 0.6 L de una mezcla (TAL) compuesta de turba, arena y limo (1:1:1, en volúmen), suplementada con 400 g de Superfosfato de cal 18%, 40 g de Nitrato potásico, 40 g de Sulfato potásico, 20 g de Carbonato cálcico y 10 g de Sulfato magnésico por 100 L de mezcla. Ambos, mezcla TAL y macetas se esterilizaron a 1.25 Kp/cm² durante 3 hr. A partir de los 10 días de la siembra y con intervalo de 1 semana, las plantas de cada maceta recibieron 100 ml de una solución nutritiva (HOAGLAND y ARNON, 1950).

El inóculo consistió en una dilución al 4% en agua estéril, de conidias y micelio obtenidos de un cultivo en caldo de patata-dextrosa (CPD), donde habían crecido los distintos aislamientos de F. oxysporum y F. solani en agitación continua a 150 rpm y temperatura ambiente en el laboratorio (20 - 27 C) du-

rante 10 días (TRAPERO CASAS y JIMENEZ DIAZ, 1983). Las concentraciones de conidias en la dilución varió con los diferentes aislamientos y experimentos ($2-5.6 \cdot 10^6$ conidias/ml).

En un segundo método (II), plantas del cultivar PV-2245 de 10 días de crecimiento en arena estéril (1.25 Kp/cm^2 durante 3 hr) se trasplantaron, sin herir las raíces, a vasos de plástico de 70 mm de diámetro conteniendo 200 ml de agua desionizada. Se dispusieron 4 plantas/vaso que se mantuvieron separadas y erectas mediante tiras de papel adhesivo cruzadas sobre el borde del vaso. La inoculación se realizó adicionando al agua desionizada en cada vaso 5 ml de una suspensión de conidias obtenida de un cultivo en CPD, que había crecido en agitación continua a 150 rpm y temperatura ambiente de laboratorio (20-27 C) durante 10 días. La concentración de conidias fluctuó entre $5.5-11.5 \cdot 10^6$ conidias/ml con los diferentes aislamientos y experimentos. Tras la inoculación, los vasos con plantas se colocaron en agitación continua a 100-120 rpm y 24 ± 8 C en un invernadero de cristal climatizado. En el transcurso del experimento se repuso el agua consumida en cada vaso cada 3 días (TRAPERO CASAS y JIMENEZ DIAZ, 1983).

En un tercer método (III) las plantas del cultivar PV-25 en la cámara Koxka, crecieron en vasos de plástico de 70 mm de diámetro (3 plantas/vaso), que contenían 0.2 L de vermiculita esterilizada (1.25 Kp/cm^2 durante 3 hr) abonada con 60 ml de solución nutritiva (HOAGLAND y ARNON, 1950). Las plántulas se inocularon 1 semana después de la siembra, depositando alrededor de la base del tallo tres discos de PDA de 4 mm de diámetro con micelio del hongo y cubriendo posteriormente los mismos con vermiculita estéril humedecida (VAN ETTEN, 1974).

Las reacciones de las plantas a la inoculación se evaluaron cada 10 días a partir del décimo día posterior a la ino-

culación. La severidad de la reacción se evaluó según las escalas recogidas en los Cuadro 15,16,17.

Experimentos 1 y 2 (Cultivo de las plantas en suelo)

Estos experimentos se llevaron a cabo en una cámara - Koxka de crecimiento de plantas y en invernadero, respectivamente, y tuvieron por objeto determinar la patogenicidad de 15 aislamientos de F. oxysporum en el primero y de 25 aislamientos de F. oxysporum más 15 aislamientos de F. solani (sensu lato) en el segundo. Dichos aislamientos se obtuvieron al azar en número de 1 por campo, de las colonias desarrolladas sobre los medios de cultivo agar-jugo V-8-oxgall-PCNB o agar-peptona-PCNB en placas petri durante el procesado de las muestras de suelos (Capítulo II) procedentes de 41 campos del Valle del Guadalquivir con o sin historia de severos ataques de MPR.

Las plantas crecieron durante 2 meses (Noviembre-Diciembre de 1983 en la cámara Koxka y Abril-Mayo de 1984 en el invernadero) en macetas de arcilla que contenían la mezcla TAL infestada artificialmente (método I). La mezcla TAL en cada maceta se infestó adicionando sobre su superficie, y justo tras efectuar la siembra, 100 ml de una suspensión de conidias y micelio en agua estéril. Para cada aislamiento fúngico se inocularon 9 plantas en tres repeticiones (macetas, 3 plantas/maceta), que se distribuyeron en bloques completamente al azar. Nueve plantas en tres macetas igualmente tratadas excepto por la ausencia de inóculo en el sustrato sirvieron como testigo.

Experimentos 3,4,5 y 6 (Cultivo de las plantas en medio líquido)

Estos experimentos tuvieron por objeto determinar la patogenicidad de 115 aislamientos de F. oxysporum procedentes de

CUADRO 15. Escala de severidad de la reacción en la parte aérea del garbanzo a la inoculación con los
lamientos de Fusarium oxysporum y F. solani (sensu lato)^x

Valor de severidad	Descripción
1	No síntomas
2	Clorosis, amarillez y/o necrosis de los folíolos en el tercio inferior de la planta.
3	Síntomas de severidad 2 afectando a los dos tercios inferiores de la planta.
4	Síntomas de severidad 2 afectando a toda la planta
5	Planta muerta

^x Tomada de TRAPERO CASAS y JIMENEZ DIAZ (1983).

CUADRO 16. Escala de severidad de la reacción en la parte subterránea del garbanzo a la inoculación con aislamientos de Fusarium oxysporum

Valor de severidad	Descripción
1	No síntomas
2	Necrosis afectando al 25% del sistema radicular de la planta
3	Necrosis afectando al 50% del sistema radicular de la planta
4	Necrosis afectando al 75% del sistema radicular de la planta
5	Necrosis afectando al 100% del sistema radicular de la planta

CUADRO 17. Escala de severidad de la reacción en la parte subterránea del garbanzo a la inoculación con aislamientos de Fusarium solani (sensu lato)

Valor de severidad	Descripción
1	No síntomas
2	Necrosis cortical restringida en el 25% del eje raíz tallo que incluye el hipocotilo y el epicotilo subterráneos
3	Síntomas de severidad 2 afectando al 50% de la citada zona
4	Síntomas de severidad 2 afectando al 75% de la citada zona
5	Síntomas de severidad 2 afectando a toda la zona citada

muestras de suelo de cuatro campos (Bujalance, Cortijo de los Montecitos, Montilla y Santaella) con historia de severos ataques de MPR (TRAPERO CASAS y JIMENEZ DIAZ, 1983). Dichos aislamientos fueron elegidos al azar en número de 30 por campo (excepto en el campo de Montecitos del que se aislaron 25), de las colonias desarrolladas sobre el medio agar-jugo-V-8-oxgall-PCNB en placas petri durante el procesado de las muestras de suelo para la determinación de la densidad de propágulos viables de F. oxysporum en ellos.

