



**Junta de Andalucía**  
Consejería de Agricultura, Ganadería,  
Pesca y Desarrollo Sostenible  
Instituto Andaluz de Investigación  
y Formación Agraria, Pesquera, Alimentaria  
y de la Producción Ecológica



## **TESIS DOCTORAL**

# **FUSARIOSIS DE LOS CULTIVOS DE LA FRESA Y EL ESPÁRRAGO EN ESPAÑA: CARACTERIZACIÓN Y MÉTODOS DE CONTROL**

Eduardo de la Lastra Alcalde

*Directora: Dra. María Nieves Capote Maínez*



---

“La ciencia es la poesía de la realidad”

R. Dawkins

---

El trabajo desarrollado durante esta Tesis se ha podido realizar gracias a la financiación del Instituto Andaluz de Investigación y Formación Agraria, Pesquera, Alimentaria y de la Producción Ecológica (IFAPA) y del Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA):

- Contrato predoctoral FPI2015-0003 (FPI-INIA), financiado por INIA dentro del “Programa Estatal de Promoción del Talento y su Empleabilidad” del Plan Estatal de I+D+i, convocatoria 2013-2016.
- Proyecto RTA2013-00062-C05, financiado por INIA y co-financiado por el Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER 2007-2013) “Programa Operativo Economía basada en el Conocimiento”.
- Proyecto RTA2015-00008-C02, financiado por INIA y co-financiado por el Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER 2014-2020) “Programa Operativo de Crecimiento Inteligente”.

## LISTA DE PUBLICACIONES

Los capítulos de este trabajo están basados en los resultados generados durante la realización de esta Tesis Doctoral, dando lugar a las siguientes publicaciones en revistas científicas indexadas (SCI, Science Citation Index):

- **De la Lastra, E.\***, Villarino, M.\*, Astacio, J.D., Larena, I., De Cal, A., Capote, N. (2019). Genetic diversity and vegetative compatibility of *Fusarium solani* species complex of strawberry in Spain. *Phytopathology* 109: 2142-2151. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-05-19-0173-R>
- **De la Lastra, E.**, Basallote-Ureba, M.J., De los Santos, B., Miranda, L., Vela-Delgado, M. D., Capote, N. (2018). A TaqMan real-time polymerase chain reaction assay for accurate detection and quantification of *Fusarium solani* in strawberry plants and soil. *Scientia Horticulturae* 237: 128-134. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2018.04.007>
- **De la Lastra, E.**, Marín-Guirao, J.I., López-Moreno, F.J., Soriano, T., De Cara-García, M., Capote, N. (2021). Potential inoculum sources of *Fusarium* species involved in asparagus decline syndrome and evaluation of soil disinfestation methods by qPCR protocols. *Pest Management Science*. <https://doi.org/10.1002/ps.6519>
- **De la Lastra, E.**, Camacho, M., Capote, N. Soil bacteria as potential biological control agents of *Fusarium* species associated to asparagus decline syndrome. **(En preparación)**.

\*Estos autores contribuyeron igualmente a la realización del trabajo.

Otras aportaciones destacables que se han desarrollado durante el periodo de la Tesis Doctoral se detallan a continuación:

### 1. Publicaciones en revistas SCI:

- Villarino, M., **De la Lastra, E.**, Basallote-Ureba, M.J., Capote N., Larena, I., Melgarejo P., De Cal, A. (2019). Characterization of *Fusarium solani* populations associated with Spanish strawberry crop. *Plant Disease* 103: 1974-1982. DOI: [10.1094/PDIS-02-19-0342-RE](https://doi.org/10.1094/PDIS-02-19-0342-RE)

- Brizuela, A.M., **De la Lastra, E.**, Marín-Guirao, J.I., Gálvez, L., De Cara-García, M., Capote, N., Palmero, D. (2020). *Fusarium* consortium populations associated with asparagus crop in Spain and their role on field decline syndrome. *Journal of Fungi* 6: 336. <https://doi.org/10.3390/jof6040336>

## 2. Publicaciones en revistas de divulgación:

- **De la Lastra, E.**, De Cara, M., Soriano, T., Capote, N. (2020). Especies de *Fusarium* relacionadas con el síndrome del decaimiento del espárrago en Andalucía. *Phytoma* 322: 2-9. <https://www.phytoma.com/la-revista/phytohemeroteca/324-diciembre-2020/especies-de-fusarium-relacionadas-con-el-sindrome-del-decaimiento-del-esparrago-en-andalucia>
- Rodríguez-Navarro, D., Rodríguez-Berbel, N., Galiano, M., **De la Lastra, E.**, Barrau, C., Basallote-Ureba, M.J., Capote, N. (2019). Estudios *in vitro* de la capacidad de biocontrol de hongos y oomicetos fitopatógenos por cepas de *Bacillus* y *Pseudomonas*. *Phytoma* 311: 1-7. <https://www.phytoma.com/la-revista/phytohemeroteca/311-agosto-septiembre-2019/estudios-in-vitro-de-la-capacidad-de-biocontrol-de-hongos-y-oomicetos-fitopatogenos-por-cepas-de-bacillus-y-pseudomonas>

## 3. Comunicaciones en congresos:

- **De la Lastra, E.**, Palmero, D., Astacio, J.D., De Cara, M., Capote, N. (2018). Caracterización de especies de *Fusarium* implicadas en el decaimiento del espárrago en España. XIX Congreso de la Sociedad Española de Fitopatología (SEF), Toledo, España. Póster 095.
- De Cara-García, M., Capote, N., Brizuela, A., **De Lastra, E.**, Palmero, D. (2018). Presencia de especies de *Fusarium* asociados con el síndrome del decaimiento del espárrago en suelos de tres provincias españolas. XIX Congreso de la Sociedad Española de Fitopatología (SEF), Toledo, España. Póster 139.
- Capote, N., **De la Lastra, E.**, Aguado, A., Basallote-Ureba, M.J. (2016). Detección y cuantificación de *F. solani* en suelo y plantas de fresa mediante PCR en tiempo real y determinación de su diversidad. XVIII Congreso de la Sociedad Española de Fitopatología

(SEF), Palencia, España. Participación Oral.

#### 4. Informes Científico-Técnicos:

- **De la Lastra, E.,** Basallote-Ureba, M.J., De los Santos, B., Miranda, L., Vela-Delgado M. D., Capote, N. (2020). Detección molecular de *Fusarium solani* en suelo y plantas de fresa. Consejería de Agricultura, Ganadería, Pesca y Desarrollo Sostenible, Instituto de Investigación y Formación Agraria y Pesquera, Sevilla (Ed.). 15 pp. <https://www.juntadeandalucia.es/agriculturaypesca/ifapa/servifapa/registro-servifapa/f807dcf0-f992-419f-8b34-eb163f1303f>





## AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, me gustaría agradecer a Nieves Capote Maínez, mi jefa, por la dedicación y paciencia que ha tenido estos años conmigo. Porque ha sabido orientarme cuando estaba perdido, porque ha confiado en mí cuando estaba decidido. Gracias por la oportunidad que me has dado de trabajar contigo.

Gracias a lxs alumnxs que han pasado por nuestro grupo de trabajo para realizar sus TFG o TFM. Porque todos sabemos que la ciencia debería agradecer más a lxs estudiantes que realizan sus prácticas en centros de trabajo sin recibir remuneración alguna. En especial a Juandi, que le gustó tanto trabajar con nosotros que quiso realizar ambas.

Quiero agradecer a Pepa, una experta investigadora y encantadora persona, que me enseñó los fundamentos de *Fusarium*. Lo único que lamento es que se jubilara a mitad de mi tesis y no tuviéramos más tiempo para poder aprender más de ti.

Gracias a Ana Aguado, porque, aunque esté ocupada, siempre tiene un momento para ti, para una palabra de ánimo, para darte tres soluciones donde tú no veas ninguna.

No me olvido de lxs técnicxs de laboratorio, cuyo trabajo es indispensable para que la ciencia avance, porque sin vosotrxs lxs investigadores estamos perdidxs. Especialmente a Mari Carmen, me alegro de haber trabajado codo con codo en el laboratorio todos estos años contigo. Una magnífica compañera de trabajo, pero sobre todo, mejor persona. Me encantan las tertulias que hemos tenido mientras hacíamos nuestros aislamientos. Eres el corazón de nuestro laboratorio y estos últimos meses te hemos echado mucho de menos.

Me gustaría agradecer especialmente a Ana Pastrana y Jose María el recibimiento que me dieron en California. Porque los comienzos pueden ser muy duros, sobre todo cuando estás solo, pero ellos me integraron en su “familia americana” y me hicieron sentir como uno más. Gracias por brindarme una de las experiencias más bonitas de mi vida.

Quiero dedicar esta Tesis a mis padres, porque aunque no entiendan muy bien lo que hago, ni a lo que me dedico, siempre he tenido su apoyo incondicional. Si he llegado a donde he llegado, es gracias a ellos.

Finalmente, pero no por ello menos importante, quiero mencionar a mis amigxs, la familia

que eliges. No quiero nombrar individualmente, para que no me acusen de favoritismos. Así que os agradezco a todxs simplemente estar ahí y compartir conmigo vuestro tiempo. Porque al final, lo más importante, son aquellos pequeños momentos de felicidad.

**GRACIAS A TODXS!!**

## ÍNDICE DE CONTENIDOS

<b>RESUMEN-SUMMARY</b> .....	<b>1</b>
<b>INTRODUCCIÓN GENERAL Y OBJETIVOS</b> .....	<b>11</b>
El género <i>Fusarium</i> .....	<b>11</b>
El cultivo de la fresa en España.....	<b>19</b>
<i>Fusarium solani</i> , patógeno emergente en el cultivo de la fresa.....	<b>22</b>
El cultivo del espárrago en España.....	<b>26</b>
El síndrome del decaimiento del espárrago.....	<b>29</b>
Métodos de control de enfermedades ocasionadas por <i>Fusarium</i> spp.....	<b>37</b>
Control químico.....	<b>37</b>
Medidas culturales.....	<b>37</b>
Cultivares resistentes.....	<b>39</b>
Control biológico.....	<b>40</b>
Control preventivo.....	<b>42</b>
Objetivos.....	<b>47</b>
Bibliografía introducción.....	<b>49</b>

<b>CAPÍTULO I:</b> Diversidad genética y compatibilidad vegetativa del complejo de especies de <i>Fusarium solani</i> de fresa en España	<b>61</b>
<b>CAPÍTULO II:</b> Protocolo TaqMan de PCR cuantitativa en tiempo real para la detección y cuantificación precisa de <i>Fusarium solani</i> en plantas de fresa y suelo	<b>87</b>
<b>CAPÍTULO III:</b> Potenciales fuentes de inóculo de especies de <i>Fusarium</i> involucradas en el síndrome del decaimiento del espárrago y evaluación de métodos de desinfestación de suelo mediante protocolos de qPCR	<b>111</b>
<b>CAPÍTULO IV:</b> Bacterias del suelo como potenciales agentes de control biológico de especies de <i>Fusarium</i> asociadas al síndrome de decaimiento del espárrago	<b>141</b>
<b>RESUMEN DE LOS RESULTADOS</b>	<b>161</b>
<b>DISCUSIÓN GENERAL</b>	<b>167</b>
Bibliografía discusión.....	<b>172</b>
<b>CONCLUSIONES</b>	<b>177</b>
Abreviaturas.....	<b>179</b>
<b>ANEXO I</b>	<b>183</b>
<b>ANEXO II</b>	<b>203</b>

## RESUMEN

La fresa y el espárrago son dos cultivos hortícolas de gran importancia económica y social en Andalucía. Ambos cultivos se ven afectados por hongos de suelo del género *Fusarium* que merman su producción, provocando pérdidas económicas en el sector. El complejo de especies de *Fusarium solani* (FSSC) es el agente causal de la podredumbre de raíz y corona de fresa. A su vez, distintas especies del género *Fusarium* (*F. proliferatum*, *F. oxysporum* f. sp. *asparagi* y *F. redolens*) están involucradas en el síndrome del decaimiento del espárrago (ADS, por sus siglas en inglés “Asparagus Decline Syndrome”). En esta Tesis se ha llevado a cabo la **caracterización** de las especies del FSSC presentes en las dos áreas productoras de fresa en España, viveros de producción de planta de las provincias de Ávila, Segovia y Valladolid y campos de producción de fruto de la provincia de Huelva, a través de un abordaje molecular (identificación de las especies por secuenciación molecular, determinación de la diversidad genética y la estructura de la población mediante análisis filogenético) y biológico (determinación de los grupos de compatibilidad vegetativa (VCG, por sus siglas en inglés “Vegetative Compatibility Group”)) (**Capítulo I**). Asimismo, se han desarrollado **protocolos de PCR cuantitativa en tiempo real** (qPCR) para disponer de herramientas moleculares fiables para la detección específica y cuantificación del FSSC en el cultivo de la fresa (**Capítulo II**) y de las principales especies de *Fusarium* implicadas en el ADS: *F. proliferatum*, *F. oxysporum* y *F. redolens* (**Capítulo III**). Estos protocolos de qPCR se han aplicado 1) como **herramientas de diagnóstico fiable** de plantas sintomáticas en campos de fresa y espárrago; 2) como **métodos de control preventivo y análisis de riesgo** de enfermedades, mediante la detección y cuantificación de los hongos patógenos en suelo y agua de riego de fincas de producción; 3) para **la evaluación de la eficacia de tratamientos de desinfestación** de suelo basados en biosolarización, mediante la cuantificación de las densidades de inóculo de los distintos patógenos de fresa y espárrago en el suelo antes y después de los tratamientos. Asimismo, se han abordado métodos de control sostenible del ADS a través de la evaluación de bacterias rizosféricas de los géneros *Bacillus*, *Brevibacterium* y *Streptomyces* como potenciales **agentes de control biológico** de las especies de *Fusarium* asociadas a este síndrome (**Capítulo IV**).

**Capítulo I.** Se obtuvieron 100 aislados de FSSC a partir de plantas sintomáticas y de suelo de fincas de fresa provenientes de las dos regiones productoras de fresa en España: viveros de producción de plantas del norte y centro (provincias de Ávila, Segovia y Valladolid) y campos de producción de fruto del suroeste (provincia de Huelva). Mediante la secuenciación de tres regiones del genoma (*EF-1 $\alpha$* , ITS + 28S y *RPB2*), se determinó la composición de las especies, la diversidad genética y las relaciones filogenéticas entre los aislados de ambas zonas de producción. Asimismo, se identificaron los VCGs presentes en las poblaciones de FSSC de ambas regiones. Se identificaron un total de 7 especies filogenéticas distintas pertenecientes al Clado 3 del FSSC. Las dos áreas productoras presentaron una composición de especies diferente, siendo FSSC 5 y FSSC 2 las especies más abundantes en viveros y campos de producción, respectivamente, y las únicas especies compartidas por ambas áreas de cultivo. Los análisis de diversidad genética determinaron que las poblaciones de FSSC 5 y FSSC 2 de viveros y campos de producción de fruto estaban altamente diferenciadas con una baja tasa de migración entre ambas zonas. Se definieron un total de 47 haplotipos distintos, ninguno de los cuales fue compartido por ambas áreas productoras. Se detectaron aislados patógenos en todas las especies, excepto en FSSC 6 y FSSC 9. FSSC 3 + 4, presente sólo en campos de producción de fruto, fue la especie que mostró el mayor porcentaje de aislados patógenos. No se observó relación entre patogenicidad y origen de los aislados (planta o suelo). Las poblaciones de FSSC procedentes de los campos de producción de fresa de Huelva mostraron mayor diversidad genética y de VCG que las presentes en viveros. Este trabajo ha contribuido al conocimiento de la diversidad del FSSC presente en las regiones productoras de fresa de España y podrá aplicarse, por tanto, para el desarrollo de adecuadas estrategias de manejo del cultivo.

**Capítulo II.** Se desarrolló una herramienta molecular, basada en PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR), para la detección y cuantificación precisa de las especies de FSSC en plantas de fresa y suelo. Se diseñaron un par de cebadores y una sonda TaqMan basados en la secuencia del gen del factor de la traducción 1 alfa (*EF-1 $\alpha$* ), demostrando alta especificidad y sensibilidad de detección (hasta 50 fg de ADN genómico del hongo y hasta 100 conidias/g suelo). En la reacción de qPCR, se incluyó la detección en multiplex de un control interno positivo (CIP), basado en ADN del bacteriófago lambda ( $\lambda$ ), para aumentar la fiabilidad de la detección. El protocolo de qPCR fue validado con muestras de plantas y suelo procedentes de viveros y campos de producción de fruto

de fresa, comparándolo con los métodos tradicionales de cultivo en placa, donde se comprobó su mayor fiabilidad y sensibilidad. Se constató una correlación sustancial entre ambos métodos de detección cuando se analizaron muestras de plantas, y una correlación moderada en el caso de muestras de suelo. Asimismo, esta herramienta se utilizó para evaluar la eficacia del tratamiento de desinfestación del suelo mediante biosolarización con gallinaza sobre la disminución de los niveles de FSSC en el suelo. Los suelos biosolarizados experimentaron una reducción significativa de la densidad de inóculo del hongo en el suelo tras la desinfestación, lo que correlacionó con un aumento significativo de la producción de fruto. Este protocolo de qPCR representa una herramienta útil y aplicable para la evaluación preventiva del suelo y de plantas de vivero antes de la plantación, para evitar así la infección por FSSC y las consecuentes pérdidas de producción.

**Capítulo III.** Se diseñaron protocolos de qPCR para la detección y cuantificación de *Fusarium proliferatum*, *F. oxysporum* y *F. redolens*, principales especies de *Fusarium* involucradas en el síndrome del decaimiento del espárrago en España. Los cebadores y las sondas TaqMan se diseñaron en la región ITS (*F. oxysporum*) y en la región IGS (*F. proliferatum* y *F. redolens*) del ADN ribosomal, demostrando alta especificidad y sensibilidad de detección (hasta 1-10 fg de ADN genómico del hongo y hasta 10 conidias/g suelo). En cada uno de los protocolos de qPCR diseñados, se incluyó la detección en multiplex de un CIP basado en ADN de  $\lambda$ , para aumentar la fiabilidad de la detección. Estos protocolos se validaron sobre plantas de espárrago sintomáticas y muestras de suelo procedentes de campos de producción con síntomas de decaimiento, demostrando ser más sensibles y fiables que los métodos de detección tradicionales de cultivo en placa. *F. oxysporum* y *F. proliferatum* fueron las especies más abundantes en las plantas sintomáticas. En las muestras de suelo, *F. oxysporum* fue la especie predominante, seguida de *F. redolens*. Para determinar las posibles fuentes de inóculo de las especies de *Fusarium* patógenas, se analizó el agua de riego de fincas de espárrago con y sin problemas de decaimiento. La presencia de especies patógenas de *Fusarium* en el agua de riego de las parcelas afectadas por ADS fue demostrada. Esto sugiere que, además del material vegetal de vivero y el suelo de cultivo, el agua de riego es una potencial fuente de inóculo de las especies de *Fusarium* analizadas. A su vez, las herramientas moleculares diseñadas se aplicaron para evaluar la eficacia de tres tratamientos de desinfestación del suelo sobre la reducción de la densidad de inóculo de *F. proliferatum*, *F. oxysporum* y *F. redolens* en el suelo: fumigación química con dazomet, biosolarización con pellet

de gallinaza y de *Brassica carinata*. Se demostró que la biosolarización con pellet de *B. carinata* redujo los niveles de las tres especies de *Fusarium* en el suelo con la misma eficacia que el tratamiento químico, lo que se reflejó en un aumento en la producción y el rendimiento del cultivo. Estos resultados avalan el uso de la biosolarización con enmiendas orgánicas como una alternativa eficaz y sostenible a los tratamientos químicos de desinfección, y se pueden aplicar para reducir la concentración de inóculo en el suelo antes de la plantación.

**Capítulo IV.** Se evaluaron cinco cepas bacterianas rizosféricas, pertenecientes a los géneros *Bacillus*, *Brevibacterium* y *Streptomyces*, como potenciales agentes de biocontrol de aislados patógenos de *F. proliferatum*, *F. oxysporum* f. sp. *asparagi* y *F. redolens* del espárrago. Todas las cepas bacterianas inhibieron el crecimiento micelial de los aislados fúngicos en los ensayos de enfrentamientos duales *in vitro*. Las cepas más efectivas (*Streptomyces fradiae* Hvs6, *Bacillus velezensis* FC37 y *B. licheniformis* Hvs2) fueron coinoculadas en plantas de espárrago junto con los aislados patógenos de las tres especies de *Fusarium*, respectivamente. FC37 y HVS2 fueron las más efectivas para controlar los aislados patógenos de *F. proliferatum* y *F. oxysporum* f. sp. *asparagi*, seguida por Hvs2. Hvs6 mostró un menor efecto protector, solamente en plantas inoculadas con *F. proliferatum*. No se observó efecto de protección contra los aislados de *F. redolens* por parte de ninguna de las cepas bacterianas ensayadas. FC37 produjo altos niveles de actividad proteasa y amilasa y presentó actividad solubilizadora de fosfato. Hvs2 produjo una gran diversidad de actividades enzimáticas, destacando en la producción de  $\beta$ -glucosidasa y celulasa, además de producir ácido cianhídrico (HCN). Estos resultados sugieren que los mecanismos de acción antagonistas frente a las especies *F. proliferatum* y *F. oxysporum* f. sp. *asparagi* estén relacionado con estas propiedades antifúngicas. Este trabajo ha demostrado la eficacia de dos cepas de *Bacillus* (FC37 y Hvs2) como potenciales agentes de biocontrol del síndrome del decaimiento del espárrago. Esta estrategia de control, más sostenible y respetuosa con el medioambiente, reduciría la dependencia de los tratamientos químicos.



## ABSTRACT

Strawberry and asparagus are two horticultural crops of great economic and social importance in Andalusia. Both crops are affected by soil-borne fungi of the genus *Fusarium* that reduce their production, causing economic losses. *Fusarium solani* species complex (FSSC) is the causal agent of Crown and root rot of strawberry. In the same way, different species of *Fusarium* (*F. proliferatum*, *F. oxysporum* f. sp. *asparagi* and *F. redolens*) are involved in the Asparagus decline syndrome (ADS). In this Thesis, the **characterization** of the FSSC species present in the two strawberry-producing areas in Spain, plant production nurseries in the provinces of Ávila, Segovia and Valladolid, and fruit production fields in the province of Huelva, has been carried out through a molecular (identification of the species by molecular sequencing, determination of the genetic diversity and the population structure through phylogenetic analysis) and biological approaches (determination of vegetative compatibility groups (VCG)) (**Chapter I**). Likewise, quantitative real-time PCR (qPCR) protocols have been developed to provide reliable molecular tools for the specific detection and quantification of FSSC in strawberry fields (**Chapter II**) and of the main *Fusarium* species involved in ADS: *F. proliferatum*, *F. oxysporum* and *F. redolens* (**Chapter III**). These qPCR protocols have been applied 1) as **reliable diagnostic tools** on symptomatic plants of strawberry and asparagus fields; 2) as **preventive control and disease risk analysis methods**, through the detection and quantification of the fungal pathogens in soil and irrigation water of production fields; 3) for **the evaluation of the efficacy of soil disinfestation treatments** based on biosolarization, by quantifying the inoculum densities of the different strawberry and asparagus pathogens in the soil before and after the treatments. Likewise, sustainable control methods for ADS have been approached through the evaluation of rhizospheric bacteria of the *Bacillus*, *Brevibacterium* and *Streptomyces* genera as **potential biological control agents** of the *Fusarium* species associated with this syndrome (**Chapter IV**).

**Chapter I.** One hundred isolates of FSSC were collected from symptomatic plants and soil of strawberry fields from the two strawberry-producing regions in Spain: plant production nurseries in the north and center (Ávila, Segovia and Valladolid provinces) and fruit production

fields in the southwest (Huelva province). The species composition, the genetic diversity and the phylogenetic relationships between the isolates from both production areas were determined by sequencing three regions of the genome (*EF-1 $\alpha$* , ITS + 28S, and *RPB2*). Likewise, the VCGs present in the FSSC populations of both regions were determined. A total of 7 distinct phylogenetic species belonging to Clade 3 of FSSC were identified. Both producing areas presented a different species composition, with FSSC 5 and FSSC 2 being the most abundant species in nurseries and production fields, respectively, and the unique species shared by both growing areas. The genetic diversity analysis determined that the populations of FSSC 5 and FSSC 2 from nurseries and fruit production fields were highly differentiated with a low migration rate between both zones. A total of 47 different haplotypes were defined, none of which was shared by both producing areas. Pathogenic isolates were present in all but FSSC 6 and FSSC 9 species. FSSC 3 + 4, which was only present in fruit production fields, contained the highest percentage of pathogenic isolates. No relationship was observed between pathogenicity and the source of isolates (plant or soil). The FSSC populations from the strawberry production fields of Huelva showed greater genetic and VCG diversity than those present in nurseries. This work has contributed to the knowledge of the diversity of the FSSC present in the strawberry-producing regions of Spain and, therefore, can be applied to the development of adequate crop management strategies.

**Chapter II.** A molecular tool, based on qPCR, was developed for the accurate detection and quantification of FSSC species in strawberry plants and soil. A pair of primers and a TaqMan probe were designed based on the translation elongation factor 1 alpha (*EF-1 $\alpha$* ) gene, showing high specificity and sensitivity of detection (up to 50 fg of fungal genomic DNA and up to 100 conidia / g soil). A positive internal control (PIC), based on DNA from bacteriophage lambda ( $\lambda$ ), was included in the qPCR reaction in multiplex to increase the reliability of the detection. The qPCR protocol was validated on plant and soil samples from nurseries and strawberry fruit production fields, comparing it with traditional plate culture methods, where its greater reliability and sensitivity were verified. A substantial correlation was found between both detection methods when plant samples were analyzed, and a moderate correlation in the case of soil samples. Likewise, this tool was applied to evaluate the effectiveness of soil disinfection treatments based on biosolarization with chicken manure on the reduction of FSSC levels in the soil. The biosolarized soils displayed a significant reduction of the fungal inoculum density in the soil after disinfection,

which correlated with a significant increase in fruit production. This qPCR protocol represents a useful and applicable tool for the preventive evaluation of soil and nursery plants before planting, to avoid infection by FSSC and the consequent loss of production.

**Chapter III.** qPCR protocols were designed for the detection and quantification of *Fusarium proliferatum*, *F. oxysporum* and *F. redolens*, the main *Fusarium* species involved in the Asparagus decline syndrome in Spain. Primers and TaqMan probes were designed in the ITS region (*F. oxysporum*) and the IGS region (*F. proliferatum* and *F. redolens*) of ribosomal DNA, displaying high specificity and sensitivity of detection (up to 1-10 fg of genomic DNA of the fungus and up to 10 conidia / g soil). A  $\lambda$  DNA-based PIC was included in each designed qPCR reaction in multiplex, to increase detection reliability. These protocols were validated on symptomatic asparagus plants and soil samples from production fields with decline symptoms, proving to be more sensitive and reliable than traditional plate culture detection methods. *F. oxysporum* and *F. proliferatum* were the most abundant species in symptomatic plants. In the soil samples, *F. oxysporum* was the predominant species, followed by *F. redolens*. To determine the possible sources of inoculum of the pathogenic *Fusarium* species, the irrigation water of asparagus fields with and without decline problems was analyzed. The presence of pathogenic *Fusarium* species in the irrigation water of the ADS-affected fields was demonstrated. This suggests that, in addition to nursery plant material and cultivation soil, irrigation water is a potential source of inoculum for the *Fusarium* species analyzed. Likewise, the designed molecular tools were applied to evaluate the effectiveness of three soil disinfestation treatments on the reduction of *F. proliferatum*, *F. oxysporum* and *F. redolens* inoculum densities in the soil: chemical fumigation with dazomet, and biosolarization with pellet of chicken manure and *Brassica carinata*. Biosolarization with *B. carinata* pellet reduced the levels of the three *Fusarium* species in the soil with the same effectiveness as the chemical treatment, which was reflected in an increase in the production and crop yields. These results support the use of biosolarization with organic amendments as an effective and sustainable alternative to chemical disinfestation treatments, and can be applied to reduce the fungal inoculum in the soil before planting.

**Chapter IV.** Five rhizospheric bacterial strains, belonging to *Bacillus*, *Brevibacterium* and *Streptomyces* genera, were evaluated as potential biocontrol agents of pathogenic isolates of *F. proliferatum*, *F. oxysporum* f. sp. *asparagi* and *F. redolens* of asparagus. All the bacterial strains inhibited the mycelial growth of the fungal isolates in the dual confrontation *in vitro* assays. The most effective strains (*Streptomyces fradiae* Hvs6, *Bacillus velezensis* FC37 and *B. licheniformis* Hvs2) were co-inoculated in asparagus plants together with the pathogenic isolates of the three *Fusarium* species, respectively. FC37 and Hvs2 were the most effective in controlling pathogenic *F. proliferatum* and *F. oxysporum* f. sp. *asparagi* isolates. Hvs6 showed a lower protective effect, only on plants inoculated with *F. proliferatum*. No protective effect against *F. redolens* isolates was observed by any of the bacterial strains tested. FC37 produced high levels of protease and amylase activity and exhibited phosphate solubilizing activity. Hvs2 produced a great diversity of enzymatic activities, standing out in the production of  $\beta$ -glucosidase and cellulase, in addition to producing hydrocyanic acid (HCN). These results suggest that the antagonistic mechanisms of action against *F. proliferatum* and *F. oxysporum* f. sp. *asparagi* are related to these antifungal properties. This work has demonstrated the efficacy of two *Bacillus* strains (FC37 and Hvs2) as potential biocontrol agents of asparagus decline syndrome. This control strategy, more sustainable and respectful with the environment, would reduce dependence on chemical treatments.

# **Introducción General y Objetivos**



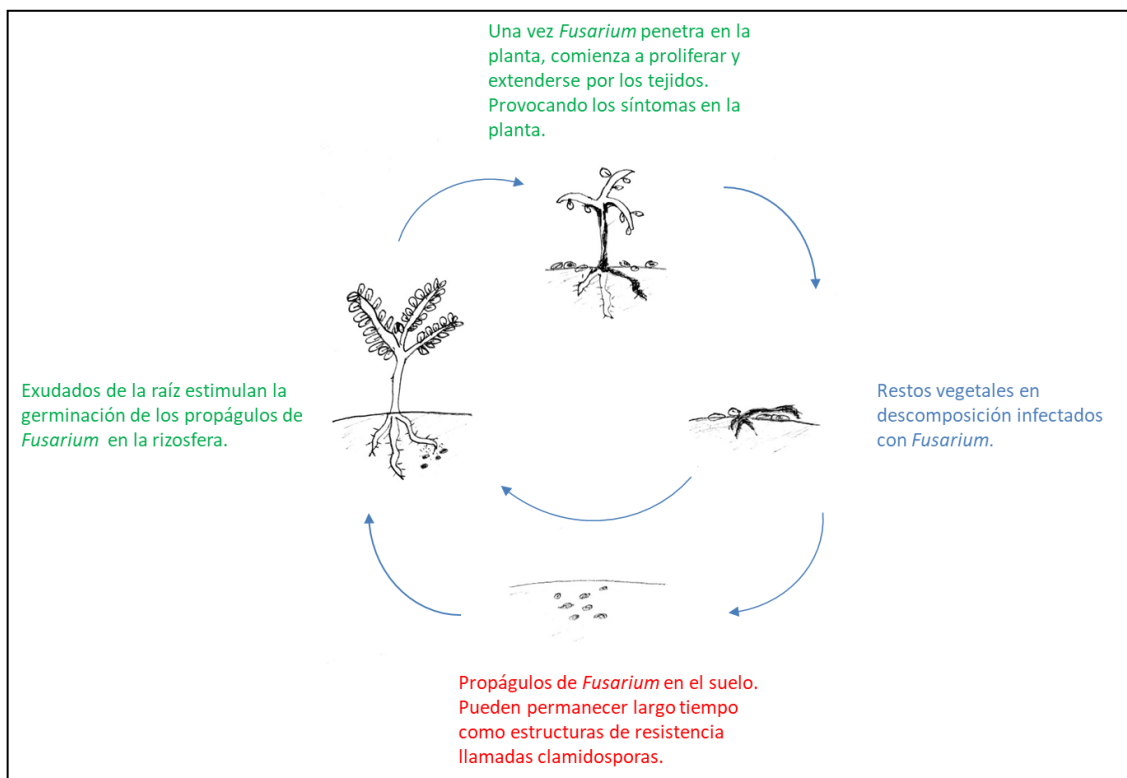
## INTRODUCCIÓN GENERAL

### El género *Fusarium*

El género *Fusarium* fue descrito por Link en 1809. Las especies del género *Fusarium* son habitantes comunes del suelo, restos orgánicos, raíces y parte aérea de las plantas. Está ampliamente distribuido por todo el mundo debido a su capacidad para crecer en un amplio rango de sustratos y a la dispersión de sus esporas mediante mecanismos eficientes (Nelson y col., 1994). Muchas especies de *Fusarium* viven en el suelo como saprófitas o en el interior de plantas como endófitas, aparentemente sin provocar daño alguno a la planta. Sin embargo, se han descrito multitud de especies pertenecientes a este género capaces de producir enfermedades en plantas, humanos y animales. Las infecciones más comunes en animales y humanos afectan a córneas y uñas (Boonpasart y col., 2002; Cullen y col., 2019), aunque pueden darse casos de infecciones sistémicas en pacientes inmunodeprimidos (Rabodinirina y col., 1994). Además, algunas especies de *Fusarium* son capaces de producir metabolitos secundarios tóxicos, llamados micotoxinas, que representan una amenaza para la seguridad alimentaria humana y del ganado (Munkvold, 2017).

En su faceta como patógeno de plantas, el género *Fusarium* es capaz de provocar diversas enfermedades en un elevado número de especies. Según una lista publicada por la Sociedad Americana de Fitopatología (<https://www.apsnet.org/edcenter/resources/commonnames/Pages/default.aspx>), en la que se incluyen plantas de importancia económica, aproximadamente el 80% de las mismas puede padecer alguna enfermedad relacionada con *Fusarium*. El tipo de enfermedades que provocan las especies de *Fusarium* es bastante variable, así como su gravedad. Pueden incluir podredumbre de raíz o tallo, marchitamiento, podredumbre de semilla o fruto, amarilleamiento o caída de hojas (Leslie y Summerell, 2006).

El ciclo de la enfermedad suele ser similar entre las distintas especies de *Fusarium*, y se puede dividir en tres fases: durmiente, parasítica y saprófita (Beckman, 1987). En la fase durmiente se produce la formación de estructuras de resistencia o durmientes en el suelo. Durante la fase parasítica el hongo penetra la planta huésped y coloniza los tejidos, provocando los síntomas en la planta. Finalmente, se produce una fase saprófita en los tejidos de la planta muerta (**Figura 1**).



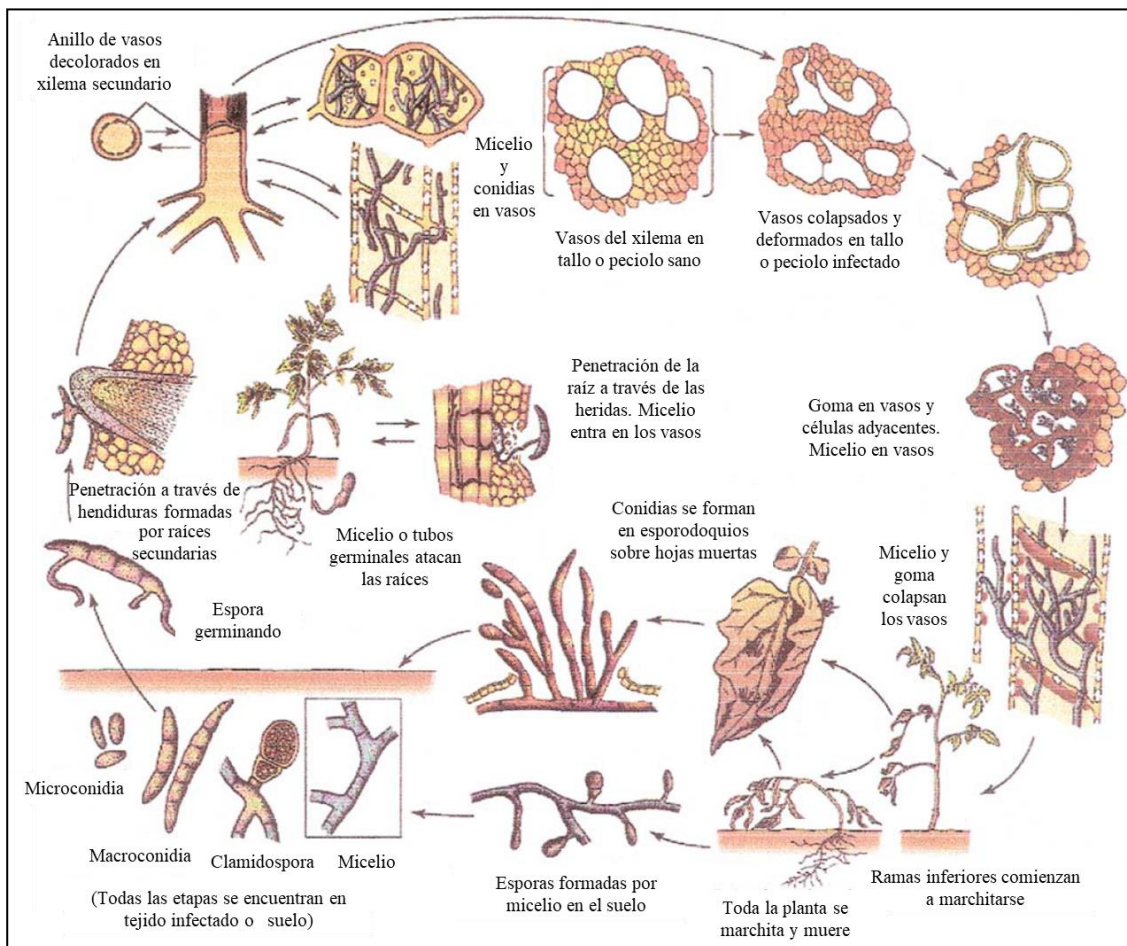
**Figura 1.** Esquema representativo del ciclo infeccioso típico de un *Fusarium* patógeno de plantas. Con las fases durmiente (rojo), parasítica (verde) y saprófita (azul).

En la fase durmiente, los propágulos del hongo presentes en el suelo, ya sea en forma de micelio del hongo, esporas tipo macroconidias o microconidias, o estructuras de resistencia llamadas clamidosporas, se encuentran en letargo al encontrarse en un medio desfavorable. Sin embargo, pueden volver a activarse cuando estos propágulos entran en contacto con exudados de raíz liberados a la rizosfera por una planta hospedadora, aunque también pueden ser activados por los exudados de una planta no hospedadora o por restos vegetales remanentes (Steinkellner y col., 2008).

La fase parasítica comienza cuando el propágulo es activado y penetra en los tejidos de la planta a través de alguna abertura en la epidermis, normalmente producida por la formación de nuevas raíces secundarias, heridas provocadas por otros parásitos o por el manejo del cultivo, o a través de las flores o semillas (Rodríguez-Gálvez y Mendgen, 1995; Rodríguez-Molina, 2003). Una vez el hongo ha penetrado, comienza a proliferar y las hifas invaden el tejido de la planta provocando diferentes síntomas. Durante el proceso de infección, se produce una alta cantidad de



esporas y clamidosporas que pueden liberarse al suelo a través de los restos de la planta infectada que se descomponen. De esta forma, pueden infectar a otra planta o permanecer en el suelo en estado durmiente durante largo tiempo hasta la llegada de un nuevo hospedador. Algunas especies de *Fusarium* son capaces de colonizar los tejidos de las plantas sin provocarle síntomas. Estos huéspedes alternativos actúan como reservorios de *Fusarium* y constituyen potenciales fuentes de inóculo. En aquellas especies de *Fusarium* que llegan a penetrar el xilema de la planta, la proliferación del micelio del hongo provoca el colapso de estos vasos y, por lo tanto, un déficit de agua y nutrientes en la planta infectada (Walter y col., 2009). Esto ocurre, por ejemplo, en la fusariosis del tomate, enfermedad producida por el colapso de los vasos del xilema de la planta por el micelio de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* (**Figura 2**).