La inoculación se realizó adicionando 5 ml de una suspensión de micelio y conidias a vasos con 200 ml de agua desionizada en los que se encontraban las plántulas (método II).

Cada aislamiento de F. oxysporum se contrastó sobre 12 plantas en tres vasos (4 plantas/vaso) que fueron distribuidos completamente al azar sobre la plataforma giratoria. Asimismo, 12 plantas depositadas en tres vasos en ausencia de inóculos sirvieron como testigo.

Las plantas crecieron durante 20 días en los vasos, expuestas al inóculo, transcurridos los cuales se retiraron de los mismos para realizar en cada una de ellas observaciones sintomatológicas y evaluación de severidad de la reacción. Los experimentos referidos se desarrollaron durante los meses de Diciembre de 1984 y Enero-Febrero de 1985.

Experimentos 7, 8 9 y 10 (Cultivo en vermiculita)

Estos experimentos tuvieron por objeto determinar la patogenicidad de 120 aislamientos de F. solani (sensu lato) procedentes de los mismos cuatro campos anteriormente citados. Similarmen- te, dichos aislamientos fueron elegidos al azar en núme-

ro de 30 por campo, de las colonias desarrolladas sobre el medio agar-jugo V-8-oxgall-PCNB en placas petri durante el procesado de las muestras de suelo para determinar la densidad de propágulos viables de F. solani (sensu lato) en ellos.

Para cada aislamiento se inocularon 8 plántulas en tres vasos, e igual número de ellas similarmente tratadas excepto por la ausencia de inóculo sirvieron como testigo. Los vasos con las plántulas constituyeron repeticiones experimentales y se distribuyeron completamente al azar en una cámara Koxka de crecimiento de plantas.

Las plantas se inocularon depositando discos de PDA con micelio alrededor de la base del tallo (método III) y las reacciones se evaluaron sobre la sintomatología y severidad 20 días después de la inoculación. Estos experimentos se desarrollaron paralelamente a los experimentos 3, 4, 5 y 6.

RESULTADOS

Patogenicidad de *Fusarium oxysporum*

a) Cultivo en suelo

Los 40 aislamientos de suelo de *F. oxysporum*, cuya patogenicidad sobre el cultivar de garbanzo PV-24 fue investigada por este método de inoculación en los Experimentos 1, 2 (Pág. 61), indujeron una sintomatología en la parte aérea de la planta similar a la descrita por TRAPERO CASAS y JIMENEZ DIAZ (1983), tras inoculaciones con aislamientos de *F. oxysporum* obtenidos de plantas infectadas en campos de garbanzo del Valle del Guadalquivir. En nuestros experimentos, ningún síntoma afectó a las plantas no inoculadas que sirvieron como testigo.

Dichos síntomas consistieron en clorosis seguida de amarillez, necrosis y caída de folíolos, que se inició en las hojas inferiores y progresó acrópetamente en la planta. El examen de la sección longitudinal del tallo de las plantas inoculadas con los aislamientos de suelo, o con los aislamientos de referencia FO-8012 (Marchitez Vascular) y FO-7952 (Amarillez Vascular), permitió una primera identificación de los aislamientos como causante de infección vascular o no vascular. Dos (5%) de los 40 aislamientos, causantes de infección vascular, indujeron una coloración castaño oscura a lo largo de la médula y xilema de las plantas inoculadas, mientras que los 38 aislamientos restantes no indujeron esta coloración, quedando la infección aparentemente restringida a la zona del cuello y raíz, donde se observaron lesiones necróticas corticales de color castaño oscuro.

Los primeros síntomas aéreos se observaron a los 20 días después de la inoculación en el Experimento 1 (Cuadro 18),

CUADRO 18. Reacción del cultivar de garbanzo PV-2/4 a la inoculación con aislamientos de *Fusarium oxysporum* obtenidos de suelos de 15 campos del Valle del Guadalquivir con historia de severos ataques de Marchitez y Podredumbre de Raíz (Experimento 1)^x

Sintomatología	Número de aislamientos	Severidad media (\pm d.t.) y tiempo desde la inoculación ^y	
		20 días	50 días
Amarillez Vascular	1	2.8 \pm 0.94	4.5 \pm 0.94
Amarillez no vascular y lesiones necróticas corticales en raíz y cuello	14	1.9 \pm 0.96	3.4 \pm 0.66

^x Semillas desinfectadas y germinadas se sembraron en macetas, en una mezcla de suelo infestada por adición de 100 ml de una suspensión de conidias y micelio de cada aislamiento.
^y Evaluada según una escala 1 - 5 (1 = no síntomas, 5 = planta muerta). La reacción a cada aislamiento fue evaluada en 9 plantas. Cada aislamiento utilizado procede de un campo muestreado.

CUADRO 19. Reacción del cultivar de garbanzo PV-2/4 a la inoculación con aislamientos de Fusarium oxysporum y F. solani (sensu lato) obtenidos de suelos de 26 campos del Valle del Guadalupe con o sin historia de severos ataques de Marchitez y Podredumbre de Raíz (Experimento 2)x

<u>Fusarium spp.</u>	Sintomatología	Número de aislamientos	Severidad media (\pm d.t.) y tiempo desde la inoculación ^y	
			30 días	60 días
<u>F. oxysporum</u>	Amarillez vascular	1	1.3 \pm 0.67	3.8 \pm 0.42
	Amarillez no vascular y lesiones necróticas corticales en raíz y cuello	2/4	1.2 \pm 0.51	3.5 \pm 0.42
<u>F. solani</u> (sensu lato)	Amarillez no vascular y podredumbre negra de raíz y cuello	2	4.6 \pm 0.39	4.9 \pm 0.10
	Amarillez no vascular y necrosis corticales en raíz y cuello	13	1.8 \pm 0.87	3.6 \pm 0.25

x Semillas desinfectadas y germinadas se sembraron en macetas, en una mezcla de suelo infestada por adición de 100 ml de una suspensión de conidias y micelio de cada aislamiento.
y Evaluada según una escala 1 - 5 (1 = no síntomas, 5 = planta muerta). La reacción a cada aislamiento fue evaluada en 9 plantas. Cada aislamiento utilizado procede de un campo muestreado.

que se realizó en una cámara de crecimiento Koxka, y a los 30 días de aquella en el Experimento 2 (Cuadro 19) realizado en invernadero. Los valores medios de la severidad de la reacción en ambos experimentos se muestran en los Cuadros 18 y 19.

Todos los aislamientos de F. oxysporum investigados resultaron patogénicos para el cultivar PV-24, si bien difirieron entre sí en virulencia. La severidad de la reacción fue ligeramente superior en el ambiente controlado de la cámara Koxka (Experimento 1, Cuadro 18), que en el ambiente fluctuante de invernadero (Experimento 2 Cuadro 19). Asimismo, los dos aislamientos de F. oxysporum causantes de Amarillez Vascular fueron ligeramente más virulentos que los que indujeron Amarillez No Vascular (Cuadro 18, 19), y de virulencia similar al aislamiento de referencia FO-7952 que causó una reacción de severidad media 3.5 (no mostrada en los Cuadro 18 y 19).

F. oxysporum fue reaislado de trozos de raíz, cuello y tallo de plantas afectadas de Amarillez Vascular con coloración castaño oscuro de xilema y médula, lo que confirmó la naturaleza vascular de la infección por los aislamientos que inducen dicha sintomatología. Por el contrario, los reaislamientos efectuados de plantas inoculadas con aislamientos causantes de Amarillez No Vascular solo resultaron positivos los reaislamientos realizados de raíz y cuello, que corresponde a la infección restringida, no sistémica, que causan dichos aislamientos.

b) Cultivo en agua

Con este método se investigó en los Experimentos 3-6, la patogenicidad sobre el cultivar P-2245 de garbanzo, de 115 aislamientos de F. oxysporum (Cuadro 20,21,22,23), obtenidos de

muestras de suelo de cuatro campos con historia de severos ataques de MPR (TRAPERO CASAS y JIMENEZ DIAZ, 1983).

Todos los aislamientos investigados resultaron patogénicos e indujeron en la parte aérea de la planta una Amarillez como la descrita para las inoculaciones por cultivo en suelo infestado (Pág. 67). Ningún síntoma se desarrolló en las plantas que sirvieron como testigo.

Los primeros síntomas foliares comenzaron a manifestarse a los 10 días después de la inoculación y aumentaron en severidad progresivamente hasta el momento en que se realizó la evaluación final de la reacción, a los 20 días después de la inoculación. Para ello se retiraron las plantas del cultivo líquido y se observaron y evaluaron los síntomas en las partes aérea y subterránea. Los síntomas en la parte subterránea de la planta consistieron en necrosis de extensión variable y color castaño oscuro que afectó a raíces y cuello, similar a la descrita por TRAPERO CASAS y JIMENEZ DIAZ (1983) para inoculaciones en cultivo líquido de F. oxysporum.

Tras la observación de secciones longitudinales del tallo de plantas inoculadas, ocho (7%) de los 115 aislamientos fueron clasificados como causantes de Amarillez Vascular y originaron una coloración castaño oscura a lo largo de la médula y xilema similar a la causada por el aislamiento de referencia FO-7972. Por el contrario, los 107 aislamientos restantes no originaron dicha coloración vascular y fueron clasificados como causantes de Amarillez No Vascular.

La severidad de las reacciones en la parte aérea y subterránea de las plantas inoculadas se presenta en los Cuadros 20, 21, 22 y 23. Sólo en tres de los cuatro experimentos realizados se detectaron aislamientos de F. oxysporum causante de

CUADRO 20. Reacción del cultivar de garbanzo P-2245 a la inoculación por cultivo en agua con aislamientos de Fusarium oxysporum obtenidos de suelo de un campo con historia de severos ataques de Marchitez y Podredumbre de Raíz en Montilla (Córdoba) (Experimento 3)X

Sintomatología	Número de aislamientos	Severidad media (+ d.t.)	
		Sistema radicular ^Y	Parte aérea ^Z
Amarillez vascular	3	2.8 ± 0.42	3.1 ± 0.33
Amarillez no vascular y lesiones necróticas corticales en raíz y cuello	27	3.4 ± 0.49	2.5 ± 0.67

X Plántula de 10 días de crecimiento en arena estéril se mantuvieron durante 20 días en vasos de plástico, con las raíces sumergidas en una suspensión en agitación que contenía micelio y conidios (5.5-11.5 · 10⁶/ml) de F. oxysporum. La reacción a cada aislamiento fue evaluada en 12 plantas. Y Evaluada a los 20 días después de la inoculación según una escala 1 - 5 (1 = no síntomas, 5 = necrosis en el 100% del sistema radicular). Z Evaluada a los 20 días después de la inoculación según una escala 1 - 5 (1 = no síntomas, 5 = planta muerta).

CUADRO 21. Reacción del cultivar de garbanzo P-2245 a la inoculación por cultivo en agua con aislamientos de Fusarium oxysporum obtenidos de suelo de un campo con historia de severos ataques de Marabí y Podredumbre de Raíz en Santaella (Córdoba) (Experimento 4)^x

Sintomatología	Número de aislamientos	Severidad media (\pm d.t.)	
		Sistema radicular ^y	Parte aérea ^z
Amarillez vascular	3	2.0 \pm 0.00	3.3 \pm 0.68
Amarillez no vascular y lesiones necróticas corticales en raíz y cuello	27	2.8 \pm 1.82	2.1 \pm 0.31

^x Plántula de 10 días de crecimiento en arena estéril se mantuvieron durante 20 días en vasos de plástico, con las raíces sumergidas en una suspensión en agitación que contenía micelio y conidios (5.5-11.5 . 10⁶/ml) de F. oxysporum. La reacción a cada aislamiento fue evaluada en 12 plantas.

^y Evaluada a los 20 días después de la inoculación según una escala 1 - 5 (1 = no síntomas, 5 = necrosis en el 100% del sistema radicular).

^z Evaluada a los 20 días después de la inoculación según una escala 1 - 5 (1 = no síntomas, 5 = planta muerta).

CUADRO 22. Reacción del cultivar de garbanzo P-2245 a la inoculación por cultivo en agua con aislamientos de Fusarium oxysporum obtenidos de suelo de un campo con historia de severos ataques de Marchitez y Podredumbre de Raíz en Cortijo de los Montecitos (Córdoba) (Experimento 5)^x

Sintomatología	Número de aislamientos	Severidad media (+ d.t.)	
		Sistema radicular ^y	Parte aérea ^z
Amarillez vascular	2	3.5 ± 0.87	3.5 ± 0.58
Amarillez no vascular y lesiones necróticas corticales en raíz y cuello	23	3.4 ± 0.76	2.2 ± 0.48

^x Plántula de 10 días de crecimiento en arena estéril se mantuvieron durante 20 días en vasos de plástico, con las raíces sumergidas en una suspensión en agitación que contenía micelio y conidios (5.5-11.5 · 10⁶/ml) de F. oxysporum. La reacción a cada aislamiento fue evaluada en 12 plantas y Evaluada a los 20 días después de la inoculación según una escala 1 - 5 (1 = no síntomas, 5 = necrosis en el 100% del sistema radicular).