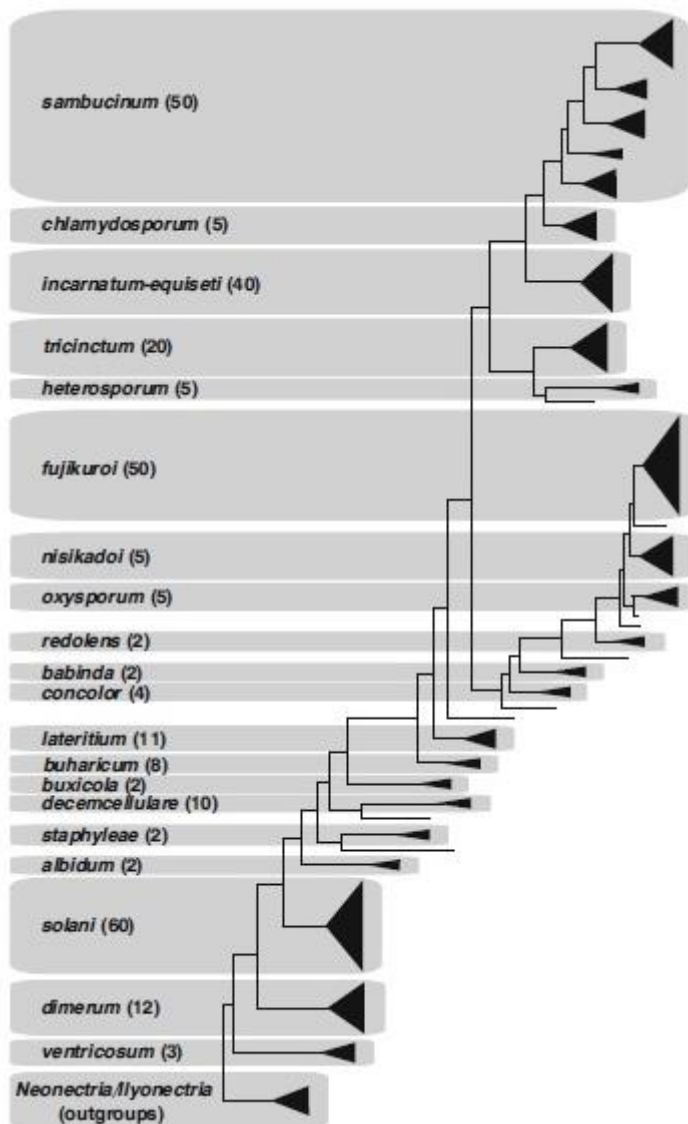
**Figura 2.** Esquema representativo de la fusariosis del tomate (modificado de Agrios, 1986).

Según Leslie y Summerell (2006), el género *Fusarium* se ubica en la División *Ascomycota*, Subdivisión *Pezizomycota*, Clase *Sordariomycetes*, Subclase *Hypocreomycetidae*, Orden *Hypocreales* y Familia *Hypocreaceae*. Se trata de la forma anamorfa (asexual) del hongo, ya que la forma teleomorfa (sexual) tiene otra clasificación distinta. La mayoría de los teleomorfos han sido clasificados en el género *Gibberella*, ubicado en el Orden *Hypocreales* y Familia *Nectriaceae*, aunque algunos pertenecen a otros órdenes. Sin embargo, debido a la dificultad para diferenciar las especies de teleomorfos mediante características morfológicas, a que la mayoría de las especies solo se han conseguido observar bajo condiciones de laboratorio, y a que en algunas especies no se conoce forma sexual, la clasificación de la forma anamorfa es la más utilizada (Leslie y Summerell, 2006).

La taxonomía de *Fusarium* ha sufrido una serie de cambios en los últimos 100 años y, en consecuencia, el concepto de especie dentro del género ha variado mucho. De esta forma, los taxónomos han seguido principalmente 3 criterios para su clasificación. El criterio morfológico ha sido el más utilizado, analizando características macroscópicas y microscópicas, como el color, forma y tamaño de la colonia, forma y tamaño de macroconidias y microconidias, y presencia o ausencia de clamidosporas. Sin embargo, este criterio puede llevar fácilmente a error debido a que especies distintas pueden ser morfológicamente muy similares. Recientemente, los criterios biológicos, basados en la reproducción sexual de los individuos dentro de la especie, y filogenéticos, a partir de la secuenciación de varias regiones del genoma o *loci* y comparación de las secuencias obtenidas con distintas bases de datos, se han convertido en herramientas más fiables de clasificación (Summerel y col., 2010).

En general, los conceptos de especie biológica y especie filogenética resultan en agrupamientos similares, mientras que frecuentemente las especies descritas morfológicamente engloban a varias especies biológicas/filogenéticas. A pesar de ello, estos últimos criterios presentan también algunas desventajas. La reproducción sexual de los individuos a veces es difícil de conseguir, incluso en condiciones experimentales o, como en el caso de *Fusarium oxysporum* y *F. redolens*, las especies no presentan reproducción sexual conocida. Por otro lado, el uso de análisis filogenéticos puede llevar a confusión, pudiendo relacionar la variación intraespecífica con distintas especies. Por ello, se debe analizar un número suficiente de aislados y de *loci* para una correcta clasificación (Summerel y col., 2010). Algunos de los *loci* utilizados más frecuentemente para el análisis filogenético de *Fusarium* son el factor de elongación de la traducción 1 alfa (*EF-1 $\alpha$* ) y la subunidad mayor y menor de la ARN polimerasa II (*RPB1* y *RPB2*, respectivamente) (O'Donnell y

col., 2008; 2015), debido a que son las regiones del genoma filogenéticamente más informativas para la identificación a nivel de especie y están muy bien representadas en las bases de datos. Mediante la combinación de estos dos criterios, las especies morfológicas de *Fusarium* se han subdividido en distintas especies con diferencias filogenéticas y biológicas entre sí, pero con caracteres morfológicos muy parecidos o idénticos entre sí. A este conjunto de especies morfológicamente similares entre sí, se le denomina complejo de especies. Se han llegado a reconocer hasta 20 complejos de especies de *Fusarium* y 300 especies filogenéticamente distintas (O'Donnell y col., 2015) (**Figura 3**). Los complejos están compuestos de aislados saprófitos y patógenos morfológicamente indistinguibles (Nalim y col., 2011; Nelson y col., 1981; O'Donnell, 2000; O'Donnell y col., 2009; Short y col., 2013).



**Figura 3.** Árbol filogenético construido a partir de las secuencias de los *loci* *RPB1* y *RPB2* (O' Donnell y col., 2015). Representa las relaciones de parentesco entre los distintos complejos de especies (en gris), así como el número aproximado de especies filogenéticamente distintas en cada complejo.

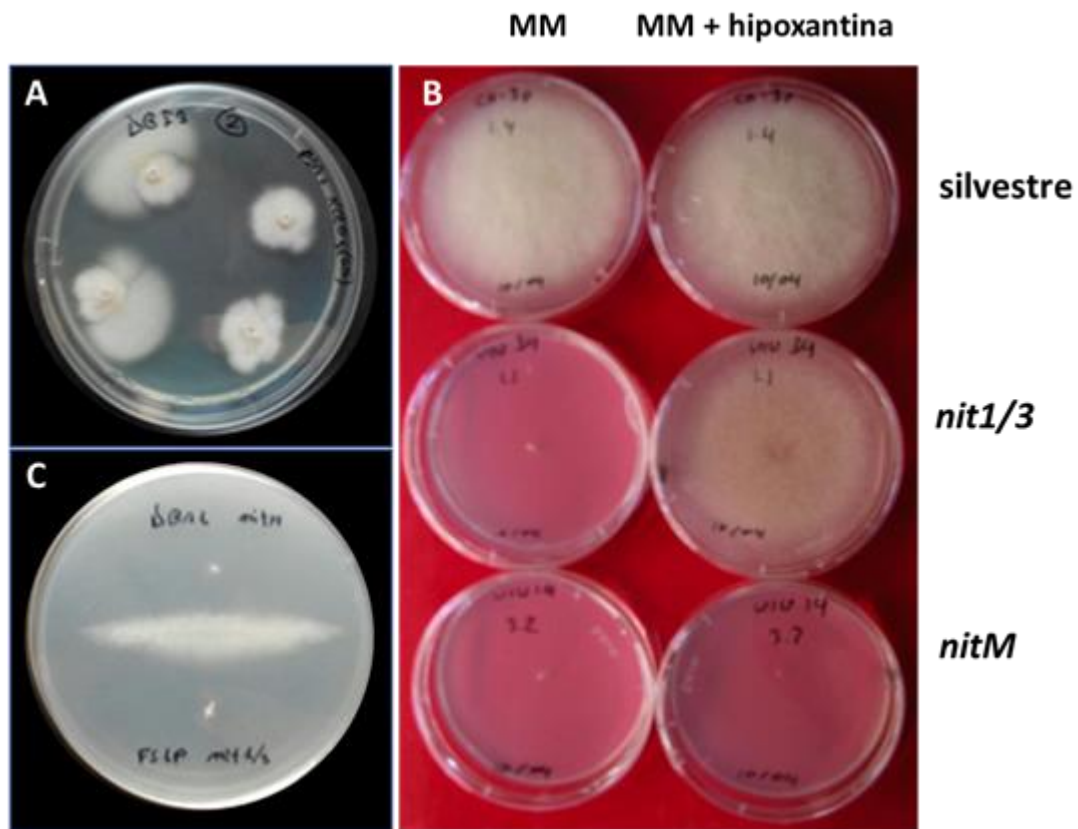
El análisis filogenético y los estudios de diversidad genética de una población de *Fusarium*, o de cualquier otro hongo, son necesarios para un mejor conocimiento del mismo, lo que es indispensable para poder implementar estrategias de control más efectivas. Este tipo de estudios se ha llevado a cabo, por ejemplo, para la caracterización de la población de *F. oxysporum* en cultivos de fresa en California (Henry y col., 2017) y de las poblaciones de varias especies de *Fusarium* en cultivos de espárrago en España y Reino Unido (Brizuela y col., 2020; Wong y Jeffries, 2006). A través de los análisis filogenéticos y de diversidad genética de poblaciones de hongos, es posible diferenciar especies dentro de un mismo género, demostrar la existencia de especies nuevas, inferir si existe relación entre grupos filogenéticos y caracteres de interés agronómico como la patogenicidad, los grupos de compatibilidad vegetativa (VCG), el origen geográfico de los aislados, etc. Asimismo, permite determinar si existe flujo genético entre dos poblaciones para determinar posibles fuentes de inóculo de una población patógena.

Cabe destacar el uso de algunos sistemas de clasificación usados comúnmente para determinados complejos de especies. Por ejemplo, los aislados del complejo de especies de *F. oxysporum* (*Fusarium oxysporum* species complex, FOOSC) suelen clasificarse en formas especiales (*formae speciales*), dependiendo del rango de hospedador al que afecten. Este tipo de clasificación, introducida por Snyder y Hansen en 1940 para *F. oxysporum*, es muy útil para distinguir los aislados según su patogenicidad y especie/s de planta a la que infectan. En una revisión reciente de esta clasificación, se han recogido 106 *formae speciales* bien descritas y otras 37 que no se han considerado suficientemente documentadas (Edel-Hermann y Lecomte, 2019). En algunas *formae speciales* esta clasificación puede ser aún más precisa, ya que, dependiendo del genotipo del huésped o cultivar al que afecten, se pueden distinguir razas, las cuáles se nombran numéricamente según el orden de descubrimiento. Por ejemplo, dentro de la forma especial de *F. oxysporum* que afecta a la lechuga (*F. oxysporum* f. sp. *lactucae*), se conocen hasta 4 razas distintas cuya patogenicidad está relacionada con el tipo de cultivar de lechuga al que infectan (Gilardi y col., 2017). Sin embargo, este tipo de clasificación también tiene algunas desventajas. La patogenicidad de los aislados puede verse afectada por muchas variables, como la temperatura, la edad del hospedador o el método de inoculación. Además, distintas especies pueden afectar al mismo hospedador, dándose casos de estudios filogenéticos que clasifican a aislados de una misma *forma specialis*, en especies filogenéticas distintas (Baayen y col. 2000b; O'Donnell y col. 1998). A pesar de estos inconvenientes, su uso está ampliamente extendido por su utilidad práctica en el campo de

la fitopatología.

La clasificación mediante grupos de compatibilidad vegetativa (VCG) refleja mejor el parentesco evolutivo entre los distintos aislados, ya que aislados pertenecientes al mismo VCG suelen presentar idénticos o muy similares genotipos, y normalmente pertenecen a la misma línea clonal (Baayen y col., 2000b; Kistler, 1997). Por ello, los análisis de compatibilidad vegetativa se han usado para estudiar los orígenes y las relaciones entre los aislados de especies de *Fusarium* y caracterizar su diversidad. El método estandarizado para la determinación del VCG fue originalmente propuesto por Puhalla (1985) y Correll y col. (1987) en FOVC, usando mutantes auxótrofos para nitrato (*nit*) (**Figura 4**). La técnica utiliza la capacidad que tienen algunos aislados para formar heterocariontes con otros aislados mediante la fusión de sus hifas o anastomosis, permitiendo el intercambio de información (Leslie, 1993). Aquellos aislados que son capaces de realizar anastomosis entre sí, pertenecen al mismo VCG. La compatibilidad vegetativa resulta una interesante herramienta para analizar la diversidad en las poblaciones de *Fusarium* (Pastrana y col., 2017a; Sharifi y col., 2008).

La incidencia de especies de *Fusarium* en cultivos de importancia económica en España ha sido registrada en numerosos trabajos (Alves-Santos y col., 2002; García-Ruiz y col., 2009; Jiménez-Díaz y col., 1989; Palmero y col., 2012; Pérez-Sierra y col., 2007). Concretamente, algunas especies de *Fusarium* afectan a cultivos hortícolas de gran importancia estratégica en el medio rural andaluz, como el cultivo de la fresa (Pastrana y col., 2014) y del espárrago (Corpas-Hervias y col., 2006).



**Figura 4.** (A) Inducción de la obtención de mutantes *nit* de *Fusarium solani* en medio Patata-dextrosa-agar (PDA) + 4% Clorato potásico. (B) Caracterización de mutantes *nit1/3* y *nitM* en medio mínimo (MM) con nitrato como única fuente de nitrógeno: el fenotipo silvestre crece usando nitrato; el mutante *nit1/3* crece en MM de forma hialina, pero crece normalmente usando hipoxantina como fuente de nitrógeno; el mutante *nitM* crece de forma hialina en los dos medios, al no poder usar ni nitrato, ni hipoxantina. (C) Enfrentamiento de mutante *nit1/3* y *nitM* en MM; si se produce anastomosis cuando las hifas contactan en el centro de la placa, se produce intercambio genético que permite la asimilación del nitrato del medio y se refleja en un crecimiento silvestre del micelio. Esto permite determinar si dos aislados pertenecen al mismo VCG.



## El cultivo de la fresa en España

El cultivo de la fresa (*Fragaria x ananassa* Duch.) en España tiene una gran importancia económica y social. España es el primer país productor de fruto de fresa de Europa y el sexto en el mundo, con una producción aproximada en 2019 de 351.960 t. El cultivo para producción de fruto se concentra en la zona costera de Huelva y se caracteriza por formar parte de una horticultura intensiva, muy tecnificada, moderna y competitiva, con marcada proyección al mercado internacional. En torno al 85% de la producción se destina a terceros países, siendo España el mayor exportador de este fruto en el mundo a fecha de 2019 ([http://www.fao.org/faostat/es/#rankings/countries\\_by\\_commodity](http://www.fao.org/faostat/es/#rankings/countries_by_commodity)) (Figura 5). La mayor parte de las exportaciones se destinan a países de nuestro entorno de la Unión Europea, siendo los principales países receptores Alemania y Francia, seguidos de Reino Unido e Italia en 2019 (<https://www.fepex.es/datos-del-sector/exportacion-importacion-espaa%20B1ola-frutas-hortalizas>).

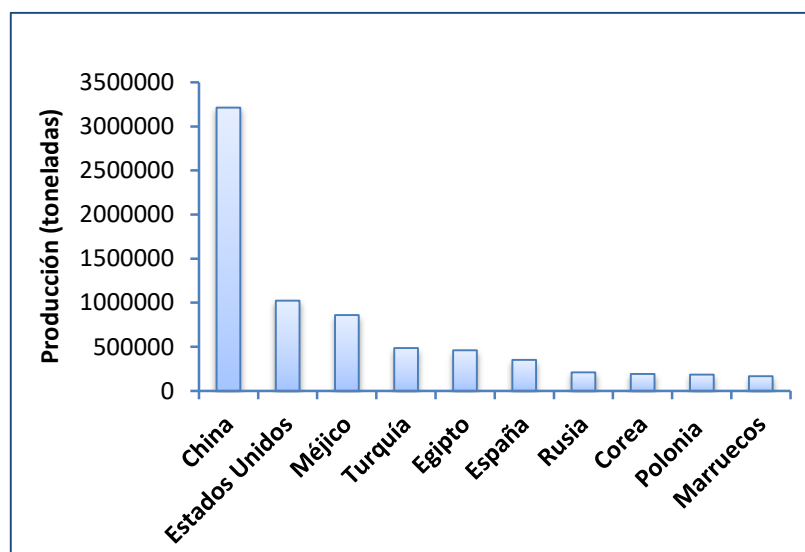


Figura 5. Los 10 países mayores productores de fresa en el mundo (FAOSTAT, 2019).

Una particularidad del cultivo de la fresa en España es su producción diferenciada en dos zonas geográficas separadas, con notables condiciones agroclimáticas distintas. La producción vegetativa de plantas se lleva a cabo en los llamados viveros de altura de Castilla y León (principalmente en las provincias de Segovia, Ávila y Valladolid), mientras que el cultivo para la obtención de frutos se realiza mayoritariamente en los campos de producción de la provincia de Huelva (Figura 6).



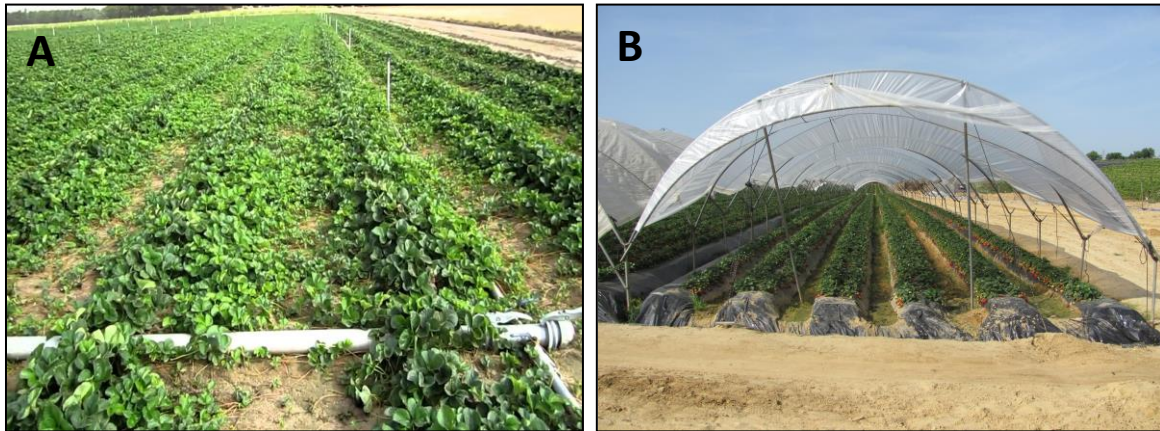
**Figura 6.** Áreas de producción de fresa en España. Las plantas son producidas en viveros de altura de las provincias de Ávila, Segovia y Valladolid (azul), y son enviadas y trasplantadas a la zona de producción de fruto de la provincia de Huelva (rojo).

Esta diferenciación es una consecuencia de la particular fisiología de la especie, la cual necesita unas condiciones específicas de fotoperiodo y termoperiodo para multiplicarse vegetativamente de modo adecuado. Esas condiciones se consiguen de manera plena en los cultivos de vivero, localizados en zonas elevadas sobre el nivel del mar, llanas, arenosas, donde las plantas adquieren una media de entre 150 y 200 horas-frío (número de horas  $< 7^{\circ}\text{C}$ ) por ciclo de cultivo, y aisladas del cultivo de producción de fruto de fresa y otros frutos rojos como medida de aislamiento fitosanitario. De esa forma, es más fácil garantizar una correcta madurez fisiológica consistente en una adecuada diferenciación a yemas de flor y una equilibrada entrada en producción en los campos



de fructificación (López-Aranda, 2008). La plantación en los viveros se produce entre abril y mayo. El material vegetal consiste en plantas estolonadas o plantas hija procedentes de plantas madre que se mantienen en el vivero bajo condiciones que preservan su buen estado fitosanitario. Este cultivo se realiza al aire libre, en extensivo y se practica la rotación trienal con cultivos como cereal, endivia, zanahoria, girasol o barbecho (**Figura 7A**). La desinfestación del suelo previa a la plantación es una actividad fundamental para evitar la infección de la planta en vivero, lo que permite partir de plantas sanas y libres de patógenos para la producción.

En los campos de producción de fruto de fresa de la provincia de Huelva, el cultivo se inicia durante septiembre y octubre, con el trasplante de las plantas procedentes de viveros. En este caso, se buscan unas condiciones agroclimáticas propicias para la fructificación, ya que el aumento del fotoperiodo y del termoperiodo en esta zona aportarán al fruto las características deseadas. La plantación se realiza sobre lomos desinfestados químicamente, protegidos por láminas plásticas opacas, con equipamiento de riego localizado y sistema de fertirrigación, bajo cubierta plástica en forma de micro o macrotúneles (**Figura 7B**). Una pequeña proporción de la producción se lleva a cabo en cultivo sin suelo o cultivo hidropónico que evita los problemas de patógenos de suelo. Sin embargo, no todas las variedades están adaptadas a este tipo de producción (Domínguez, 2012). En los últimos años, el sistema de protección con microtúneles en Huelva ha ido disminuyendo, de forma que actualmente el sistema de producción utilizado mayoritariamente es el macrotúnel (López-Aranda, 2008). Las fincas de producción de fruto son de reducido tamaño, de suelos arenosos y en ellas suele practicarse el monocultivo. La recolección de frutos se lleva a cabo desde finales de diciembre, para las variedades más tempranas, hasta principios de junio, para las variedades de producción tardía o extendida. Una vez recolectado el fruto, se procede a la retirada del cultivo y durante los meses de verano el suelo es preparado y desinfestado para la siguiente campaña.



**Figura 7.** (A) Cultivo de fresa al aire libre en vivero de altura de Segovia; (B) cultivo de fresa en campos de producción de fruto de Huelva, bajo cubierta de plástico en macrotúnel. (Fotos cedidas por la Dra. Ana Pastrana León)

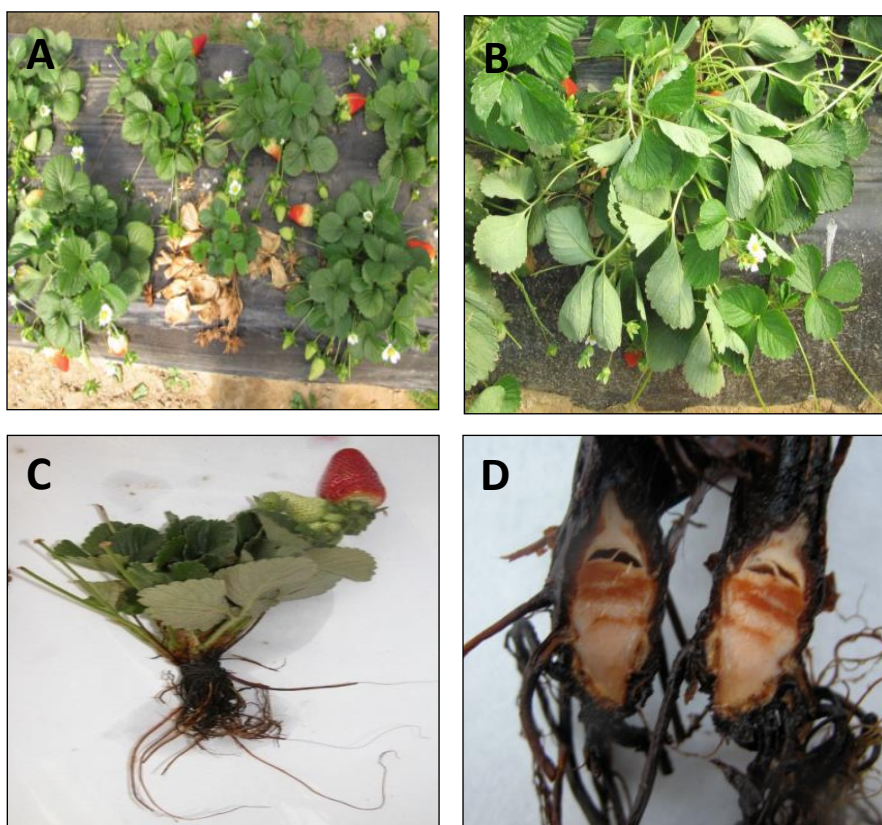
### ***Fusarium solani*, patógeno emergente en el cultivo de la fresa**

Las enfermedades del cultivo de la fresa provocan importantes pérdidas económicas en el sector. Por un lado, reducen la producción y la calidad de las plantas de vivero y de la fruta en los campos de producción, y por otro, las medidas necesarias para su control aumentan los costes de producción. Además, el uso de sustancias químicas destinadas al control de las enfermedades puede conllevar riesgos de residuos en la fruta y la contaminación del medio ambiente.

Algunas de las principales enfermedades que afectan al cultivo de la fresa son provocadas por hongos y oomicetos patógenos de suelo. Durante los últimos años, el oomiceto *Phytophthora cactorum* y el hongo *Verticillium* spp. han sido los principales patógenos de suelo del cultivo de la fresa (De Cal y col., 2004; De los Santos y col., 2002; Redondo y col., 2012). Sin embargo, la prohibición de la mayoría de los fumigantes de suelo que se usaban en el cultivo de la fresa, en especial el bromuro de metilo, según el Protocolo de Montreal (Regulación de la Comunidad Europea (CE) nº 2037/2000 del 29 de junio sobre sustancias que deterioran la capa de ozono), se considera una de las causas del aumento o emergencia de enfermedades provocadas por hongos de suelo (Martin, 2003). Más recientemente, se han descrito en el cultivo de la fresa patógenos de suelo con amplio espectro de hospedador como *Macrophomina phaseolina* (Avilés y col., 2008) y *Fusarium oxysporum* (Arroyo y col., 2009). De hecho, un reciente estudio señala a *M. phaseolina* y

*Fusarium* spp. como los principales hongos patógenos presentes en el suelo de los campos de producción en Huelva (Talavera y col., 2018).

Durante las campañas 2010-2013, se detectaron plantas con síntomas de enanismo, marchitez, necrosis y muerte en campos de producción de fruto de la provincia de Huelva. Ocasionalmente, las coronas de las plantas afectadas presentaban necrosis vasculares y corticales con colores oscilantes entre naranja y marrón oscuro (**Figura 8**). Se identificó el agente causal como *Fusarium solani* (Martius) Sacc. (teleomorfo = *Nectria haematococca* (Berkeley & Broome)) (Pastrana y col., 2014).

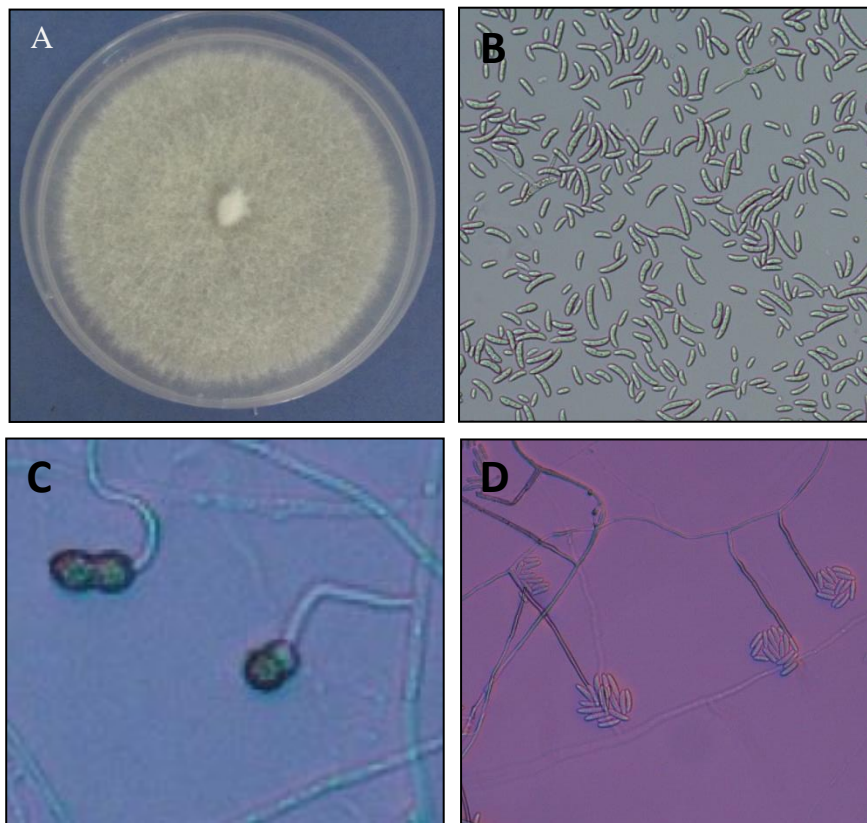


**Figura 8.** Síntomas en plantas de fresa producidos por *Fusarium solani*:  
(A) enanismo, (B) decaimiento, (C) podredumbre de raíz; (D)  
podredumbre de corona.

En España, *F. solani* se ha descrito como agente causal de algunas enfermedades que afectan a cultivos de importancia económica, como la podredumbre de cuello en judía (Tello y col., 1985),

la podredumbre de tallo y raíz en guisante (Tello y col., 1988), la podredumbre de raíz y corona del espárrago (Corpas-Hervias y col., 2006), la podredumbre del disco basal del ajo (Basallote y col., 2011) y la podredumbre de fruto y raíz en cucurbitáceas (Armengol y col., 2000; García-Jiménez y col., 1997; Gómez y col., 2008). Además, se ha descrito como patógeno de plantas de fresa, tanto en viveros de altura (Redondo y col., 2012; Villarino y col., 2019), como en campos de producción de fruto (Pastrana y col., 2014; Villarino y col., 2019).

*F. solani* puede distinguirse de otras especies de *Fusarium* gracias a sus características morfológicas, presencia de clamidosporas, longitud de las monofiálicas, y tamaño y forma de las macroconidias y microconidias (Leslie y Summerell, 2006) (**Figura 9**). Es un hongo habitual del suelo, patógeno de algunas especies vegetales y oportunista en humanos y animales (Aoki y col., 2014).



**Figura 9.** (A) Cultivo de *F. solani* en PDA. (B) Vista al microscopio de estructuras *F. solani*: microconidias y macroconidias (20X); (C) clamidosporas terminales formando dímeros (40X); (D) microfiálicas con microconidias en falsas cabezas (20X).



La especie comúnmente denominada *F. solani* se trata en realidad de un complejo de especies (*F. solani* species complex, FSSC), que engloba a más de 60 especies filogenéticas (O'Donnell, 2000). Mediante análisis filogenéticos se han descrito tres clados principales: los clados 1 y 2 presentan menor diversidad. El clado 3 es el grupo más abundante y diverso, conteniendo tanto especies saprófitas del suelo y patógenas de plantas, como algunas oportunistas de enfermedades de animales y humanos (Zhang y col., 2006).

La incidencia actual de *F. solani* en el cultivo de la fresa en España es desconocida, por lo que los estudios de caracterización son de especial interés para obtener un mayor conocimiento de este hongo y poder implementar estrategias de control efectivas. En este sentido, nuestro equipo de trabajo, junto con el grupo de la Dra. Antonieta de Cal del INIA, Madrid, llevó a cabo un estudio sobre caracterización patogénica, características morfo-culturales y sensibilidad a biocidas de aislados del FSSC procedentes de las dos áreas productoras de fresa de España, viveros de altura y campos de producción de fruto. Los resultados de este trabajo fueron publicados por Villarino y col. (2019). A continuación, se muestra un resumen de los resultados obtenidos:

**Villarino, M., De la Lastra, E., Basallote-Ureba, M.J., Capote, N., Larena, I., Melgarejo, P., De Cal, A. (2019).** Characterization of *Fusarium solani* populations associated with Spanish strawberry crop. *Plant Disease* 103: 1974-1982. DOI: [10.1094/PDIS-02-19-0342-RE](https://doi.org/10.1094/PDIS-02-19-0342-RE).

Se analizaron 103 aislados de *F. solani* recuperados de plantas de fresa sintomáticas y muestras de suelo procedentes de las dos áreas productoras de fresa de España. Los aislados estudiados mostraron una gran diversidad patogénica y morfológica. El 38% de los aislados causó enfermedad en plantas de fresa en condiciones controladas, siendo el enanismo el síntoma más característico. Aunque no hubo diferencia apreciable en el porcentaje de patógenos en ambas zonas, los aislados que presentaron mayor severidad provenían de las plantas sintomáticas de los campos de producción de fruto, mientras que los aislados menos patogénicos procedían de suelo de viveros. Dentro de los aislados patógenos, el 60% se obtuvo de plantas de fresa, mientras que el resto procedían del suelo de las fincas de ambas áreas de cultivo.

Por otro lado, la caracterización morfológica indicó dos poblaciones diferenciadas de *F. solani* entre los viveros de plantas de fresa y los cultivos de producción de fruto,

siendo el color de la colonia y la formación de macroconidias los caracteres que mejor explicaron la alta variabilidad (86,85%): Los aislados de campos de producción de fruto son en su mayoría formadores de macroconidias y sus colonias son de color crema, mientras que el 16% de los aislados de viveros no produjo macroconidias y el color de sus colonias varió entre el blanco, amarillo y rosa. A pesar de que la producción de macroconidias se ha relacionado en otros trabajos con la patogenicidad de *Fusarium* spp. (Albores y col., 2014), no se detectó una relación entre la formación de macroconidias o clamidosporas y la patogenicidad de los aislados españoles del cultivo de la fresa.

La sensibilidad a biocidas fue similar para los aislados de vivero y de campos de producción de fruto, mostrando mayor sensibilidad a la aplicación en campo de dazomet y cloropicrina y menor sensibilidad a metamsodio y 1,3 dicloropropeno. Se concluyó que el intercambio de material entre viveros y campos de producción de fruto de fresa no parece ser una de las principales fuentes de inóculo de FSSC. Se recomienda, no obstante, el análisis fitosanitario del material vegetal de vivero además de una desinfección eficiente del suelo preplantación en ambas zonas de cultivo.

### **El cultivo del espárrago en España**

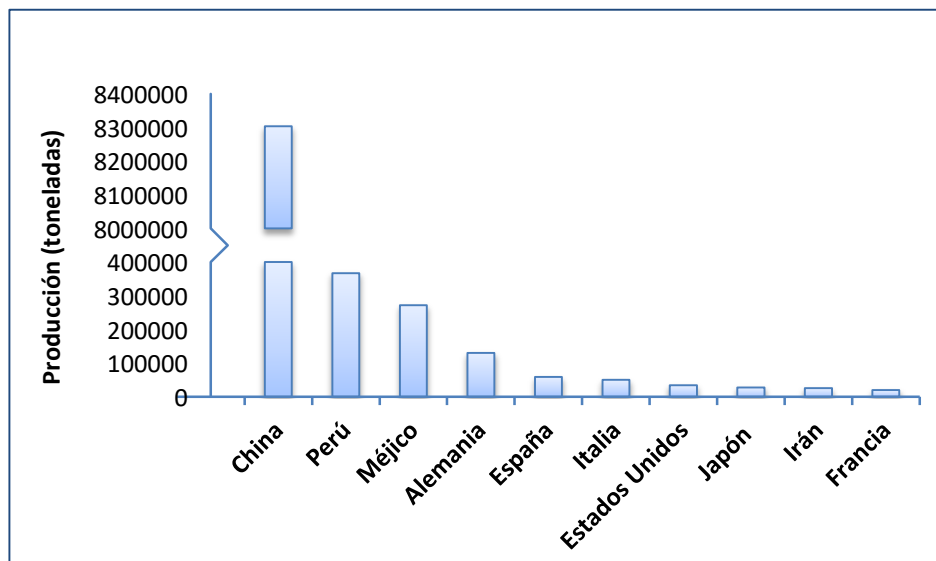
El espárrago comestible cultivado (*Asparagus officinalis* var. *Atilis* L.) es un vegetal vivaz, perenne, de la familia de las liliáceas (Serrano, 2003). La planta de espárrago está formada por tallos aéreos ramificados y una parte subterránea o “garra” constituida por un tallo denominado rizoma, raíces y yemas. La parte de la planta que se comercializa como alimento son los brotes jóvenes, llamados comúnmente “turiones” que, si se dejan madurar, forman los tallos de la planta. Comercialmente se distinguen 3 tipos de espárragos cultivables en función de su color: blanco, morado y verde (**Figura 10**). Los turiones de color blanco se consiguen enterrando los nuevos brotes para evitar que la luz del sol incida sobre ellos y sinteticen clorofila, los verdes y morados han estado expuestos al sol, por lo que adquieren el color verde y, en el caso de los morados, acumulan también antocianinas, lo cual les da su característica tonalidad.



**Figura 10.** En la actualidad existen tres tipos de espárragos cultivables: morados, blancos y verdes. (Foto cedida por Pat Kight)

El espárrago es un cultivo que necesita pocos requerimientos, pero que proporciona un alimento de alto valor nutricional y con propiedades funcionales, gracias a su alto contenido en antioxidantes naturales y otros componentes bioactivos (Rodríguez y col., 2005). Entre ellos, destacan los ácidos fenólicos, flavonoides y ácido ascórbico (Lee y col., 2014). Es un cultivo altamente social, capaz de generar un número considerable de empleos (recolección, embalaje y expedición del producto en fresco y en conserva), suficientes para mantener un medio rural y un futuro estable a la población.

El cultivo del espárrago ha ido en aumento y cobrando importancia económica en España en los últimos años. Con 13.703 ha de superficie dedicadas a su cultivo y 58.610 t de producción en 2019, es el quinto productor mundial y el segundo europeo, tras Alemania ([http://www.fao.org/faostat/es/#rankings/countries\\_by\\_commodity](http://www.fao.org/faostat/es/#rankings/countries_by_commodity)) (**Figura 11**). Entre las regiones de España con mayor producción de espárrago se encuentran: Andalucía con casi el 70% de la producción nacional (39.755 t), Navarra (6.779 t), Castilla-La Mancha (5.026 t), y Extremadura (4.938 t) (Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, 2019). La provincia de Granada reúne alrededor del 70% de la superficie de cultivo de espárrago en Andalucía, con un papel destacado en los municipios de Huétor-Tájar, Ílora, Moraleda de Zafayona, Salar, Villanueva de Mesía y Loja que conforman la Indicación Geográfica Protegida (IGP) Espárrago de Huétor-Tájar.



**Figura 11.** Los 10 países mayores productores de espárrago en el mundo (FAOSTAT, 2019).

La fecha idónea para establecer el cultivo del espárrago es a principios de primavera y se realiza principalmente de dos formas: mediante siembra de semillas o mediante división vegetativa de las garras. El ciclo anual del cultivo del espárrago consta de tres fases diferenciadas: durante el verano, desde el momento en que se dejan de recolectar turiones, la planta tiene un período de acumulación de reservas, llamado desarrollo vegetativo. Cuando llega el invierno, sufre una parada de su actividad debido a las bajas temperaturas, lo que se denomina parada vegetativa y, finalmente, al subir de nuevo las temperaturas en primavera, entra en una fase de producción de los turiones, cuya cantidad y calidad dependen de las reservas acumuladas durante el desarrollo vegetativo (Serrano, 1995). Una plantación es capaz de producir turiones de forma rentable durante 10 a 15 años, tras 1-3 años de establecimiento del cultivo.

El importante aumento del cultivo del espárrago, sobre todo en Andalucía, se debe principalmente a las posibilidades de exportación, ya que la recolección de los turiones, a principios de marzo, se adelanta hasta dos meses respecto a otros países europeos como Alemania o Francia, gracias a la ocurrencia de temperaturas invernales menos severas. Además, la producción de turiones es de 1,5 a 2 veces mayor por unidad de superficie en Andalucía que en otras zonas de producción europeas. Esto se debe a que la planta dispone de más tiempo para su desarrollo vegetativo, necesario para que acumule reservas. En Andalucía, el periodo vegetativo se prolonga desde mayo hasta noviembre mientras que en el resto de zonas productoras suele ser de junio a



septiembre (Serrano, 1995). En 2019, en torno al 40% de la producción se destinó a exportación, sobre todo a países de nuestro entorno comunitario, principalmente Alemania y Francia, y en menor medida a Italia y Dinamarca (<https://www.fepex.es/datos-del-sector/exportacion-importacion-espa%C3%B1ola-frutas-hortalizas>).

En las zonas de cultivo de espárrago se presentan cuatro problemas principales: el primero, es la concentración de la producción de garras en viveros del centro de España que suministran la misma variedad ('Grande F1') dioica, con abundantes pies femeninos, mucho menos productivos que los masculinos, y sin una trazabilidad que garantice su garantía fitosanitaria. El segundo problema es la dificultad del control de las malas hierbas, puesto que cada vez existen menos materias activas autorizadas debido a una reglamentación más estricta, acorde con el Protocolo de Montreal. En tercer lugar, la concentración de la producción en unos pocos meses que, debido a las condiciones climáticas adversas de la primavera algunos años, produce una caída de precios inasumible por los productores. Por último, el cuarto problema, y el de mayor repercusión a nivel mundial, es el denominado síndrome del decaimiento del espárrago.