^z Evaluada a los 20 días después de la inoculación según una escala 1 - 5 (1 = no síntomas, 5 = plántula muerta).

CUADRO 23. Reacción del cultivar de garbanzo P-2245 a la inoculación por cultivo en agua con aislamientos de Fusarium oxysporum obtenidos de suelo de un campo con historia de severos ataques de Marchitez y Podredumbre de Raíz en Bujalance (Córdoba) (Experimento 6)^x

Sintomatología	Número de aislamientos	Severidad media (+ d.t.)
Amarillez no vascular y lesiones necróticas corticales en raíz y cuello	30	3.3 ± 0.96
		Parte aérea ^z
		1.8 ± 0.72

^x Plántula de 10 días de crecimiento en arena estéril se mantuvieron durante 20 días en vasos de plástico, con las raíces sumergidas en una suspensión en agitación que contenía micelio y conidios (5.5-11.5 . 10⁶/ml) de F. oxysporum. La reacción a cada aislamiento fue evaluada en 12 plantas.

^y Evaluada a los 20 días después de la inoculación según una escala 1 - 5 (1 = no síntomas, 5 = necrotizada).

^z Evaluada a los 20 días después de la inoculación según una escala 1 - 5 (1 = no síntomas, 5 = planta muerta).

Amarillez Vascular (Cuadro 20,21,22). Dichos aislamientos - constituyeron además una baja proporción de la población de - F. oxysporum muestreada, ya que en ningún caso superaron el - 10% de los aislamientos investigados en cada campo, a pesar de que éstos tienen historia de severos ataques de MPR (TRAPERO CASAS y JIMENEZ DIAZ, 1983). Los aislamientos causantes de Amarillez Vascular originaron síntomas en la parte aérea más severos (severidad media = 3.1 - 3.5, Cuadro 20, 21, 22) que los debidos a los aislamientos causantes de Amarillez No Vascular (severidad media = 1.8 - 2.5, Cuadro 20, 21, 22, 23). Los síntomas inducidos por el aislamiento de referencia FO-7952, causante de Amarillez Vascular, fueron similares a los inducidos por los aislamientos del mismo tipo obtenidos de suelo, y tuvieron una severidad media de 3.0 - 3.9. Por el contrario, y en general, los aislamientos causantes de Amarillez No Vascular originaron necrosis en la parte subterránea de la planta más severa que las inducidas por los aislamientos causantes de Amarillez Vascular (Cuadro 20,21). Asimismo, la reacción inducidas por los aislamientos causantes de Amarillez No Vascular en la parte subterránea fué más severa en la escala 1 - 5 que la que originaron en la parte aérea (Cuadro 20,21,22 y 23).

Patogenicidad de Fusarium solani (sensu lato)

a) Cultivo en suelo

En el Experimento 2 se investigó con este método de inoculación la patogenicidad sobre el cultivar PV-24 de 15 aislamientos de F. solani (sensu lato) obtenidos de suelo de otros tantos campos con historia de severos ataques del complejo MPR (TRAPERO CASAS y JIMENEZ DIAZ, 1983).

El tipo de severidad de los síntomas causados por dichos aislamientos en las plantas inoculadas permitió distinguir dos grupos de ellos, uno constituido por dos (13%) aislamientos identificados como F. eumartii por su morfología conidial y otro constituido por los 13 (87%) aislamientos restantes, características morfológicamente de F. solani (sensu stricto).

Los aislamientos de F. eumartii causaron flacidez seguida de amarillez y necrosis de las hojas en tallos que permanecían verdes, y podredumbre negra severa de raíz y cuello; mientras que los aislamientos de F. solani (sensu stricto) causaron amarillez progresiva de los folíolos seguida de necrosis y caída de los mismos, en ausencia de flacidez, y necrosis corticales y negras en cuello y raíz pero no podredumbre severa.

El progreso de la severidad de la reacción en las plantas inoculadas en el tiempo fué también distintivo para los aislamientos de F. eumartii y F. solani (sensu stricto). Los aislamientos de F. eumartii causaron la muerte de la mayoría de las plantas inoculadas a los 30 días después de la inoculación, al igual que el aislamiento FS-8013 utilizado como referencia e identificado también como F. eumartii (Cuadro 19); mientras que los aislamientos de F. solani (sensu stricto) no causaron muerte de planta ni aún 60 días después de la inoculación (Cuadro 19). Tanto los aislamientos de F. eumartii como los de F. solani causaron infecciones restringidas a las zonas de raíz y cuello necrosadas, ya que solo se obtuvieron de dichas partes de las plantas inoculadas en los reaislamientos efectuados tras la evaluación de los síntomas. Las plantas que sirvieron como testigo resultaron asintomáticas y dieron resultados negativos en los reaislamientos.

b) Cultivo en vermiculita

En los Experimentos 7 a 10 se investigó con este método de inoculación la patogenicidad sobre el cultivar PV-25 de 120 aislamientos de F. solani (sensu lato) obtenidos de cuatro campos con historia de severos ataques de MPR (TRAPERO CASAS y JIMENEZ DIAZ, 1983). De dichos campos se obtuvieron asimismo los 115 aislamientos de F. oxysporum cuya patogenicidad se determinó por cultivo líquido en los Experimentos 3 a 6 (Pág. 61).

Al igual que en el Experimento 2 con la inoculación por cultivo de las plantas en suelo infestado, los 120 aislamientos de F. solani (sensu lato) investigados constituyeron 2 grupos distinguibles por el tipo y severidad de síntomas causados en las plantas inoculadas: Un grupo, constituido por los 35 (29%) aislamientos más virulentos, se caracterizó por inducir severa amarillez y necrosis de los folíolos y muerte de la planta (severidad media 3.7 - 4.7 en una escala de 1 - 5 para síntomas aéreos, Cuadro 24,25,26,27); así como por una severa podredumbre de raíz y cuello (severidad media 4.3 - 4.9 en una escala de 1 - 5, Cuadro 24,25,26,27). Dicha reacción fue similar a la inducida por el aislamiento FS-8013 utilizado como referencia. A diferencia del Experimento 2, solo 10 (31%) de los aislamientos más virulentos pertenecieron a F. eumarti, mientras que 25 (69%) pertenecieron a F. solani (sensu stricto) (Cuadro 24,25,26,27). Los aislamientos más virulentos representaron el 20.0 - 46.7% con respecto al total de los aislamientos investigados en cada campo muestreado.

Un segundo grupo estuvo constituido por los 85 (71%) aislamientos de F. solani (sensu lato) restantes de inferior virulencia que los pertenecientes al grupo anterior; que se caracterizó por inducir clorosis, amarillez y necrosis en un máximo de los dos tercios inferiores de las plantas inoculadas (severidad media 2.7 - 3.3 en una escala 1 - 5, Cuadro 24,25,26,27), así como una necrosis cortical en raíz y cuello (severidad me--

CUADRO 24. Reacción del cultivar de garbanzo PV-25 a la inoculación por cultivo de vermiculita con aislamientos de Fusarium solani (sensu lato) obtenidos de suelo de un campo con historia de severos ataques de Marchitez y Podredumbre de Raíz en Montilla (Córdoba) (Experimento 7)^x

Sintomatología	Número de aislamientos	Severidad media (+ d.t.)	
		Sistema radicular ^y	Parte aérea ^z
Amarillez no vascular y podredumbre negra de raíz y cuello	7	4.3 ± 1.28	3.7 ± 1.04
Amarillez no vascular y necrosis corticales en raíz y cuello	23	2.2 ± 1.48	2.7 ± 1.05

^x Plántulas de 7 días de crecimiento en vermiculita estéril en vasos de plástico se inocularon depositando discos de agar con micelio de F. solani en contacto con la base del tallo. La reacción a cada aislamiento fue evaluada en 8 plantas.

^y Evaluada a los 16 días después de la inoculación según una escala 1 - 5 (1 = no síntomas, 5 = necrosis localizada en el 100% del eje raíz tallo que comprende el hypocotilo y epicotilo subterráneo).

^z Evaluada a los 16 días después de la inoculación según una escala 1 - 5 (1 = no síntomas, 5 = planta muerta).

CUADRO 25. Reacción del cultivar de garbanzo PV-25 a la inoculación por cultivo de vermiculita con aislamientos de Fusarium solani (sensu lato) obtenidos de suelo de un campo con historia de severos ataques de Marchitez y Podredumbre de Raíz en Cortijo de los Montecitos (Córdoba) (Experimento 8)†

Sintomatología	Número de aislamientos	Severidad media (\pm d.t.)
		Sistema radicular ^y Parte aérea ^z
Amarillez no vascular y podredumbre negra de raíz y cuello	8	4.5 \pm 0.95 4.4 \pm 0.73
Amarillez no vascular y necrosis corticales en raíz y cuello	22	2.6 \pm 1.37 3.0 \pm 0.92

X Plántulas de 7 días de crecimiento en vermiculita estéril en vasos de plástico se inocularon depositando discos de agar con micelio de F. solani en contacto con la base del tallo. La reacción a cada aislamiento fue evaluada en 8 plantas.

Y Evaluada a los 20 días después de la inoculación según una escala 1 - 5 (1 = no síntomas, 5 = necrosis localizada en el 100% del eje raíz tallo que comprende el hypocotilo y epicotilo subterráneo).

Z Evaluada a los 20 días después de la inoculación según una escala 1 - 5 (1 = no síntomas, 5 = planta muerta).

CUADRO 26. Reacción del cultivar de garbanzo PV-25 a la inoculación por cultivo de vermiculita con aislamientos de Fusarium solani (sensu lato) obtenidos de suelo de un campo con historia de severos ataques de Marchitez y Podredumbre de Raíz en Santaella (Córdoba) (Experimento 9)^x

Sintomatología	Número de aislamientos	Severidad media (\pm d.t.)	
		Sistema radicular ^y	Parte aérea ^z
Amarillez no vascular y podredumbre negra de raíz y cuello	14	4.9 \pm 0.24	4.2 \pm 0.89
Amarillez no vascular y necrosis corticales en raíz y cuello	16	4.4 \pm 0.79	3.2 \pm 0.87

^x Plántulas de 7 días de crecimiento en vermiculita estéril en vasos de plástico se inocularon dentro de cada aislamiento de F. solani en contacto con la base del tallo. La reacción a

^y Evaluada a los 20 días después de la inoculación según una escala 1 - 5 (1 = no síntomas, 5 = necrosis localizada en el 100% del eje raíz tallo que comprende el hypocotilo y epicotilo subterráneo).

^z Evaluada a los 20 días después de la inoculación según una escala 1 - 5 (1 = no síntomas, 5 = planta muerta).

CUADRO 27. Reacción del cultivar de garbanzo PV-25 a la inoculación por cultivo de vermiculita con aislamientos de Fusarium solani (sensu lato) obtenidos de suelo de un campo con historia de severos ataques de Marchitez y Podredumbre de Raíz en Bujalance (Córdoba) (Experimento 10)^x

Sintomatología	Número de aislamientos	Severidad media (\pm d.t.)	Parte aérea ^y
			Sistema radicular ^y
Amarillez no vascular y podredumbre negra de raíz y cuello	6	4.9 \pm 0.47	4.7 \pm 0.73
Amarillez no vascular y necrosis corticales en raíz y cuello	24	3.2 \pm 1.12	2.9 \pm 0.95

^x Plántulas de 7 días de crecimiento en vermiculita estéril en vasos de plástico se inocularon hopu- sitando discos de agar con micelio de F. solani en contacto con la base del tallo. La reacción a cada aislamiento fue evaluada en 8 plantas.

^y Evaluada a los 20 días después de la inoculación según una escala 1 - 5 (1 = no síntomas, 5 = necrosis localizada en el 100% del eje raíz tallo que comprende el hypocotilo y epicotilo subterráneo).
^z Evaluada a los 20 días después de la inoculación según una escala 1 - 5 (1 = no síntomas, 5 = planta muerta).

dia 2.2 - 3.2 en una escala 1 - 5, Cuadro 24,25,26,27). En los cuatro campos muestreados las reacciones inducidas en las partes aérea o subterránea por los aislamientos menos virulentos fueron menos severas que las inducidas por los aislamientos más virulentos (Cuadro 24,25,26,27). Todos los aislamientos de F. solani (sensu lato) investigados causaron infecciones restringidas a las zonas de cuello y raíz ya que solo de ellas resultaron positivos los reaislamientos de plantas inoculadas. Las plantas que sirvieron como testigo resultaron asintomáticas y dieron resultados negativos en los reaislamientos.