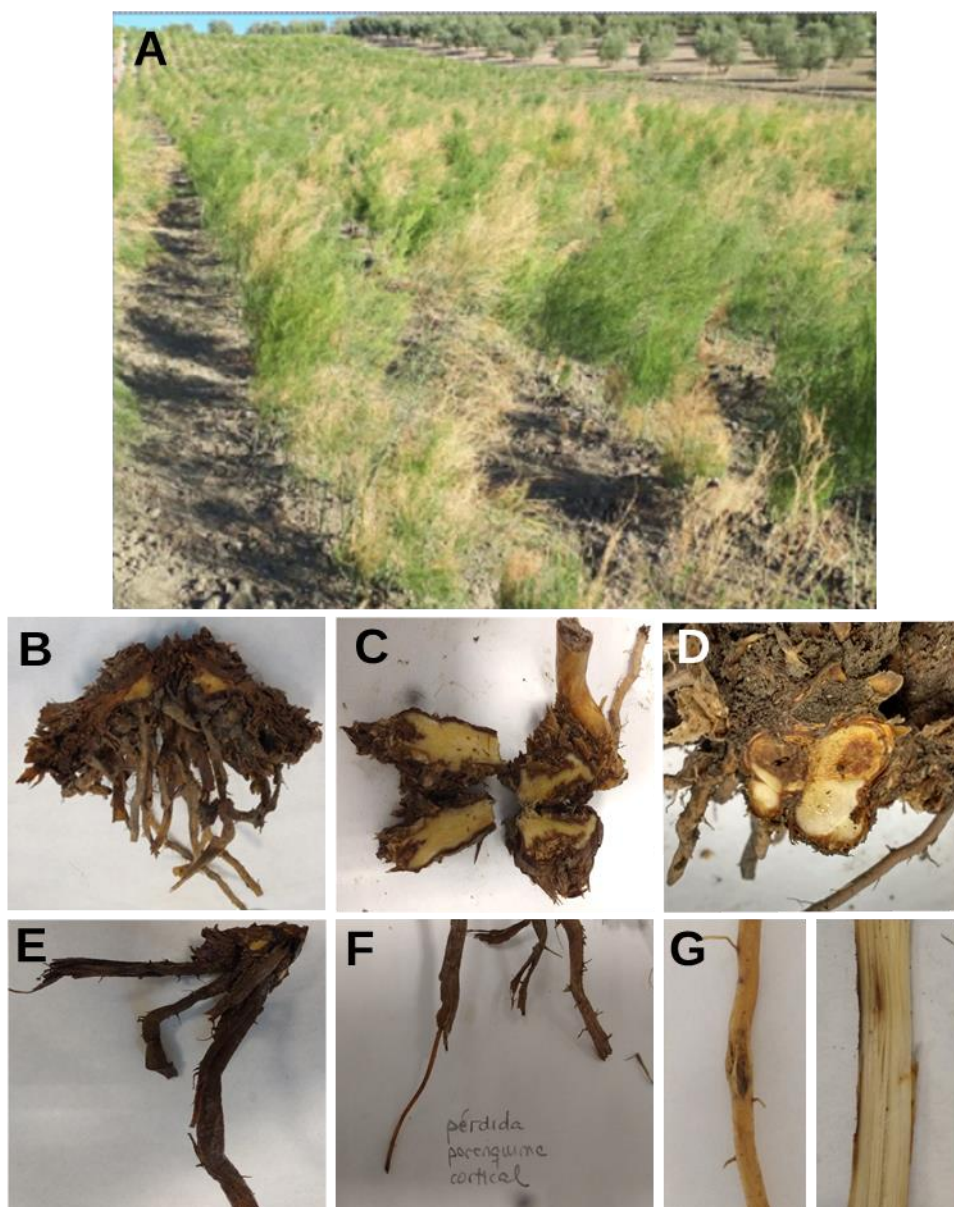
## **El síndrome del decaimiento del espárrago**

El decaimiento del espárrago es un síndrome que provoca prematuramente el agotamiento productivo de las fincas dedicadas a este cultivo e impide su replantación. Fincas que podrían producir de forma rentable durante más de 10 años, deben ser levantadas antes de tiempo porque dejan de ser provechosas, con lo que se deben buscar nuevas localizaciones donde seguir cultivando espárrago. Debido al incremento que ha experimentado este cultivo en los últimos años, es menor la disponibilidad de tierras nuevas sin precedente de cultivo de espárrago y los productores se arriesgan a plantar en parcelas con historial de problemas fitosanitarios. Como consecuencia, los síntomas de decaimiento prematuro aparecen tras 4-6 años de la plantación, o incluso antes.

Son varios los factores que se han asociado a este síndrome. Entre los factores abióticos, se ha relacionado con la acumulación en el suelo de compuestos alelopáticos producidos por las propias plantas de espárrago, que pueden afectar negativamente al desarrollo de posteriores plantaciones (Blok y Bollen 1993; Noperi-Mosqueda y col., 2020). Otras posibles causas del síndrome son los problemas derivados de la acumulación de residuos de herbicidas, el agotamiento de nutrientes o la alteración de la estructura del suelo (Schofield, 1991). Por otro lado, entre los

factores bióticos, el síndrome se ha asociado estrechamente a la podredumbre de rizomas y raíces (PRR), enfermedad producida por varias especies patógenas de *Fusarium* (Elena y Kranias, 1996; Elmer, 2001; 2015). Los síntomas de esta enfermedad consisten en: podredumbre de turiones, rizomas y raíces, coloración vascular en la base del tallo y rizomas, pérdida de raíces absorbentes o secundarias, reducción del tamaño de la planta, clorosis y marchitez de los frondes, y muerte ocasional de la planta (Corpas-Hervias y col., 2006) (**Figura 12**). Estos síntomas pueden verse agravados cuando el cultivo está sometido a factores de estrés como la plantación superficial de las garras, la sequía o el cultivo en suelos encharcados o con pH ácido.

Las principales especies de *Fusarium* descritas como involucradas en la PRR son *Fusarium oxysporum* f. sp. *asparagi* (Foa) y *F. proliferatum*, (Corpas-Hervias y col., 2006; Damicone y Manning, 1985; Elmer, 2001; LaMondia y Elmer, 1989; Schreuder y col., 1995). *F. redolens*, morfológicamente muy similar a *F. oxysporum*, también ha sido descrito como un patógeno importante en el complejo de la enfermedad (Baayen y col., 2000a), al igual que *F. verticillioides* y *F. solani* (Corpas-Hervias y col., 2006). La distribución de estas especies varía entre zonas geográficas y campos de cultivo, según las condiciones ambientales que puedan favorecer a una o varias especies de *Fusarium*.



**Figura 12.** Sintomatología en plantas de espárrago relacionada con la podredumbre de rizomas y raíces (PRR) ocasionada por *Fusarium*. (A) Imagen de una finca afectada (Foto cedida por Dr. Miguel de Cara); (B) Garra con necrosis y escasez de raíces; (C) Necrosis en rizoma; (D) Necrosis en la base de los turiones; (E) Ahuecamiento de raíces; (F) Pérdida de parénquima cortical de la raíz; (G) Detalle de necrosis externa e interna de raíz.

Para conocer con mayor profundidad la relevancia que tienen las especies de *Fusarium* en el decaimiento del espárrago en España, nuestro equipo de trabajo, en colaboración con el grupo del Dr. Miguel de Cara del IFAPA Centro la Mojonera, Almería, y del Dr. Daniel Palmero de la

Universidad Politécnica de Madrid, llevó a cabo el análisis del consorcio de especies de *Fusarium* presente en el suelo y las plantas sintomáticas de 41 fincas de espárragos de las principales áreas productoras de España (Navarra, Madrid y Andalucía) (**Figura 13**) y su relación con el síndrome del decaimiento del espárrago. Los resultados de este trabajo fueron publicados por Brizuela y col. (2020). A continuación, se muestra un resumen de los principales resultados obtenidos:

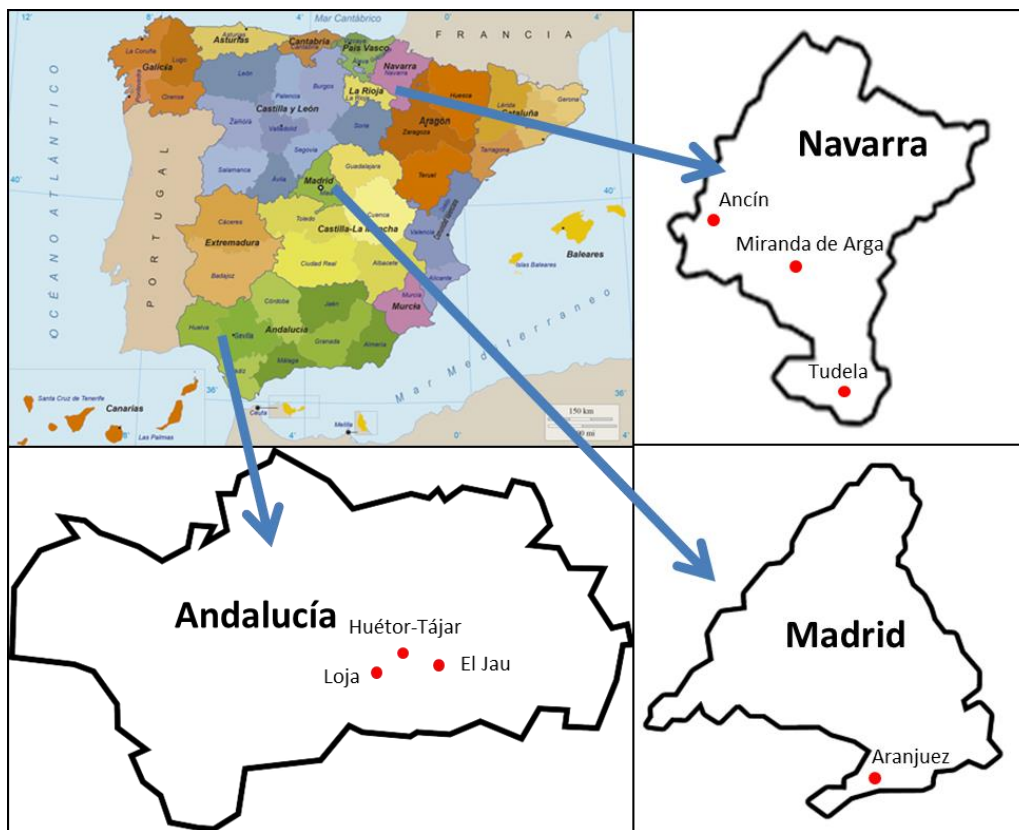
**Brizuela, A.M., De la Lastra, E., Marín-Guirao, J.I., Gálvez, L., De Cara-García, M., Capote, N., Palmero, D. (2020).** *Fusarium* consortium populations associated with asparagus crop in Spain and their role on field decline syndrome. *Journal of Fungi* 6: 336. DOI: [10.3390/jof6040336](https://doi.org/10.3390/jof6040336).

En los suelos de las fincas de espárrago prospectadas en las provincias de Madrid, Navarra y Granada, se identificaron ocho especies del género *Fusarium* pertenecientes a siete complejos de especie: *F. oxysporum*, *F. proliferatum*, *F. redolens*, *F. solani*, *F. equiseti*, *F. culmorum*, *F. compactum* y *F. acuminatum* con distribución variable entre las tres regiones. *F. oxysporum* fue la especie predominante en todos los suelos analizados. Por otro lado, en plantas de espárrago sintomáticas, se identificaron trece especies de *Fusarium* pertenecientes a siete complejos de especie: *F. oxysporum*, *F. proliferatum*, *F. nygamai*, *F. redolens*, *F. solani sensu stricto*, *F. falciforme*, *F. tonkinense*, *F. eumartii*, *F. equiseti*, *F. culmorum*, *F. brachygibosum*, *F. graminearum* y *F. avenaceum*. En las tres regiones analizadas, *F. oxysporum* fue la especie más abundante en plantas sintomáticas.

Se realizaron ensayos de patogenicidad con 37 aislados procedentes de plantas sintomáticas y 258 aislados de suelo de fincas localizadas en la región productora de Granada. *F. oxysporum*, *F. proliferatum* y *F. redolens* mostraron patogenicidad para la variedad de espárrago 'Grande F1', siendo *F. proliferatum* la especie más agresiva. Estas tres especies se consideraron, por tanto, las principales especies asociadas al síndrome del decaimiento del espárrago. Aproximadamente el 90% de los aislados procedentes de plantas fueron patógenos, mientras que, entre los aislados de suelo, el 64,4% de *F. oxysporum* y el 92,9% de *F. proliferatum* fueron patógenos (los aislados de suelo de *F. redolens* no fueron testados). Ninguno de los aislados de las otras especies de *Fusarium* evaluadas mostró patogenicidad, incluida *F. solani*, que anteriormente había sido

descrita como patógena de espárrago (Corpas-Hervias et al., 2006). Los resultados sobre las especies de *Fusarium* involucradas en el síndrome del decaimiento del espárrago en la provincia de Granada fueron publicados por nuestro grupo de trabajo en un artículo de divulgación (De la Lastra y col., 2020) (Anexo 1).

Los análisis filogenéticos multilocus de las principales especies patógenas para el espárrago, *F. oxysporum*, *F. proliferatum* y *F. redolens*, utilizando secuencias parciales de *EF-1 $\alpha$* , *RPB1* y *RPB2*, clasificaron con precisión los aislados de *F. oxysporum* dentro de la especie filogenética FOOSC 2, y determinaron que *F. proliferatum* y *F. redolens* fueron las únicas especies presentes de sus respectivos complejos de especie, *F. fujikuroi* species complex (FFSC) y *F. redolens* species complex (FRSC). Dentro de cada especie, aislados procedentes de Navarra, Madrid y Granada se asociaron en el mismo grupo filogenético y compartieron incluso el mismo haplotipo. No se detectó diferenciación genética entre las poblaciones de *F. oxysporum* presentes en las tres regiones productoras de España. Por otro lado, los análisis de diversidad genética mostraron que *F. oxysporum*, además de ser la especie de *Fusarium* más abundante en suelo y plantas enfermas, fue la especie con mayor diversidad genética (nucleotídica y haplotípica). Estos resultados indicaron que el origen geográfico no establece una diferenciación entre los aislados, a pesar de las diferencias de gestión del cultivo y el uso de diferentes variedades en las tres regiones productoras españolas.



**Figura 13.** Localidades de las tres principales zonas productoras de espárrago en España donde se realizó el muestreo de suelo y plantas sintomáticas (Modificado de Brizuela y col., 2020).

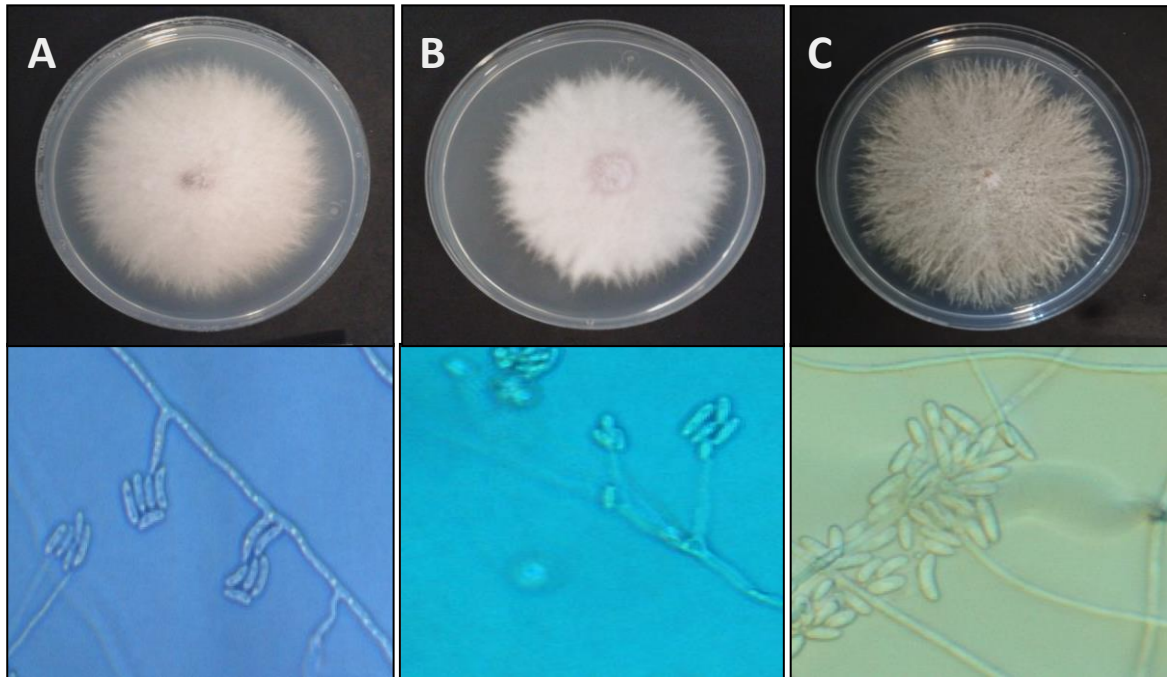
Teniendo en cuenta los resultados de este trabajo, se ha demostrado que las especies *F. oxysporum* f. sp. *asparagi*, *F. proliferatum* y *F. redolens* son las principales especies involucradas en el síndrome del decaimiento del espárrago en España:

- *Fusarium oxysporum* f. sp. *asparagi* (**Figura 14A**) fue descrito como patógeno del espárrago por Cohen y Heald en 1941. No posee razas conocidas que afecten a diferentes cultivares del espárrago. Pertenece al complejo de especies de *F. oxysporum* (FOSC). Las especies filogenéticas que componen este complejo están aún poco definidas, ya que la clasificación por el rango de hospedador al que afectan (*formae speciales*) es la más utilizada. Sin embargo, algunos trabajos han dirigido su esfuerzo para desarrollar un sistema de clasificación más acorde con las relaciones evolutivas entre las distintas especies. Un estudio filogenético preliminar de aislados de *F. oxysporum* patógenos de la banana,

determinó que FOOSC consistía en tres clados claramente diferenciados, donde estaban representadas algunas especies morfológicamente idénticas (O'Donnell y col., 1998). Más tarde, la inclusión de 88 aislados de origen clínico en el análisis filogenético, identificó un cuarto clado (O'Donnell y col., 2004). Sin embargo, un reciente análisis filogenético más completo, donde se utilizaron ocho *loci* para inferir las relaciones filogenéticas entre los aislados, sugirió que estos cuatro clados pueden agruparse en solo dos especies filogenéticas distintas: PS1 y PS2 (Laurence y col., 2014).

- *Fusarium proliferatum* (Matsushima) (teleomorfo = *Gibberella intermedia* (Kuhlman) (**Figura 14B**) pertenece al complejo de especies de *F. fujikuroi* (FFSC). Actualmente, se considera que forman este complejo al menos 50 especies filogenéticas, agrupadas en 3 clados: americano, africano y asiático. *F. proliferatum* pertenece al clado asiático, junto a otras especies como *F. fujikuroi sensu stricto*; el clado americano está compuesto por especies como *F. circinatum* y *F. subglutinans*, y al clado africano pertenecen especies como *F. verticillioides* y *F. acutatum* (Kvas y col., 2009; O'Donnell y col., 1998). Muchas de las especies de este grupo, incluido *F. proliferatum*, se han descrito como productoras de micotoxinas (Munkvold, 2017).
- *Fusarium redolens* (Wollenweber) (**Figura 14C**) ha sido comúnmente considerado como miembro del complejo de especies de *F. oxysporum*, debido a sus similitudes morfológicas. Sin embargo, análisis filogenéticos han demostrado las importantes diferencias entre estos dos grupos, y actualmente se considera un complejo de especies diferente (FRSC). Este complejo es menos diverso que los anteriores, y solo agrupa a dos especies filogenéticas distintas: *F. redolens sensu stricto* y *F. hostae* (Baayen y col., 2001).





**Figura 14.** Cultivo en PDA (arriba) y microconidias vistas al microscopio (40 X) (abajo) de (A) *Fusarium oxysporum*, (B) *F. proliferatum* y (C) *F. redolens*.

Al tratarse el espárrago de un cultivo perenne, los patógenos pueden permanecer todo el año en el interior del huésped. Tanto *F. oxysporum* f. sp. *asparagi* como *F. redolens* se localizan más frecuentemente en rizomas y raíces, a través de los cuales se produce la infección, debido a su capacidad para sobrevivir en el suelo en forma de estructuras de resistencia llamadas clamidosporas. Por el contrario, *F. proliferatum* no produce clamidosporas, pero puede sobrevivir en el suelo y en restos de cultivo infectados en forma de micelio (Durán, 2001). *F. proliferatum* se detecta con más frecuencia en el tallo de la planta, donde forma esporodoquios en los que se producen conidias que pueden dispersarse con facilidad y rapidez por el aire o por salpicaduras del agua de lluvia o riego por aspersión.

Las garras de plantación procedentes de vivero constituyen la principal vía de transmisión de la PRR, y juegan un importante papel en el desarrollo y la expansión de la enfermedad (Blok y Bollen, 1996; Corpas-Hervias y col., 2006; Elmer, 2001). En contraste, en las semillas la infección queda restringida normalmente a la superficie y, por lo tanto, puede ser fácilmente eliminada mediante desinfección superficial de las mismas (Inglis, 1980). Sin embargo, la utilización de



plantas procedentes de semillero retrasa la acumulación de reservas en la garra con el consiguiente retraso de dos o tres años en la entrada en plena producción. Esto hace que la forma generalizada de plantación sea a través de garras, con los posibles problemas fitosanitarios derivados.

## **Métodos de control de enfermedades ocasionadas por *Fusarium* spp.**

### *Control químico*

Una de las principales medidas de control de enfermedades provocadas por hongos de suelo, entre los que se encuentra *Fusarium* spp., es el uso de fumigantes químicos para reducir los niveles de inóculo en el suelo. Los fumigantes de suelo autorizados con restricciones en el cultivo de la fresa son: dazomet, metam-sodio y metam-potasio, aunque 1,3-dicloropropeno y cloropicrina tienen permisos temporales renovables. Nuestro equipo de trabajo analizó la efectividad *in vitro* de algunos de estos fumigantes químicos sobre aislados de FSSC obtenidos del cultivo de la fresa en España. Los aislados mostraron mayor sensibilidad a la aplicación de dazomet y cloropicrina, y menor sensibilidad a metamsodio y 1,3 dicloropropeno (Villarino y col., 2019). En el cultivo del espárrago, al tratarse de un cultivo perenne, no es común el uso de fumigantes de suelo.

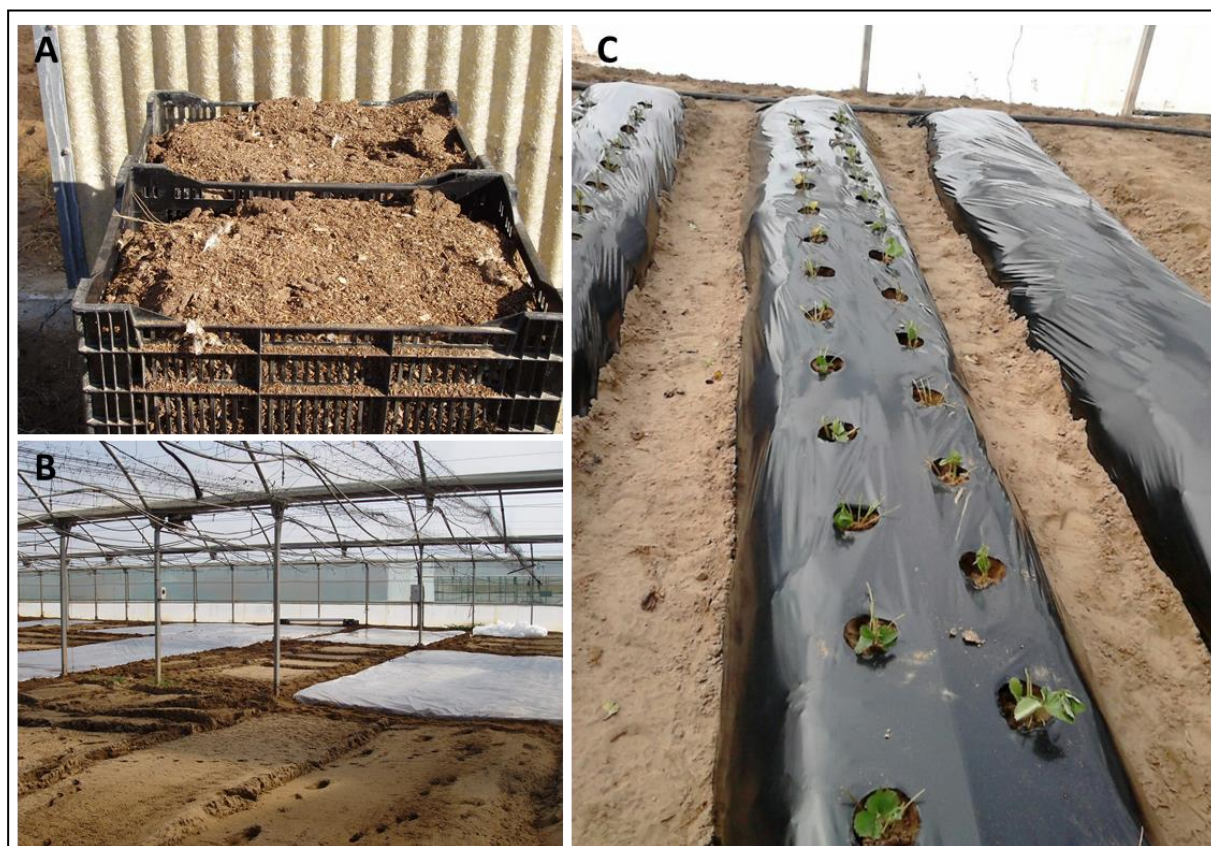
Sin embargo, los tratamientos químicos no siempre muestran la efectividad deseada, su uso continuado puede inducir la aparición de resistencia a los mismos en el patógeno, y pueden producir un efecto pernicioso para el medio ambiente y la salud humana. Además, la progresiva prohibición de su uso y comercialización por parte de la Unión Europea, consecuente con el Protocolo de Montreal, ha supuesto la desaparición de una gran parte de las sustancias activas utilizadas como desinfectantes de suelo. La estrategia europea “De la huerta a la mesa” dentro del “Pacto Verde Europeo” pretende, entre otros objetivos, reducir el 50% de todos los productos fitosanitarios que se aplican en agricultura a nivel mundial en el año 2030. La búsqueda de alternativas a los fumigantes químicos de suelo es, por tanto, de crucial importancia para poder mantener los niveles de producción.

### *Medidas culturales*

Otras estrategias de control incluyen medidas culturales como la rotación de cultivos. Para que ésta sea efectiva, se debe conocer la gama de huéspedes que pueden verse afectados por el patógeno. La problemática con las especies de *Fusarium* es que éstas pueden afectar a un amplio

rango de especies de plantas (Leslie y Summerell, 2006; Molinero-Ruiz y col., 2011). Además, aunque se trate de un patógeno relativamente específico, como en el caso de *F. oxysporum* f. sp. *asparagi*, frecuentemente son capaces de colonizar las raíces de otros cultivos, actuando éstos como reservorios (Blok y Bollen, 1997, Pastrana y col., 2017b).

Una alternativa sostenible con resultados positivos es la biosolarización. Es una técnica de desinfestación del suelo que combina la solarización, mediante la colocación de plástico para aumentar la temperatura del suelo, y la aplicación de enmiendas orgánicas, cuyos gases son retenidos por el plástico y provocan un efecto fungicida (**Figura 15**). El uso de estas enmiendas para la fumigación del suelo resulta más económico que la mayoría de los pesticidas químicos, ya que pueden usarse residuos orgánicos reciclables procedentes de la industria agrícola y pesquera (Bello y col., 2000). El pellet de gallinaza como enmienda orgánica ha demostrado su eficacia en la disminución de los niveles de *Fusarium* en el suelo y de la severidad de la podredumbre de corona y raíz del espárrago (Borrego-Benjumea y col., 2014) con el consiguiente aumento significativo de la producción (Domínguez y col., 2014). El efecto biocida de estos materiales es causado por la liberación de compuestos nitrogenados como amonio y nitrato, ácidos orgánicos y varias sustancias volátiles. Además, hay autores que señalan un efecto añadido de desinfestación por la descomposición anaeróbica de estos compuestos (Song y col., 2020). Por otro lado, el pellet de *Brassica* es otro biofumigante natural prometedor contra hongos patógenos de suelo, incluyendo al género *Fusarium* (Hanschen y Wilkenmann, 2020; Prasad y Kumar, 2017). Estas plantas de la familia de las crucíferas tienen un alto contenido en glucosinolatos, metabolitos secundarios producidos por la planta que juegan un importante papel en la respuesta defensiva de la misma. Los glucosinolatos se encuentran normalmente almacenados en la vacuola de las células vegetales. Cuando la planta sufre algún tipo de daño y se produce lisis celular, los glucosinolatos se liberan de la vacuola y son rápidamente hidrolizados por la enzima mirosinasa, liberando multitud de compuestos activos. Entre estos compuestos, se encuentran unas sustancias volátiles bioactivas llamadas isotiocianatos, que poseen un alto potencial biocida (Hanschen y Wilkenmann, 2020).



**Figura 15.** Desinfestación del suelo mediante biosolarización en una finca experimental de IFAPA Centro Chipiona: (A) Enmienda de gallinaza para aplicar en el suelo; (B) Colocación de plástico sobre los lomos para solarización; (C) Plantas de fresa trasplantadas en lomos biosolarizados con gallinaza (2500 g/m<sup>2</sup>). (Fotos cedidas por la Dra. María Dolores Vela Delgado)

### *Cultivares resistentes*

El uso de variedades resistentes al patógeno es una estrategia muy efectiva para el control de enfermedades provocadas por *Fusarium* (Andrés-Ares y col., 1999; Sanogo y Zhang, 2016). La obtención de cultivares tolerantes o resistentes es una tarea ardua y prolongada y, a todo ello, se suma la dificultad de su éxito debido a la alta diversidad genética y patogénica de los hongos del género *Fusarium* (Blok y Bollen, 1997; Lassaga y col., 1998). Son varios los trabajos que se han realizado en fresa para evaluar la susceptibilidad de distintos cultivares a especies de *Fusarium*. Algunas variedades como ‘San Andreas’ o ‘Portola’ han demostrado ser resistentes frente a la fusariosis causada por *F. oxysporum* f. sp. *fragariae* (*Fof*) en California (Koike y Gordon, 2015), mientras que, en España, las variedades con mejores resultados frente a aislados patógenos

españoles de *Fof* son ‘Rociera FNM’, ‘San Andreas’, ‘Camarosa’, ‘Sabrina’ y ‘Sabrosa Candonga’ (Borrero y col., 2017). En espárrago no se han descrito cultivares comerciales resistentes a *Fusarium* spp. Aunque la especie *Asparagus densiflorus* es una fuente conocida de resistencia a *Fusarium* (He y col., 2001), no se han conseguido híbridos de *A. densiflorus* y *A. officinalis* que muestren resistencia a este grupo de patógenos (Marcellan y Camadro, 1999).

### *Control Biológico*

Otra estrategia de lucha contra las enfermedades fúngicas es el control biológico a través del uso de microorganismos capaces de interrumpir o alterar alguna etapa del ciclo de vida del patógeno. El modo de acción puede consistir en antibiosis, competencia por el nicho o los nutrientes, depredación, parasitismo, hipovirulencia o inducción de resistencia en la planta.

Para el control biológico de enfermedades ocasionadas por especies de *Fusarium*, se han llevado a cabo varias iniciativas. Una de ellas consiste en el uso de cepas no patógenas de *F. oxysporum* capaces de controlar enfermedades de marchitez y podredumbre causadas por cepas patógenas de esta especie (De Lamo y Takken, 2020). Se han realizado trabajos con éxito en este sentido tanto en fresa (Tezuka y Makino, 1991), como en espárrago (He y col., 2002). La capacidad de biocontrol se logra por la competencia con las cepas patógenas por los nutrientes y por los sitios de infección en las raíces, y a través de resistencia sistémica adquirida (SAR), provocada por reacciones de defensa de la planta (Fravel y col., 2003).

Otra estrategia de control biológico implica el uso de microorganismos antagonistas como, por ejemplo, hongos del género *Trichoderma*. En particular, se ha comprobado la eficacia de las especies de *Trichoderma* en el control de la Fusariosis en fresa (Ahmed y El-Fiki, 2017) y en espárrago (Arriola y col., 2000). Por otro lado, las bacterias promotoras del crecimiento vegetal o PGPR (en inglés, “plant growth-promoting rhizobacteria”), aisladas de la rizosfera, favorecen el crecimiento de la planta mediante la síntesis de compuestos beneficiosos, por ejemplo, fitohormonas como la auxina, o facilitando la absorción de ciertos nutrientes del medio, como hierro, fósforo o nitrógeno. Algunas de estas bacterias favorecen el crecimiento vegetal de forma indirecta, actuando como antagonistas directos de los patógenos o induciendo resistencia en la planta a través de SAR (Beneduzi y col., 2012). Algunas de las sustancias más comunes producidas por estas bacterias son enzimas hidrolíticas como quitinasas, glucanasas, proteasas y lipasas, que pueden lisar la pared celular de los hongos, y sustancias tóxicas para el patógeno, como HCN

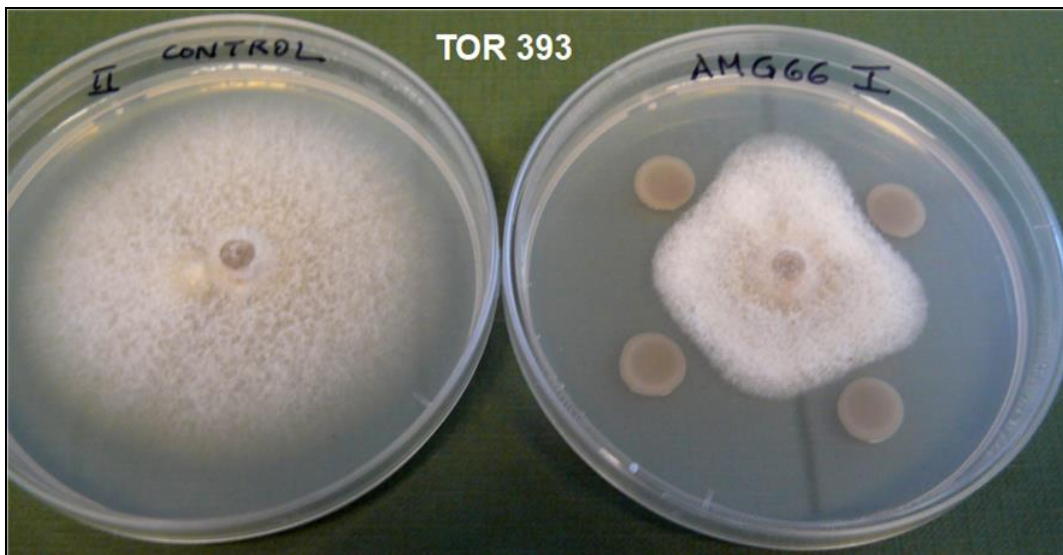
(Maksimov y col., 2011).

Se han utilizados bacterias PGPR de los géneros *Pseudomonas* y *Bacillus* para el control de enfermedades del cultivo de la fresa (Esitken y col., 2010; Pastrana y col., 2016) y del espárrago (Liddycoat y col., 2009). En este sentido, nuestro equipo de trabajo, junto con el grupo de la Dra. Dulce N. Rodríguez del IFAPA Centro Las Torres, Sevilla, llevó a cabo un estudio *in vitro* para analizar la eficacia de dos cepas bacterianas del género *Bacillus* (*B. amiloliquefaciens* y *B. aryabhatai*) y tres cepas de *Pseudomonas* (*P. aeruginosa*, *P. brassicacearum* y *P. lini*) como potenciales agentes de control biológico de dos aislados patógenos de FSSC, TOR-725 y TOR-393, procedentes de suelo y plantas de fresa de campos de producción de fruto, respectivamente. Los resultados de este trabajo fueron publicados en un artículo de divulgación por Rodríguez-Navarro y col. (2019) (Anexo 2). A continuación, se muestra un resumen de los resultados obtenidos:

**Rodríguez-Navarro, D., Rodríguez-Berbel, N., Galiano, M., De la Lastra, E., Barrau, C., Basallote-Ureba, M.J., Capote, N. (2019).** Estudios *in vitro* de la capacidad de biocontrol de hongos y oomicetos fitopatógenos por cepas de *Bacillus* y *Pseudomonas*. *Phytoma* 311: 1-7.

Los enfrentamientos duales *in vitro* (**Figura 16**) demostraron que todas las cepas bacterianas ensayadas fueron capaces de controlar el desarrollo de ambos aislados de FSSC. Los mejores resultados de inhibición del crecimiento micelial de FSSC se alcanzaron con las cepas de *Pseudomonas* RBA83 y AMG66 (77 y 67% de inhibición, respectivamente). Además, ambas fueron las que provocaron mayor reducción de la esporulación en el aislado TOR-725. No se encontraron diferencias significativas en la esporulación de TOR-393 en presencia de las bacterias respecto al control sin bacterias.

El ensayo de actividad enzimática reflejó que las cepas de *Pseudomonas* son capaces de producir ácido cianhídrico, un compuesto volátil tóxico que afecta al sistema respiratorio de los hongos, lo que resulta en la inhibición de su crecimiento (Kirimura y col., 1987). *Bacillus amiloliquefaciens* BPA4 fue la cepa que produjo mayor número de enzimas hidrolíticas: celulasa, proteasa,  $\beta$ -glucosidasa y amilasa, capaces de degradar la pared celular de los hongos patógenos.



**Figura 16.** Enfrentamiento dual en placa de PDA entre la cepa bacteriana de *Pseudomonas* AMG66 y el aislado de FSSC TOR 393. El desarrollo del micelio del hongo se ve inhibido en presencia de la bacteria (derecha) respecto al control sin bacteria (izquierda).

Cabe mencionar el uso de hongos formadores de micorrizas arbusculares como método de biocontrol contra enfermedades ocasionadas por hongos patógenos de suelo. Estos hongos se asocian con las raíces de la planta y favorecen la absorción de nutrientes, ya sea al aumentar la superficie radicular de la planta o aumentando la disponibilidad de estos nutrientes (Tahat y col., 2010). Se ha demostrado la eficacia del uso del hongo formador de micorrizas arbusculares de la especie *Glomus mosseae* en plantas de fresa inoculadas con *F. oxysporum* f. sp. *fragariae* (*Fof*), donde se comprobó un mayor crecimiento de las plantas inoculadas con *G. mosseae* y una mayor tolerancia a la podredumbre provocada por *Fof* (Li y col., 2010). El mismo efecto beneficioso y de protección contra *Fusarium* se ha descrito en el espárrago. Plántulas de espárrago inoculadas con *Glomus* sp. tuvieron un mayor crecimiento y tolerancia a *F. oxysporum* f. sp. *asparagi* que aquellas plantas sin inocular (Mohammad y Matsubara, 2012).

#### *Control preventivo*

Para un control efectivo de las enfermedades en los cultivos, resulta clave la prevención de la enfermedad, empleando diferentes medidas que pueden incluir la certificación del material vegetal libre de patógenos y la plantación en suelos exentos de los mismos. Tradicionalmente, la detección e identificación de los hongos en material vegetal y en suelo se lleva a cabo mediante

técnicas de cultivo en placa, seguidas de la caracterización morfológica de los aislados obtenidos (Leslie y Summerel, 2006). Sin embargo, estos métodos suelen ser muy laboriosos, requieren bastante tiempo y el ojo experto de taxonomistas para una identificación correcta. Por otro lado, los métodos moleculares basados en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR por sus siglas en inglés “polymerase chain reaction”), permiten una detección rápida, precisa y fiable y la cuantificación de la especie diana en muestras de distinto origen.

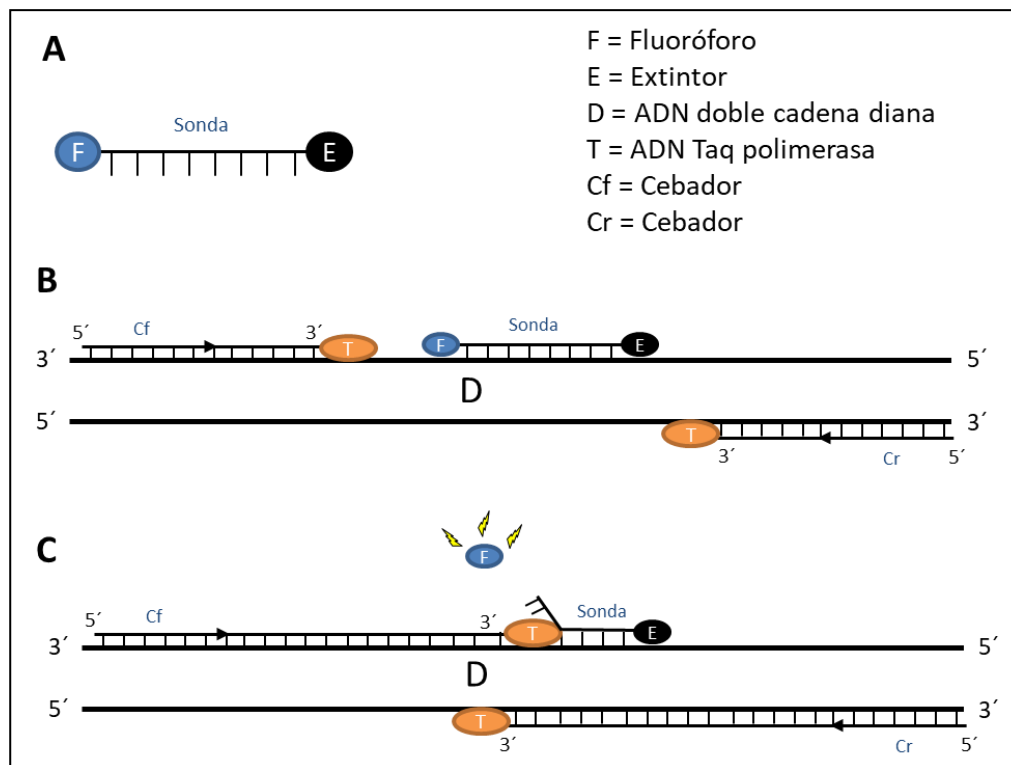
La PCR consiste en la amplificación de un fragmento específico de ADN mediante ciclos sucesivos de desnaturalización, hibridación de cebadores específicos y polimerización. La PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR) es un tipo de PCR que incluye además la detección mediante emisión de fluorescencia. Existen diferentes químicas de PCR en tiempo real que se han clasificado en dos grupos principales; el primer grupo utiliza moléculas fluorescentes que se intercalan en el ADN de doble cadena, como SYBR Green I y Eva Green; mientras que el segundo grupo incluye el uso de oligonucleótidos marcados con fluoróforos. Este último, a su vez, se ha dividido en tres subgrupos según el tipo de moléculas fluorescentes utilizadas en la reacción de PCR: (i) sondas-cebadores (Scorpions, Amplifluor, LUX, Cyclicons, Angler); (ii) sondas de hidrólisis (TaqMan, MGB-TaqMan, ensayo Snake) y sondas de hibridación (Hybprobe o FRET, Molecular Beacons, HyBeacon, MGB-Pleiades, MGB-Eclipse, ResonSense, o Yin-Yang); y (iii) análogos de ácidos nucleicos (PNA, LNA, ZNA, cebador Plexor, Tiny-Molecular Beacon) (Navarro y col., 2015).