DISCUSION

Fusarium oxysporum y F. solani (sensu lato) existen con elevadas frecuencia y densidades de población en suelos cultivados del Valle del Guadalquivir (Capítulo II). Los resultados de inoculaciones artificiales con métodos anteriormente contrastados (TRAPERO CASAS y JIMENEZ DIAZ, 1983), con una muestra aleatoria de 40 aislamientos de F. oxysporum y 15 de F. solani (sensu lato) obtenidos (1 por campo) de campos cultivados con o sin historia de MPR, indican que los componentes de las poblaciones de ambas especies pueden ser en su mayoría patógenicos para garbanzo (Cuadro 18,19).

El tipo y severidad de las reacciones inducidas por los varios aislamientos de F. oxysporum y F. solani en las inoculaciones, permitió distinguir dos grupos de aislamientos para cada especie. En F. oxysporum los aislamientos más virulentos causaron infecciones vasculares y Amarillez foliar, y los menos virulentos causaron necrosis restringidas en cuello y raíces y Amarillez foliar. Ambos grupos de aislamientos corresponden a los obtenidos por TRAPERO CASAS y JIMENEZ DIAZ (1983) de plantas afectadas de MPR, y descritos como causantes de Amarillez Vascular y Amarillez no Vascular con necrosis corticales de raíz y cuello, respectivamente. Dichos autores también describieron un tipo de aislamiento de superior virulencia, causante de Marchitez Vascular, que no hemos encontrado entre nuestros aislamientos de F. oxysporum.

En F. solani (sensu lato) los aislamientos más virulentos causaron una extensa podredumbre negra de cuello y raíces que ocasionó flacidez y amarillez foliar y posterior muerte de la planta, mientras que los menos virulentos causaron necrosis de cuello y raíces y amarillez foliar pero no muerte de las plantas. Los aislamientos más virulentos (37) constituyeron el 27% de los 135 investigados obtenidos de 19 campos con historia de MPR; de los cuales 12 (33%) fueron posteriormente identifica

dos como F. eumartii y 25 (67%) como F. solani (sensu stricto). TRAPERO CASAS y JIMENEZ DIAZ (1983) descubrieron asimismo aislamientos de F. eumartii entre los de F. solani (sensu lato) obtenidos de plantas afectadas de MPR, y constataron que eran de virulencia similar a los más virulentos de F. solani (sensu stricto).

Las frecuencias con que se detectaron los aislamientos de F. oxysporum y F. solani más virulentos, de suelos de campos cultivados con o sin historia de MPR (Cuadro 18,19), y en particular de cuatro campos con historia conocida de ataques de MPR (TRAPERO CASAS y JIMENEZ DIAZ, 1983) (Cuadro 28), no corresponde a la importancia y severidad de este complejo de enfermedades descrita por TRAPERO CASAS y JIMENEZ DIAZ (1983), ni a la frecuencia con que dichos autores obtuvieron los aislamientos más virulentos de plantas afectadas de MPR. Así, solo 2 (5%) de 40 aislamientos de F. oxysporum elegidos al azar de entre los obtenidos de 40 campos muestreados (1 por campo) resultaron pertenecer al grupo de Amarillez Vascular, mientras que los 38 restantes pertenecieron al grupo menos virulento causante de Amarillez no Vascular y necrosis de cuello y raíz (Cuadro 18,19). Similarmente, sólo 2 (13%) de los 15 aislamientos de F. solani (sensu lato) obtenidos de suelo de 15 campos con historia de MPR pertenecieron al grupo de F. eumartii o F. solani (sensu stricto) más virulento (Cuadro 19).

Más importante aún a dicho respecto, es la consideración de las frecuencias con que fueron aislados los aislamientos más virulentos de ambas especies fúngicas, en una muestra aleatoria de 30 aislamientos de cada especie obtenidos de suelo de campos con historia de ataques severos de MPR (Cuadro 28). Mientras que en ningún caso obtuvimos ejemplares representativos de aislamientos excepcionalmente virulentos causantes de Marchitez Vascular (TRAPERO CASAS y JIMENEZ DIAZ, 1983), a pesar de que dichos aislamientos se han obtenido de plantas afec

tadas en el campo de Bujalance (TRAPERO CASAS y JIMENEZ DIAZ, - 1983). En total sólo 8 (7%) de los 115 aislamientos de F. oxysporum estudiados causaron Amarillez Vascular, con fre--- cuencia en los campos individuales que variaron 0-10% (Cuadro - 28); y sólo 35 (29%) de los correspondientes 120 de F. solani (sensu lato) investigados causaron extensa podredumbre de cue-- llo y raíces y muerte de plantas, con frecuencias en los campos que variaron 20-47% (Cuadro 28).

Tales bajas frecuencias, más acentuadas proporcional-- mente en F. oxysporum que en F. solani pueden reflejar el predo-- minio de los componentes menos virulentos en las poblaciones de suelo de F. oxysporum y F. solani que infectan garbanzo en el - Valle del Guadalquivir, pero también la necesidad de aumentar - el tamaño muestral con niveles fiables la proporción de los más virulentos en dichas poblaciones. En todo caso nuestro resulta-- do sugiere que la determinación cuantitativa de las poblaciones de F. oxysporum y F. solani en suelos cultivados del Valle del Guadalquivir, no es un método lo suficientemente preciso que - permita estimar predictivamente el riesgo potencial de MPR en cultivos de garbanzo, y lleve al agricultor a elegir anticipada-- mente entre las alternativas posibles en su gestión. Posible-- mente tal objetivo requiera una aproximación experimental dife-- rente, que conduzca a determinar el citado riesgo potencial me-- diante ensayos in vivo con muestras de suelo, sin necesidad de determinar y cuantificar los componentes fúngicos patogénicos - en el mismo.

CUADRO 28. Tipo y frecuencia de aislamientos de Fusarium spp. patogénicos de garbanzo obtenidos de cuatro campos cultivados con historia de severos ataques de Marchitez y Podredumbre de Raíz en la provincia de Córdoba

<u>Fusarium</u> sp.	Tipo de aislamiento	Bujalance		Montecitos		Montilla		Santaelia	
		Nº	(%)	Nº	(%)	Nº	(%)	Nº	(%)
<u>F. oxysporum</u>	Amarillez Vascular	0	0	2	8	3	10	3	10
	Amarillez no Vascular	30	100	23	92	27	90	27	90
	Total	30	100	25	100	30	100	30	100
<u>F. eumartii</u>	Amarillez no Vascular y podredumbre de cuello y raíces	0	0	3	10	7	23	0	0
	Amarillez no Vascular y podredumbre de cuello y raíces	6	20	5	17	0	0	14	47
<u>F. solani</u>	Amarillez no Vascular y necrosis de cuello y raíces	24	80	22	73	23	77	16	53
	Total	30	100	30	100	30	100	30	100

CONCLUSIONES

Fusarium oxysporum y F. solani (sensu lato) pueden ser aislados y cuantificados específicamente en los suelos del Valle del Guadalquivir con los medios de cultivo agar-jugo V-8-oxgall-PCNB y agar-peptona-PCNB. El medio de Komada es tan eficaz como los anteriores para cuantificar la población de F. oxysporum, pero resulta inferior a dichos medios de en la cuantificación de F. solani (sensu lato).