Las químicas más utilizadas en fitopatología para la detección y cuantificación de hongos patógenos son las basadas en SYBR Green y TaqMan (Capote y col., 2012):

- La química SYBR Green se basa en la emisión de fluorescencia no específica cuando el fluoróforo se une al ADN de doble cadena. Esta técnica tiene la ventaja de que es más económica y sencilla de diseñar al no requerir el uso de sondas. Sin embargo, suele ser menos sensible que la qPCR TaqMan y menos específica, ya que la molécula de SYBR Green se une a cualquier ADN de doble cadena que se amplifique en la reacción, independientemente de su secuencia. Por tanto, si el diseño de los cebadores no es el adecuado, se pueden producir dímeros de cebadores (en inglés “primer-dimers”) o fragmentos de amplificación no específicos que pueden impedir una correcta detección y cuantificación de la muestra diana.
- La química TaqMan consiste en el uso de un oligonucleótido o sonda que hibrida con el



fragmento de ADN en la región delimitada por los dos cebadores. Esta sonda contiene un fluoróforo en su extremo 5' y un extintor o “quencher” en su extremo 3', que bloquea la emisión de fluorescencia cuando está cercano al fluoróforo. Durante la polimerización, la ADN polimerasa libera el fluoróforo mediante su actividad exonucleasa 5'-3', emitiéndose, por tanto, fluorescencia (**Figura 17**). La cantidad de fluorescencia emitida es directamente proporcional a la cantidad de ADN diana existente en la muestra.



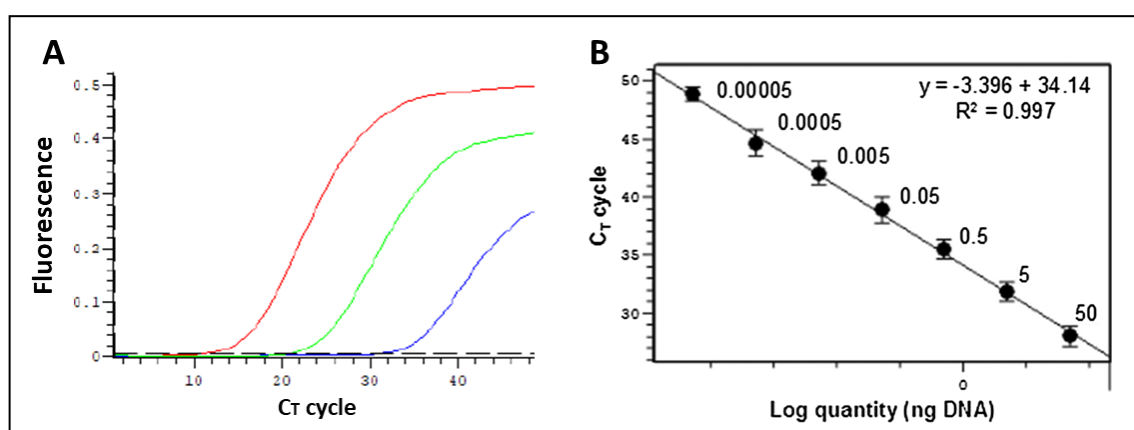
**Figura 17.** qPCR tipo TaqMan. (A) Este sistema se basa en el uso de un oligonucleótido (sonda) con un fluoróforo unido al extremo 5' y una molécula llamada “extintor” en el extremo 3' que inhibe la emisión de fluorescencia del fluoróforo cuando ambos están cercanos. (B) La secuencia de la sonda se une específicamente al ADN diana y, debido a la actividad exonucleasa 5'-3' de la Taq ADN polimerasa, (C) el fluoróforo se separa de la sonda y queda libre del efecto tamponador del “extintor”, emitiendo fluorescencia.

Para la cuantificación de la cantidad de ADN diana presente en la muestra, la técnica qPCR utiliza una recta de calibración que se construyen mediante diluciones seriadas de cantidades conocidas del ADN diana. Cuando se alcanza un ciclo de amplificación en el que la emisión de



fluorescencia es detectada por el equipo, se genera una curva en tiempo real que indica el ciclo de detección ( $C_t$ ) y la intensidad de la señal de fluorescencia. El  $C_t$  es inversamente proporcional a la cantidad de ADN diana en la muestra y, mediante la recta de calibrado, se cuantifica la cantidad de ADN de forma precisa (**Figura 18**).

Esta técnica, además de una mayor especificidad y sensibilidad, no precisa del análisis del resultado mediante electroforesis en geles de agarosa, lo que aporta rapidez y evita problemas de contaminación cruzada, típicos de la PCR convencional. Así, permite el análisis rápido y fiable de un elevado número de muestras. Su alta sensibilidad permite además evitar el paso de extracción de ADN, que suele ser laborioso y de alto coste, pudiéndose usar protocolos de preparación directa de muestras, como por ejemplo diluciones de extractos crudos de plantas (Pastrana y col. 2017c).



**Figura 18.** (A) Curvas de amplificación de muestras analizadas mediante qPCR en tiempo real tipo TaqMan donde se observa el aumento de fluorescencia a lo largo de los ciclos de amplificación. (B) Recta de calibración con cantidades conocidas de ADN diana.

Se han desarrollado numerosos protocolos de qPCR para la detección y cuantificación de especies de *Fusarium* en material vegetal y muestras de suelo como método de control preventivo (Carneiro y col., 2017; López-Mondéjar y col., 2012; Migliorini y col., 2015; Pollard y Okubara, 2019; Singh y Kapoor, 2018; Zitnick-Anderson y col., 2018). Se trata de una herramienta muy potente que permite evaluar el estado fitosanitario del material vegetal de vivero (plantones y

semillas) y de un suelo previo a la plantación. Como método de control preventivo, la técnica de qPCR se ha utilizado también para la detección de especies de *Fusarium* en agua de riego (Matthews y col., 2020) debido a que varios estudios han demostrado la dispersión de *Fusarium* spp. a través de esta vía (Moein y col., 2019; Palmero y col., 2009).

La técnica de qPCR también se aplica para el diagnóstico de enfermedades de plantas mediante la detección precisa y eficaz del patógeno en plantas sintomáticas. Del mismo modo, ha demostrado ser una herramienta útil para la detección y cuantificación de esporas de *Fusarium* que se transmiten por el aire (Halstensen y col., 2006). Por último, se han utilizado protocolos de qPCR para evaluar la eficacia de diversos fumigantes de suelo en el control de enfermedades ocasionadas por *Fusarium*, mediante la cuantificación de la reducción de la densidad de inóculo del hongo en el suelo tras los tratamientos de desinfestación (Li y col., 2014).

## OBJETIVOS

El principal objetivo de esta Tesis ha sido adquirir un mayor conocimiento sobre las especies de *Fusarium* que afectan al cultivo de la fresa y del espárrago, dos cultivos de gran importancia económica y social en Andalucía, mediante la caracterización molecular y biológica de sus poblaciones, la determinación de sus posibles fuentes de inóculo, y la obtención de medidas de control alternativas al uso de agentes químicos: 1) herramientas moleculares de detección basadas en qPCR como control preventivo, 2) métodos de desinfestación de suelo alternativos a la fumigación química y 3) control biológico. Este objetivo general se ha desarrollado a través de los siguientes objetivos específicos:

1. Caracterización de aislados de FSSC provenientes de viveros de producción de planta de fresa y de campos de producción de fruto de fresa y de sus posibles fuentes de inóculo (**Capítulo I**).
  - 1.1. Identificación precisa de las especies presentes en ambas zonas de cultivo mediante análisis de secuencia multilocus, utilizando tres regiones del ADN genómico: el factor de elongación de la traducción 1 alfa (*EF-1 $\alpha$* ); la región del espaciador de transcritos interno o ITS (por sus siglas en inglés, “Internal Transcribed Spacer”) más los dominios D1 y D2 de la subunidad grande 28S del ADN ribosomal nuclear; y la subunidad menor de la ARN polimerasa II (*RPB2*).
  - 1.2. Determinación de la diversidad genética y la estructura de la población de FSSC del cultivo de la fresa mediante análisis filogenético.
  - 1.3. Determinación de los grupos de compatibilidad vegetativa (VCG) de los aislados de FSSC del cultivo de la fresa.
2. Diseño de una herramienta molecular, mediante PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR), para la detección y cuantificación específica de FSSC en plantas de fresa y suelo (**Capítulo II**).
  - 2.1. Diseño de cebadores y sonda TaqMan
  - 2.2. Validación del protocolo de qPCR en muestras de planta y suelo.
  - 2.3. Aplicación del protocolo de qPCR para evaluar la eficacia de la biosolarización como tratamiento de desinfestación de suelo alternativo a la fumigación química.
3. Diseño de una herramienta molecular, mediante qPCR, para la detección y cuantificación de *F. oxysporum*, *F. proliferatum* y *F. redolens* en muestras de planta, suelo y agua de riego (**Capítulo III**).
  - 3.1. Diseño de cebadores y sondas TaqMan

- 3.2. Validación de los protocolos de qPCR en muestras de planta y suelo.
- 3.3. Aplicación de los protocolos de qPCR para la detección preventiva de las especies de *Fusarium* en agua de riego
- 3.4. Aplicación de los protocolos de qPCR para evaluar la eficacia de la biosolarización como tratamiento de desinfección de suelo alternativo a la fumigación química.
4. Evaluación de la capacidad de biocontrol de cepas bacterianas de los géneros *Bacillus*, *Brevibacterium* y *Streptomyces* sobre especies de *Fusarium* causantes del síndrome del decaimiento del espárrago (**Capítulo IV**).
  - 4.1. Antagonismo *in vitro* mediante enfrentamientos duales en placa.
  - 4.2. Evaluación de la capacidad de biocontrol *in vivo* mediante coinoculación en plantas de espárrago.
  - 4.3. Determinación de los posibles mecanismos de acción de los agentes de biocontrol mediante ensayos de actividad enzimática y de producción de compuestos tóxicos y promotores del crecimiento vegetal.

**BIBLIOGRAFÍA INTRODUCCIÓN**

- Agrios, G.N. (1986). Fitopatología. Limusa (Ed.), México (México). 786 pp.
- Ahmed, M.F.A., El-Fiki, I.A.I. (2017). Effect of biological control of root rot diseases of strawberry using *Trichoderma* spp. Middle East J. Appl. Sci. 7: 482-492.
- Albores, L., Baños, S., Herrera, J., Necha, L., López, M., Hernández, A. (2014). Morphological and molecular characterization of pathogenic isolates of *Fusarium* spp. obtained from gladiolus corms and their sensitivity to *Jatropha curcas* L. oil. Afr. J. Microbiol. Res. 8: 724-733.
- Alves-Santos, F.M., Cordeiro-Rodrigues, L., Sayagués, J.M., Martín-Domínguez, R., García-Benavides, P., Crespo, M.C., Díaz-Mínguez, J.M., Eslava, A.P. (2002). Pathogenicity and race characterization of *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* isolates from Spain and Greece. Plant Pathol. 51: 605-611.
- Andrés-Ares, J.L., Collar-Urquijo, J., Iglesias-Vázquez, C., Tello-Marquina, J. (1999). Evaluación de la resistencia de variedades comerciales de clavel a patotipos de *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* detectados en Galicia. Bol. San. Veg. Plagas 25: 209-220.
- Aoki, T., O'Donnell, K., Geiser, D.M. (2014). Systematics of key phytopathogenic *Fusarium* species: current status and future challenges. J. Gen. Plant Pathol. 80: 189-201.
- Armengol, J., José, C.M., Moya, M.J., Sales, R., García-Jiménez, J. (2000). *Fusarium solani* f. sp. *cucurbitae* race 1, a potential pathogen of grafted watermelon production in Spain. Bulletin OEPP/EPPO 30: 179-183.
- Arriola, L.L., Hausbeck, M.K., Rogers, J., Safir, G.R. (2000). The effect of *Trichoderma harzianum* and arbuscular mycorrhizae on *Fusarium* root rot in asparagus. Hort. Tech. 10: 141-144.
- Arroyo, F.T., Llergo, Y., Aguado, A., Romero, F. (2009). First report of *Fusarium* wilt caused by *Fusarium oxysporum* on strawberry in Spain. Plant Dis. 93: 323.
- Avilés, M., Castillo, S., Bascon, J., Zea-Bonilla, T., Martín-Sánchez, P.M., Perez-Jiménez, R.M. (2008). First report of *Macrophomina phaseolina* causing crown and root rot of strawberry in Spain. Plant Dis. 57: 382.
- Baayen R.P., O'Donnell, K., Bonants, P.J.M., Cigelnik, E., Kroon, L.P.N.M., Roebroek, J.A., Waalwijk, C. (2000)b. Gene genealogies and AFLP analyses in *Fusarium oxysporum* complex identify monophyletic and nonmonophyletic *formae speciales* causing wilt and root rot disease. Phytopathology 90: 891-900.
- Baayen, R.P., O'Donnell, K., Breeuwsma, S., Geiser, D.M., Waalwijk, C. (2001). Molecular relationships of fungi within the *Fusarium redolens*-*F. hostae* clade. Phytopathology 91: 1037-1044.

- Baayen, R.P., van den Boogert, P.H.J.F., Bonants, P.J.M., Poll, J.T.K., Blok, W.J., Waalwijk, C. (2000)a. *Fusarium redolens* f. sp. *asparagi*, causal agent of asparagus root rot, crown rot and spear rot. Eur. J. Plant Pathol. 106: 907-912.
- Basallote, M.J., Zurera, C., Melero, J.M., Prados, A.M. (2011). Nueva enfermedad en el cultivo del ajo ocasionada por *Fusarium* spp. Phytoma 229: 56-58.
- Beckman, C.H. (1987). The nature of wilt diseases of plant. American Phytopathological Society Press, St. Paul, MN: 175 pp.
- Bello, A., López, J.A., Sanz, R., Escuer, M., Herrero, J. (2000). Biofumigation and organic amendments. In: Regional workshop on methyl bromide alternatives for North Africa and southern European countries. UNEP, Nairobi: 113-141.
- Beneduzi, A., Ambrosini, A., Passaglia, L.M. (2012). Plant Growth-Promoting Rhizobacteria (PGPR): The potential as antagonist and biocontrol agents. Gen. Mol. Biol. 35: 1044-1051.
- Blok, W.J., Bollen, G.J. (1993). The role of autotoxins from root residues of the previous crop in the replant disease of asparagus. Netherlands J. Plant Pathol. 99: 29-40.
- Blok, W.J., Bollen, G.J. (1996). Inoculum sources of *Fusarium oxysporum* f. sp. *asparagi* in asparagus production. Ann. Appl. Biol. 128: 219-231.
- Blok, W.J., Bollen, G.J. (1997). Host specificity and vegetative compatibility of Dutch isolates of *Fusarium oxysporum* f. sp. *asparagi*. Can. J. Bot. 75: 383-393.
- Boonpasart, S., Kasetsuwan, N., Puangsricharern, V., Pariyakanok, L., Jittpoonkusol, T. (2002). Infectious keratitis at King Chulalongkorn Memorial Hospital: A-12-year retrospective study of 391 cases. J. Med. Assoc. Thai. 85 (Suppl. 1): S217-S230.
- Borrego-Benjumea, A., Basallote-Ureba, M.J., Melero-Vara, J.M., Abbasi, P.A. (2014). Characterization of *Fusarium* isolates from asparagus fields in Southwestern Ontario and influence of soil organic amendments on *Fusarium* crown and root rot. Phytopathology 104: 403-415.
- Borrero, C., Bascón, J., Gallardo, M.A., Orta, M.S., Avilés, M. (2017). New foci of strawberry *Fusarium* wilt in Huelva (Spain) and susceptibility of the most commonly used cultivars. Sci. Hortic. 226: 85-90.
- Brizuela, A.M., De la Lastra, E., Marín-Guirao, J.I., Gálvez, L., de Cara-García, M., Capote, N., Palmero, D. (2020). *Fusarium* consortium populations associated with asparagus crop in Spain and their role on field decline syndrome. J. Fungi 6: 336.
- Capote, N., Pastrana, A.M., Aguado, A., Sánchez-Torres, P. (2012). Molecular tools for detection of plant pathogenic fungi and fungicide resistance. In: C.J.R. Cumagun (Ed.), Plant Pathology, InTech - Open Access Publisher, London: 151-202.
- Carneiro, G.A., Matic, S., Ortu, G., Garibaldi, A., Spadaro, D., Gullino, M.L. (2017) Development and validation of a TaqMan real-time PCR assay for the specific detection and quantification

- of *Fusarium fujikuroi* in rice plants and seeds. *Phytopathology* 107: 885-892.
- Cohen, S.I., Heald, F.D. (1941). A wilt and root rot of asparagus caused by *Fusarium oxysporum* Schlecht. *Pl. Dis. Repr.* 25: 503-509.
- Correll, J.C., Klittich, C.J.R., Leslie, J.F. (1987). Nitrate nonutilizing mutants of *Fusarium oxysporum* and their use in vegetative compatibility test. *Phytopathology* 77: 1640-1646.
- Corpas-Hervias, C., Melero-Vara, J.M., Molinero-Ruiz, M.L., Zurera-Muñoz, C., Basallote Ureba, M.J. (2006). Characterization of isolates of *Fusarium* spp. obtained from asparagus in Spain. *Plant Dis.* 90: 1441-1451.
- Cullen, M., Jacob, M.E., Cornish, V., VanderSchel, I.Q., Cotter, H.V.T., Cubeta, M.A., Carbone, I., Gilger, B.C. (2019). Multi-locus DNA sequence analysis, antifungal agent susceptibility, and fungal keratitis outcome in horses from Southeastern United States. *PLoS ONE* 14: e0214214.
- Damicone, J.P., Manning, W.J. (1985). Frequency and pathogenicity of *Fusarium* spp. isolated from first-year asparagus grown from transplants. *Plant Dis.* 69: 413-416.
- De Cal, A., Martínez-Treceno, A., López-Aranda, J.M., Melgarejo, P. (2004). Chemical alternatives to methyl bromide in Spanish strawberry nurseries. *Plant Dis.* 88: 210-214.
- De Lamo, F.J., Takken, F.L.W. (2020). Biocontrol by *Fusarium oxysporum* using endophyte-mediated resistance. *Front. Plant Sci.* 11: 37.
- De la Lastra, E., Marín-Guirao, J.I., López-Moreno, F.J., De Cara, M., Soriano, T., Capote, N. (2020). Especies de *Fusarium* relacionadas con el síndrome del decaimiento del espárrago en Andalucía. *Phytoma* 324: 2-9.
- De los Santos, B., Porras, M., Blanco, C., Barrau, C., Romero, F. (2002). First report of *Phytophthora cactorum* on strawberry plants in Spain. *Plant Dis.* 86: 1051.
- Domínguez, P. (2012). Evaluación agronómica de selecciones avanzadas del Programa Nacional de Mejora Genética de Fresa (*Fragaria x ananassa* Duch.), en diferentes sistemas de cultivo y valoración de parámetros de calidad del fruto. Tesis doctoral. Universidad de Córdoba, Córdoba.
- Domínguez, P., Miranda, L., Soria, C., De los Santos, B., Chamorro, M., Romero, F., Daugovish, O., López-Aranda, J.M., Medina, J.J. (2014). Soil biosolarization for sustainable strawberry production. *Agron. Sustain. Dev.* 34: 821-829.
- Durán, R.M. (2001). Etiología de enfermedades de espárrago causadas por patógenos de suelo en Andalucía. Tesis doctoral. Universidad de Córdoba, Córdoba.
- Edel-Hermann, V., Lecomte, C. (2019). Current status of *Fusarium oxysporum* *formae speciales* and races. *Phytopathology* 109: 512-530.
- Elena, K., Kranias, L. (1996). *Fusarium* spp. as a cause of crown and root rot of asparagus in Greece. *Bulletin OEPP/EPPO* 26: 407-411.

- Elmer, W.H. (2001). *Fusarium* diseases of asparagus. In: Paul E. Nelson Memorial Symposium. B.A. Summerell, J.F. Leslie, D. Backhouse, W.L. Bryden, L.W. Burgess (Eds.), *Fusarium*. American Phytopathological Society Press, St. Paul, MN: 248-262.
- Elmer, W.H. (2015). Management of *Fusarium* crown and root rot of asparagus. *Crop Prot.* 73: 2-6.
- Esitken, A., Yildiz, H.E., Ercisli, S., Donmez, M.F., Turan, M., Gunes, A. (2010). Effects of plant growth promoting bacteria (PGPB) on yield, growth and nutrient contents of organically grown strawberry. *Sci. Hortic.* 124: 62-66.
- FAOSTAT. 2019. [http://www.fao.org/faostat/es/#rankings/countries\\_by\\_commodity](http://www.fao.org/faostat/es/#rankings/countries_by_commodity)
- FEPEX. 2019. <https://www.fepex.es/datos-del-sector/exportacion-importacion-esp%C3%B1ola-frutas-hortalizas>
- Fravel, D., Olivain, C., Alabouvette, C. (2003). *Fusarium oxysporum* and its biocontrol. *New Phytol.* 157: 493-502.
- García-Jiménez, J., Armengol, J., Moya, M.J., Sales, R. (1997). First report of *Fusarium solani* f. sp. *cucurbitae* Race 1 in Spain. *Plant Dis.* 81: 1216.
- García Ruiz, A., de Cara, M., Santos, M., Tello, J.C. (2009). *Fusarium* wilt of carnation in northwestern coast of Cádiz (Spain). *Bol. San. Veg. Plaga* 35: 317-328.
- Gilardi, G., Franco Ortega, S., van Rijswijk, P.C.J., Ortu, G., Gullino, M.L., Garibaldi, A. (2017). A new race of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae* of lettuce. *Plant Pathol.* 66: 677-688.
- Gómez, J., Guerra-Sanz, J.M., Sánchez-Guerrero, M.C., Serrano, Y., Melero-Vara, J.M. (2008). Crown rot of zucchini squash caused by *Fusarium solani* f. sp. *cucurbitae* in Almería province. *Plant Dis.* 92: 1137.
- Halstensen, A.S., Nordby, K.C., Eduard, W., Klemsdal, S.S. (2006). Real-time PCR detection of toxigenic *Fusarium* in airborne and settled grain dust and associations with trichothecene mycotoxins. *J. Environ. Monit.* 8: 1235-1241.
- Hanschen, F.S., Winkelmann, T. (2020). Biofumigation for fighting replant disease- A Review. *Agronomy* 10: 425.
- He, C., Hsiang, T., Wolyn, D.J. (2001). Activation of defense responses to *Fusarium* infection in *Asparagus densiflorus*. *Eur. J. Plant Pathol.* 107: 473-483.
- He, C.Y., Hsiang, T., Wolyn, D.J. (2002). Induction of systemic disease resistance and pathogen defence responses in *Asparagus officinalis* inoculated with nonpathogenic strains of *Fusarium oxysporum*. *Plant Pathol.* 51: 225-230.
- Henry, P.M., Kirkpatrick, S.C., Islas, C.M., Pastrana, A.M., Yoshisato, J.A., Koike, S.T., Daugovich, O., Gordon, T.R. (2017). The population of *Fusarium oxysporum* f. sp. *fragariae*, cause of *Fusarium* wilt of strawberry, in California. *Plant Dis.* 101: 550-556.
- Inglis, D.A. (1980). Contamination of asparagus seed by *Fusarium oxysporum* f. sp. *asparagi* and



*Fusarium moniliforme*. Plant Dis. 64: 74-76.

- Jiménez-Díaz, R.M., Trapero-Casas, A., de la Colina, J.C. (1989). Races of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceri* infecting chickpeas in southern Spain. In: E.C. Tjamos, C.H. Beckman (Eds.), Vascular wilt diseases of plants. NATO ASI Series (Series H: Cell Biology), Springer, Berlin, Heidelberg, 28.
- Kirimura, K., Hirowatari, Y., Usami, S. (1987). Alterations of respiratory systems in *Aspergillus niger* under the conditions of citric acid fermentation. Agric. Biol. Chem. 51: 1299-1303.
- Kistler, H.C. (1997). Genetic diversity in the plant-pathogenic fungus *Fusarium oxysporum*. Phytopathology 87: 474-479.
- Koike, S.T., Gordon, T.R. (2015). Management of Fusarium wilt of strawberry. Crop Prot. 73: 67-72.
- Kvas, M., Marasas, W.F.O., Wingfield, B.D., Wingfield, M.J., Steenkamp, E.T. (2009). Diversity and evolution of *Fusarium* species in the *Gibberella fujikuroi* complex. Fungal Divers. 34: 1-21.
- LaMondia, J.A., Elmer, W.H. (1989). Pathogenicity and vegetative compatibility among isolates of *Fusarium oxysporum* and *F. moniliforme* colonizing asparagus tissues. Can. J. Bot. 67: 2420-2424.
- Lassaga, S.L., Camadro, A.L., Babinec, F.J. (1998). Assessing genetic variability for *Fusarium* resistance in three asparagus populations with an *in vitro* assay. Euphytica 103: 131-136.
- Laurence, M.H., Summerell, B.A., Burgess, L.W., Liew, E.C.Y. (2014). Genealogical concordance phylogenetic species recognition in the *Fusarium oxysporum* species complex. Fungal Biol. 118: 374-384.
- Lee, J.W., Lee, J.H., Yu, I.H., Gorinstein, S., Bae, J.H., Ku, Y.G. (2014). Bioactive compounds, antioxidant and binding activities and spear yield of *Asparagus officinalis* L. Plant Foods Human Nutr. 9: 175-181.
- Leslie, J.F. (1993). Fungal vegetative compatibility. Annu. Rev. Phytopathol. 31: 127-150.
- Leslie, J.F., Summerell, B.A. (2006). The *Fusarium* laboratory manual. Blackwell, Iowa. 388 pp. ISBN: 978-0-813-81919-8
- Li, Y., Mao, L., Yan, D., Ma, T., Shen, J., Guo, M., Wang, Q., Ouyang, C., Cao, A. (2014). Quantification of *Fusarium oxysporum* in fumigated soils by a newly developed real-time PCR assay to assess the efficacy of fumigants for Fusarium wilt disease in strawberry plants. Pest. Manag. Sci. 70: 1669-1675.
- Li, Y., Yanagi, A., Miyawaki, Y., Okada, T., Matsubara, Y. (2010). Disease tolerance and changes in antioxidative abilities in mycorrhizal strawberry plants. J. Jpn. Soc. Hortic. Sci. 79: 174-178.
- Liddycoat, S.M., Greenberg, B.M., Wolyn, D.J. (2009). The effect of plant growth-promoting rhizobacteria on asparagus seedlings and germinating seeds subjected to water stress under

- greenhouse conditions. *Can. J. Microbiol.* 55: 388-394.
- Link, H.F. (1809). *Observationes in ordines plantarum naturalis*, Dissertatio I. Mag. Ges. Naturf. Freunde, Berlin 3: 3-42.
- López-Aranda, J.M. (2008). El cultivo de la fresa en Huelva. En: Junta de Andalucía. Consejería de Agricultura y Pesca (Ed.), *La fresa de Huelva*. Sevilla: 103-172.
- López-Mondéjar, R., Beaulieu, R., Ros, M., Pascual, J.A. (2012). SCAR-based real-time TaqMan PCR for early detection of *Fusarium oxysporum* in melon seedlings under greenhouse nursery conditions. *Crop. Prot.* 33: 1-6.
- Maksimov, I.V., Abizgil'dina, R.R., Pusenkova, L.I. (2011). Plant growth promoting rhizobacteria as alternative to chemical crop protectors from pathogens (Review). *Appl. Biochem. Microbiol.* 47: 333-345.
- Marcellán, O.N., Camadro, E.L. (1999). Formation and development of embryo and endosperm in intra- and inter-specific crosses of *Asparagus officinalis* and *A. densiflorus* cv. Sprengeri. *Sci. Hortic.* 81: 1-11.
- Martin, F.N. (2003). Development of alternative strategies for management of soilborne pathogens currently controlled with methyl bromide. *Annu. Rev. Phytopathol.* 41: 325-350.
- Matthews, M.C., Mostert, D., Ndayihanzamaso, P., Rose, L.J., Viljoen, A. (2020). Quantitative detection of economically important *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* strains in Africa in plants, soil and water. *PLoS One* 15: 1-20.
- Migliorini, D., Ghelardini, L., Tondini, E., Luchi, N., Santini, A. (2015). The potential of symptomless potted plants for carrying invasive soilborne plant pathogens. *Divers. Distrib.* 21: 1218-1229.
- Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente. (2019). <https://www.mapa.gob.es/es/estadistica/temas/estadisticas-agrarias/agricultura/superficies-producciones-anuales-cultivos/>
- Moein, S., Mazzola, M., Ntushelo, N.S., McLeod, A. (2019). Apple nursery trees and irrigation water as potential external inoculum sources of apple replant disease in South Africa. *Eur. J. Plant Pathol.* 153: 1131-1147.
- Molinero-Ruiz, L., Rubio-Pérez, E., González-Domínguez, E., Basallote-Ureba, M.J. (2011). Alternative hosts for *Fusarium* spp. causing crown and root rot of asparagus in Spain. *J. Phytopathol.* 59: 114-116.
- Munkvold G.P. (2017). *Fusarium* species and their associated mycotoxins. In: A. Moretti, A. Susca (Eds.), *Mycotoxigenic Fungi. Methods in molecular biology*, Humana Press, New York, NY. 1542 pp.
- Nahiyani, A.S.M., Matsubara, Y. (2012). Tolerance to *Fusarium* root rot and changes in antioxidative ability in mycorrhizal asparagus plants. *HortScience* 47: 356-360.

- Nalim, F.A., Samuels, G.J., Wijesundera, R.L., Geiser, D.M. (2011). New species from the *Fusarium solani* species complex derived from perithecia and soil in the Old World tropics. *Mycologia* 103: 1302-1330.
- Navarro, E., Serrano-Heras, G., Castaño, M.J., Solera, J. (2015). Real-time PCR detection chemistry. *Clin. Chim. Acta* 439: 231-250.
- Nelson, P.E., Dignani M.C., Anaisse E.J. (1994). Taxonomy, biology, and clinical aspects of *Fusarium* species. *Clin. Microbiol. Rev.* 7: 479-504.
- Nelson, P.E., Toussoun, T.A., Cook, R.J. (1981). *Fusarium: Diseases, biology and taxonomy*. The Pennsylvania State University Press. University Park and London.
- Noperi-Mosqueda, L.C., López-Moreno, F.J., Navarro-León, E., Sánchez, E., Blasco, B., Moreno, D.A., Soriano, T. (2020). Effects of asparagus decline on nutrients and phenolic compounds, spear quality, and allelopathy. *Sci. Hortic.* 261: 109029.
- O'Donnell, K. (2000). Molecular phylogeny of the *Nectria haematococca-Fusarium solani* species complex. *Mycologia* 92: 919-938.
- O'Donnell, K., Cigelnik, E., Nirenberg, H.I. (1998). Molecular systematics and phylogeography of the *Gibberella fujikuroi* species complex. *Mycologia* 90: 465-93.
- O'Donnell, K., Gueidan, C., Sink, S., Johnston, P.R., Crous, P.W., Glenn, A. (2009). A two-locus DNA sequence database for typing plant and human pathogens within the *Fusarium oxysporum* species complex. *Fungal Genet. Biol.* 46: 936-948.
- O'Donnell, K., Kistler, H.C., Cigelnik, E., Ploetz, R.C. (1998). Multiple evolutionary origins of the fungus causing Panama disease of banana: concordant evidence from nuclear and mitochondrial gene genealogies. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95: 2044e2049.
- O'Donnell, K., Sutton, D.A., Fothergill, A., McCarthy, D., Rinaldi, M.G., Brandt, M.E., Zhang, N., Geiser, D.M. (2008). Molecular phylogenetic diversity, multilocus haplotype nomenclature, and in vitro antifungal resistance within the *Fusarium solani* species complex. *J. Clin. Microbiol.* 46: 2477-2490.
- O'Donnell, K., Sutton, D.A., Rinaldi, M.G., Magnon, K.C., Cox, P.A., Revankar, S.G., Sanche, S., Geiser, D.M., Juba, J.H., Van Burik, J.A.H., Padhye, A., Anaissie, E.J., Francesconi, A., Walsh, T.J., Robinson, J.S. (2004). Genetic diversity of human pathogenic members of the *Fusarium oxysporum* complex inferred from multilocus DNA sequence data and amplified fragment length polymorphism analyses: Evidence for the recent dispersion of a geographically widespread clonal lineage and nosocomial origin. *J. Clin. Microbiol.* 42: 5109-5120.
- O'Donnell, K., Ward, T.J., Robert, V.A.R.G., Crous, P.W., Geiser, D.M., Kang, S. (2015). DNA sequence-based identification of *Fusarium*: Current status and future directions. *Phytoparasitica* 43: 583-595.
- Palmero, D., De Cara, M., Nosir, W., Gálvez, L., Cruz, A., Woodward, S., Gonzalez-Jaen, M.T.,

- Tello, J. (2012). *Fusarium proliferatum* isolated from garlic in Spain: Identification, toxigenic potential and pathogenicity on related *Allium* species. *Phytopathol. Mediterr.* 51: 207-218.
- Palmero, D., Iglesias, C., De Cara, M., Lomas, T., Santos, M., Tello, J.C. (2009). Species of *Fusarium* isolated from river and sea water of southeastern Spain and pathogenicity on four plant species. *Plant Dis.* 93: 377-385.
- Papizadeh, M., van Diepeningen, A.D., Zamanizadeh, H.R., Saba, F., Ramezani, H. (2018). *Fusarium ershadii* sp. nov., a pathogen on *Asparagus officinalis* and *Musa acuminata*. *Eur. J. Plant Pathol.* 151: 689-701.
- Pastrana, A., Basallote-Ureba, M., Aguado, A., Akdi, K., Capote, N. (2016). Biological control of strawberry soil-borne pathogens *Macrophomina phaseolina* and *Fusarium solani*, using *Trichoderma asperellum* and *Bacillus* spp. *Phytopathol. Mediterr.* 55: 109-120.
- Pastrana, A.M., Basallote-Ureba, M.J., Aguado, A., Capote, N. (2017)c. Potential inoculum sources and incidence of strawberry soil-borne pathogens in Spain. *Plant Dis.* 101: 751-760.
- Pastrana, A.M., Basallote-Ureba, M.J., Capote, N. (2017)b. Symptomless reservoirs of *Fusarium oxysporum* f. sp. *fragariae* and alternative hosts of *Fusarium solani* pathogenic to strawberry. *J. Plant Pathol.* 99: 141-148.
- Pastrana, A.M., Capote, N., De los Santos, B., Romero, F., Basallote-Ureba, M.J. (2014). First report of *Fusarium solani* causing Crown and Root Rot on strawberry crops in southwestern Spain. *Plant Dis.* 98: 161.
- Pastrana, A.M., Kirkpatrick, S.C., Kong, M., Broome, J.C., Gordon, T.R. (2017)a. *Fusarium oxysporum* f. sp. *mori*, a new *forma specialis* causing Fusarium wilt of blackberry. *Plant Dis.* 101: 2066-2072.
- Pérez-Sierra, A., Landeras, E., León, M., Berbegal, M., García-Jiménez, J., Armengol, J. (2007). Characterization of *Fusarium circinatum* from *Pinus* spp. in northern Spain. *Mycol. Res.* 111: 832-839.
- Pollard, A.T., Okubara, P.A. (2019). Real-time PCR quantification of *Fusarium avenaceum* in soil and seeds. *J. Microbiol. Methods* 157: 21-30.
- Prasad, P., Kumar, J. (2017). Management of Fusarium wilt of chickpea using brassicas as biofumigants. *Legume Research* 40: 178-182.
- Puhalla, J.E. (1985). Classification of strains of *Fusarium oxysporum* on the basis of vegetative compatibility. *Can. J. Bot.* 63: 179-183.
- Rabodonirina, M., Piens, M.A., Monier, M.F., Gueho, E., Fiere, D., Mojon, M. (1994). *Fusarium* infections in immunocompromised patients: Case reports and literature review. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 13: 152-161.
- Redondo, C., Villarino, M., Larenas, J., Melgarejo, P., De Cal, A. (2012). Enfermedades emergentes en los viveros de altura de fresa tras la retirada total del bromuro de metilo en 2009. XVI

Congreso Nacional de la SEF. Málaga, septiembre 2012.

- Rodríguez, R., Jaramillo, S., Rodríguez, G., Espejo, J.A., Guillén, R., Fernández-Bolaños, J., Herredia, A., Jiménez, A. (2005). Antioxidant activity of ethanolic extracts from several asparagus cultivars. *J. Agric. Food Chem.* 53: 5212-5217.
- Rodríguez-Gálvez, E., Mendgen, K. (1995). The infection process of *Fusarium oxysporum* in cotton root tips. *Protoplasma* 189: 61-72.
- Rodríguez-Molina, M.C. (2003). Vascular colonisation patterns in susceptible and resistant tomato cultivars inoculated with *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* races 0 and 1. *Plant Pathol.* 52: 199-203.
- Rodríguez-Navarro, D.N., Rodríguez-Berbel, N., Galiano, M., De la Lastra, E., Barrau, C., Basallote-Ureba, M.J., Capote, N. (2019). Estudios *in vitro* de la capacidad de biocontrol de hongos y oomicetos fitopatógenos por cepas de *Bacillus* y *Pseudomonas*. *Phytoma* 311: 1-7.
- Sanogo, S., Zhang, J. (2016). Resistance sources, resistance screening techniques and disease management for Fusarium wilt in cotton. *Euphytica* 207: 255-271.
- Schofield, P.E. (1991). Asparagus decline and replant problem in New Zealand. *New Zeal. J. Crop Hort.* 19: 213-220.
- Schreuder, W., Lamprecht, S.C., Marasas W.F.O., Calitz, F.J. (1995). Pathogenicity of three *Fusarium* species associated with asparagus decline in South Africa. *Plant Dis.* 79: 177-181.
- Serrano, Z. (2003). El espárrago: técnicas de producción. Impresos Izquierdo S.L. Madrid. 280 pp.
- Sharifi, K., Zare, R., Rees-George, J. (2008). Vegetative compatibility groups among *Fusarium solani* isolates causing potato dry rot. *J. Biol. Sci.* 8: 374-379.
- Short, D.P.G., O'Donnell, K., Thrane, U., Nielsen, K.F., Zhang, N., Juba, J.H., Geiser, D.M. (2013). Phylogenetic relationships among members of the *Fusarium solani* species complex in human infections and the descriptions of *F. keratoplasticum* sp. nov. and *F. petroliphilum* stat. nov. *Fungal Genet. Biol.* 53: 59-70.
- Singh, N., Kapoor, R. (2018). Quick and accurate detection of *Fusarium oxysporum* f. sp. *carthami* in host tissue and soil using conventional and real-time PCR assay. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 34: 175.
- Snyder, W.C., Hansen, H.N. (1940). The species concept in *Fusarium*. *Am. J. Bot.* 27: 64-67.
- Song, Z., Massart, S., Yan, D., Cheng, H., Eck, M., Berhal, C., Ouyang, C., Li, Y., Wang, Q., Cao, A. (2020). Composted chicken manure for anaerobic soil disinfestation increased the strawberry yield and shifted the soil microbial communities. *Sustainability* 12: 6313.
- Steinkellner, S., Mammerler, R., Vierheilig, H. (2008). Germination of *Fusarium oxysporum* in root exudates from tomato plants challenged with different *Fusarium oxysporum* strains. *Eur. J. Plant Pathol.* 122: 395-401.

- Summerell, B.A., Laurence M.H., Liew, E.C.Y., Leslie, J.F. (2010). Biogeography and phylogeography of *Fusarium*: a review. *Fungal Divers.* 44: 3-13.
- Tahat, M.M., Kamaruzaman, S., Othman, R. (2010). Mycorrhizal fungi as a biocontrol agent. *Plant Pathol. J.* 4: 198-207.
- Talavera, M., Verdejo, S., De los Santos, B., Gómez, J.A., Vela, M.D., Miranda, L., Fernández, M., Soria, C., Medina, J.J. (2018). Problemática fitopatológica del cultivo de la fresa en Huelva. Junta de Andalucía. Consejería de Agricultura, Pesca y Desarrollo Rural, Instituto de Investigación y Formación Agraria y Pesquera (Ed.).
- Tello, J.C., Lacasa, A., Molina, R. (1985). Una nota fitopatológica sobre el complejo parasitario del pie de la judía (*Phaseolus vulgaris*). *ITEA* 61: 57-69.
- Tello, J.C., Lacasa, A., Navas, A. (1988). Prospección de micosis en el cultivo del guisante (*Pisum sativum* L.) en Murcia. *Phytoma* 1: 46-53.
- Tezuka, T, Makino, T. (1991). Biological control of *Fusarium* wilt of strawberry by nonpathogenic *Fusarium oxysporum* isolated from strawberry. *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn.* 57: 506-511.
- Villarino, M., De la Lastra, E., Basallote-Ureba, M.J., Capote, N., Larena, I., Melgarejo, P., De Cal, A. (2019). Characterization of *Fusarium solani* populations associated with Spanish strawberry crops. *Plant Dis.* 103: 1974-1982.
- Walter, S., Nicholson, P., Dooha, F.M. (2009). Action and reaction of host and pathogen during *Fusarium* head blight disease. *New Phytol.* 185: 54-66.
- Wong, J.Y., Jeffries, P. (2006). Diversity of pathogenic *Fusarium* populations associated with asparagus roots in decline soils in Spain and the UK. *Plant Pathol.* 55: 331-342.
- Zhang, N., O'Donnell, K., Sutton, D.A., Nalim, F.A., Summerbell, R.C., Padhye, A.A., Geiser, D.M. (2006). Members of the *Fusarium solani* species complex that cause infections in both humans and plants are common in the environment. *J. Clin. Microbiol.* 44: 2186-2190.
- Zitnick-Anderson, K., Simons, K., Pasche, J.S. (2018). Detection and qPCR quantification of seven *Fusarium* species associated with the root rot complex in field pea. *Can. J. Plant Pathol.* 40: 261-271.

# **Capítulo I**

**Diversidad genética y  
compatibilidad vegetativa del  
complejo de especies de  
*Fusarium solani* de fresa en  
España**





## Genetic Diversity and Vegetative Compatibility of *Fusarium solani* Species Complex of Strawberry in Spain

Eduardo De la Lastra,<sup>1</sup> María Villarino,<sup>2</sup> Juan Diego Astacio,<sup>1</sup> Inmaculada Larena,<sup>2</sup> Antonieta De Cal,<sup>2</sup> and Nieves Capote<sup>1,†</sup>

<sup>1</sup>IFAPA Centro Las Torres, 41200 Alcalá del Río, Sevilla, Spain

<sup>2</sup>Department of Plant Protection, Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria, 28040 Madrid, Spain

Accepted for publication 25 July 2019.

### ABSTRACT

*Fusarium solani* is a soilborne fungus that is a pathogen to >100 plant species. It is the causal agent of crown and root rot in strawberry. We collected 100 *F. solani* isolates from diseased plants and soils from two distinct geographic areas of strawberry production in Spain: plant nurseries located in the north-central region of the country and fruit production fields located in the southwestern region. The aims of this study were to accurately identify the isolates within the *Fusarium solani* species complex (FSSC) based on multilocus sequence typing, determine the genetic diversity and population structure of strawberry-associated FSSC based on phylogenetic analysis, and determine the vegetative compatibility among isolates in both strawberry production areas. Seven phylogenetic species, restricted to clade 3 of FSSC, were defined in the Spanish strawberry crops, showing a regional variation of species composition. Isolates from nurseries were composed of four phylogenetic species (i.e., FSSC 2, FSSC 5, FSSC 9, and an unknown FSSC species) that matched with five vegetative compatibility groups (VCGs). Isolates from fruit production fields included five phylogenetic species (i.e., FSSC 2,

FSSC 3 + 4, FSSC 5, FSSC 6, and FSSC 11) distributed into 29 VCGs not correlated with phylogenetic groups. FSSC 5 and FSSC 2 were the most abundant species in nurseries and fruit production fields, respectively, and they were the only species present in both production areas. Of the 47 sequence-based haplotypes defined, no haplotypes were shared between nurseries and fruit production fields. Pathogenic isolates were present in all but FSSC 6 and FSSC 9 species, and FSSC 3 + 4 contained the higher percentage of pathogenic isolates. No relationship was observed between pathogenicity and the source of isolates (plant or soil). Generally, species present in fruit production fields showed higher genetic diversity than those present in nurseries. This work can contribute to understanding the diversity of this species complex in Spanish strawberry production areas, which will be useful for developing integrated disease management strategies.

**Keywords:** *Fusarium* multilocus sequence typing, fruit production fields, mycology, nursery, phylogenetic analysis, vegetative compatibility groups

<sup>†</sup>Corresponding author: N. Capote; [marian.capote@juntadeandalucia.es](mailto:marian.capote@juntadeandalucia.es)

**Funding:** This work was supported by European Regional Development Fund (ERDF) grant RTA2013-00062-C05-02, with cofinancing from the 2014 to 2020 ERDF “Smart Growth” Operational Programme. E. De la Lastra is supported by a PhD fellowship from the European Union and the Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria. M. Villarino held postdoctoral contracts that were associated with Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria grant RTA2013-00062-C05-01 from the Ministry of Economy and Competitiveness, Spain.

E. De la Lastra and M. Villarino contributed equally to this work.

\*The e-Xtra logo stands for “electronic extra” and indicates that one supplementary figure and one supplementary table are published online.

The author(s) declare no conflict of interest.

This article is in the public domain and not copyrightable. It may be freely reprinted with customary crediting of the source. The American Phytopathological Society, 2019.

## 1. Introduction

Spain is the number one producer of strawberry (plants and fruit) in the European region (FAOSTAT, 2016). Strawberry cultivation in Spain is divided by both cultural methods and geography. The production of plants takes place in high-elevation nurseries in the north-central region of Spain (mainly Segovia and Ávila provinces), where optimal agroclimatic conditions allow an adequate vegetative multiplication of plants (López-Aranda, 2008). Plant cultivation is carried out extensively in open sandy fields in a triennial crop rotation mainly with cereal, endive, and carrot. Strawberry runner plants are uprooted or harvested during the months of September and October and transplanted into fruit production fields located mainly in southwestern Spain (Huelva province). Cultivation for fruit production takes place intensively in beds under plastic macro- or microtunnels, with controlled fertilization and irrigation.

Soil disinfestation is an essential activity for strawberry fruit producers to start from healthy and pathogen-free plants (De Cal et al., 2004). The phase out of chemical soil fumigants used in the European Union, including methyl bromide, in accordance with the Montreal Protocol is a likely cause for the emergence and reemergence of soilborne fungal diseases in the strawberry crop (Martin, 2003).

Among soilborne fungal pathogens that affect strawberry crops, *Fusarium solani* (Mart) Sacc has been described as the causal agent of crown and root rot in strawberry-causing stunted growth, wilting, and/or plant death (Pastrana et al., 2014). The fungus has been detected in plant material and soil from Spanish strawberry nurseries (Redondo et al., 2012) and fruit production fields (Pastrana et al., 2014). *F. solani* has also been described as a strawberry pathogen in Italy (Manici et al., 2005), Mexico (Ceja-Torres et al., 2008), Iran (Ayoubi and Soleimani, 2016), and Pakistan (Mehmood et al., 2017). In addition, metagenomic analysis of strawberry cultivation soils also revealed an abundance of pathogenic *F. solani* in strawberry fields in Estonia (Mirmajlessi et al., 2018). Studies on the current incidence in Spanish strawberry nurseries and fruit production fields and inoculum density in soils are scarce, because *F. solani* was not described as a strawberry pathogen. Yield losses at the national level have not yet been calculated; however, a negative correlation between inoculum density of *F. solani* in the soil and fruit yield has been described in Spanish fruit production fields (De la Lastra et al., 2018). In addition, the capacity of this fungus to adapt to long-term survival in soil as resistant structures called chlamydospores (Schippers and van Eck, 1981), its ability to asymptotically colonize other plant species that could act as fungal reservoirs (Molinero-Ruiz et

al., 2011; Pastrana et al., 2017), and the introduction of potentially infected runner plants into fruit production fields make *F. solani* a threat to strawberry crops in Spain.

The fungus *F. solani* is a phylogenetically and biologically complex group known as the *F. solani* species complex (FSSC), which is composed of morphologically indistinguishable saprophytic and pathogenic isolates (Nalim et al., 2011; O'Donnell, 2000; O'Donnell et al., 2008; Short et al., 2013; Zhang et al., 2006). Phylogenetic analyses of FSSC have led to the description of three major clades that comprise >60 phylogenetic species (O'Donnell, 2000). Clade 1 of the FSSC has only two known species: *Fusarium illudens* and *Fusarium plagianthi* from New Zealand. Clade 2 comprises at least eight phylogenetic species, including *Fusarium viguliforme* and *Fusarium tucumaniae*, the causal agents of soybean sudden death syndrome (Aoki et al., 2003). Clade 3 is the most abundant and diverse group, containing species associated with soils and plants as well as with opportunistic animal and human diseases (Zhang et al., 2006). Several species in this clade have been named; the most common are FSSC 1 (*Fusarium petroliphilum*), FSSC 2 (*Fusarium keratoplasticum*), FSSC 3 + 4 (*Fusarium falciforme*), FSSC 5 (*F. solani sensu stricto*), and FSSC 6 (*Fusarium metavorans* sp. nov.) (Al-Hatmi et al., 2018; Nalim et al., 2011; Schroers et al., 2016; Short et al., 2013; Summerbell and Schroers, 2002). However, the majority of species remain unnamed and are classified by numbering.

A multilocus sequence typing (MLST) database, *Fusarium* MLST (<http://www.westerdijkinstituut.nl/fusarium>), with partial sequences from phylogenetically informative loci was developed to facilitate accurate identification of single phylogenetic *Fusarium* species. For accurate FSSC identification, the analysis of three loci has been suggested: the translation elongation factor-1 $\alpha$  (*EF-1 $\alpha$* ), the internal transcribed spacer (ITS) ribosomal DNA (rDNA) region plus D1 and D2 domains of the nuclear 28S large subunit (LSU), and the second largest subunit of RNA polymerase II (*RPB2*) (O'Donnell et al., 2008, 2010; Zhang et al., 2006).

FSSC can reproduce both sexually and asexually. In addition, some isolates have the ability to anastomose and fuse their hyphae with each other to form stable heterokaryons, allowing the exchange of genetic information (Leslie, 1993; Sugimoto et al., 2003). Isolates that are able to anastomose belong to the same vegetative compatibility group (VCG) (Puhalla, 1985). Heterokaryon formation by somatic fusion between individuals can occur independently of sexual reproduction, but generally, it only takes place among strains with similar genotypes. Thus, vegetative compatibility

has been used to study the origins and relatedness of isolates among *Fusarium* species and provides a valuable trait to characterize diversity (Swift et al., 2002).

Estimating the genetic diversity and the population structure of FSSC from the strawberry crop can increase our understanding of the pathogen and improve the management. In addition, the analysis of the genetic diversity could reflect the sequence of migration and spread throughout the strawberry crop, and hence, it could provide information on the source of inoculum of this fungus. Studies on the characterization of *F. solani* isolates from strawberry plants and soil from nurseries and fruit production fields in Spain have revealed considerable variability and differences in morphological and pathogenic characteristics among the isolates in both strawberry production areas (Villarino et al., 2019). In this work, additional characterization of these isolates has been carried out to compare species composition, genetic variability, and vegetative compatibility of FSSC isolates from both production areas. To achieve this, 100 isolates of FSSC were obtained from diseased strawberry plants and soils and a multilocus sequence dataset consisting of concatenated *EF-1 $\alpha$* , ITS + LSU, and *RPB2* partial sequences to identify the strawberry-associated FSSC strains in both strawberry production areas via the *Fusarium* MLST online database and to assess the genetic diversity and the relationships among isolates by phylogenetic analyses. Additionally, we determined the vegetative compatibility among isolates based on nitrate nonutilizing (*nit*) mutants.

## 2. Material and methods

### 2.1. Fungal isolates

FSSC isolates were obtained from strawberry plants from nurseries and fruit production fields during the 2014/2015, 2015/2016, and 2016/2017 strawberry seasons. Two nurseries were sampled each year in the Navalmanzano and Arévalo localities (Segovia and Ávila provinces, respectively). For each nursery, 20 symptomatic runner plants from the center row of each plot were sampled three times after planting (June, August, and September months) throughout each season, making a total of 60 runner plants per nursery and season. Plant densities in nurseries are about 15,000 plants per 1 ha. Thirteen fruit production fields were sampled each season: 12 located in Huelva (the province with the largest volume of strawberry production in Spain) and 1 located in Cádiz, a province with lower-volume strawberry production. We collected all of the declined or dead plants from each plot of 2,150 plants. Plant crown, root, and petiole segments (0.5 to 1 cm) were surface sterilized in 1% sodium hypochlorite for 2 min, rinsed in sterile distilled water, air dried, placed onto potato dextrose

agar (PDA), and incubated at 25°C for 2 days in darkness followed by 5 days at a 12-h photoperiod (OSRAM L 18-W/21-840 Hellweiss Lumilux Cool White; 75  $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ).

Additional isolates of FSSC were obtained from nonfumigated soils from the same nurseries and fruit production fields from which plants were sampled. Soil samples in nurseries consisted of 20 random samples per nursery (0- to 20-cm depth) collected at the beginning of the season and pooled in a composite sample. Soil samples in fruit production fields consisted of soil immediately below the collected plants (0- to 20-cm depth). Samples were processed by dilution plating. Soil (5 to 10 g) was added to a flask containing 150 ml of 0.1% water-agar and placed on a stir plate for 30 min at 150 rpm. Dilutions (10- to 100-fold) were made, and 1-ml aliquots from undiluted and diluted suspensions were spread onto petri dishes containing PDA amended with 0.5 g liter<sup>-1</sup> streptomycin and selective media for *Fusarium* spp. (Nash and Snyder medium; five plates per soil sample); they were incubated at 25°C for 2 days in darkness followed by 3 additional days with a 12-h photoperiod.

*Fusarium*-like white to pale cream colonies from plant and soil samples were selected after 10 days of incubation. Cultures derived from single spores were subsequently obtained. Morphological characterization was performed by microscopic examination. Unbranched monophialides, microconidia, macroconidia, and chlamydospores were consistent with the descriptions of *F. solani* (Martius) Appel & Wollenweber emend Snyder & Hansen (Leslie and Summerell, 2006). Identification was confirmed by sequencing of a portion of the *EF-1 $\alpha$*  gene using primers EF1 and EF2 (O'Donnell et al., 1998b). Fungal isolates were stored in 20% (vol/vol) glycerol at -80°C. To compare isolates coming from nurseries and fruit production fields based on species composition, genetic variability, and compatibility groups, 100 isolates were selected for further characterization taken equally from the two production areas. These isolates were previously characterized morphologically and pathogenically by Villarino et al. (2019).

## 2.2. DNA extraction, amplification, and sequencing

DNA was extracted from single-spore cultures of the 100 selected isolates (Supplementary Table S1) using the Isolate II Plant DNA Kit (Bioline) following the manufacturer's instructions with some modifications. Briefly, fungal mycelium grown on PDA was scraped from the plate, placed into a centrifuge tube containing lysis buffer (Bioline), and homogenized with a pistil coupled to an electric drill. The subsequent DNA extraction steps were performed as described in the instruction

manual. The DNA concentration was determined on an ND-1000 NanoDrop spectrophotometer (Nano-Drop Products).

PCR reactions were performed to amplify and partially sequence three genes of each isolate for MLST: *EF-1 $\alpha$* , ITS + LSU, and *RPB2*. For the amplification of the 59 and 39 fragments of the *RPB2* gene, two pairs of primers were designed by the alignment of partial sequences from the FSSC species reported on GenBank using MEGA7 software (Kumar et al., 2016) and identification of specific consensus sequences (Table 1). PCR reactions contained 10 $\times$  PCR Buffer (Intron Biotechnology, Inc.), 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.25 mM each dNTP, 0.4  $\mu$ M each primer (Table 1), 1 U of i-Pfu DNA polymerase (Intron Biotechnology, Inc.), and 20 to 100 ng of genomic DNA. Amplifications were carried out at 95 $^{\circ}$ C for 3 min followed by 35 cycles of 30 s at 95 $^{\circ}$ C, 20 s at 59 $^{\circ}$ C (for *EF-1 $\alpha$* ) or 55 $^{\circ}$ C (for ITS + LSU and *RPB2*), and 30 s at 72 $^{\circ}$ C. The size of the amplicons was resolved in 1.5% agarose gels in 0.5 $\times$  TAE (Tris-acetate-EDTA) buffer; then, they were stained with RedSafe nucleic acid staining solution (Intron Biotechnology, Inc.) and visualized over an ultraviolet transilluminator. Amplicons were purified using the FavorPrep Gel/PCR purification kit (Favorgen) following the manufacturer's instructions and sequenced by STAB VIDA DNA Sequencing Service. Sequences were deposited in GenBank and compared with available sequences in GenBank and *Fusarium*-ID databases by BLAST analysis.

To accurately identify the FSSC isolates present in nursery and fruit production fields, an MLST was performed according to the *Fusarium* MLST database (<http://www.westerdijkinstituut.nl/fusarium/>) using sequences of the three studied loci.

**Table 1.** Primers used in this study for the amplification of partial sequences of the translation elongation factor-1 $\alpha$  (*EF-1 $\alpha$* ) gene, the internal transcribed spacer (ITS) region plus D1 and D2 domains of the nuclear 28S large-subunit (LSU) ribosomal DNA, and the second largest subunit of the RNA polymerase II (*RPB2*) gene of *Fusarium solani* species complex isolates from strawberry crops.

Primer	Sequence (5'-3')	Locus	Length (bp)	Reference
ef1	ATGGGTAAGGARGACAAGAC	<i>EF1-<math>\alpha</math></i>	666	O'Donnell <i>et al.</i> , 1998
ef2	GGARGTACCAGTSATCATGTT			O'Donnell <i>et al.</i> , 1998
Fs-RPB2-5F	GGGGAGACCAGAAGAAGGC	<i>RBP2</i> (5' region)	864	This work
Fs-RPB2-5R	CCCATGGCCTGTTTACCCAT			This work
Fs-RPB2-3F	GCCCATGATTCAACGTGATGC	<i>RBP2</i> (3' region)	960	This work
Fs-RPB2-3R	CGAAGCTTGCGTCCAGTATG			This work
ITS5	GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG	ITS + LSU	1,084	White <i>et al.</i> , 1990
NL4	GGTCCGTGTTTCAAGACGG			O'Donnell <i>et al.</i> , 2010

### 2.3. Phylogenetic analysis

Independent and concatenated *EF-1 $\alpha$* , ITS + LSU, and *RPB2* sequence fragments (3,574 nucleotides) were used for the phylogenetic analysis of nursery and fruit production field isolates, including FSSC sequences retrieved from GenBank. In addition, previously characterized (Villarino et al., 2019) pathogenic and nonpathogenic isolates from both production areas were separately analyzed. Multiple sequence alignments were performed in MEGA7 software (Kumar et al., 2016) using the CLUSTALW algorithm (Thompson et al., 1994) refined with MUSCLE (Edgar, 2004) and edited manually. Phylogenetic analyses were conducted using MEGA7 through maximum likelihood (ML) analysis using the general time-reversible model (Tavaré, 1986) for the analysis of strawberry FSSC and GenBank-retrieved isolates (Fig. 1) or the Tamura and Nei model (Tamura and Nei, 1993) for the separate analysis of nursery (Fig. 2) and fruit production field (Fig. 3) isolates, with a rate of variation across sites (Yang, 1994) and a proportion of invariable sites (Shoemaker and Fitch, 1989) for both models. Support for internal branches was assessed by 1,000 ML bootstrapped pseudoreplicates of data. Nodes with bootstrap support >70% were indicated in the final trees.

### 2.4. Genetic diversity

Haplotype distribution of the isolates was performed by DnaSP v5 software (Librado and Rozas, 2009). Number of haplotypes (h), haplotype (or gene) diversity (H), and nucleotide diversity (p) of the FSSC species defined were calculated using DnaSP v5. A haplotype is defined as a particular sequence (i.e., two individuals have different haplotypes if their sequences differ in one or more nucleotides). Haplotype diversity measures the singularity of a haplotype in a given population in relation to sample size, and it is based on the frequency of each haplotype in a given population. Nucleotide diversity is used to measure the degree of polymorphism in a population based on the average number of nucleotide differences among DNA sequences in the population (Nei, 1987). To examine a possible exchange of genetic information among isolates from nurseries and fruit production fields via runner plants, genetic diversity between populations (Dxy) in the nursery and the fruit production field were calculated for the only two species present in both production areas (i.e., FSSC 2 and FSSC 5) using DNA sequence information from concatenated loci. Dxy (Nei, 1987) measures the extent of DNA divergence between populations considering the effect of DNA polymorphisms. It is calculated as the average number of nucleotide substitutions per site between populations. In addition, for these two species FSSC 2 and FSSC 5, genetic differentiation parameters

(sequence-based statistic for genetic differentiation [Fst] and nearest neighbor statistic for genetic differentiation [Snn]) and the inferred gene flow (Nm) between nursery and fruit production fields were estimated by DnaSP v5 software. Fst (Hudson et al., 1992) is a sequence-based statistic that uses the information on the number of differences between sequences within and among preassigned populations. Values of Fst range from zero (complete panmixia) to one (completely distinct populations). Nm is an estimation of the gene flow between populations, which is a measure of the exchange of genetic information among populations via migration of individuals, where N is the size of the population and m is the migration rate. Gene flow is detected when  $N > 1$ , and it is not detected when  $N < 1$ . Snn is a measure of how often the most similar sequence is found in the same preassigned population (Hudson, 2000). Values of Snn range from 0.5 to 1. Snn is expected to be near 1 when the populations at the two localities are highly differentiated and near 0.5 when the population is panmictic. Significance of Snn value was computed by permutation (randomization) test (Hudson et al., 1992).

## 2.5. VCGs

Vegetative compatibility tests were assessed in FSSC isolates from nurseries and fruit production fields using nitrate *nit* mutants as described by Jacobson and Gordon (1988). *nit* 1/3 and *nit* M mutants were obtained by culturing wild-type isolates on PDA amended with 4 to 6% potassium chlorate at 25°C with a 12-h photoperiod for 7 to 10 days. The fast-growing sectors of the fungus that are believed to be chlorate resistant were transferred in parallel to plates containing Czapek agar (CZ) and CZ + 2% hypoxanthine, respectively. Colonies with flat growth and hyaline mycelium on CZ plates and wild-type growth on CZ + hypoxanthine plates were identified as *nit* 1/3 mutants. Colonies with flat growth and hyaline mycelium on both CZ and CZ + hypoxanthine media were identified as *nit* M mutants. *nit* 1/3 mutants were obtained for all isolates. *nit* M mutants were also obtained for each VCG group and used as testers. *nit* 1/3 mutants obtained from all studied isolates were paired with the *nit* M testers (including the one belonging to its own VCG as a control) on CZ plates. If wild-type growth mycelium develops along the line of contact between the *nit* 1/3 and *nit* M isolates, anastomosis has occurred, and hence, that isolate was assigned to the VCG represented by the *nit* M isolate. The absence of wild-type growth indicated that the *nit* 1/3 isolate was not compatible with the *nit* M strain (Jacobson and Gordon, 1988). This process was continued until all isolates were

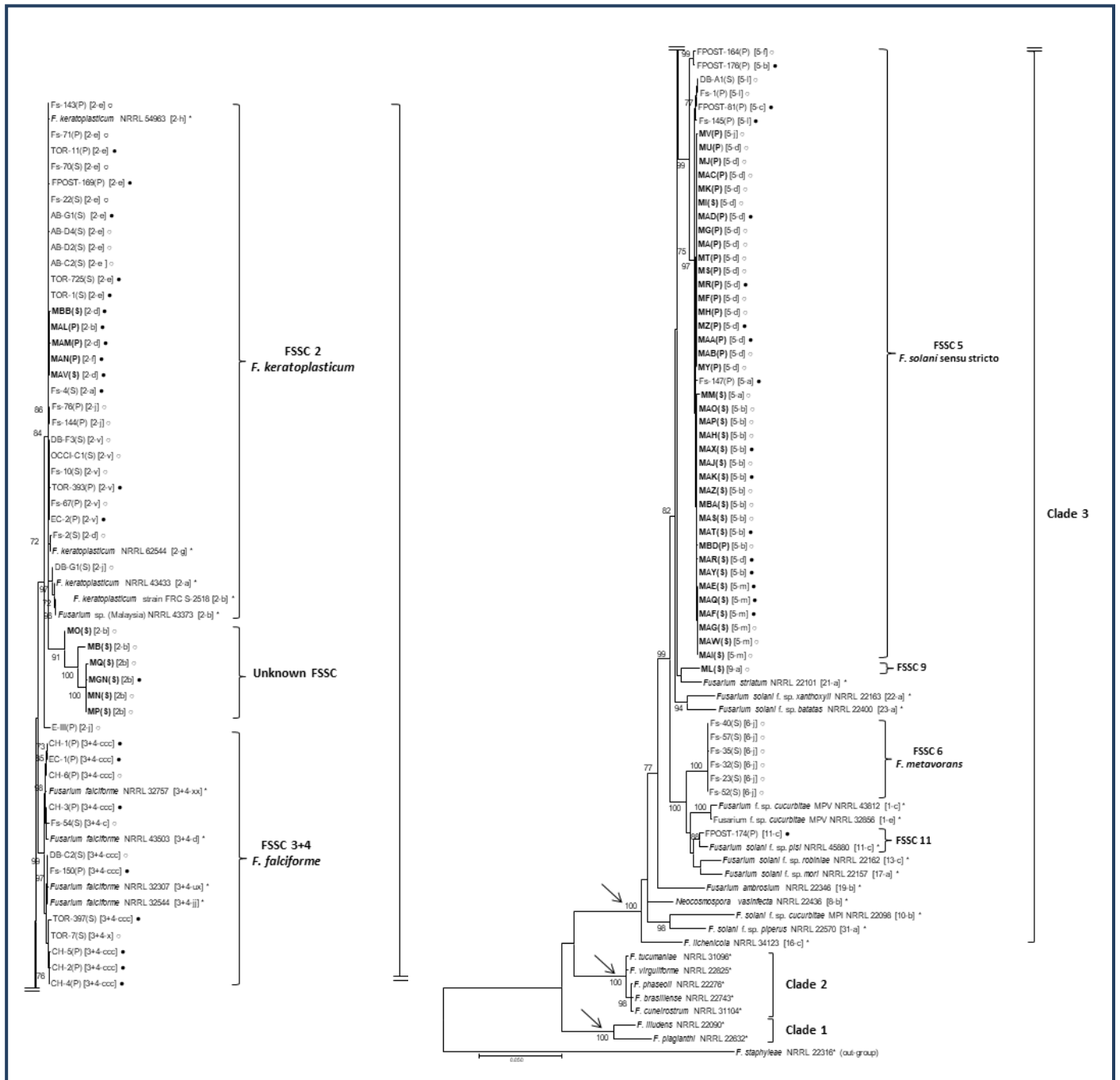


associated with a VCG. If a *nit* 1/3 isolate was not compatible with any other *nit* M strain, it was paired with its own *nit* M mutant to discard self-incompatibility and assigned a unique VCG.

### 3. Results

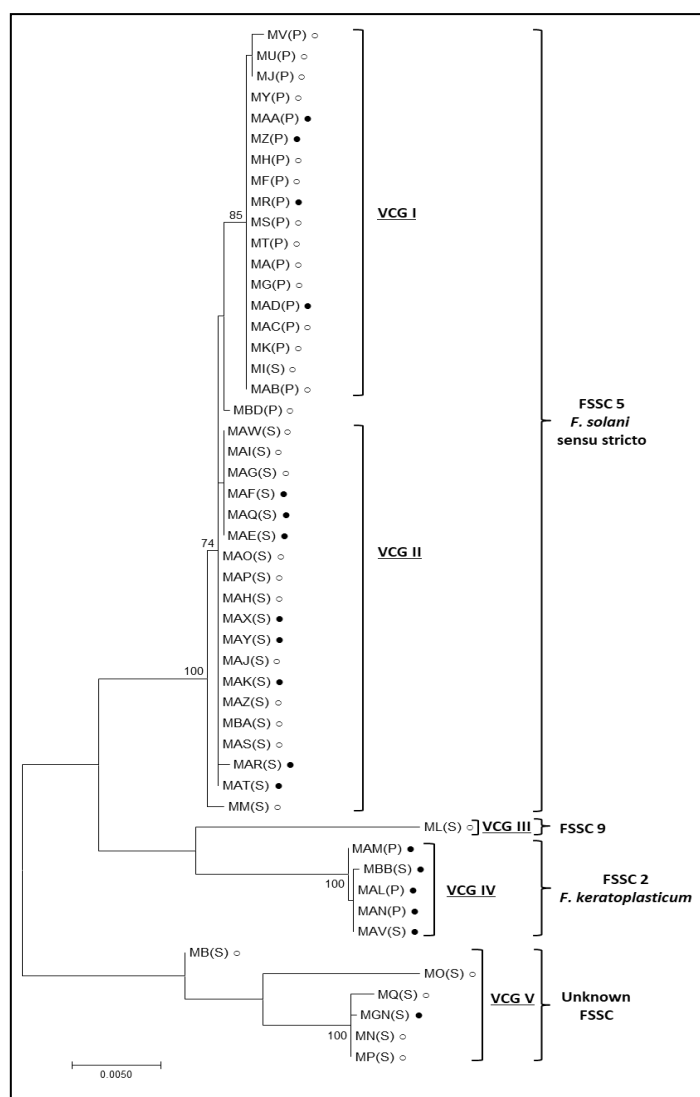
#### 3.1. Identification of FSSC species associated with the strawberry crop

Fifty FSSC isolates were obtained from Spanish strawberry nurseries (29 from soil and 21 from strawberry plants), and 50 isolates were selected from Spanish fruit production fields (25 from soil and 25 from strawberry plants), including previously characterized pathogenic and nonpathogenic isolates (Villarino et al., 2019). The partial *EF-1 $\alpha$* , ITS + LSU rDNA, and *RPB2* sequences used for the MLST of the isolates consisted of 666, 1,084, and 1,824 base pairs, respectively, totaling 3,574 base pairs of aligned DNA sequence per isolate. Phylogenetic analyses of the 100 isolates along with representatives of the known FSSC clades 1, 2, and 3 species strongly supported that all of the strawberry-associated isolates were restricted to clade 3 of FSSC (Fig. 1).

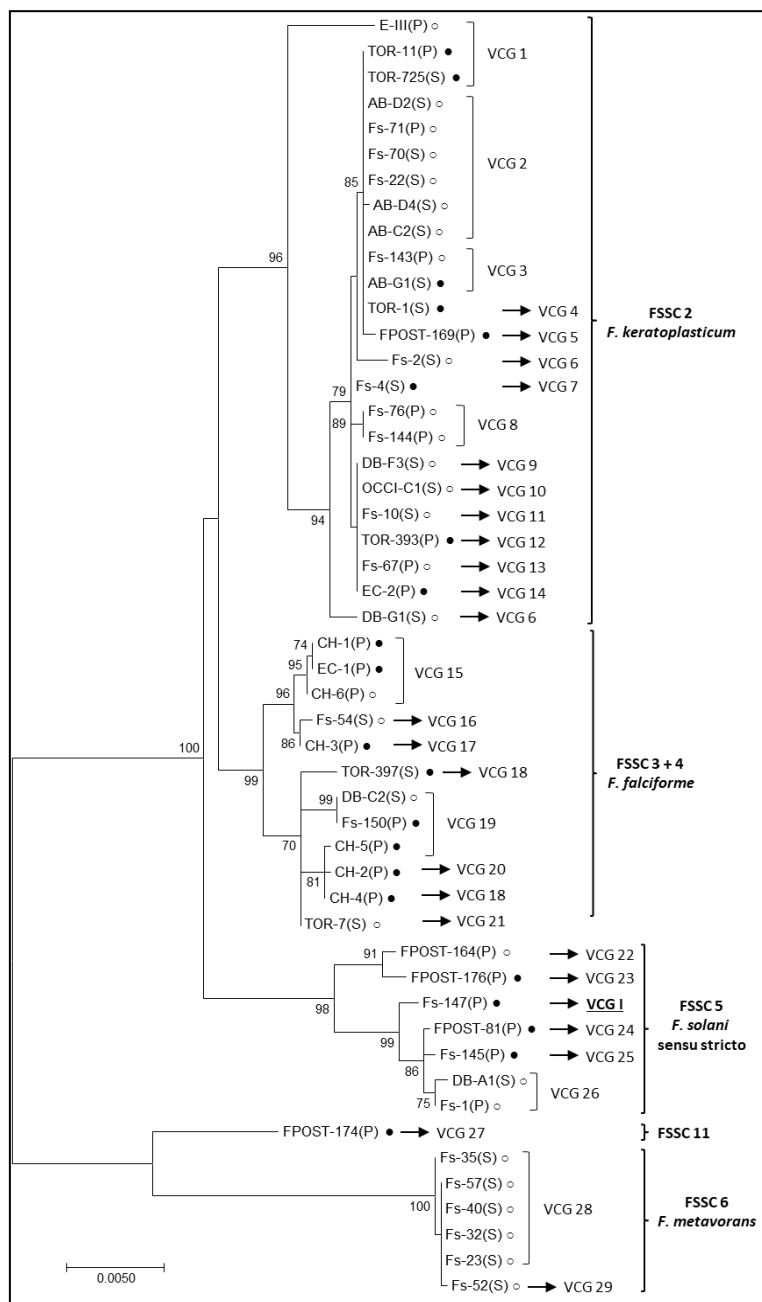


**Fig. 1.** Phylogenetic diversity of *Fusarium solani* species complex (FSSC) isolates from soil (S) and strawberry plants (P) of Spanish strawberry nurseries (bold) and fruit production fields (not bold) using maximum likelihood analysis of the concatenated elongation factor-1 $\alpha$  (666 base pairs), internal transcribed spacer + large subunit (1,084 base pairs), and RNA polymerase II (1,824 base pairs) sequence data. *Fusarium staphyliae* NRRL 22316 was used as an outgroup. Support values are above branches and represent bootstrap values of  $\geq 70\%$ . Haplotypes defined by the *Fusarium* multilocus sequence typing database appear in brackets. Arrows indicate the bootstrap support of the three clades described in the FSSC. ●, Pathogenic isolates; ○, nonpathogenic isolates. \*Sequences retrieved from GenBank.

MLST and phylogenetic analysis defined seven phylogenetic species within the FSSC in the Spanish strawberry crop: that is, FSSC 5 (the most abundant species; named *F. solani sensu stricto*; 45% of all isolates), FSSC 2 (named *F. keratoplasticum*; 29%), FSSC 3 + 4 (named *F. falciforme*; 12%), FSSC 6 (named *F. metavorans* sp. nov.; 6%), and the unnamed phylogenetic species FSSC 9 (1%) and FSSC 11 (1%). An unknown species (6% of all isolates) was also detected in nurseries and strongly supported by individual and multilocus phylogenetic analyses (99% bootstrap by *EF-1a* and *RPB2*, 98% bootstrap by ITS + LSU [data not shown], and 91% bootstrap by multilocus) (Fig. 1). There was a regional variation of species composition. The most abundant species, FSSC 5 and FSSC 2, were present in both strawberry areas at different frequencies: FSSC 5 was the most abundant in nurseries (76%), and FSSC 2 was the most abundant in fruit production fields (48%). The rest of the species were exclusively from nurseries (FSSC 9 and the unknown FSSC) (Fig. 2) or fruit production fields (FSSC 3 + 4, FSSC 6, and FSSC 11) (Fig. 3).



**Fig. 2.** Phylogenetic tree and vegetative compatibility groups (VCGs) inferred from *Fusarium solani* species complex (FSSC) isolates from soil (S) and strawberry plants (P) from strawberry nurseries in the north-central region of Spain. Phylogenetic analysis was conducted by maximum likelihood analysis of the concatenated elongation factor-1 $\alpha$ , internal transcribed spacer + large subunit, and RNA polymerase II loci. Bootstrap support values of  $\geq 70\%$  are indicated above branches. VCGs were determined using nitrate nonutilizing mutants as described by Jacobson and Gordon (1988). ●, Pathogenic isolates; ○, nonpathogenic isolates.



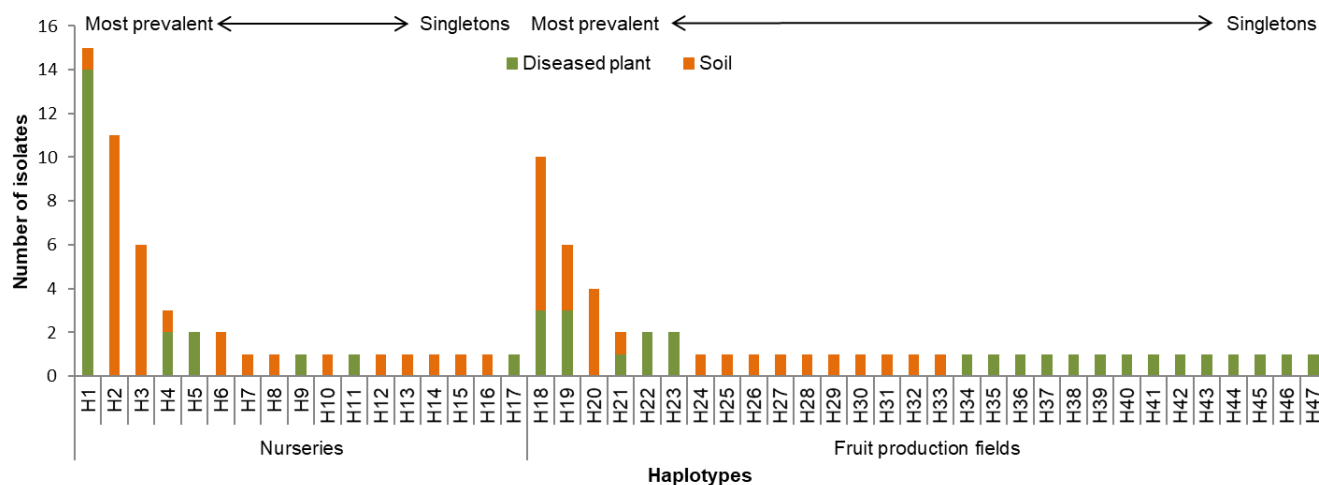
**Fig. 3.** Phylogenetic tree and vegetative compatibility groups (VCGs) inferred from *Fusarium solani* species complex (FSSC) isolates from soil (S) and strawberry plants (P) from strawberry fruit production fields from the southwestern region of Spain. Phylogenetic analysis was conducted by maximum likelihood analysis of the concatenated elongation factor-1 $\alpha$ , internal transcribed spacer + large subunit, and RNA polymerase II loci. Bootstrap support values of  $\geq 70\%$  are indicated above branches. VCGs were determined using nitrate nonutilizing mutants as described by Jacobson and Gordon (1988). Underlined VCG corresponds to nursery compatibility group I. ●, Pathogenic isolates; ○, nonpathogenic isolates.

FSSC 2, FSSC 3 + 4, FSSC 5, and the unknown FSSC species contained pathogenic and nonpathogenic isolates from plant and soil origins. FSSC 6 and FSSC 9 were composed of nonpathogenic isolates from soil, and FSSC 11 was formed by a single pathogenic isolate from plant origin. Among the FSSC species containing pathogenic isolates, FSSC 3 + 4 from fruit production fields showed the highest percentage of pathogenic isolates (67%) followed by FSSC 2 (46%), FSSC 5 (37%), the unknown FSSC (17%), and FSSC 11 (a single pathogenic isolate) (Fig. 1 and Supplementary Fig. S1).

The pathogenic species detected in nurseries were FSSC 2, FSSC 5, and the unknown FSSC, which contained 100, 32, and 20% of pathogenic isolates, respectively. Pathogenic nursery isolates within FSSC 2 and FSSC 5 species came from both soil and plant sources, and the unknown FSSC pathogenic isolate was from soil origin. The only FSSC 9 nursery isolate was nonpathogenic to strawberry, and it was from soil origin (Fig. 2). The main pathogenic species detected in fruit production fields were FSSC 2, FSSC 3 + 4, and FSSC 5, which contained 29, 67, and 57% of pathogenic isolates from soil and plant origin, respectively. FSSC 11 was composed of a single plant isolate pathogenic to strawberry. All isolates in FSSC 6 were from soil origin and nonpathogenic to strawberry (Fig. 3). No relationship was observed between pathogenicity and the isolation source of isolates (soil or plant).

### 3.2. Genetic diversity

Haplotype analysis showed that the 100 FSSC isolates were distributed among 47 haplotypes (17 from nurseries and 30 from fruit production fields). No haplotypes were shared between nurseries and fruit production fields. The distribution of haplotypes was strongly tailed. Eleven unique multilocus haplotypes (singletons) were observed in nurseries, and 24 were observed in fruit production fields (Fig. 4). Some isolates from plants and soil shared the same haplotype: the most prevalent haplotype (H1) was detected in nurseries and contained isolates recovered from diseased plants (14 isolates) and soil (1 isolate). Haplotype H4 from nurseries and haplotypes H18, H19, and H21 from fruit production fields were also composed of isolates recovered from both soil and diseased plants (Fig. 4).



**Fig. 4.** Histogram showing the distribution of *Fusarium solani* species complex isolates from diseased plants and soil from Spanish strawberry nurseries and fruit production fields defined as number of isolates per multilocus haplotype.

Genetic diversity was analyzed for the FSSC species detected in the two strawberry production areas using multilocus analyses (Table 2). Except for FSSC 6, all species in fruit production fields showed higher genetic diversity (haplotype and nucleotide diversity) than those from nurseries. The unknown FSSC from nurseries and FSSC 5 and FSSC 3 + 4 from fruit production fields were the FSSC species with higher genetic diversity, showing the highest values of haplotype and nucleotide diversity.