La intensidad y duración de la desecación de las muestras de suelo en el proceso de análisis para estimar la densidad de propágulos viables de F. oxysporum y F. solani (sensu lato), reducen significativamente los niveles absolutos de propágulos de estos hongos en el suelo detectables con los medios selectivos de cultivo.

Los suelos cultivados en el Valle del Guadalquivir poseen poblaciones elevadas de F. oxysporum y F. solani (sensu lato), predominando la primera especie en suelos arcillosos y la segunda tanto en estos como en los franco-arcillosos, con densidades medias de propágulos entre 167-6467, que están en el intervalo de lo descrito por diversos autores en otros países.

Dichas poblaciones fúngicas disminuyen con la profundidad del suelo, pero son muy elevadas en el perfil explorado por las raíces de garbanzo, donde se mantienen elevadas, con ligeras fluctuaciones, a lo largo del año.

Las poblaciones de F. oxysporum y F. solani (sensu lato) en suelos cultivados del Valle del Guadalquivir contienen componentes patogénicos sobre garbanzo que difieren marcadamente en virulencia. Los aislamientos de suelos de ambas especies que han sido investigados se pueden clasificar en grupos por el tipo y se

veridad de las reacciones que inducen sobre este cultivo, siendo los componentes menos virulentos más frecuentes y abundantes en número que los más virulentos. Los aislamientos más virulentos de F. oxysporum causan infecciones vasculares y amarillez foliar y los menos virulentos inducen necrosis restringidas en cuello y raíces y amarillez foliar. Los aislamientos más virulentos de F. solani (sensu lato) inducen podredumbre negra extensa de cuello y raíces que ocasiona flacidez y amarillez foliar y posterior muerte de la planta y los menos virulentos causan necrosis de cuello y raíces y amarillez foliar pero no muerte de las plantas.

La frecuencia de los componentes más virulentos de F. oxysporum y F. solani (sensu lato) de suelo obtenidos de campos con historia de severos ataques de MPR no se corresponde con la frecuencia con que TRAPERO CASAS y JIMENEZ DIAZ los obtuvieron de plantas de garbanzo afectadas de MPR.

Como conclusión de todo lo expuesto, la estimación de las densidades de poblaciones de F. oxysporum y F. solani (sensu lato) en suelos cultivados en el Valle del Guadalquivir no es un método adecuado para predecir el riesgo potencial de MPR en cultivos de garbanzo.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- ABAWI, G.S., LORBEER, J.W. 1971. Population of Fusarium oxysporum s. sp. cepae in organic soils in New York. *Phytopathology* 61 : 1042-1048.
- ALLEN, D.J. 1983. The Pathology of tropical food legumes. Jhon Wiley and sons. Chichester-New York. 413 pp.
- ANONIMO, 1982. Anuario de Estadística Agraria. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. 682 pp.
- BAKER, R. 1965. Ecology of plant pathogens in soil. VI. Inoculum density of Fusarium solani f. sp. phaseoli in bean rhizosphere as affected by cellulose and supplementary nitrogen. *Phytopathology* 55 : 1381-1382.
- BAKER, R. 1981. Ecology of the Fungus, Fusarium: Competition. Páginas 245-249 en P.E. NELSON, T.A. TOUSSOUN, R.J. COOK, eds. *Fusarium : Disease, Biology, and Taxonomy*. The Pennsylvania State University Press. U.S.A.
- BASALLOTE UREBA, María J., TRAPERO CASAS, A., JIMENEZ DIAZ, R.M. 1984. Crecimiento y distribución de Fusarium oxysporum f. sp. ciceri en cultivares de garbanzo susceptibles y resistentes. Res. III Congres. Nac. de Fitopatología. p. 53. Tenerife.
- BOOTH, C. 1977. Fusarium Laboratory guide to the identification of the major species. Comm. Mycol. Inst. Kew. Surrey. England. 58 pp.
- BOUHOT, D., ROUXEL, F. 1971. Technique sélective et quantitative d'analyse des Fusarium oxysporum et Fusarium solani dans le sol. Mode démploi. Ann. *Phytopathol.* 3 (2), 251-254.

- BURKE, D.W., HOLMES, L.D., BAKER, A.W. 1972. Distribution of Fusarium solani f. sp. phaseoli and bean root rots in relation to tillage and soil compaction. *Phytopathology* 62 : 550-554.
- COOK, R.J. 1981. Water relation in the biology of Fusarium. Páginas 236-244 en P.E. NELSON, T.A. TOUSSOUN, R.J. COOK, eds. Fusarium : Disease, Biology, and Taxonomy. The Pennsylvania State University Press. U.S.A.
- DRYDEN, P., VAN ALFEN, N.K. 1984. Soil moisture, root system density, and infection of roots of pinto beans by Fusarium solani f. sp. phaseoli under dryland conditions. *Phytopathology* 74 : 132-135.
- GERLACH, W. 1977. Fusarium species inciting plant diseases in the tropics. Páginas 210-217 en J. KRANZ, H. SCHMUTTERER, and W. KOCH eds. Diseases, pest and weeds in tropical crops. Verlag Paul Parey, Berlin.
- GERLACH, W. 1981. The present concept of Fusarium classification. Páginas 413-426 en P.E. NELSON, T.A. TOUSSOUN, R.J. COOK, eds. Fusarium : Disease, Biology, and Taxonomy. The Pennsylvania State University Press. U.S.A.
- GRIFFIN, G.J. 1981. Physiology of conidium and chlamyospore germination in Fusarium. Páginas 331-339 en P.E. NELSON, T.A. TOUSSOUN, R.J. COOK, eds. Fusarium : Disease, Biology, and Taxonomy. The Pennsylvania State University Press. U.S.A.
- HAU, F.C., CAMBEL, C.L., BEUTE, M.K. 1982. Inoculum distribution and sampling methods for Cylindrocladium crotalariae in peanuts field. *Plant Disease* 66 : 568-571.
- HOAGLAND, D.R., ARNON, D.I. 1950. The water culture method for growing plants without soil. *Calif. Agr. Exp. St., Circ.* 347, 32 pp.