**Table 2.** *Fusarium solani* species complex (FSSC) species detected in strawberry nurseries and fruit production fields and estimation of genetic diversity parameters by multilocus analysis of elongation factor-1 $\alpha$ , internal transcribed spacer + large subunit, and RNA polymerase II.

Production area and FSSC species	Number of isolates	Number of haplotypes	Haplotype (gene) diversity (H)	Nucleotide diversity ( $\pi$ )
<b>Nursery</b>				
FSSC 2	5	3	0.700 $\pm$ 0.218	0.0002 $\pm$ 0.0001
FSSC 5	38	8	0.750 $\pm$ 0.045	0.0010 $\pm$ 0.0001
FSSC 9	1	1	- <sup>a</sup>	- <sup>a</sup>
Unknown FSSC	6	5	0.933 $\pm$ 0.122	0.0061 $\pm$ 0.0021
<b>Fruit production field</b>				
FSSC 2	24	9	0.779 $\pm$ 0.068	0.0013 $\pm$ 0.0004
FSSC 3+4	12	10	0.970 $\pm$ 0.044	0.0027 $\pm$ 0.0003
FSSC 5	7	7	1.000 $\pm$ 0.076	0.0041 $\pm$ 0.0010
FSSC 6	6	3	0.600 $\pm$ 0.215	0.0002 $\pm$ 0.0001
FSSC 11	1	1	- <sup>a</sup>	- <sup>a</sup>

<sup>a</sup> Haplotype and nucleotide diversity were not calculated for species composed of a single isolate.

Measures of genetic differentiation of FSSC 2 and FSSC 5 species between nurseries and fruit production fields based on DNA sequence polymorphisms indicated that mean diversity was higher between ( $D_{xy}$ ) than within ( $p$ ) the preassigned production populations.  $F_{st}$  values for both FSSC species suggested low gene flow ( $N_m < 1$ ) between nurseries and fruit production fields. Finally,  $S_{nn}$  values are close to one with large significance (Table 3). In all, these results indicate that the FSSC 2 and FSSC 5 species at the two production areas are highly differentiated populations.

**Table 3.** Genetic differentiation parameters of *Fusarium solani* species complex 2 (FSSC 2) and FSSC 5 species between nurseries and fruit production fields.

FSSC species	$D_{xy}^a$	$F_{st}^b$	$N_m^c$	$S_{nn}^d$	$P$ value of $S_{nn}^e$
FSSC 2	$0.0015 \pm 0.0006$	0.2518	0.74	0.9655	0.0000
FSSC 5	$0.0035 \pm 0.0011$	0.2744	0.66	0.9778	0.0000

<sup>a</sup> Genetic diversity between populations (Nei, 1987).

<sup>b</sup> Sequence-based statistic for genetic differentiation (Hudson et al., 1992).

<sup>c</sup> Estimation of gene flow (Hudson, 2000).

<sup>d</sup> Nearest neighbor statistic for genetic differentiation (Hudson, 2000).

<sup>e</sup> Significance of the nearest neighbor statistic for genetic differentiation value (Hudson et al., 1992).

### 3.3. VCGs

Phylogenetic analysis of the nursery isolates using the concatenated sequences allowed the 50 isolates to be categorized into five phylogenetic groups that correlated with five VCGs based on complementation tests involving nit mutants (Fig. 2). FSSC 5 was composed of two well-supported groups corresponding to VCG I (mostly plant isolates) and VCG II (exclusively composed of soil isolates). FSSC 9, composed of a soil isolate (ML), was the unique component of VCG III. FSSC 2 species, composed of plant and soil isolates, formed a well-supported group corresponding to VCG IV. The unknown FSSC species, exclusively composed of soil isolates, formed VCG V (Fig. 2). A good relationship was found between phylogenetic groups and VCGs in nurseries. No relationship was observed between VCG and the source of the isolates (soil or plant).

Phylogenetic analysis of the 50 isolates from fruit production fields rendered five phylogenetic species that did not correlated with VCGs. A total of 29 VCGs were inferred from the fruit production field isolates collected; however, most of them (20) were composed of a single isolate (Fig. 3). The rest (VCG 1, VCG 2, VCG 3, VCG 19, and VCG 26) were composed of both

soil and plant isolates, and VCG 6, VCG 8, VCG 15, and VCG 28 were exclusively plant or soil isolates. No relationship was observed between phylogenetic species and VCGs or between phylogenetic species and the isolates source (plant or soil) in the fruit production fields.

Most of VCGs were composed of both pathogenic and nonpathogenic isolates. Anastomosis between nursery and fruit production field isolates was only detected between pathogenic and nonpathogenic nursery isolates within VCG I and one pathogenic isolate (Fs-147P) from fruit production fields, all of them within the FSSC 5 species.

#### 4. Discussion

Here, we have identified the species of FSSC present in diseased plants and soils from the two Spanish strawberry production areas (plant nurseries located in the north-central region of the country and fruit production fields in the southwestern region), determined the genetic diversity and the structure of the strawberry-associated FSSC populations, and assessed the vegetative compatibility among isolates. An accurate molecular identification of the isolates was performed by MLST using the *Fusarium* MLST online database. Identification of *Fusarium* species has been traditionally based on morphological characteristics. However, morphology is not always enough to characterize some *Fusarium* species to the species level as demonstrated in previous morphological characterization of these isolates (Villarino et al., 2019). A complementary multilocus analysis allows *Fusarium* spp. to be more accurately identified (O'Donnell et al., 2015).

Six phylogenetic species of the FSSC were identified: that is, FSSC 2 (*F. keratoplasticum*), FSSC 3 + 4 (*F. falciforme*), FSSC 5 (*F. solani sensu stricto*), FSSC 6 (*F. metavorans* sp. nov.), the unnamed phylogenetic species FSSC 9, and FSSC 11. An unknown FSSC species was also detected in the Spanish strawberry crop. All were nested within clade 3 of FSSC. There were differences in species composition and frequencies between the two production areas, with FSSC 5 and FSSC 2 being the most abundant species in nurseries and fruit production fields, respectively, and the only two species present in both areas. The rest of species were exclusive of nurseries (FSSC 9 and the unknown FSSC species) or fruit production fields (FSSC 3 + 4, FSSC 6, and FSSC 11). The identification of multiple species of FSSC associated with strawberry supports the high diversity reported for this fungus (Coleman, 2016) and accurately identified isolates that were previously designated as *F. solani*. The difference in the species composition suggests different origins of isolates in nurseries and fruit production fields, supporting similar results derived from



morphological and pathogenic characterization of these isolates in earlier studies. Colony color and production of macroconidia were different for isolates from nurseries and fruit production fields; in addition, most severely pathogenic isolates came from diseased plants from fruit production fields, and less severe isolates came mainly from nursery soil (Villarino et al., 2019). Differences in species composition may also be owing to differences in crop management, geography, and soil composition. Although the same phytosanitary treatments are applied in nurseries and fruit production fields, the strawberry production type (runner plant or fruit), the climate, and the soil composition may be different in both production areas, which may influence the composition of the microbiota and hence, soilborne pathogenic fungi.

Among the most abundant species, FSSC 3 + 4 from fruit production fields and FSSC 2 and FSSC 5 from both production areas showed the greatest percentages of pathogenic isolates. These strawberry-associated FSSC species have previously been described as pathogens to other crops, such as potato, soybean, and bean (Chehri et al., 2014; Chitrampalam and Nelson, 2016; Sousa et al., 2017). They have also been associated with human infectious diseases (Al-Hatmi et al., 2018; Edupuganti et al., 2011; Short et al., 2013), supporting that agronomical and clinical members of FSSC share a common evolutionary origin as previously described (Zhang et al., 2006). The strawberry FSSC 11 consisted of a single isolate, FPOST-174P, pathogenic to strawberry. This isolate strongly nested with *F. solani* f. sp. *pisi* within FSSC 11 in the phylogenetic analysis. Components of FSSC 11 have been described as important root pathogens of soybean, dry bean, pea, and lentil (Chitrampalam and Nelson, 2016). Based on their phylogenetic relationships, pathogenic isolates associated with strawberry could infect not only strawberry but other crops as described for some strawberry associated *F. solani* isolates, which show a broad range of hosts and have the ability to infect tomato, garlic, and asparagus crops (Pastrana et al., 2017). Finally, one of six isolates within the unknown FSSC species was pathogenic to strawberry. The unknown FSSC species from nursery formed an independent VCG that did not associate with any of the previously described species included in the analysis, and it consistently formed an independent group with strong bootstrap support. The *Fusarium* MLST analysis of *EF-1 $\alpha$* , ITS, 28S, and *RPB2* sequences from these unclassified isolates revealed association with multiple species: that is, FSSC 5 (for *EF-1 $\alpha$*  and *RPB2* sequences), FSSC 3 + 4 (for ITS), and FSSC 34 (for 28S; data not shown). A detailed study of the morphological characteristics of these undescribed isolates or the study of additional genomic loci would be necessary to obtain a better identification and classification.

Among nonpathogenic species, members of FSSC 9 and FSSC 6 were previously described as frequent agents of human opportunistic infections (Homa et al., 2018; Tupaki-Sreepurna et al., 2017). In this work, these species were detected in nursery and fruit production field soil, respectively, and they could be a component of the saprophytic microbiota.

No relationship was detected between pathogenicity and the source (soil or plant) of the isolates. Because soil has been suggested as a reservoir of *F. solani* isolates and owing to the long-time survival of this fungus in the soil, strategies to reduce the level of inoculum in production soils, such as biosolarization, are of great importance and have been successfully implemented in Spanish strawberry fruit production areas (De la Lastra et al., 2018).

A correlation between VCGs and phylogenetic groups was observed in nursery, making vegetative compatibility a good marker for phylogenetic species identification in this area. However, in fruit production fields, phylogenetic groups are unable to distinguish all of the defined 29 VCGs. VCGs represent good phenotypic characteristics for assessing diversity within populations, but genetic relationships among VCGs are not always resolved by phylogenetic analyses (Maryani et al., 2019). The higher extent of variation revealed from VCGs in fruit production fields supports the higher genetic diversity (haplotype and nucleotide diversity) for the species detected in this area compared with nurseries. This could be because of multiple introductions of FSSC in strawberry fruit production areas. In fact, strawberry runner plants transplanted in fruit production fields come not only from Spanish nurseries but also, from other plant-growing countries (e.g., The Netherlands, Poland, and the United States). Strawberry cultivation as a monoculture in the southwestern region of Spain rules out the possibility of increased variability in this area owing to isolates from rotational crops. Another factor that could contribute to differences in diversity between the two production areas is the higher number of locations sampled in fruit production fields compared with nurseries. This is owing to the scenario of strawberry production in Spain, with a higher number of small plantations in the southwestern region that contrasts with a smaller number of more extensive and probably more homogeneous nurseries in the north-central region.

Infected propagative plant material has been suggested to be a potential source of inoculum of fungal pathogens, such as *Colletotrichum acutatum* (Ureña-Padilla et al., 2001), *Phytophthora cactorum* (Browne and Bhat, 2011), and *Botrytis cinerea* (Oliveira et al., 2017) in strawberry-producing regions. In our study, we detected phylogenetic species, including pathogenic isolates, that were present in both nurseries and fruit production fields. However, analysis of the genetic

differentiation between nurseries and fruit production fields for the only two species present in both strawberry production areas (i.e., FSSC 2 and FSSC 5) showed a low migration rate between both areas and indicated that populations in nurseries and fruit production fields were highly differentiated. Vegetative compatibility analysis supports these findings. Except for an anastomosis phenomenon within FSSC5 species, vegetative compatibility between isolates from nurseries and fruit production fields was scarce. Anastomosis generally only takes place among strains with similar genotypes, supporting the genetic differentiation of isolates between the two strawberry production areas. MLST and phylogenetic analyses of combined partial sequences of *EF-1 $\alpha$* , ITS + LSU, and *RPB2* in this study have shown to be useful markers for identification and characterization of species in FSSC in strawberry crops. In addition, vegetative compatibility has been demonstrated to be another source of variability in FSSC. This information is important to understand the diversity and distribution of this complex species along Spanish strawberry production areas, and it could also be immensely useful for developing integrated disease management strategies.

### Literature cited

- Al-Hatmi, A.M.S., Ahmed, S.A., van Diepeningen, A.D., Drogari-Apiranthitou, M., Verweij, P.E., Meis, J.F., de Hoog, G.S. (2018). *Fusarium metavorans* sp nov.: The frequent opportunist ‘FSSC6’. *Med. Mycol.* 56: S144-S152.
- Aoki, T., O’Donnell, K., Homma, Y., Lattanzi, A. (2003). Sudden-death syndrome of soybean is caused by two morphologically and phylogenetically distinct species within the *Fusarium solani* species complex: *F. virguliforme* in North America and *F. tucumaniae* in South America. *Mycologia* 95: 660-684.
- Ayoubi, N., Soleimani, M.J. (2016). Morphological and molecular identification of pathogenic *Fusarium* spp. on strawberry in Iran. *Sydowia* 68: 163-171.
- Browne, G.T., Bhat, R.G. (2011). In: *Phytophthora Crown and Root Rot*. California Strawberry Commission, Watsonville, CA: 1-4.
- Ceja-Torres, L.F., Mora-Aguilera, G., Teliz, D., Mora-Aguilera, A., Sánchez-García, P., Muñoz-Ruiz, C., Tlapal-Bolanos, B., De la Torre-Almaraz, R. (2008). Fungi prevalence and etiology of strawberry dry wilt under different crop management systems. *Agrociencia* 42: 451-461.
- Chehri, K., Ghasempour, H., Karimi, N. (2014). Molecular phylogenetic and pathogenetic characterization of *Fusarium solani* species complex (FSSC), the cause of dry rot on potato in Iran. *Microb. Pathog.* 67-68: 14-19.

- Chitrampalam, P., Nelson, B. (2016). Multilocus phylogeny reveals an association of agriculturally important *Fusarium solani* species complex (FSSC) 11, and clinically important FSSC 5 and FSSC 3+4 with soybean roots in the north central United States. *Antonie Van Leeuwenhoek Int. J. Gen. Mol. Microbiol.* 109: 335-347.
- Coleman, J.J. (2016). The *Fusarium solani* species complex: Ubiquitous pathogens of agricultural importance. *Mol. Plant Pathol.* 17: 146-158.
- De Cal, A., Martínez-Treceno, A., López-Aranda, J.M., Melgarejo, P. (2004). Chemical alternatives to methyl bromide in Spanish strawberry nurseries. *Plant Dis.* 88: 210-214.
- De la Lastra, E., Basallote-Ureba, M.J., De los Santos, B., Miranda, L., Dolores Vela-Delgado, M., Capote, N. (2018). A TaqMan real-time polymerase chain reaction assay for accurate detection and quantification of *Fusarium solani* in strawberry plants and soil. *Sci. Hortic.* 237: 128-134.
- Edgar, R.C. (2004). MUSCLE: Multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res.* 32: 1792-1797.
- Edupuganti, S., Roupael, N., Mehta, A., Eaton, M., Heller, J., Bressler, A., Brandt, M., O'Donnell, K. (2011). *Fusarium falciforme* vertebral abscess and osteomyelitis: Case report and molecular classification. *J. Clin. Microbiol.* 49: 2350-2353.
- FAOSTAT. (2016). Food and Agriculture Organization of the United Nations. <http://www.fao.org/home/en/>
- Homa, M., Galgoczy, L., Manikandan, P., Narendran, V., Sinka, R., Csernetics, A., Vagvolgyi, C., Kredics, L., Papp, T. (2018). South Indian isolates of the *Fusarium solani* species complex from clinical and environmental samples: Identification, antifungal susceptibilities, and virulence. *Front. Microbiol.* 9: 1052.
- Hudson, R.R. (2000). A new statistic for detecting genetic differentiation. *Genetics* 155: 2011-2014.
- Hudson, R.R., Boos, D.D., Kaplan, N.L. (1992). A statistical test for detecting geographic subdivision. *Mol. Biol. Evol.* 9: 138-151.
- Jacobson, D.J., Gordon, T.R. (1988). Vegetative compatibility and selfincompatibility within *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis*. *Phytopathology* 78: 668-672.
- Kumar, S., Stecher, G., and Tamura, K. (2016). MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for bigger datasets. *Mol. Biol. Evol.* 33: 1870-1874.
- Leslie, J.F. (1993). Fungal vegetative compatibility. *Annu. Rev. Phytopathol.* 31: 127-150.
- Leslie, J.F., Summerell, B.A. (2006). *The Fusarium Laboratory Manual*. Blackwell Publishing, Ames, IA.
- Librado, P., Rozas, J. (2009). DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* 25: 1451-1452.

- López-Aranda, J.M. (2008). El cultivo de la fresa en Huelva. In: La fresa de Huelva. Junta de Andalucía. Consejería de Agricultura y Pesca (Ed.), Sevilla, Spain: 103-172.
- Manici, L.M., Caputo, F., Baruzzi, G. (2005). Additional experiences to elucidate the microbial component of soil suppressiveness towards strawberry black root rot complex. *Ann. Appl. Biol.* 146: 421-431.
- Martin, F.N. (2003). Development of alternative strategies for management of soilborne pathogens currently controlled with methyl bromide. *Annu. Rev. Phytopathol.* 41: 325-350.
- Maryani, N., Lombard, L., Poerba, Y.S., Subandiyah, S., Crous, P.W., Kema, G.H.J. (2019). Phylogeny and genetic diversity of the banana Fusarium wilt pathogen *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* in the Indonesian centre of origin. *Stud. Mycol.* 92: 155-194.
- Mehmood, N., Riaz, A., Jabeen, N., Anwaar, S., Hussain, S., Abbas, M., Zhang, X., Rosli, H., Gleason, M. (2017). First report of *Fusarium solani* causing fruit rot of strawberry in Pakistan. *Plant Dis.* 101: 1681.
- Mirmajlessi, S.M., Bahram, M., Mand, M., Najdabbasi, N., Mansouripour, S., Loit, E. (2018). Survey of soil fungal communities in strawberry fields by Illumina amplicon sequencing. *Eurasian Soil Sci.* 51: 682-691.
- Molinero-Ruiz, L., Rubio-Pérez, E., González-Domínguez, E., Basallote-Ureba, M.J. (2011). Alternative hosts for *Fusarium* spp. causing crown and root rot of asparagus in Spain. *J. Phytopathol.* 159: 114-116.
- Nalim, F.A., Samuels, G.J., Wijesundera, R.L., Geiser, D.M. (2011). New species from the *Fusarium solani* species complex derived from perithecia and soil in the Old World tropics. *Mycologia* 103: 1302-1330.
- Nei, M. (1987). *Molecular Evolutionary Genetics*. Columbia University Press, New York.
- O'Donnell, K. (2000). Molecular phylogeny of the *Nectria haematococca-Fusarium solani* species complex. *Mycologia* 92: 919-938.
- O'Donnell, K., Cigelnik, E., Nirenberg, H.I. (1998)a. Molecular systematics and phylogeography of the *Gibberella fujikuroi* species complex. *Mycologia* 90: 465-493.
- O'Donnell, K., Kistler, H.C., Cigelnik, E., Ploetz, R.C. (1998)b. Multiple evolutionary origins of the fungus causing Panama disease of banana: Concordant evidence from nuclear and mitochondrial gene genealogies. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 2044-2049.
- O'Donnell, K., Sutton, D.A., Fothergill, A., McCarthy, D., Rinaldi, M.G., Brandt, M.E., Zhang, N., Geiser, D.M. (2008). Molecular phylogenetic diversity, multilocus haplotype nomenclature, and *in vitro* antifungal resistance within the *Fusarium solani* species complex. *J. Clin. Microbiol.* 46: 2477-2490.
- O'Donnell, K., Sutton, D., Rinaldi, M., Sarver, B., Balajee, S., Schroers, H., Summerbell, R., Robert, V., Crous, P., Zhang, N., Aoki, T., Jung, K., Park, J., Lee, Y., Kang, S., Park, B., Geiser, D.

- (2010). Internet-accessible DNA sequence database for identifying fusaria from human and animal infections. *J. Clin. Microbiol.* 48: 3708-3718.
- O'Donnell, K., Ward, T.J., Robert, V.A.R.G., Crous, P.W., Geiser, D.M., Kang, S. (2015). DNA sequence-based identification of *Fusarium*: Current status and future directions. *Phytoparasitica* 43: 583-595.
- Oliveira, M.S., Amiri, A., Zuniga, A.I., Peres, N.A. (2017). Sources of primary inoculum of *Botrytis cinerea* and their impact on fungicide resistance development in commercial strawberry fields. *Plant Dis.* 101: 1761-1768.
- Pastrana, A., Capote, N., De los Santos, B., Romero, F., Basallote-Ureba, M.J. (2014). First report of *Fusarium solani* causing crown and root rot on strawberry crops in southwestern Spain. *Plant Dis.* 98: 161.
- Pastrana, A.M., Basallote-Ureba, M.J., Capote, N. (2017). Symptomless reservoirs of *Fusarium oxysporum* f. sp. *fragariae* and alternative hosts of *Fusarium solani* pathogenic to strawberry. *J. Plant Pathol.* 99: 141-148.
- Puhalla, J.E. (1985). Classification of strains of *Fusarium oxysporum* on the basis of vegetative compatibility. *Can. J. Botany-Rev. Can. De Bot.* 63: 179-183.
- Redondo, C., Villarino, M., Larena, I., Melgarejo, P., De Cal, A. (2012). Enfermedades emergentes en los viveros de altura de fresa tras la retirada del bromuro de metilo en 2009. XVI Congreso Nacional de la Sociedad Española de Fitopatología. Málaga, Spain.
- Schippers, B., van Eck, W.H. (1981). Formation and survival of chlamydospores in *Fusarium*. In: *Fusarium: Diseases, Biology, and Taxonomy*. P.E. Nelson, T.A. Toussoun, and R.J. Cook (Eds.), Penn. State Univ. Press, University Park: 250-260
- Schroers, H.J., Samuels, G.J., Zhang, N., Short, D.P.G., Juba, J., Geiser, D.M. (2016). Epitypification of *Fusisporium (Fusarium) solani* and its assignment to a common phylogenetic species in the *Fusarium solani* species complex. *Mycologia* 108: 806-819.
- Shoemaker, J.S., Fitch, W.M. (1989). Evidence from nuclear sequences that invariable sites should be considered when sequence divergence is calculated. *Mol. Biol. Evol.* 6: 270-289.
- Short, D.P.G., O'Donnell, K., Thrane, U., Nielsen, K.F., Zhang, N., Juba, J.H., Geiser, D.M. (2013). Phylogenetic relationships among members of the *Fusarium solani* species complex in human infections and the descriptions of *F. keratoplasticum* sp. nov. and *F. petroliphilum* stat. nov. *Fungal Genet. Biol.* 53: 59-70.
- Sousa, E.S., Melo, M.P., Mota, J.M., Sousa, E.M.J., Beserra, J.E.A., Matos, K.S. (2017). First report of *Fusarium falciforme* (FSSC 3+4) causing root rot in lima bean (*Phaseolus lunatus* L.) in Brazil. *Plant Dis.* 101: 1954.
- Sugimoto, M., Koike, M., Nagao, H., Okumura, K., Tani, M., Kuramochi, K. (2003). Genetic diversity of the entomopathogen *Verticillium lecanii* on the basis of vegetative compatibility. *Phytoparasitica* 31:450-457.

- Summerbell, R., Schroers, H. (2002). Analysis of phylogenetic relationship of *Cylindrocarpon lichenicola* and *Acremonium falciforme* to the *Fusarium solani* species complex and a review of similarities in the spectrum of opportunistic infections caused by these fungi. *J. Clin. Microbiol.* 40: 2866-2875.
- Swift, C.E., Wickliffe, E.R., Schwartz, H.F. (2002). Vegetative compatibility groups of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cepae* from onion in Colorado. *Plant Dis.* 86: 606-610.
- Tamura, K., Nei, M. (1993). Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial-DNA in humans and chimpanzees. *Mol. Biol. Evol.* 10:512-526.
- Tavaré, S. (1986). Some probabilistic and statistical problems in the analysis of DNA sequences. In: *Some Mathematical Questions in Biology—DNA Sequence Analysis*. R. M. Miura, American Mathematical Society (Ed.), Providence, RI: 57-86.
- Thompson, J.D., Higgins, D.G., Gibson, T.J. (1994). Clustal-W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22: 4673-4680.
- Tupaki-Sreepurna, A., Al-Hatmi, A., Kindo, A., Sundaram, M., de Hoog, G. (2017). Multidrug-resistant *Fusarium* in keratitis: A clinico-mycological study of keratitis infections in Chennai, India. *Mycoses* 60: 230-233.
- Ureña-Padilla, A.R., Mitchell, D.J., Legard, D.E. (2001). Oversummer survival of inoculum for *Colletotrichum* crown rot in buried strawberry crown tissue. *Plant Dis.* 85: 750-754.
- Villarino, M., De la Lastra, E., Basallote-Ureba, M.J., Capote, N., Larena, I., Melgarejo, P., De Cal, A. (2019). Characterization of *Fusarium solani* populations associated with Spanish strawberry crops. *Plant Dis.* 103: 1974-1982.
- White, T.J., Bruns, T., Lee, S., Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. M. A. Innis, D. H Gelfand, J. J. Sninsky, and T. J. White (Eds), Academic Press, San Diego, CA: 315-322.
- Yang, Z.H. (1994). Maximum-likelihood phylogenetic estimation from DNA-sequences with variable rates over sites—approximate methods. *J. Mol. Evol.* 39: 306-314.
- Zhang, N., O'Donnell, K., Sutton, D.A., Nalim, F.A., Summerbell, R.C., Padhye, A.A., Geiser, D.M. (2006). Members of the *Fusarium solani* species complex that cause infections in both humans and plants are common in the environment. *J. Clin. Microbiol.* 44: 2186-2190.





## **Capítulo II**

**Protocolo TaqMan de PCR  
cuantitativa en tiempo real para  
la detección y cuantificación  
precisa de *Fusarium solani* en  
plantas de fresa y suelo**





Contents lists available at ScienceDirect

Scientia Horticulturae

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/scihorti](http://www.elsevier.com/locate/scihorti)

## A TaqMan real-time polymerase chain reaction assay for accurate detection and quantification of *Fusarium solani* in strawberry plants and soil



Eduardo De la Lastra<sup>a</sup>, María José Basallote-Ureba<sup>a</sup>, Berta De los Santos<sup>a</sup>, Luis Miranda<sup>a</sup>,  
María Dolores Vela-Delgado<sup>b</sup>, Nieves Capote<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> IFAPA Centro Las Torres-Tomejil, Apdo. Oficial, 41200 Alcalá del Río, Sevilla, Spain

<sup>b</sup> IFAPA Centro Chipiona, Camino de Esparragosa s/n, 11550, Chipiona, Cádiz, Spain

### ARTICLE INFO

#### Keywords:

*Fusarium solani*  
*Fragaria x ananassa*  
qPCR  
Inoculum density  
Biosolarization

### ABSTRACT

A new TaqMan real-time polymerase chain reaction (qPCR) was developed to accurately detect and quantify the soil-borne fungus *Fusarium solani*, pathogen to strawberry, in plant and soil samples. The assay was designed using sequences from the translation elongation factor 1 alpha (*EF-1α*) gene. The assay is highly specific: it specifically detected *F. solani* isolates when tested against 95 fungal isolates from 27 different species. The detection limit of the assay was 50 fg for *F. solani* genomic DNA and  $10^2$  conidia/g soil. A significant correlation ( $P = 0.0002$ ) was observed between the amount of genomic DNA of *F. solani* detected by qPCR and the number of fungal propagules present in artificially inoculated soils. The effectiveness of the assay was validated by comparing it to traditional methods for the detection of *F. solani* in diseased strawberry plants and pre-planting soils from strawberry fields. A substantial and moderate correlation was found between the qPCR-based and traditional detection methods in diseased plants and soils. The amount of *F. solani* DNA estimated in roots and crowns of symptomatic strawberry plants ranged from 16 to 190 pg/mg fresh tissue. Inoculum densities in pre-planting soils varied between  $3.1 \times 10^2$  and  $1.3 \times 10^5$  colony-forming units per gram (CFU/g) of soil. Effectiveness was also evaluated by assessing the ability of the assay to detect decreasing levels of *F. solani* populations during biosolarization treatment. Taken together, this novel qPCR assay represents a useful tool for rapid assessment of pre-planting soils and nursery plants to prevent *F. solani* infection and production losses.

\* Corresponding author.

*E-mail* addresses: [eduardo.lastra@juntadeandalucia.es](mailto:eduardo.lastra@juntadeandalucia.es) (E. De la Lastra), [mariaj.basallote@juntadeandalucia.es](mailto:mariaj.basallote@juntadeandalucia.es) (M.J. Basallote-Ureba), [berta.santos@juntadeandalucia.es](mailto:berta.santos@juntadeandalucia.es) (B. De los Santos), [luis.miranda.enamorado@juntadeandalucia.es](mailto:luis.miranda.enamorado@juntadeandalucia.es) (L. Miranda), [mdolores.vela@juntadeandalucia.es](mailto:mdolores.vela@juntadeandalucia.es) (M.D. Vela-Delgado), [marian.capote@juntadeandalucia.es](mailto:marian.capote@juntadeandalucia.es) (N. Capote).

<https://doi.org/10.1016/j.scienta.2018.04.007>

Received 7 February 2018; Received in revised form 3 April 2018; Accepted 4 April 2018

0304-4238/ © 2018 Elsevier B.V. All rights reserved

## 1. Introduction

*Fusarium solani* (Mart.) Appel & Wollenw. is a ubiquitous soil-borne fungus that can infect a wide range of plant species (Kolattukudy and Gamble, 1995). *F. solani* has been described as the causal agent of crown and root rot in strawberry—a disease that causes stunted growth, wilting and/or plant death (Pastrana et al., 2014). The fungus was detected in soils and asymptomatic plant material from strawberry nurseries, and in soils and diseased plants from fruit production fields in Spain (Pastrana et al., 2014; Redondo et al., 2012) and causing fruit rot in Pakistan (Mehmood et al., 2017).

Strawberry crop in Spain is also threatened by another soil-borne pathogen of the genus *Fusarium*, *F. oxysporum* f. sp. *fragariae* (*Fof*), detected as a point outbreak in soilless grown strawberries in 2008 (Arroyo et al., 2009). Several years later, only one isolation was reported from plants cultivated on soil in prospections made in nurseries and fruit production fields along 2011–2014 seasons (Pastrana et al., 2017a). New focuses of *Fof* have recently appeared in fruit production fields, probably related to the phasing out of most of the chemical soil fumigants used in European Union (Borrero et al., 2017).

*F. solani* is well adapted to long-term survival in soil as it can form resistant structures named chlamydospores (Schippers et al., 1981). It can also persist in organic plant residues (Booth, 1971), and asymptotically colonize other plant species (Molinero-Ruiz et al., 2011; Pastrana et al., 2017b). These features make eradication quite difficult because chlamydospores, conidia and mycelia may serve as source of inoculum for infection in subsequent growing seasons. Specifically, in strawberry crops, infected plants from nurseries and not effectively disinfested soils could serve as sources of infection in fruit production plants (Pastrana et al., 2017a).

Studies on current incidence in strawberry nurseries and fruit production fields and inoculum density in soils are scarce because it was only recently described as pathogen for strawberry. Methods to detect and identify the fungus are currently based on plate culturing of small pieces of plant tissues and soil dilutions, followed by morphological characterization. These traditional methods are laborious, time-consuming and not always accurate due to the presence of other *Fusarium* species in propagative plant material and soil, and due to the irregular distribution of the fungus in these samples. In contrast, molecular methods based in quantitative real-time polymerase chain reaction (qPCR) enable the accurate identification and quantification of target samples and, due to its feasibility and high throughput, the rapid analysis of a large number of samples. This

technique has been successfully applied for the specific detection of members of *Fusarium solani* species complex (FSSC), such as *F. virguliforme*, which is the causal agent of soybean sudden death syndrome (Gao et al., 2004; Li et al., 2008; Mbofung et al., 2011); and *F. solani* f. sp. *phaseoli*, the causal agent of bean root rot (Filion et al., 2003). It has also been used clinically for the detection of *F. solani*, which can cause keratitis of the eye in humans (Bernal-Martínez et al., 2012; Muraosa et al., 2014).

Control strategies such as biosolarization are emerging as sustainable alternatives to the use of chemicals for soil disinfection in strawberry crop management (Chamorro et al., 2015). The use of the solarization technique combined with the application of organic amendments, such as fresh chicken manure, has provided promising results in terms of soil productivity and crop yields (De los Santos et al., 2017). To date, no study exists that has reported the effect of biosolarization on *F. solani* inoculum density in strawberry soils and its effect on disease control and plant yields. Furthermore, no study exists that details the use of qPCR for this purpose. Therefore, the objectives of this work were (1) to develop a duplex qPCR assay to detect and quantify *F. solani* in strawberry plant tissues and soil samples, including the detection of an internal positive control (IPC); (2) to validate the developed qPCR assay by comparing it with traditional detection methods (plant tissue cultures and soil plate-counting techniques); and (3) to apply the qPCR assay in a real-world scenario by assessing the efficiency of biosolarization to increase strawberry fruit production.

## 2. Material and methods

### 2.1. Isolation of *Fusarium solani* from plant and soil

A total of 66 *F. solani* isolates were collected from 93 diseased strawberry plants and 26 soil samples from strawberry fruit producing fields at Huelva province in Southwestern Spain during 2014–2016 strawberry seasons (Table 1).

**Table 1.** Isolates of *Fusarium solani*, *Fusarium* spp. and other fungal species used in this study.

Species	Isolates	Source	Origin	qPCR	Acc. No. <i>EF-1α</i>
<i>Fusarium solani</i>	TOR-1	Soil	fruit production field	+	KF275034
	TOR-7	Soil	fruit production field	+	KY486705
	TOR-11	Strawberry root	nursery	+	KF275033

Species	Isolates	Source	Origin	qPCR	Acc. No. <i>EF-1a</i>
	TOR-393	Strawberry crown	fruit production field	+	KX215048
	TOR-397	Soil	fruit production field	+	KX215049
	TOR-725	Soil	fruit production field	+	KX215050
	TOR-743	Strawberry crown	fruit production field	+	KX215051
	FPOST-81	Strawberry root	fruit production field	+	KF275032
	FPOST-164	Strawberry root	fruit production field	+	KX215052
	FPOST-169	Strawberry crown	fruit production field	+	KX215053
	FPOST-174	Strawberry crown	fruit production field	+	KX215054
	FPOST-176	Strawberry crown	fruit production field	+	KX215055
	E-III	Strawberry crown	fruit production field	+	KX215056
	Fs-1S	Soil	fruit production field	+	KY486652
	Fs-2S	Soil	fruit production field	+	KY486653
	Fs-4S	Soil	fruit production field	+	KY486654
	Fs-10S	Soil	fruit production field	+	KY486655
	Fs-18S	Soil	fruit production field	+	KY486656
	Fs-19S	Soil	fruit production field	+	KY486657
	Fs-22S	Soil	fruit production field	+	KY486658
	Fs-23S	Soil	fruit production field	+	KY486659
	Fs-32S	Soil	fruit production field	+	KY486660
	Fs-35S	Soil	fruit production field	+	KY486661
	Fs-38S	Soil	fruit production field	+	KY486662
	Fs-40S	Soil	fruit production field	+	KY486663
	Fs-41S	Soil	fruit production field	+	KY486664
	Fs-43S	Soil	fruit production field	+	KY486665
	Fs-45S	Soil	fruit production field	+	KY486666
	Fs-50S	Soil	fruit production field	+	KY486667
	Fs-52S	Soil	fruit production field	+	KY486668
	Fs-53S	Soil	fruit production field	+	KY486669
	Fs-54S	Soil	fruit production field	+	KY486670
	Fs-55S	Soil	fruit production field	+	KY486671
	Fs-56S	Soil	fruit production field	+	KY486672
	Fs-57S	Soil	fruit production field	+	KY486673
	Fs-70S	Soil	fruit production field	+	KY486674
	Fs-1P	Strawberry root	fruit production field	+	KY486675
	Fs-67P	Strawberry crown	fruit production field	+	KY486676
	Fs-69P	Strawberry crown	fruit production field	+	KY486677
	Fs-71P	Strawberry crown	fruit production field	+	KY486678
	Fs-76P	Strawberry root	fruit production field	+	KY486679
	Fs-143P	Strawberry root	fruit production field	+	KY486680
	Fs-144P	Strawberry root	fruit production field	+	KY486681
	Fs-145P	Strawberry crown	fruit production field	+	KY486682

Species	Isolates	Source	Origin	qPCR	Acc. No. <i>EF-1α</i>
	Fs-146P	Strawberry root	fruit production field	+	KY486683
	Fs-147P	Strawberry root	fruit production field	+	KY486684
	Fs-148P	Strawberry crown	fruit production field	+	KY486685
	Fs-149S	Soil	fruit production field	+	KY486686
	Fs-150P	Strawberry crown	fruit production field	+	KY486687
	AB-C2	Soil	fruit production field	+	KY486688
	AB-D2	Soil	fruit production field	+	KY486689
	AB-D4	Soil	fruit production field	+	KY486690
	AB-G1	Soil	fruit production field	+	KY486691
	DB-A1	Soil	fruit production field	+	KY486692
	DB-C2	Soil	fruit production field	+	KY486693
	DB-F3	Soil	fruit production field	+	KY486694
	DB-G1	Soil	fruit production field	+	KY486695
	OCCI-C1	Soil	fruit production field	+	KY486696
	CH-1P	Strawberry root	fruit production field	+	KY486697
	CH-2P	Strawberry root	fruit production field	+	KY486698
	CH-3P	Strawberry crown	fruit production field	+	KY486699
	CH-4P	Strawberry crown	fruit production field	+	KY486700
	CH-5P	Strawberry root	fruit production field	+	KY486701
	CH-6P	Strawberry crown	fruit production field	+	KY486702
	EC-1P	Strawberry crown	fruit production field	+	KY486703
	EC-2P	Strawberry root	fruit production field	+	KY486704
<i>F. acuminatum</i>	TOR-28	Strawberry	IFAPA collection	-	
<i>F. avenaceum</i>	Fav-4699	Cereal	IFAPA collection	-	
	FPOST-7	Strawberry	IFAPA collection	-	
<i>F. cereales</i>	CECT 20547	Corn	IFAPA collection	-	
<i>F. circinatum</i>	CECT 20568	Pinus	IFAPA collection	-	
<i>F. commune</i>	TOR-58	Strawberry	IFAPA collection	-	
<i>F. colmurum</i>			IFAPA collection	-	
<i>F. graminearum</i>	Fgr-6478	Cereal	IFAPA collection	-	
<i>F. equiseti</i>	TOR-9	Strawberry	IFAPA collection	-	
	FPOST-15	Strawberry	IFAPA collection	-	
<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>fragariae</i>	G2-4	Strawberry	IFAPA collection	-	
<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i>	Foly	Tomato	IFAPA collection	-	
<i>F. poae</i>	Fpo-6606	Cereal	IFAPA collection	-	
<i>F. proliferatum</i>	TOR-23	Strawberry	IFAPA collection	-	
<i>F. redolens</i>	181-BL		IFAPA collection	-	
<i>F. sambucinum</i>	Fsam-PA	Potato	IFAPA collection	-	
<i>F. sporotrichoides</i>	Fsp-4596	Strawberry	IFAPA collection	-	
<i>F. tritinctum</i>	CECT 20150	Corn	IFAPA collection	-	

Species	Isolates	Source	Origin	qPCR	Acc. No. <i>EF-1<math>\alpha</math></i>
<i>F. verticilloides</i>	Fver-2982	Corn seeds	IFAPA collection	-	
<i>Verticillium dahliae</i>	F55/11	Strawberry	IFAPA collection	-	
<i>Macrophomina phaseolina</i>	MAC-15	Strawberry	IFAPA collection	-	
<i>Colletotrichum acutatum</i>	CECT 20240	Strawberry	IFAPA collection	-	
<i>Phoma exigua</i>	Phe-1	Strawberry	IFAPA collection	-	
<i>Rhizoctonia</i> sp.	TOR-380	Strawberry	IFAPA collection	-	
<i>Chaetomium</i> sp.	TOR-269	Strawberry	IFAPA collection	-	
<i>Trichoderma</i> sp.	TOR-13	Strawberry	IFAPA collection	-	
<i>Phytophthora cactorum</i>	PF-305	Strawberry	IFAPA collection	-	
<i>Pythium litorale</i>	TOR-239	Strawberry	IFAPA collection	-	
<i>Phytophthora cinnamomi</i>	CECT 20186	Quecus	IFAPA collection	-	

Sampled diseased plants were carefully washed under tap water and cut longitudinally in half. Small pieces from one half (crowns and roots) were surface disinfested in 1% sodium hypochlorite for 2 min, rinsed in sterile distilled water, air-dried, placed on potato dextrose agar (PDA) (Difco) plates, and incubated at 25 °C for 2 days in darkness and 5 days at a 12 h photoperiod (OSRAM L 18 W/21-840 Hellweiss Lumilux Cool White, 75  $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ). The other longitudinal half of the plant was used for DNA extraction and further detection and quantification of *F. solani* by qPCR (see below).

Soil samples were collected one month before standard soil fumigation. Twelve samples (0–20 cm depth, approximately 100 g) taken at random in each plot were pooled and mixed as a composite sample. Soil samples were air-dried for 7–10 days at room temperature, passed through a 1 mm-mesh sieve and stored at 5 °C until used. Five grams of the composite soil sample were passed through a 1 mm-mesh sieve, added to a flask containing 150 ml of 0.1% water agar (WA) (Difco™), and placed on a stir plate for 1 min. Before the stirring ended, 1 ml of the suspension was removed and dilutions (1:1, 1:10 and 1:100) were spread on V8 agar plates (5 plates/soil sample) and incubated at 25 °C for two days in darkness and three additional days with a 12 h photoperiod. Three replicates per plot were analyzed.



## 2.2. Characterization of *F. solani* isolates

*Fusarium solani*-like colonies from plant material and soils were selected and identified based in morphological characteristics (Leslie and Summerell, 2006). DNA from single spore cultures was isolated using the Isolate II Plant DNA Kit (Bioline, London UK), while following the manufacturers' instructions with some modifications: Fungal mycelium grown on PDA was scraped from the plate, placed into a centrifuge tube containing lysis buffer (Bioline) and homogenized with a pistil coupled to an electric drill. The subsequent DNA extraction steps were performed as described in the instruction manual. The DNA concentration was determined using a ND-1000 NanoDrop spectrophotometer (NanoDrop Products, Wilmington, DE). Species identification was confirmed by sequencing of a portion of the translation elongation factor-1 alpha (*EF-1 $\alpha$* ) gene using primers EF1 and EF2 (O'Donnell et al., 1998). Fungal cultures were stored in 20% (v/v) glycerol at  $-80^{\circ}\text{C}$  until use.

## 2.3. Design of duplex qPCR assay

Partial sequences of the *EF-1 $\alpha$*  gene from *F. solani* isolates obtained during this study (Table 1), (Acc. No. KF275032-KF275034, KY486652-KY486705, and KX215048-KX215056) were aligned with *EF-1 $\alpha$*  partial sequences from *Fusarium* species reported on GeneBank using MEGA 7.0 software (Kumar et al., 2016). Nucleotide sequences that showed specific consensus for FSSC Clade 3 (but not for the rest of *Fusarium* spp.) were selected and used with Primer Express software v2.0 (Applied Biosystems) to design forward/reverse primers and a TaqMan probe (Table 2). The 5' end of the *F. solani* TaqMan probe was labeled with 6-FAM (fluorescein) and the 3' end harbored a Non-Fluorescent Quencher (NFQ) and a Minor Groove Binder (MGB) molecule (Life Technology) to increase specificity. To discard false negative amplifications, an internal positive control (IPC) was designed consisting of 1 pg of lambda ( $\lambda$ ) bacteriophage DNA added to each sample and amplified in duplex qPCR reactions. Primer Express software (v 2.0) was used to design primers  $\lambda$ -F and  $\lambda$ -R, and a TaqMan probe labeled with Cy5 fluorophore at the 5' end and a BlackBerry Quencher (BBQ) quencher in the 3' end (Table 2).

**Table 2.** Primers and TaqMan probes designed for the specific duplex qPCR-based detection of *Fusarium solani* with positive internal control.

Target	Oligo Name	Oligo Type	Sequence (5'→3')	Tm	Amplicon size	Target gene
<i>Fusarium solani</i>	Fs-F	Forward primer	GCTTATCTCGGGTCGTGGAA	59°C	93 bp	<i>EF-1<math>\alpha</math></i>
	Fs-R	Reverse primer	CAAGTGACCGGTCTGTAGATGAT	57°C		
	Fs-P	TaqMan probe	FAM-TCATCAGTCACTTCATGCTGA-MGB	70°C		
Lambda phage	$\lambda$ -F	Forward primer	GGTGGAAACCGCATTCTGTAC	58°C	69 bp	Lambda genome
	$\lambda$ -R	Reverse primer	CCGTCGAGAATACTGGCAATTT	59°C		
	$\lambda$ -P	TaqMan probe	Cy5-TCGTGCTGTCGCGGATCGCAGGT-BBQ	73°C		

Tm: Oligo melting temperature.

#### 2.4. Specificity and sensitivity of the duplex TaqMan PCR assay

qPCR reactions were performed in 96-well plates in a Chromo 4™ thermocycler (Bio-Rad). Reaction cocktails contained 5  $\mu$ L of DNA template (extracted from plant material or from artificially or naturally infested soils, see below), 1x SensiMix (SensiMix™ Probe No-Rox Kit, Biorline), 1  $\mu$ M forward and reverse primers for *F. solani* (Fs-F and Fs-R), 100 nM forward and reverse primers for IPC ( $\lambda$ -F and  $\lambda$ -R), 250 nM TaqMan probe for *F. solani* (FAM-Fs-P), 100 nM TaqMan probe for IPC (Cy5- $\lambda$ -P), 1 pg  $\lambda$  genomic DNA and 1 mg/ml BSA. Amplifications were carried out at 95 °C for 10 min, then 50 cycles of 10 s at 95 °C, followed by 1 min at 60 °C. Sterile distilled water was used as a non-template control.

For species specificity, *F. solani* primers and probe were tested on 95 described isolates, most of them commonly associated to strawberry diseases. Of these, 66 were *F. solani* from strawberry, 16 were *Fusarium* spp. and 10 were fungal species that were not related to *Fusarium* spp. (Table 1).

To evaluate the sensitivity and detection limit of the assay for *F. solani* in plant material, qPCR reactions were carried out with the designed primers and probe on decreasing concentration of DNA obtained from *F. solani* TOR-1 isolate (50 ng–50 fg of total genomic DNA) diluted in DNA from a healthy plant. Three replicates per sample were amplified and values obtained for each dilution series were used to generate standard curves for quantification of *F. solani* in strawberry plants.

To evaluate the sensitivity and detection limit of the assay for *F. solani* in soils, 5 g of sterile soil was artificially inoculated with 5 ml of *F. solani* TOR-1 conidial suspension serial dilutions ( $10^7$ ,  $10^6$ ,  $10^5$ ,  $10^4$ ,  $10^3$ ,  $10^2$ , 10 and 1 conidia/ml) to obtain soils harboring  $10^7$ ,  $10^6$ ,  $10^5$ ,  $10^4$ ,  $10^3$ ,  $10^2$ , 10 and 1 conidia/g soil. These soil samples were dried at room temperature. Total soil DNA was extracted in triplicate from 250 mg of each soil dilution using the MoBio PowerSoil DNA isolation kit (MoBio Laboratories, Solana Beach, CA). Next, qPCR was performed using these DNA samples to detect and quantify levels of *F. solani*. In parallel, 250 mg from each soil suspension was resuspended in 2.5 ml of water-agar and spread in triplicate Petri dishes containing PDA. Plates were incubated for 5 days at 25 °C with a 12 h photoperiod, and CFU/g soil were estimated. The linear correlation between conidia/g soil (inoculated), CFU/g soil estimated by plate counting, and pg of *F. solani* DNA in the soil (quantified by qPCR) was calculated using the Pearson coefficient.

### 2.5. Validation of the assay in infected plants

To determine the reliability of the qPCR assay in the detection and quantification of *F. solani* in infected plants, traditional and molecular detection methods were evaluated and compared. Samples of 93 diseased plants collected from strawberry fruit production fields in 2014–2016 were each halved. The first half was used to detect the presence of *F. solani* either by plate culturing of small tissue pieces on PDA, and the second half was used to extract DNA using the Isolate II Plant DNA Kit (Bioline, London UK) following the manufacturers' instructions. DNA concentrations were determined using a ND-1000 NanoDrop spectrophotometer (NanoDrop Products, Wilmington, DE) and amplified by using the duplex qPCR protocol that we designed. Standard curves with serial dilutions of *F. solani* TOR-1 genomic DNA were included in each qPCR assay in triplicate to facilitate quantification. Cohen's kappa index for agreement between tissue culture and molecular qPCR-based detection methods was calculated as described by Landis and Koch (1977).

### 2.6. Validation of the assay in naturally infested soils

For validation in naturally infested soils, the 26 soil samples collected from strawberry fruit producing fields in 2014–2016 were used. Assays for *F. solani* isolation by plate dilution culturing were performed in triplicate, as described above. Total DNA was extracted from 250 mg of soil

using the MoBio PowerSoil DNA isolation kit (MoBio Laboratories, Solana Beach, CA) and qPCR was performed to detect and quantify *F. solani*. Cohen's kappa index for agreement between plate culturing and molecular qPCR-based detection methods was calculated as described by Landis and Koch (1977).

### 2.7. Application of the assay to determine the efficacy of biosolarization treatment

Strawberry plants were planted in an experimental field (El Cebollar, IFAPA) located in southwestern Spain (Moguer, Huelva) in October for two consecutive crop seasons (2015/16 and 2016/17). Two soil plots were considered each year: one untreated and the other biosolarized. The same plots were used in the two consecutive analyzed seasons. For the biosolarized soil, fresh chicken manure (at 2500 g/m<sup>2</sup>) was applied every second week of July and soil solarization was carried out under a low density transparent polyethylene film (0.05mm thick, LDPE) from mid-July to mid-August, annually. Plots were sprinkler-irrigated to field capacity before and after the biosolarization procedure (Medina-Mínguez et al., 2009). Four beds were planted per plot with 38 plants per bed. Composite soil samples were taken prior to planting in the biosolarized and non-biosolarized plots and comprised 4 samples per bed. Inoculum densities of *F. solani* were determined in these soils via soil plate counting and the qPCR assay, as described above. In addition, diseased plants were collected throughout both seasons and the incidence of *F. solani* infection was determined as the percentage of dead plants with respect to the total number of plants per bed. Fruit yields were determined as the accumulated grams of fruit per plant over the production season—values that were recorded per bed and correlated to the initial *F. solani* population densities.

### 2.8. Data analysis

Linear regression equations were calculated from standard curves. DNA concentration and CFU/g soil were obtained via extrapolation of the cycle threshold value using MJ Opticon Monitor software 3.1. The efficiencies of the reactions were calculated from the slope of the standard curves according to the following formula:  $E = 10^{(-1/\text{slope})} - 1$ .

Correlation between conidia/g soil (inoculated), CFU/g soil estimated by soil plate counting, and pg of *F. solani* DNA quantified by qPCR was calculated by Pearson correlation coefficient using Statistix 9.0 software.

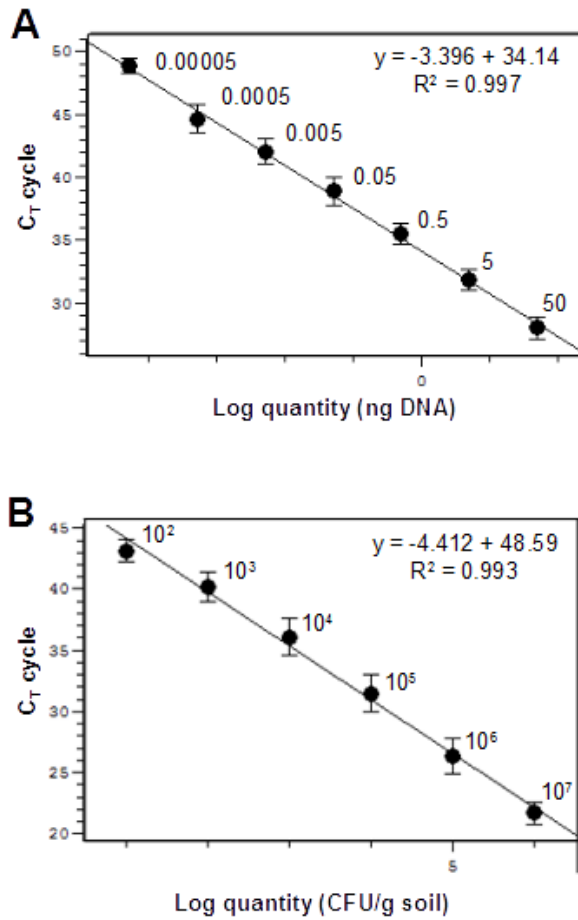
Pearson correlation analyses were conducted to determine the association between inoculum density in soil (estimated as pg DNA *F. solani*/g soil by qPCR), number of viable propagules/g soil estimated by plate counting, disease incidence and accumulated fruit production per plant, using Statistix 9.0 software.

### 3. Results

#### 3.1. Specificity and sensitivity of duplex qPCR TaqMan assay for *F. solani*

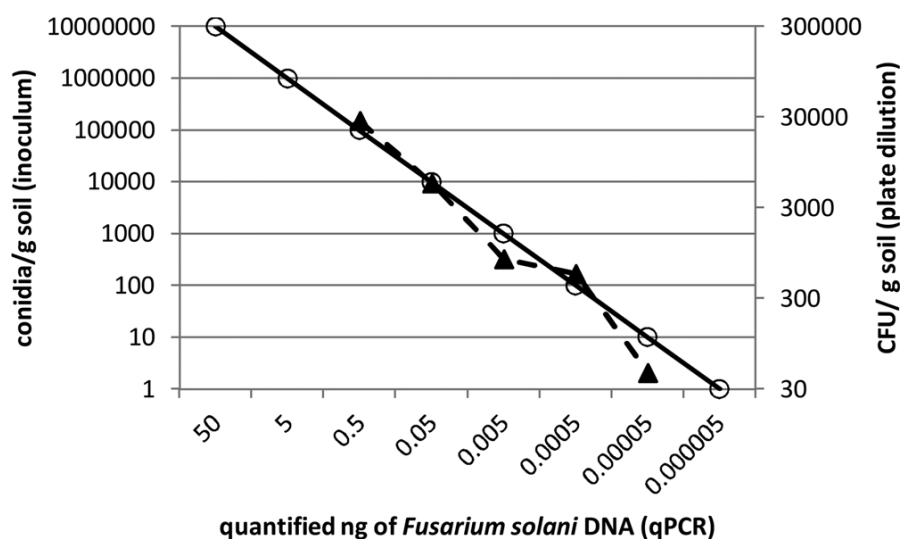
The primers and probe designed for the *EF-1 $\alpha$*  gene detected only DNA specific to *F. solani* isolated from strawberry plants and soil samples and not from any other *Fusarium* spp. or other fungal species tested (Table 1).

There was a linear relationship ( $R^2 = 0.994$ ) between DNA concentration of *F. solani* in plants (10-fold serial dilutions of genomic DNA) and quantification cycles (Ct) in the qPCR reactions using the designed primers and TaqMan probe. The detection limit was found to be 50 fg for genomic DNA (Fig. 1A). Similarly, a linear relationship was obtained from DNA derived from artificially inoculated soil with 10-fold serial dilutions of *F. solani* conidial suspensions and Ct values ( $R^2 = 0.995$ ). The detection limit was found to be  $10^2$  conidia/g of soil (Fig. 1B).



**Fig. 1.** Standard curves (triplicates  $\pm$  standard deviation) for quantification of *Fusarium solani* by quantitative real-time PCR showing limit of detection of 10-fold dilutions of genomic DNA from *F. solani* TOR-1 isolate in DNA from a healthy plant (A) and colony forming units (CFU) per gram of soil artificially inoculated with serial dilutions of TOR-1 conidial suspensions (B).

A robust and highly significant correlation (Pearson coefficient 0.9888;  $P = 0.0002$ ) was present between the amount of genomic DNA of *F. solani* detected in artificially inoculated soils by qPCR, and the inoculum density (CFU/g soil) estimated by soil plate culturing (Fig. 2).



**Fig. 2.** Correlation between ng of *Fusarium solani* DNA quantified by quantitative real-time PCR (qPCR), and colony forming units (CFU) per gram of soil (▲) estimated by dilution plating of soils artificially inoculated with serial dilutions of conidial suspensions (○).

### 3.2. Validation of the assay in plants and soil samples from strawberry fruiting fields

Of the 93 plants analyzed, 25 were detected to be infected by *F. solani* using qPCR and tissue culturing methods, while 55 of the plants were found to be negative for *F. solani* via both methods. In 12 plants, *F. solani* was detected by qPCR but not by tissue culturing, while only one plant was detected by tissue culturing and not by qPCR (Fig. 3). A substantial agreement (Cohen's kappa index =  $0.69 \pm 0.10$ ) and 86.02% coincidental results were observed between the two detection methods. The amount of *F. solani* DNA estimated in roots and crowns of symptomatic strawberry plants by the designed qPCR method ranged from 16 to 190 pg DNA/mg fresh tissue.

Of 26 field soil samples collected, *F. solani* was detected in 15 of them by qPCR and plate culture methods and five samples were negative for *F. solani* by both methods. Four soil samples were detected as positive for *F. solani* by qPCR but not by soil plate culturing, while two samples were detected by plate culturing but not by qPCR. A moderate agreement (Cohen's kappa index =  $0.46 \pm 0.19$ ) and 76.92% coincidental results were observed between dilution plating and qPCR detection methods. The detectable number of conidia/g soil by qPCR ranged from  $3.1 \times 10^2$  to  $1.3 \times 10^5$ .

		Detection by molecular method		
		+	-	
Detection by traditional method	+	a	c	
	-	b	d	
		a + b	c + d	e

		qPCR (plant material)		
		+	-	
Tissue culturing	+	25	1	26
	-	12	55	67
		37	56	93

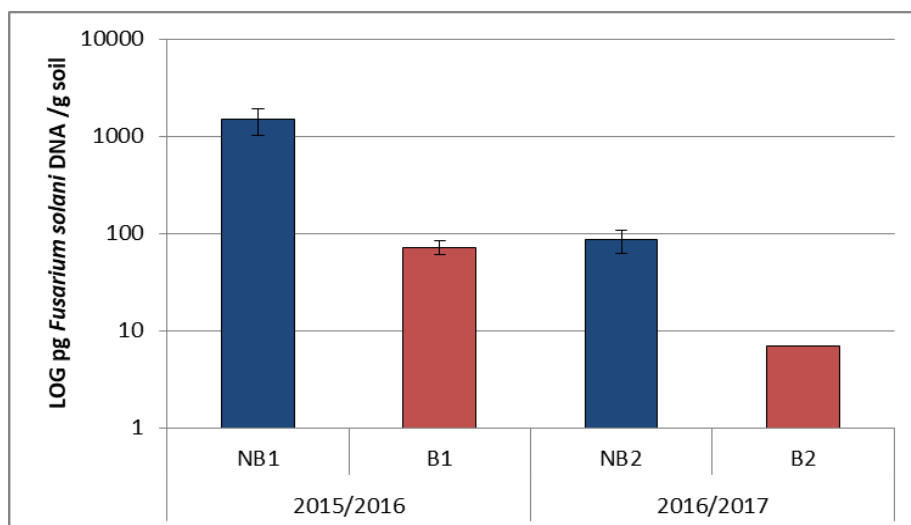
		qPCR (soil)		
		+	-	
Dilution plating	+	15	2	17
	-	4	5	9
		19	7	26

**Fig. 3.** Comparison of the Taqman duplex qPCR assay with plant tissue culturing and soil dilution plating methods for the detection of *Fusarium solani* in strawberry plant material and soil samples. A) number (no.) of samples detected as positive by both methods; B) No. of samples detected positive only by qPCR; C) No. of samples detected positive only by culture methods; D) No. of samples detected negative by both methods; E) total number of analyzed samples.

### 3.3. Application of the qPCR assay to assess the efficacy of biosolarization to treat *F. solani* infection

In the 2015/16 season, the quantified inoculum density of *F. solani* ranged from 506 to 2591 pg DNA/g in non-biosolarized soils, and from 39 to 91 pg DNA/g in biosolarized soils. In the next season, 47–128 pg *F. solani* DNA/g was detected in non-biosolarized soils, and 7–8 pg DNA/g in biosolarized soils (Fig. 4).





**Fig. 4.** Inoculum density of *Fusarium solani* in biosolarized (B) and non-biosolarized (NB) pre-planting soils measured as pg DNA/g soil by qPCR. Data are the means  $\pm$  standard error of four beds per treatment, with each bed sampled in triplicate.

In biosolarized and non-biosolarized soils, *F. solani* inoculum density measured in pg DNA/g soil by qPCR was positively correlated ( $r = 0.6979$ ,  $P = 0.0026$ ) with the number of CFU/g soil measured by plate counting method. Inoculum densities of *F. solani*, whether measured as pg DNA/soil or CFU/g soil, were negatively correlated with fruit yield ( $r = -0.7438$ ,  $P = 0.0010$ ;  $r = -0.6096$ ,  $P = 0.0122$ , respectively) but not correlated with disease incidence (Table 3).

**Table 3.** Correlation coefficients between the inoculum density of *F. solani* in untreated and biosolarized pre-planting soils measured as pg DNA/g soil by qPCR, the number of colony-forming units/g soil measured by plate counting, the disease incidence and the fruit production yield per plant.

	Inoculum density (CFU/g soil)		Incidence (% dead plants)		Yield (g/plant)	
	Pearson coefficient	<i>P</i> value	Pearson coefficient	<i>P</i> value	Pearson coefficient	<i>P</i> value
pg DNA/g soil	0.6979	0.0026	0.041	0.8803	-0.7438	0.0010
CFU/g soil			0.304	0.2524	-0.6096	0.0122

#### 4. Discussion

A new real-time quantitative (qPCR) assay was developed for the detection and quantification of *Fusarium solani* in strawberry plants and soils. *F. solani* was quantified based on the detection of the elongationfactor-1 $\alpha$  (*EF-1 $\alpha$* ) gene. The assay detected only DNA sequences specific to *F. solani*. The qPCR assay was able to accurately quantify inoculum density in soil and diseased strawberry plants. It was able to detect as low as 50 fg of *F. solani* genomic DNA and 100 conidia/g soil. The use of a positive internal control (based on DNA sequences from the  $\lambda$  bacteriophage) duplexed in the qPCR assay, prevents the detection of false negatives, (i.e. samples not amplified due to the presence of PCR inhibitors in plant extracts or soil), further enhancing the reliability of the assay. Previous protocols for qPCR-based detection of *F. solani* have been published that utilized sequences from the nuclear ribosomal RNA genes (Li et al., 2008; Muraosa et al., 2014), but the *EF-1 $\alpha$*  marker has been demonstrated as more specific for species discrimination (O'Donnell et al., 2010). Other protocols based on *EF-1 $\alpha$*  sequences used SYBR Green I chemistry (Filion et al., 2003), although most of these assays did not utilize internal controls and were not multiplexed.

A significant correlation ( $P = 0.0002$ ) was obtained between the amount of genomic DNA of *F. solani* detected by qPCR and the number of fungal propagules present in artificially inoculated soils, demonstrating the potential of the assay to accurately quantify the inoculum density of *F. solani* occurring in soil. Applicability of the duplex qPCR protocol was also evaluated on diseased plants and on naturally infested soil samples from strawberry production fields. In infected plants, a high percentage of coincidental results were obtained between qPCR and traditional isolation methods. Among the discrepancies, 12.9% (12 from 93) of the samples tested positive by qPCR but not by plant tissue culturing, confirming the higher sensitivity of the qPCR detection method and/or better homogenization of the sample for DNA extraction versus the tissue culturing method. Conversely, only one plant (1.1%) was detected to be infected by *F. solani* by tissue culturing but not by qPCR, probably due to the irregular distribution of the fungus in the plant, and the use of only one half of the plant for DNA extraction and amplification. The use of the designed duplex qPCR method is thus recommended for an accurate *F. solani* diagnosis of plant material to avoid accidental introduction of the pathogen in strawberry production fields via infected nursery plants. The use of qPCR for quantification of *F. solani* in plants could also be applied to the study of the susceptibility of strawberry varieties to *F. solani* infection or to assess the efficacy of chemical or biological control agents, as reported for other strawberry pathogens (Pastrana et al., 2016). Recent

and numerous works have also used qPCR methods to detect DNA of fungal pathogens as disease diagnostic tools (Bressan et al., 2016; Haudenshield et al., 2017) and to screen for infections in symptomless plants to prevent the spread of disease (Migliorini et al., 2015).

In the same way, the designed qPCR method was able to detect *F. solani* in naturally infected soils. Samples detected as positive by qPCR but not by plate culturing (15.38%) confirm the higher sensitivity of the molecular technique. On the contrary, samples that failed to be detected by qPCR but were detected by soil plate may have arisen due to the soil sampling method and could be improved by either increasing the size of the sample and/or the number of replicates analyzed per sample, as proposed by others (Bilodeau et al., 2012; Jiménez-Fernández et al., 2010). So, qPCR molecular methods would be desirable for the most accurate detection of *F. solani* in naturally infested soils. This qPCR diagnostic method represents a valuable tool for disease risk assessment. In fact, similar qPCR-based methods have also been developed to accurately detect and quantify of fungal pathogens in soil samples (Bilodeau et al., 2012; Huang et al., 2016; Mbofung et al., 2011), and conduct risk assessment for fungal diseases (Almquist et al., 2016; Wang et al., 2013; Wei et al., 2015).

Our findings have, in addition, shown to be useful for assessing the efficacy of fumigation methods, such as biosolarization. The assay could also aid in the selection of soils for strawberry cultivation, as there was a positive correlation between pg *F. solani* DNA/g soil measured by qPCR and the number of propagules in soils. There was a negative correlation between inoculum density of *F. solani* in the soil (pg DNA/g soil or CFU/g soil) and production yield, although no significant correlation was detected between initial fungal inoculum and incidence of the disease. This can be explained by the nature of *F. solani* infection symptoms in strawberry—one of the most pronounced being plant stunting and loss of plant vigor and, consequently, a decrease in fruit yield, without plant death. Previous studies have also used qPCR-based methods to assess the effect of biosolarization on the soil microbial community in strawberry cultivation and its influence in fruit yield (Ozyilmaz et al., 2016), and for predicting disease risk based on quantification of pathogens in the soil (Westphal et al., 2014), although this study is the first to focus on *F. solani*.

Our results support the idea that qPCR-based molecular approaches represent a useful tool for *Fusarium solani* disease management in strawberry production. Use of the assay that we developed could allow the preventive detection of *F. solani* in strawberry propagative plant material from nurseries prior to transplantation into fruit production fields. In addition, the assay could be

used to determine of inoculum density present in nursery and fruit production soils prior to planting in order to assess disease risk potential.

### Literature cited

- Almquist, C., Persson, L., Olsson, A., Sundstrom, J., Jonsson, A. (2016). Disease risk assessment of sugar beet root rot using quantitative real-time PCR analysis of *Aphanomyces cochlioides* in naturally infested soil samples. *Eur. J. Plant Pathol.* 145: 731-742.
- Arroyo, F.T., Llergo, Y., Aguado, A., Romero, F. (2009). First report of Fusarium wilt caused by *Fusarium oxysporum* on strawberry in Spain. *Plant Dis.* 93: 323-323.
- Bernal-Martínez, L., Buitrago, M., Castelli, M., Rodríguez-Tudela, J., Cuenca-Estrella, M. (2012). Detection of invasive infection caused by *Fusarium solani* and non-*Fusarium solani* species using a duplex quantitative PCR-based assay in a murine model of fusariosis. *Med. Mycol.* 50: 270-275.
- Bilodeau, G., Koike, S., Uribe, P., Martin, F. (2012). Development of an assay for rapid detection and quantification of *Verticillium dahliae* in soil. *Phytopathology* 102: 331-343.
- Booth, C. (1971). *The Genus Fusarium*. Commonwealth Mycological Institute, Kew Surrey, England.
- Borrero, C., Bascón, J., Gallardo, M.A., Orta, M.S., Avilés, M. (2017). New foci of strawberry Fusarium wilt in Huelva (Spain) and susceptibility of the most commonly used cultivars. *Sci. Hortic.* 226: 85-90.
- Bressan, M., Blum, A., Castel, L., Trinsoutrot-Gattin, I., Laval, K., Gangneux, C. (2016). Assessment of *Verticillium flax* inoculum in agroecosystem soils using real-time PCR assay. *Appl. Soil Ecol.* 108: 176-186.
- Chamorro, M., Domínguez, P., Medina-Mínguez, J.J., Miranda, L., Soria, C., Romero, F., López-Aranda, J.M., Daugovish, O., Mertely, J., De los Santos, B. (2015). Assessment of chemical and biosolarization treatments for the control of *Macrophomina phaseolina* in strawberries. *Sci. Hortic.* 192: 361-368.
- De los Santos, B., Miranda, L., Medina-Mínguez, J.J., Chamorro, M., Aguado, A., Aparicio, L., Gómez-Mora, J.A., Romero, F., López-Aranda, J.M. (2017). Efecto de la biosolarización sobre hongos patógenos de suelo en el cultivo de la fresa. In: A. De Cal, P. Melgarejo, (Eds.), *Control biológico de enfermedades vegetales*. Phytoma España: 149-156.
- Filion, M., St-Arnaud, M., Jabaji-Hare, S. (2003). Quantification of *Fusarium solani* f. sp. *phaseoli* in mycorrhizal bean plants and surrounding mycorrhizosphere soil using real-time polymerase chain reaction and direct isolations on selective media. *Phytopathology* 93: 229-235.

- Gao, X., Jackson, T., Lambert, K., Li, S., Hartman, G., Niblack, T. (2004). Detection and quantification of *Fusarium solani* f. sp *glycines* in soybean roots with real-time quantitative polymerase chain reaction. *Plant Dis.* 88: 1372-1380.
- Haudenschild, J., Song, J., Hartman, G. (2017). A novel, multiplexed, probe-based quantitative PCR assay for the soybean root-and stem-rot pathogen, phytophthora sojae, utilizes its transposable element. *PLoS One*: 12.
- Huang, C.-H., Tsai, R.-T., Vallad, G.E. (2016). Development of a TaqMan real-time polymerase chain reaction assay for detection and quantification of *Fusarium oxysporum* f. sp *lycopersici* in soil. *J. Phytopathol.* 164: 455-463.
- Jiménez-Fernández, D., Montes-Borrego, M., Navas-Cortés, J.A., Jiménez-Díaz, R., Landa, B. (2010). Identification and quantification of *Fusarium oxysporum* in planta and soil by means of an improved specific and quantitative PCR assay. *Appl. Soil Ecol.* 46: 372-382.
- Kolattukudy, P.E., Gamble, D.L. (1995). *Nectria haematococca* Pathogenesis and host specificity in plant diseases. In: K. Kohmoto, U.S. Singh, R.P. Singh, (Eds.), *Pathogenesis and Host Specificity in Plant Pathogenic Fungi and nematodes*. Eukaryotes. Pergamon, UK. Vol. II: 83-102.
- Kumar, S., Stecher, G., Tamura, K. (2016). MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Mol. Biol. Evol.* 33: 1870-1874.
- Landis, J.R., Koch, G.G. (1977). Measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics* 33: 159-174.
- Leslie, J.F., Summerell, B.A. (2006). *The Fusarium Laboratory Manual*. Blackwell Publishing, Iowa, USA.
- Li, S., Hartman, G.L., Domier, L.L., Boykin, D. (2008). Quantification of *Fusarium solani* f. sp *glycines* isolates in soybean roots by colony-forming unit assays and real-time quantitative PCR. *Theor. Appl. Genet.* 117: 343-352.
- Mbofung, G.C.Y., Fessehaie, A., Bhattacharyya, M.K., Leandro, L.F.S. (2011). A New TaqMan real-time polymerase chain reaction assay for quantification of *Fusarium virguliforme* in soil. *Plant Dis.* 95: 1420-1426.
- Medina-Mínguez, J.J., Miranda, L., Soria, C., Palencia, P., López-Aranda, J.M. (2009). Non-Chemical Alternatives to Methyl Bromide for Strawberry: Biosolarization as Case-Study in Huelva (Spain).
- Mehmood, N., Riaz, A., Jabeen, N., Anwaar, S., Hussain, S., Abbas, M., Zhang, X., Rosli, H., Gleason, M. (2017). First report of *Fusarium solani* causing fruit rot of strawberry in Pakistan. *Plant Dis.* 101: 1681-1681.
- Migliorini, D., Ghelardini, L., Tondini, E., Luchi, N., Santini, A. (2015). The potential of symptomless potted plants for carrying invasive soilborne plant pathogens. *Divers. Distrib.* 21: 1218-1229.

- Molinero-Ruiz, L., Rubio-Pérez, E., González-Domínguez, E., Basallote-Ureba, M. (2011). Alternative hosts for *Fusarium* spp. causing crown and root rot of asparagus in Spain. *J. Phytopathol.* 159: 114-116.
- Muraosa, Y., Schreiber, A., Trabasso, P., Matsuzawa, T., Taguchi, H., Moretti, M., Mikami, Y., Kamei, K. (2014). Development of cycling probe-based real-time PCR system to detect *Fusarium* species and *Fusarium solani* species complex (FSSC). *Int. J. Med. Microbiol.* 304: 505-511.
- O'Donnell, K., Kistler, H.C., Cigelnik, E., Ploetz, R.C. (1998). Multiple evolutionary origins of the fungus causing Panama disease of banana: concordant evidence from nuclear and mitochondrial gene genealogies. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95: 2044-2049.
- O'Donnell, K., Sutton, D., Rinaldi, M., Sarver, B., Balajee, S., Schroers, H., Summerbell, R., Robert, V., Crous, P., Zhang, N., Aoki, T., Jung, K., Park, J., Lee, Y., Kang, S., Park, B., Geiser, D. (2010). Internet-Accessible DNA sequence database for identifying *Fusaria* from human and animal infections. *J. Clin. Microbiol.* 48: 3708-3718.
- Ozyilmaz, U., Benlioglu, K., Yildiz, A., Benlioglu, H.S. (2016). Effects of soil amendments combined with solarization on the soil microbial community in strawberry cultivation using quantitative real-time PCR. *Phytoparasitica* 44: 661-680.
- Pastrana, A., Ureba, M.J., Aguado, A., Capote, N. (2017)a. Potential inoculum sources and incidence of strawberry soilborne pathogens in Spain. *Plant Dis.* 101: 751-760.
- Pastrana, A., Capote, N., De los Santos, B., Romero, F., Ureba, M.J. (2014). First report of *Fusarium solani* causing crown and root rot on strawberry crops in Southwestern Spain. *Plant Dis.* 98: 161-161.
- Pastrana, A., Ureba, M.J., Aguado, A., Akdi, K., Capote, N. (2016). Biological control of strawberry soil-borne pathogens *Macrophomina phaseolina* and *Fusarium solani*, using *Trichoderma asperellum* and *Bacillus* spp. *Phytopathol. Mediterr.* 55: 109-120.
- Pastrana, A.M., Basallote-Ureba, M.J., Capote, N. (2017)b. Symptomless reservoirs of *Fusarium oxysporum* f. sp. *fragariae* and alternative hosts of *Fusarium solani* pathogenic to strawberry. *J. Plant Pathol.* 99: 141-148.
- Redondo, C., Villarino, M., Larena, I., Melgarejo, P., De Cal, A. (2012). Enfermedades emergentes en los viveros de altura de fresa tras la retirada del bromuro de metilo en 2009. XVI Congreso Nacional de la Sociedad Española de Fitopatología, Málaga, Spain. Page 321.
- Schippers, B., van Eck, W.H. (1981). Formation and survival of chlamydospores in *Fusarium*. In: P.E. Nelson, T.A. Tousson, R.J. Cook, (Eds.), *Fusarium: Disease, Biology, and Taxonomy*. Penn State University Press Pennsylvania: 250-260.
- Wang, Y.L., Wang, Y., Tian, C.M. (2013). Quantitative detection of pathogen DNA of *Verticillium* wilt on smoke tree *Cotinus coggygia*. *Plant Dis.* 97: 1645-1651.

- Wei, F., Fan, R., Dong, H.T., Shang, W.J., Xu, X.M., Zhu, H. Q., Yang, J.R., Hu, X.P. (2015). Threshold microsclerotial inoculum for cotton *Verticillium* wilt determined through wet-sieving and real-time quantitative PCR. *Phytopathology* 105: 220-229.
- Westphal, A., Li, C.G., Xing, L.J., McKay, A., Malvick, D. (2014). Contributions of *Fusarium virguliforme* and *Heterodera glycines* to the disease complex of Sudden death syndrome of soybean. *PLoS One* 9.





## **Capítulo III**

**Potenciales fuentes de inóculo de especies de *Fusarium* involucradas en el síndrome del decaimiento del espárrago y evaluación de métodos de desinfestación de suelo mediante protocolos de qPCR**



## Research Article



Received: 10 March 2021

Revised: 17 May 2021

Accepted article published: 19 June 2021

Published online in Wiley Online Library:

(wileyonlinelibrary.com) DOI 10.1002/ps.6519

# Potential inoculum sources of *Fusarium species* involved in asparagus decline syndrome and evaluation of soil disinfestation methods by qPCR protocols

Eduardo de la Lastra,<sup>a</sup> José I Marín-Guirao,<sup>b</sup> Francisco J López-Moreno,<sup>c</sup> Teresa Soriano,<sup>c</sup> Miguel de Cara-García<sup>b\*</sup>  and Nieves Capote<sup>a\*</sup> 



## Abstract

**BACKGROUND:** Asparagus decline syndrome (ADS), one of the most important diseases affecting asparagus crops, causes important yield losses worldwide. *Fusarium proliferatum*, *F. oxysporum* and *F. redolens* are among the main species associated with ADS. To explore their potential inoculum sources and the effectiveness of soil disinfestation practices for ADS management, molecular methods based on a quantitative real-time polymerase chain reaction (qPCR) were developed. qPCR-based molecular tools demonstrated advantages in the sensitive and specific detection and quantification of fungal pathogens in comparison with less-accurate and time-consuming traditional culture methods.

**RESULTS:** *F. proliferatum*, *F. oxysporum* and *F. redolens* could be specifically detected and accurately quantified in asparagus plants, soil and irrigation water collected from asparagus fields with ADS symptoms by means of the designed TaqMan qPCR protocols. Furthermore, these molecular tools were successfully applied for evaluation of the efficacy of diverse soil disinfestation treatments. Chemical fumigation with dazomet and biosolarization with pellets of *Brassica carinata* contributed to a significant reduction in the inoculum densities of the three *Fusarium* species in treated soils, which was correlated with production increases.

**CONCLUSIONS:** The capability to accurately detect and quantify the main *Fusarium* species involved in ADS in plants, soil and water samples by means of qPCR will allow identification of high-risk fields that can be avoided or managed to reduce yield losses. Quantification of pathogen densities in the soil may also provide essential insights into the effectiveness of soil disinfestation methods for ADS management.

© 2021 Society of Chemical Industry.

Supporting information may be found in the online version of this article.

**Keywords:** ADS; *Fusarium proliferatum*; *F. oxysporum*; *F. redolens*; soil; irrigation water; biosolarization; fumigants; TaqMan real-time PCR

\* Correspondence to: M Cara-García, Institute for Research and Training in Agriculture and Fisheries, IFAPA La Mojonera, Camino San Nicolás, 1. La Mojonera, 04745 Almería, Spain, E-mail: franciscom.cara@juntadeandalucia.es; N Capote, Institute for Research and Training in Agriculture and Fisheries, IFAPA Las Torres, Ctra. Sevilla-Cazalla, Km. 12,2, Alcalá del Río, 41200 Seville, Spain. E-mail: marian.capote@juntadeandalucia.es

<sup>a</sup> Institute for Research and Training in Agriculture and Fisheries, IFAPA Las Torres, Seville, Spain

<sup>b</sup> Institute for Research and Training in Agriculture and Fisheries, IFAPA La Mojonera, Almería, Spain

<sup>c</sup> Institute for Research and Training in Agriculture and Fisheries, IFAPA Camino del Purchil, Granada, Spain

## 1. Introduction

Asparagus (*Asparagus officinalis* L.) is a high-value crop worldwide, considered as a food with great antioxidant and healthy properties (Rodríguez et al., 2005). Spain has a cultivated area of 13,703 ha and a production of 58,610 t (FAOSTAT, 2019), ranking fifth in the world and second in Europe. Andalusia (mainly Granada province), at the South of Spain, encompasses 65% of the national surface dedicated to the cultivation of asparagus (8,700 ha) (MAPA, 2019).

Asparagus decline is one of the most important syndromes of this crop in most producing areas worldwide (Elmer, 2001). Symptoms associated with the disease consist of a progressive and premature reduction in production (decrease in the number and size of the spears), chlorosis and dead of plants, and replanting problems. Consequently, field crops able to maintain profitable yields for 10 to 15 years, must be prematurely uprooted, and new asparagus plantation cannot be established in these soils (Grogan and Kimble, 1959).

Several factors have been suggested to be involved in the decline and replanting disease of asparagus or asparagus decline syndrome (ADS), including the accumulation of allelopathic compounds in the soil as well as their interaction with soil microbiota and microfauna (Lake et al., 1993; Noperi-Mosqueda, 2020), the soil fatigue due to nutrient depletion, the use of more productive although less tolerant varieties, inadequate irrigation management, and climatic and edaphic conditions (Schofield, 1991). None of them, however, have been confirmed as the cause of ADS. In addition, some authors have associated the decline symptoms with the presence of pathogenic fungi of the genus *Fusarium*, as causal agents of *Fusarium* crown and root rot (FCRR) (Elenas and Kranias, 1996; Baayen et al., 2000; Elmer, 2001; Corpas-Hervías et al., 2006). The species of *Fusarium* involved in FCRR vary in their composition and pathogenicity among different crop areas (Schreuder et al., 1995; Elmer, 1996; Blok and Bollen, 1997; Wong and Jeffries, 2006). In southern Spain, *F. oxysporum* f. sp. *asparagi*, *F. proliferatum*, and *F. redolens* are the most abundant species of *Fusarium* detected in asparagus plants from field affected by ADS, and approximately 90% of them are pathogenic to asparagus. *F. proliferatum* is the most aggressive species, but all three species are able to cause reduction in root development, root rot, chlorosis of fronds, plant wilt, and finally plant death (Brizuela et al., 2020; De la Lastra et al., 2020).