- KAUFMAN, D.D., WILLIAMS, L.E. 1965. Influence of soil reaction and mineral fertilization on number and types of fungi antagonistic to four soil-borne plant pathogens. *Phytopathology* 55 : 570-574.
- KOMADA, H. 1977. A new selective medium of isolating Fusarium from natural soil. *Proc. Am. Phyt. Soc.* 3 : 221.
- KOMMEDAHL, T. 1966. Relation of exudates of pea roots to germination of spores in races of Fusarium oxysporum f. sp. lisi. *Phytopathology* 56 : 721-722.
- KRAFT, J.M., BURKE, D.W., HAGLUND, W.A. 1981. Fusarium diseases of bean, peas, and lentils. Páginas 142-156 en P.E. NELSON, T.A. TOUSSOUN, R.J. COOK, eds. Fusarium : Disease, Biology, and Taxonomy. The Pennsylvania State University Press. U.A.S.
- LOUVET, J., ALABOUVETTE, C., ROUXEL, F. 1981. Microbiological suppressiveness of some soils to Fusarium wilts. Páginas 261-275 en P.E. NELSON, T.A. TOUSSOUN, R.J. COOK, eds. Fusarium: Disease, Biology and Taxonomy. The Pennsylvania State University Press. U.S.A.
- MAROIS, J.J. DUNN, M.T., PAPAIVIZAS, G.C. 1983. Reinvasion of fumigated soil by Fusarium oxysporum f. sp. melonis *Phytopathology* 73 : 680-684.
- Mc MULLEN, M.P., STACK, R.W. 1983. Effects of isolation techniques and media on the differential isolation of Fusarium species. *Phytopathology* 73 : 458-462.

- MENZIES, J.D. 1970. Factors affecting plant pathogen population in soil. Páginas 16-21 en T.A. TOUSSOUN, R.V. VEGA, P.E. NELSON eds. Root diseases and soil-borne pathogens. University of California Press. U.S.A.
- NASH SMITH, Shirley. 1970. The significance of populations of pathogenic *Fusaria* in soil. Páginas 28-30 en T.A. TOUSSOUN, R.V. VEGA, P.E. NELSON eds. Root diseases and soil-borne pathogens. University of California Press. U.S.A.
- NASH, S.M., SNYDER, W.C. 1962. Quantitative estimations of propagules of the bean root rot Fusarium in field soils. *Phytopathology* 52 : 567-572.
- PAPAVIZAS, G.C. 1967. Evaluation of various media and antimicrobial agents for isolation of Fusarium in field soil. *Phytopathology* 57 : 848-852.
- ROUXEL, F., BOUHOT, D. 1971. Recherches sur l'écologie des champignons parasites dans le sol. *Ann. Phytopathol.*, 3 (2), 171-188.
- SCHIPPERS, B. VAN ECK, W.H. 1981. Formation and survival of chlamydospores in Fusarium. Páginas 251-260 en P.E. NELSON, T.A. TOUSSOUN, R.J. COOK, eds. Fusarium : Disease, Biology, and Taxonomy. The Pennsylvania State University Press. U.S.A.
- SCHROTH, M.N., SNYDER, W.C. 1961. Effect of host exudates on chlamydospore germination of bean root rot fungus, Fusarium solani f. sp. phaseoli. *Phytopathology* 51 : 389-393.

- SINGH, R.S., CHAUBE, H.S. 1970. A technique for estimation of asexual and conidial propagules of Fusarium spp. in soil. Labdev. J. Sci. Tech. 8 B (3) : 172-174.
- SMITH, Shirley N., SNYDER, W.C. 1971. Relationship of inoculum density and soil types to severity of Fusarium wilt of sweet potato. Phytopathology 61 : 1049-1051.
- SMITH, Shirley N., SNYDER, W.C. 1972. Germination of Fusarium oxysporum chlamydospores in soils favorable and unfavorable to wilt establishment. Phytopathology 62 : 273-277.
- SMITH, Shirley N., SNYDER, W.C. 1975. Persistence of Fusarium oxysporum f. sp. vasinfectum in fields in the absence of cotton. Phytopathology 65 : 190-196.
- STONER, M.F. 1981. Ecology of Fusarium in noncultivated soils. Páginas 276-286 en P.E. NELSON, T.A. TOUSSOUN, R.J. COOK, eds. Fusarium : Disease, Biology, and Taxonomy. The Pennsylvania State University Press. U.S.A.
- TAMIMI, K.M.N., HADWAN, H.A. 1980. Population levels of four species of Fusarium and some other rhizospheric fungi found in potato fields of Central Iraq. Proc. V Congress of the Mediterranean Phytopathological Union pp. 194-198. Patras (Greece).
- TELLO, J. 1984. Observaciones sobre la persistencia en el suelo de microconidias de Fusarium oxysporum. Res. III Congres. Nac. de Fitopatología. p. 60. Tenerife.

- TRAPERO CASAS, A., JIMENEZ DIAZ, R.M. 1983. La marchitez y Podredumbre de Raíz del Garbanzo en el Valle del Guadalquivir: Importancia, distribución, etiología, epidemiología y medios de lucha. Tesis Doctoral, E.T.S.I.A., Universidad de Córdoba. 295 pp.
- TRAPERO CASAS, A., JIMENEZ DIAZ, R.M. 1983^a. Lucha contra la "seca" del garbanzo. Trofeo de Investigación del Monte de Piedad y Caja de Ahorros de Córdoba. 124 pp.
- TRAPERO CASAS, A., JIMENEZ DIAZ, R.M. 1985. Fungal wilt and root rot disease of chickpea in southern Spain. *Phytopathology* 75 : en prensa.
- VANCURA, V., STOTZKY, G. 1976. Gaseous and volatile exudates from germinating seeds and seedlings *Can. J. Bot.* 54 : 518-532.
- VAN ETEN, H.D. 1974. Pisatin accumulation and lesion development in peas infected with Aphanomyces euteiches, Fusarium solani f. sp. pisi or Rhizoctonia solani. *Phytopathology* 64 : 1433-1440.
- WOLTZ, S.S., JONES, J.P. 1981. Nutritional requirements of Fusarium oxysporum : Basis for a disease control system. Páginas 340-349 en P.E. NELSON, T.A. TOUSSOUN, R.J. COOK, eds. Fusarium : Disease, Biology, and Taxonomy. The Pennsylvania State University Press. U.S.A.