The origin of the inoculum in the fields is not clear. The perennial nature of the crop only permits soil disinfestation at the beginning of the crop, so it is not reapplied during the 12 to 15 years that the productive crop lasts. When the crop is uprooted, these *Fusarium* species can persist

in the plant debris or in the soil during long time as resistance structures (Leslie and Summerell, 2006). New plantations in soils previously cultivated with asparagus usually suffer replanting problems, probably due to the presence of these *Fusarium* species in the soil (Blok and Bollen, 1996). On the other hand, nursery plants have been demonstrated to be another source of inoculum since they have been proved to be carriers of pathogenic *Fusarium* species (Blok and Bollen, 1996; Corpas-Hervías et al., 2006). Irrigation water has also been postulated as an external inoculum source for replanting diseases in other crops such as apple (Moein et al., 2019).

Currently, there is scarcity of efficient management strategies for controlling fungal asparagus diseases. Commercial cultivars resistant to FCRR are currently unavailable due to the high genetic diversity within *Fusarium* spp. and the narrow genetic basis of cultivable asparagus (Kathe et al., 2019). Additionally, the widely used cultivar ‘Grande F1’ is highly susceptible to pathogenic *Fusarium* species (Corpas-Hervías et al., 2006; Brizuela et al., 2020). Alternative and more sustainable strategies are emerging to control asparagus diseases. Soil amendments with cruciferous residues, animal manures, and composts derived from agro-industrial wastes, combined with soil solarization have provided promising results in the reduction of the inoculum density of *Fusarium* species pathogenic to asparagus (Borrego-Benjumea et al., 2010; 2014).

An early and accurate detection of *Fusarium* species in plant material and pre-planting soil should be advisable as a preventive control strategy against ADS disease. Furthermore, irrigation water should be explored as a potential source of *Fusarium* inoculum in asparagus fields. The methods to detect and identify fungal species affecting asparagus crop are currently based on plate culturing of plant tissues and soil fractions, followed by morphological characterization. These traditional methods are laborious, time-consuming and require the expertise of taxonomists for an accurate identification. In contrast, molecular methods based in quantitative real-time polymerase chain reaction (qPCR) enable the rapid and accurate identification and quantification of target samples. Due to its feasibility and high throughput, qPCR enables rapid analysis of many samples. In addition, an internal positive control (IPC) can be included in the reaction, detected in multiplex, to discard false negatives, especially in soil samples with high content of PCR inhibitors.

Therefore, the objectives of this work were (1) to explore irrigation water as a potential source of inoculum of the main *Fusarium* species associated to ADS in Spain (*F. proliferatum*, *F. oxysporum*, and *F. redolens*) as a preventive control strategy, and (2) to assess the effectiveness of soil disinfestation treatments in reducing the inoculum level of the three pathogenic *Fusarium*

species, and their reflection on production yields. To do this, molecular tools based on qPCR protocols using TaqMan probes were developed and validated for the specific detection and quantification of *F. proliferatum*, *F. oxysporum*, and *F. redolens* in plant, soil and irrigation water samples, including the detection of a multiplexed IPC to enhance reliability.

## 2. Material and methods

### 2.1. Design of specific qPCR assays

Design of qPCR protocols were made for each of the three main *Fusarium* species pathogenic to asparagus detected in Spain: *F. proliferatum*, *F. oxysporum* and *F. redolens* (Brizuela et al., 2020). For the design of specific primers and probes, multicopy spacer DNA regions of ribosomal DNA were used: the IGS region (*F. proliferatum* and *F. redolens*) and the ITS region (*F. oxysporum*). Partial sequences of the respective IGS and ITS regions from *Fusarium* species obtained from Spanish asparagus fields (Brizuela et al., 2020) and from relative *Fusarium* species retrieved from GeneBank were aligned using MEGA 7.0 software (Kumar et al., 2016). Nucleotide sequences that showed specific consensus for each *Fusarium* species (but not for the rest of *Fusarium* spp.) were selected and used to design forward/reverse primers and TaqMan probes using Integrated DNA Technologies, Inc. software (Coralville, Iowa, USA) under its default settings (Supplementary Fig S1). A BLASTn query against the NCBI GenBank database was used to ensure the specificity of the primers and probes *in silico*. TaqMan probes were labeled with 6-carboxy-fluorescein (6-FAM) reporter dye at the 5' end, harbored an internal ZEN quencher, and an Iowa Black FQ quencher (IBFQ) at the 3' end. To discard false negative amplifications, an IPC was used consisting of lambda ( $\lambda$ ) bacteriophage DNA (1 pg) added to each sample and amplified in duplex qPCR reactions using specific primers ( $\lambda$ -F and  $\lambda$ -R) and a HEX-TaqMan probe, as previously described (De la Lastra et al., 2018).

qPCR reactions for each *Fusarium* species were performed in 96-well plates using a CFX Connect thermocycler (Bio-Rad) in a 20  $\mu$ l reaction volume. Reaction cocktails contained DNA template (5  $\mu$ L), iTaq universal probes Supermix (1x) (Bio-Rad), forward and reverse primers (600 nM) for *F. proliferatum*, *F. oxysporum*, and *F. redolens*, respectively, forward and reverse primers (100nM) for IPC ( $\lambda$ -F and  $\lambda$ -R), TaqMan probes (150 nM) for *Fusarium* species, TaqMan probe (100 nM) for IPC (Cy5- $\lambda$ -P) (Table 1),  $\lambda$  genomic DNA (1 pg) and BSA (1mg/mL). Amplifications

were carried out at 95 °C for 10 min, then 40 cycles of 10 s at 95 °C, followed by 1 min at 60 °C. In each run, sterile distilled water was used as a negative control. The data were analyzed using the CFX Connect software (Biorad).

**Table 1.** Primers and TaqMan probes designed for the specific qPCR-based detection of *Fusarium proliferatum*, *F. oxysporum*, *F. redolens*, and an internal positive control (IPC).

Target	Oligo Name	Oligo Type	Sequence (5'→3')	Modifications <sup>†</sup>	Amplicon size	Target
<i>Fusarium proliferatum</i>	FP-F3	Forward primer	TGCAGGGTAGGTAACCTC		107 bp	IGS
	FP-R3	Reverse primer	CAATCGATTTCTGGTAGA			
	FAM-IGS-FP2	TaqMan probe	AAAGAACTTGCCTACCCTGTACCT	5'FAM/ZEN/3'IBFQ		
<i>Fusarium oxysporum</i>	FOX-F1	Forward primer	CATTTCAACCCTCAAGCA		115 bp	ITS
	FOX-R1	Reverse primer	CCAGTAACGAGGGTTTTAC			
	FAM-ITS-FOX	TaqMan probe	TTGGGACTCGCGTTAATTCGCGTT	5'FAM/ZEN/3'IBFQ		
<i>Fusarium redolens</i>	FR-Fb	Forward primer	CTCTGACCTTGCGGTCTA		117 bp	IGS
	FR-Rb	Reverse primer	TACCTACTTCMAGCTCTGAG			
	FAM-IGS-FRb	TaqMan probe	TTGTCTGCCAGGCCGTGAGTAT	5'FAM/ZEN/3'IBFQ		
Lambda phage (IPC)	λ-F	Forward primer	GGTGGAAACCGCATTCTGTAC		69 bp	Lambda genome
	λ-R	Reverse primer	CCGTCGAGAATACTGGCAATTT			
	HEX-λ-P	TaqMan probe	TCGTGCTGTGCGGATCGCAGGT	5'HEX/ZEN/3'IBFQ		

<sup>†</sup> FAM: 6-Carboxyfluorescein, 5' fluorophore; ZEN: internal quencher; IBFQ: Iowa Black FQ, 3' quencher

## 2.2. Specificity and sensitivity of the duplex TaqMan PCR assays

For species specificity, each set of primers and probe were tested on a total of 68 isolates including *F. proliferatum*, *F. oxysporum*, and *F. redolens* isolates from asparagus plants, other *Fusarium* spp., and other fungal species (Supplementary Table 1).

The sensitivity of the qPCR assays for the detection of the *Fusarium* species in plant material was evaluated on decreasing concentrations of DNA obtained from *F. proliferatum* GR\_FP200 isolate, *F. oxysporum* GR\_FOA16 isolate, and *F. redolens* GR\_FR186 isolate (0.10 ng to 1 fg of total genomic DNA) diluted in a background of DNA (20 ng/μl) extracted from healthy plants. Three replicates per sample were amplified and values obtained for each dilution series were used to generate standard curves for quantification of the respective *Fusarium* species in asparagus plants.

To evaluate the sensitivity and detection limit of the qPCRs in soils, centrifuge tubes containing sterile soil (1 g) were artificially inoculated with 1 mL of serial dilutions ( $10^5$ ,  $10^4$ ,  $10^3$ ,  $10^2$  and 10 microconidia/mL) of conidial suspension of *F. proliferatum* GR\_FP200 isolate, *F.*

*oxysporum* GR\_FOA16 isolate, and *F. redolens* GR\_FR186 isolate, respectively, to obtain soils harboring  $10^5$ ,  $10^4$ ,  $10^3$ ,  $10^2$  and 10 microconidia/g soil, respectively. Total soil DNA was extracted in triplicate from 250 mg of each soil sample using the DNeasy PowerSoil Pro Kit (Qiagen), and the extracted DNA (5  $\mu$ l) were used in the qPCR to quantify the levels of *F. proliferatum*, *F. oxysporum*, and *F. redolens* in these soils. In parallel, 1 mL of some of the same serial dilutions ( $10^3$ ,  $10^2$  and 10 microconidia/mL) were spread in triplicate Petri dishes containing PDA. Plates were incubated for 5 days at 25 °C with a 12 h photoperiod, and colony forming units (cfu/g soil) were counted. The linear correlation between cfu/g soil estimated by plate counting and ng DNA/g soil (quantified using the standard curve of genomic DNA of each *Fusarium* species) was calculated using the Pearson coefficient.

### 2.3. Validation of the assay in plants and soil

To determine the reliability of the qPCR assays in the detection and quantification of *F. proliferatum*, *F. oxysporum*, and *F. redolens* in infected plants, 30 asparagus plants were artificially inoculated by root dipping in a suspension of  $10^6$  conidia/mL of each respective *Fusarium* species, and incubated in a growth chamber set at 25/18 °C (light/dark) with a 14 h photoperiod (14,000 lux). Ten non-inoculated plants were used as negative controls. Declined and dead plants were collected and used to reisolate the inoculated fungi by plate culturing and qPCR analysis. Standard curves with serial dilutions of genomic DNA from *Fusarium* species were included in each qPCR assay in triplicate to facilitate quantification.

On the other hand, 30 symptomatic asparagus plants were collected from two asparagus fields with historical decline symptoms in Granada province and processed in the same way as artificially infected plants. Identification of *Fusarium* colonies obtained on PDA was confirmed by sequencing of a portion of the *EF-1 $\alpha$*  gene using primers ef1 and ef2 (O'Donnell et al., 1998).

qPCR protocols were also validated in soil samples collected from the same asparagus fields from which plants were sampled. Twenty-four sampling points were taken (5-30 cm deep) and analyzed by the Warcup technique using Komada's semi-selective medium, following the protocol described by Tello et al. (1991). *Fusarium* species were identified by morphological characteristics (Nelson et al., 1983; Leslie and Summerell, 2006). *F. oxysporum* and *F. redolens*, which were morphologically indistinguishable, were identified by sequencing a portion of the *EF-1 $\alpha$*  gene using



primers ef1 and ef2 (O'Donnell et al., 1998).

In addition, total DNA was extracted from 250 mg of each sampled soil in triplicate using the DNeasy PowerSoil Pro Kit (Qiagen) and qPCRs were performed to detect and quantify *F. proliferatum*, *F. oxysporum*, and *F. redolens*, using their respective standard curves.

#### 2.4. Detection of *Fusarium* species in irrigation water

Watering water was collected from five asparagus fields showing ADS symptoms in Granada province and from two non-affected orchards located in Seville province, as negative controls. Three samples (1 liter each) per field were taken in July 2020, September 2020 and May 2021 for the same fields from which plants and soil samples were collected, and in May 2021 for the rest of fields. Water samples were filtered through 0.22  $\mu\text{m}$  membranes with the help of a vacuum pump. DNA was extracted from the filters using the DNeasy PowerWater Kit (Qiagen), and qPCR for the detection and quantification of *F. proliferatum*, *F. oxysporum* and *F. redolens* were performed in triplicate as explained above.

#### 2.5. Evaluation of the effectiveness of soil disinfestation treatments

Three different control strategies based on soil disinfestation were applied in a commercial asparagus field with historical decline symptoms located in Loja (Granada province): biosolarization with pellet of poultry manure (500  $\text{g}/\text{m}^2$ ) (PPM); biosolarization with pellet of *Brassica carinata* (500  $\text{g}/\text{m}^2$ ) (PB); and chemical fumigation with dazomet (600  $\text{g}/\text{m}^2$ ) (QF). Control consisted in non-treated plots. All treatments were irrigated to field capacity, and PPM, PB and QF plots were solarized with a transparent low-density polyethylene film (50  $\mu\text{m}$  thick, LDPE) from the beginning of May to mid-June 2018. A complete randomized blocks design with 4 treatments and 4 repetitions was used. Each elementary plot measured 4.2 x 11 meters, each containing three cultivation lines. Transplantation of asparagus plants took place in June 2018. Soil samples were taken from each repetition plot for each treatment one day before disinfestation treatments, and again just before transplanting. For each experimental plot, composite samples were taken at a depth between 5 and 30 cm. Inoculum densities of *F. proliferatum*, *F. oxysporum*, and *F. redolens* were determined via qPCR assays, as described above. In addition, crop yields were determined for each treatment as cumulative production (measured as the sum in grams of

asparagus shoots throughout the production season), cumulative yield (calculated as accumulated production per cultivated area), and total number of asparagus shoots harvested, values that were correlated with the inoculum densities of each *Fusarium* species in the soil after disinfestation treatments.

## 2.6. Data analysis

Linear regression equations were calculated from standard curves. DNA concentration was obtained via extrapolation of the cycle threshold value using CFX Manager software (version 3.1). The efficiencies of the reactions were calculated from the slope of the standard curves according to the following formula:  $E = 10^{(-1/\text{slope})} - 1$ .

Percentage of inoculum reduction in soil for each *Fusarium* species was calculated comparing inoculum densities before and after disinfestation treatments. Analyses of variance on the percentage of reduction at different soil disinfestation treatments were performed through one way-ANOVA. Fisher's least significant difference (LSD) tests at 99.5% confidence were performed when differences between treatments were detected, using Statistix 9.0 software (Analytical Software, Tallahassee, FL, USA). Arcsine square root transformation was applied to percentages.

Pearson correlation analyses were conducted to determine the association between inoculum density in soil (estimated as pg DNA/g soil of *F. proliferatum*, *F. oxysporum*, and *F. redolens* quantified by qPCR), number of viable propagules/g soil estimated by plate counting, and cumulative production, cumulative yield, and total number of asparagus shoots harvested throughout the season, using Statistix 9.0 software.

## 3. Results

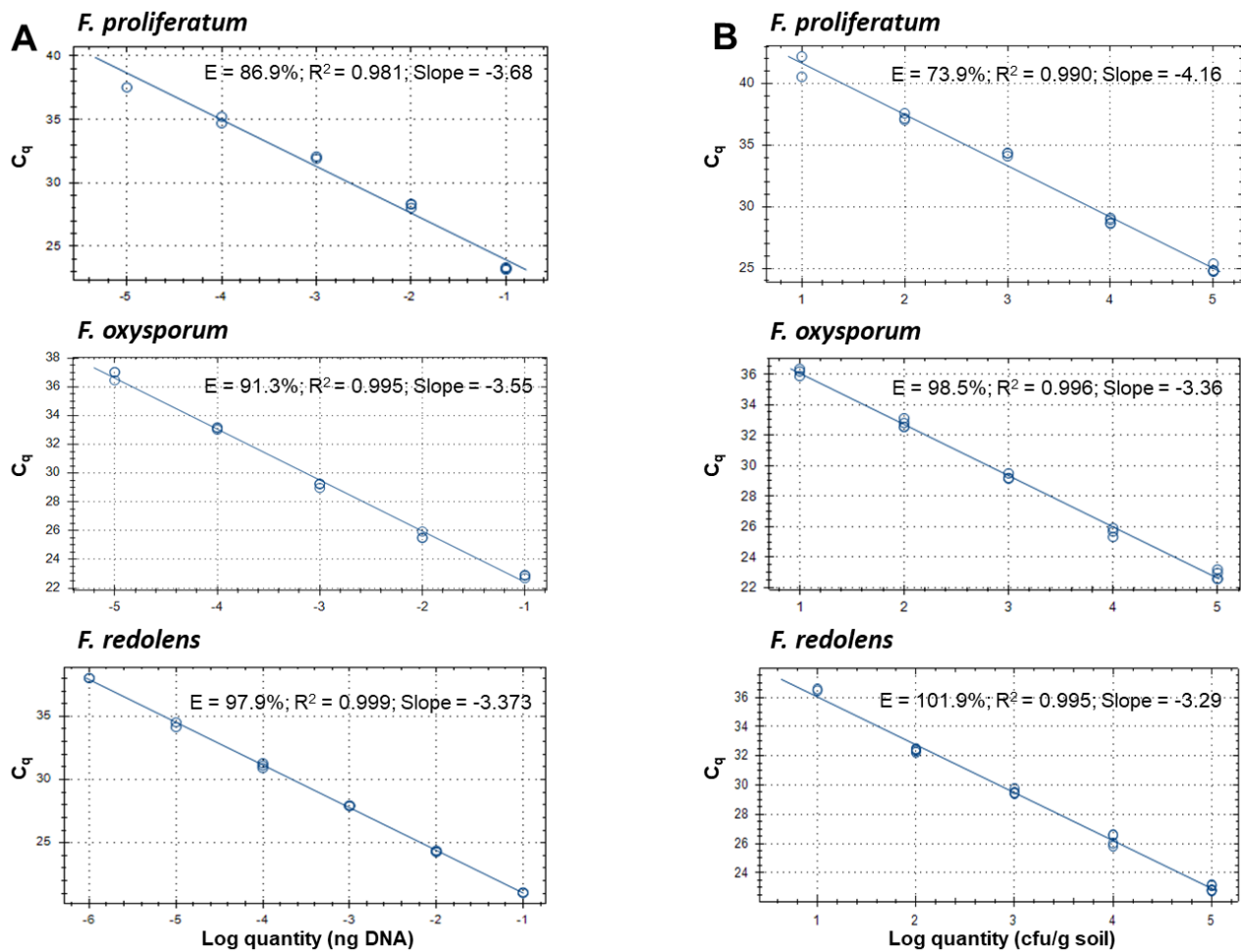
### 3.1. Specificity and sensitivity of the qPCR TaqMan assays for *F. proliferatum*, *F. oxysporum* and *F. redolens*

The set of specific primers and TaqMan probes designed for the accurate detection and quantification of *F. proliferatum*, *F. oxysporum* and *F. redolens* and the positive internal control (PIC), respectively, are shown in Table 1. The specificity of the qPCR assays was confirmed for *F. oxysporum* and *F. redolens*, giving no cross-detection and no amplification with DNA from other

fungus species tested. The qPCR protocol of *F. proliferatum* could also detect DNA from other phylogenetically closed species that belong to the *Fusarium fujikuroi* species complex (FFSC): *F. fujikuroi*, *F. concentricum*, *F. fractiflexum* and *F. sacchari* (Supplementary Table 1).

Linear relationships were established ( $R^2 = 0.981$ ;  $0.995$ ;  $0.999$  for *F. proliferatum*, *F. oxysporum* and *F. redolens*, respectively) between DNA concentration of *Fusarium* species (10-fold serial dilutions of genomic DNA) and quantification cycles (Cq) in the qPCR reactions using the designed primers and TaqMan probes (Figure 1A). Similarly, a linear relationship was obtained from DNA derived from artificially inoculated soil with 10-fold serial dilutions of *F. proliferatum*, *F. oxysporum* and *F. redolens* conidial suspensions and Cq values ( $R^2 = 0.990$ ;  $0.996$ ;  $0.995$ , respectively) (Figure 1B). The limit of detection for *F. proliferatum* and *F. oxysporum* was 10 fg of genomic DNA and 10 cfu/g soil. The detection limit for *F. redolens* was 1 fg of genomic DNA and 10 cfu/g soil. The qPCR assays were found to be sensitive, displacing the same sensitivity in simplex and duplex (including primers and probes for IPC) conditions.

A strong and highly significant correlation was detected between ng DNA/g soil for *F. proliferatum* (Pearson coefficient 0.9986,  $P = 0.0339$ ), *F. oxysporum* (Pearson coefficient 0.9999,  $P = 0.0084$ ) and *F. redolens* (Pearson coefficient 0.9995,  $P = 0.0201$ ) detected in artificially inoculated soils by qPCR analysis, and the inoculum density (cfu/g soil) estimated by soil plate culturing.



**Figure 1.** Standard curves for the quantification of *Fusarium* species pathogenic to asparagus by quantitative real-time PCR showing the limit of detection of A) 10-fold dilutions of genomic DNA from *Fusarium proliferatum* GR\_FP200 isolate, *F. oxysporum* GR\_FOA16 isolate, and *F. redolens* GR\_FR186 isolate in DNA (20 ng/ml) from a healthy asparagus plant; B) 10-fold dilutions of DNA from soil artificially inoculated with serial dilutions of conidial suspensions from the same *Fusarium* isolates. Cq indicates the PCR cycle at which an amplification signal is detected. E means the efficiency of the reaction.

### 3.2. Validation of the assay in plants and soil samples

All the artificially inoculated plants tested positive for *F. proliferatum*, *F. oxysporum* and *F. redolens*, by qPCR and tissue culturing methods, while the 10 non-inoculated plants tested negative via both methods. The infection levels quantified by qPCR were much higher for *F. oxysporum* (from 175.9 to 48,614.0 pg DNA/mg fresh tissue) than for the other two species (0.1 to 705.9 pg DNA/mg fresh tissue for *F. proliferatum*, and 2.0 to 632.3 pg DNA/mg fresh tissue for *F. redolens*) (Supplementary Table 2). Out of 30 symptomatic plants analyzed, 4 tested positive for *F.*

*proliferatum* using qPCR and tissue culturing methods, while 6 of the plants were found to be negative for both methods. In 16 plants, *F. proliferatum* was detected by qPCR but not by tissue culturing (Supplementary Figure 2), while 4 plants were detected by tissue culturing and not by qPCR. Inoculum densities in *F. proliferatum* naturally infected plants ranged from  $1.5 \times 10^{-3}$  to 156.8 pg DNA/mg fresh tissue. In the analysis of *F. oxysporum*, 12 plants were positive using both methods, while 1 plant tested negative via both methods. In 17 plants, *F. oxysporum* was detected by qPCR but not by tissue culturing, while none was detected by tissue culturing and not by qPCR (Supplementary Figure 2). Quantification of *F. oxysporum* in these plants was also higher than those for the other two species and ranged from  $1.3 \times 10^{-2}$  to 7,638.9 pg DNA/mg fresh tissue. For *F. redolens*, none of the 30 plants tested positive by tissue culturing methods, but the fungus was detected in 22 plants by qPCR (Supplementary Figure 2). *Fusarium redolens* inoculum densities in naturally infected plants were very low and varied from  $4.6 \times 10^{-5}$  to  $5.5 \times 10^{-2}$  pg DNA/mg fresh tissue (Supplementary Table 2).

From 24 field soil samples collected, *F. proliferatum* was detected in all of them by qPCR (ranged from 0.05 to 55.03 pg DNA/g soil), while it was detected in 21 samples by plate culture methods. *F. oxysporum* was detected in all soil samples by qPCR (ranged from 4.30 to 749.60 pg DNA/g soil) as well as by plate culturing. *F. redolens* was also detected in all soil samples by qPCR (ranged from 1.22 to 190.27 pg DNA/g soil), and by plate culturing. A robust correlation was observed between the pg DNA/g soil of *F. proliferatum* (Pearson coefficient 0.8199,  $P = 0.0127$ ), *F. oxysporum* (Pearson coefficient 0.7206,  $P = 0.0437$ ) and *F. redolens* (Pearson coefficient 0.6724,  $P = 0.0677$ ) estimated by qPCR analysis and the inoculum density estimated by soil plate culturing.

### 3.3. Irrigation water as potential inoculum source of *Fusarium* species

*Fusarium proliferatum* and *F. oxysporum* were detected in the irrigation water of the five asparagus fields showing ADS symptoms. Inoculum densities varied from 101 to 34001 fg DNA/ L water for *F. proliferatum*, and from 134 to 15354 fg DNA/ L water for *F. oxysporum*. In fields with three sampling dates, the highest concentration of both *Fusarium* species was detected in May. *F. redolens* was detected in the irrigation water of two of the five affected fields and at a low concentration. None of the three *Fusarium* species was detected in the irrigation water collected from the two asparagus fields without ADS problems (Table 2).

**Table 2.** Detection and quantification of *Fusarium proliferatum*, *F. oxysporum*, and *F. redolens* in irrigation water of asparagus production fields by qPCR protocols.

Field	Orchard characteristic	Sample date	Inoculum density (fg DNA/L)		
			<i>F. proliferatum</i>	<i>F. oxysporum</i>	<i>F. redolens</i>
Field No. 1	ADS symptoms	July 2020	310 ± 128	322 ± 175	-
		September 2020	187 ± 77	286 ± 186	-
		May 2021	2409 ± 1354	2184 ± 721	-
Field No. 2	ADS symptoms	July 2020	-	-	-
		September 2020	101 ± 101	-	-
		May 2021	1481 ± 1360	315 ± 167	-
Field No. 3	ADS symptoms	May 2021	34001 ± 15967	15354 ± 2088	129 ± 72
Field No. 4	ADS symptoms	May 2021	335 ± 268	1116 ± 1116	15 ± 9
Field No. 5	ADS symptoms	May 2021	9981 ± 6264	134 ± 124	-
Field No. 6	No ADS symptoms	September 2020	-	-	-
Field No. 7	No ADS symptoms	May 2021	-	-	-

### 3.4. Evaluation of the effectiveness of soil disinfestation treatments

The disinfestation treatment with pellet of *Brassica carinata* (PB) produced the highest reduction of the inoculum density for the three *Fusarium* species, with no significant differences with the chemical disinfestation treatment (QF) (Table 3). These percentages were significantly higher than the achieved by the non-treated control. On the other hand, the treatment with pellet of poultry manure (PPM) showed the lowest percentage of inoculum reduction for *F. proliferatum*, *F. oxysporum* and *F. redolens* (Table 3).

Data at the end of the season showed higher cumulative production, cumulative yield and total number of harvested asparagus shoots in treated soils than in non-treated ones. PB and QF treatments presented around 20% more cumulative production, cumulative yield, and total number of shoots than the non-treated control (Table 3).

**Table 3.** Inoculum densities of *Fusarium proliferatum*, *F. oxysporum* and *F. redolens* before and after soil disinfection treatments, measured by qPCR, percentage of inoculum reduction after treatments, and cumulative production in grams, cumulative yield (g/area), and total number of spears collected throughout the production season.

Disinfestation treatments	Inoculum density (pg DNA/g soil)									Production (g)	Yield (g/area)	N of Spears
	<i>F. proliferatum</i>			<i>F. oxysporum</i>			<i>F. redolens</i>					
	Before treatment	After treatment	Reduction (%)*	Before treatment	After treatment	Reduction (%)*	Before treatment	After treatment	Reduction (%)*			
<b>PPM</b>	1.9 ± 0.0	0.2 ± 0.1	41 ± 15 <b>c</b>	1292.4 ± 291.0	653.4 ± 105.6	33 ± 16 <b>c</b>	49.5 ± 7.2	18.7 ± 3.8	60 ± 7 <b>c</b>	5055	2154	265
<b>PB</b>	13.1 ± 0.8	0.3 ± 0.1	98 ± 1 <b>a</b>	2422.4 ± 342.1	386.4 ± 50.5	84 ± 1 <b>a</b>	96.8 ± 16.4	18.5 ± 1.6	80 ± 1 <b>a</b>	5720	2601	325
<b>QF</b>	6.0 ± 0.7	0.1 ± 0.1	97 ± 1 <b>a</b>	2636.7 ± 404.9	433.9 ± 70.7	81 ± 4 <b>a</b>	125.0 ± 25.4	22.9 ± 1.9	78 ± 4 <b>a</b>	5634	2482	313
<b>C</b>	3.8 ± 0.9	0.5 ± 0.1	86 ± 4 <b>b</b>	2415.6 ± 53.1	742.5 ± 9.7	69 ± 1 <b>b</b>	94.9 ± 12.3	29.2 ± 2.1	69 ± 2 <b>b</b>	4615	1942	255

PPM, pellet of poultry manure (500 g/m<sup>2</sup>); PB, pellet of *Brassica carinata* (500 g/m<sup>2</sup>); QF, dazomet (600 g/m<sup>2</sup>); C, non-treated control. Analysis of variance of means (4 repetitions per treatment) for inoculum reduction were performed.

\*Different letters denote significant differences at P≤0.05

Inoculum densities of *F. proliferatum*, *F. oxysporum* and *F. redolens* in soil samples before transplanting, were negatively correlated with production parameters (cumulative production, cumulative yield, and total number of spears), although this correlation was only significant for *F. oxysporum* (Table 4).

**Table 4.** Correlation coefficients between the inoculum densities of *Fusarium proliferatum*, *F. oxysporum* and *F. redolens* in pre-planting soils after disinfestation treatments measured by qPCR, and production parameters expressed as cumulative production in grams, cumulative yield (g/area), and total number of spears collected throughout the production season.

	<i>Fusarium</i> species	Cumulative Production (g)		Cumulative Yield (g/area)		Number of Spears	
		Pearson coefficient	<i>P</i> value	Pearson coefficient	<i>P</i> value	Pearson coefficient	<i>P</i> value
Inoculum density after treatments (pg DNA/g soil)	<i>F. proliferatum</i>	-0.7485	0.2515 <sup>NS</sup>	-0.6718	0.3282 <sup>NS</sup>	-0.5645	0.4355 <sup>NS</sup>
	<i>F. oxysporum</i>	-0.9949	0.0051*	-0.9983	0.0017*	-0.9858	0.0142*
	<i>F. redolens</i>	-0.6700	0.3300 <sup>NS</sup>	-0.6584	0.3416 <sup>NS</sup>	-0.5022	0.4978 <sup>NS</sup>

PPM, pellet of poultry manure (500 g/m<sup>2</sup>); PB, pellet of *Brassica carinata* (500 g/m<sup>2</sup>); QF, dazomet (600 g/m<sup>2</sup>); C, non-treated control; NS: not significant at *P* = 0.05

\*significant at *P* = 0.05.

#### 4. Discussion

*Fusarium proliferatum*, *F. oxysporum* and *F. redolens* are the main *Fusarium* species involved in ADS in southern Spain. Because the asparagus crop remains in the soil during its productive period, (around 15 years), and due to the ability of *Fusarium* spp. to survive in the soil for long periods, the soil has been postulated as one of the main sources of *Fusarium* inoculum in asparagus cultivation (Blok and Bollen, 1996). The detection of *Fusarium* species in asparagus nursery plants has also pointed to propagative plant material as another potential source of *Fusarium* inoculum (Corpas-Hervías et al., 2006). In this work, the presence of *F. proliferatum*, *F. oxysporum*, and *F. redolens* in the irrigation water of asparagus fields affected by ADS has been demonstrated thanks to the design and application of highly sensitive molecular detection techniques based on qPCR. This result shows irrigation water as another source of inoculum of



pathogenic *Fusarium* species. In accordance with this result, rivers and irrigation systems have previously been identified as potential sources of inoculum for pathogenic fungi (Baroudy et al., 2018; Moein et al., 2019), including *Fusarium* species (Palmero et al., 2009; Matthews et al., 2020). In this scenario, the monitoring of pathogenic *Fusarium* species in pre-planting soil, starter plant material, and irrigation water previously to the establishment of an asparagus crop would be desirable to prevent ADS and replanting problems. For this, the use of molecular tools, such as the developed qPCR assays, permits not only the sensitive and specific detection of the pathogenic *Fusarium* species in different types of samples, but also the quantification of their inoculum densities to facilitate disease risk predictions.

Numerous qPCR protocols have been developed to detect and quantify fungal pathogens in plant and soil samples (Carneiro et al., 2017; Pastrana et al., 2017; De la Lastra et al., 2018; Singh and Kapoor, 2018; Zitnick-Anderson et al., 2018; Pollard and Okubara, 2019). But, to our knowledge, these are the first qPCR assays applied for the detection of *Fusarium* species in asparagus plants, soil samples, and irrigation water from asparagus production fields. The developed qPCR protocols were based on the detection of multicopy spacer rDNA from the IGS region for *F. proliferatum* and *F. redolens*, and the ITS region for *F. oxysporum*. The high interspecific variability of the ribosomal DNA regions permitted us to design qPCR assays that detected specifically *F. oxysporum* and *F. redolens* species. The *F. proliferatum* qPCR protocol cross reacted with other phylogenetically closed *Fusarium* species belonging to the same species complex (*F. fujikuroi* species complex or FFSC): *F. fujikuroi*, *F. concentricum*, *F. fractiflexum* and *F. sacchari* (Supplementary Table 1). This fact could conduce to false positives, thus constituting a concern for ADS diagnostics, but these species do not represent a real threat since they have not been found in asparagus agricultural systems (Brizuela et al., 2020), nor have been reported as pathogens of asparagus, as far as we know. Moreover, the multicopy nature of rDNA, allows for a high sensitivity, being able to detect very small amounts of fungal DNA (as less as 1 to 10 fg) and propagules in the soil (10 cfu/g soil). In addition, the use of a positive internal control duplexed in the qPCR protocols, avoids the detection of false negatives (i.e. DNA not amplified due to the presence of PCR inhibitors in the samples), further enhancing the reliability of the assays. The coexistence of non-pathogenic and pathogenic strains of *Fusarium* species in soils and plants is common (Brizuela et al., 2020) and the designed qPCR assays are not able to specifically detect the pathogenic ones. However, since most strains isolated from asparagus plants (around 90%) and production soils (from 64% to 93% of the isolates) resulted to be pathogenic to asparagus (Brizuela

et al., 2020), the value of the qPCR assays is undeniable, especially in comparison to plating analysis methods, which are laborious, time-consuming and require the expertise of taxonomists for an accurate identification.

Also, the duplex qPCR protocols displayed higher sensitivity than culture plating methods. Identification of *F. redolens* based on morphological criteria may be quite problematic, because some morphological structures are similar, or in some cases, indistinguishable, from *F. oxysporum* (Baayen et al., 2000). In this sense, the use of the developed qPCR is essential for the specific identification and accurate quantification of *F. redolens* in different samples.

Quantification of the three *Fusarium* species in soil from ADS-affected fields served to validate the designed qPCRs as valuable tools for ADS diagnosis and prediction. A high correlation was observed between qPCR and plate culture detection methods. *F. oxysporum* was the most abundant species and showed inoculum levels almost three times higher than those registered for *F. redolens*, and more than ten times higher than those of *F. proliferatum*. Previous studies have also indicated that *F. oxysporum* was the most abundant *Fusarium* species detected in soil of ADS-affected fields (Brizuela et al., 2020; De la Lastra et al., 2020). This high inoculum level coincides with the analysis of the asparagus symptomatic plants collected from the same fields, in which *F. oxysporum* was the most abundant *Fusarium* species detected by any method used (97 % of analyzed plants), followed by *F. proliferatum* (80 %) and *F. redolens* (73 %). These results support the soil as an important inoculum reservoir for these fungi, especially for *F. oxysporum* (Blok and Bollen, 1996). The low inoculum density of *F. proliferatum* detected in soil by qPCR and plate culturing could be due to the inability of this fungal species to form resistance structures as other *Fusarium* species do, such as *F. oxysporum* or *F. redolens* (Leslie and Summerell, 2006).

Quantification of the inoculum density of pathogenic *Fusarium* species in soil may also provide essential insights about the effectiveness of soil disinfestation methods for ADS management. By using the developed qPCR tools, an important reduction of the inoculum density in the soil after treatments was observed, even in non-treated soils. Despite this, the reduction was significantly higher in soils treated with PB and QF than in non-treated soils for the three *Fusarium* species analyzed. These results suggest that the biosolarization with pellet of *Brassica carinata* could be an interesting alternative to efficiently reduce *Fusarium* inoculum in asparagus fields more respectful with the environment than the chemical fumigation with dazomet. Biofumigation effectiveness with *Brassica* formulations has already been proved in replanting diseases caused by

fungal pathogens (Hanschen and Winkelmann, 2020). Conversely, the PPM treatment showed the lowest percentage of inoculum reduction for the three species, even lower than the non-treated soil (Table 3). This is not in accordance with previous works in which biosolarization with PPM reduced the disease incidence caused by *Fusarium* in asparagus (Borrego-Benjumea et al., 2014). The efficacy of soil treatments depends, along with the time and dose of application, on physical and chemical characteristics of the soil, which could be compromising the success of the PPM treatment. In this regard, pellets were visible without decomposing in the plots where they were applied three years before (data not shown), what can be related to their lower effect in fields experiments, in contrast to greenhouse assays (Borrego-Benjumea et al., 2014).

Regarding the decrease of *Fusarium* populations detected in the control, this fact can be explained by the effect of excess water in the soil after irrigating the plots at field capacity. Flooded or watered control treatments showed similar results in other works, with inoculum reductions of fungal communities (Marín-Guirao et al., 2019) and decreases of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae* density (Matheron and Porchas, 2010). The efficacy of PB and QF treatments in the reduction of *Fusarium* inoculum in the soil correlated with the increase of production parameters, since the cumulative production, the cumulative yield and the total number of harvested asparagus shoots were around 20% higher in the plots treated with PB and QF than in non-treated plots. Moreover, the reliability of the designed qPCR assays has been proved, since the inoculum densities of *F. proliferatum*, *F. oxysporum* and *F. redolens* in soil after treatments quantified by qPCR negatively correlated with yield parameters. Other qPCR protocols have also been applied for the assessment of the efficacy of soil fumigant treatments in the control of soil-borne diseases by quantifying the inoculum level of pathogenic fungi in the soil (Li et al., 2014; Arjona-López et al., 2020) and as valuable tools for prediction of disease and yield losses (De la Lastra et al., 2018).

## 5. Conclusion

Preventive control measures such as early detection of fungal pathogens in plants, soil and irrigation water should be advisable before asparagus crop establishment to permit identification of high-risk fields. The availability of highly sensitive and accurate molecular tools such as the developed TaqMan-qPCRs is indispensable for this purpose. qPCR quantification of *Fusarium* inoculum densities in soil can also provide essential information on the effectiveness of soil treatments and prediction of production yields.

## Literature cited

- Arjona-López, J.M., Capote, N., Melero-Vara, J.M., López-Herrera, C.J. (2020). Control of avocado white root rot by chemical treatments with fluazinam in avocado orchards. *Crop. Prot.* 131: 105100.
- Baroudy, F., Habib, W., Tanos, G., Gerges, E., Saab, C., Choueiri, E., Nigro, F. (2018). Long-distance spread of *Verticillium dahliae* through rivers and irrigation systems. *Plant Dis.* 102: 1559-1565.
- Baayen, R.P., van Den Boogert, P.H.J.F., Bonants, P.J.M., Poll, J.T.K., Blok, W.J., Waalwijk, C. (2000). *Fusarium redolens* f. sp. *asparagi*, causal agent of asparagus root rot, crown rot and spear rot. *Eur. J. Plant Pathol.* 106: 907-912.
- Blok, W.J., Bollen, G.J. (1996). Inoculum sources of *Fusarium oxysporum* f. sp. *asparagi* in asparagus production. *Ann. Appl. Biol.* 128: 219-231.
- Blok, W.J., Bollen, G.J. (1997). Host specificity and vegetative compatibility of Dutch isolates of *Fusarium oxysporum* f. sp. *asparagi*. *Can. J. Bot.* 75: 383-393.
- Borrego-Benjumea, A., Basallote-Ureba, M.J., Melero-Vara, J.M., Abbasi, P.A. (2014). Characterization of *Fusarium* isolates from asparagus fields in southwestern Ontario and influence of soil organic amendments on *Fusarium* crown and root rot. *Phytopathology* 104: 403-415.
- Borrego-Benjumea, A., Melero-Vara, J.M., Basallote-Ureba, M.J. (2010). Effects of soil organic amendments and incubation temperature on the control of *Fusarium oxysporum* f. sp. *asparagi*. *Acta Hort.* 883: 369-376.
- Brizuela, A.M., De la Lastra, E., Marín-Guirao, J.I., Gálvez, L., de Cara-García, M., Capote, N., Palmero, D. (2020). *Fusarium* consortium populations associated with asparagus crop in Spain and their role on field decline syndrome. *J. Fungi* 6: 336.
- Carneiro, G.A., Matic, S., Ortu, G., Garibaldi, A., Spadaro, D., Gullino, M.L. (2017). Development and validation of a TaqMan real-time PCR assay for the specific detection and quantification of *Fusarium fujikuroi* in rice plants and seeds. *Phytopathology* 107: 885-892.
- Corpas-Hervias, C., Melero-Vara, J.M., Molinero-Ruiz, M.L., Zurera-Muñoz, C., Basallote-Ureba, M.J. (2006). Characterization of isolates of *Fusarium* spp. obtained from asparagus in Spain. *Plant Dis.* 90: 1441-1451.
- De la Lastra, E., Basallote-Ureba, M.J., De los Santos, B., Miranda, L., Vela-Delgado, M.D., Capote, N. (2018). A TaqMan real-time polymerase chain reaction assay for accurate

- detection and quantification of *Fusarium solani* in strawberry plants and soil. *Sci. Hortic.* 237: 128-234.
- De la Lastra, E., Marín-Guirao, J.I., López-Moreno, F.J., De Cara, M., Soriano, T., Capote, N. (2020). Especies de *Fusarium* relacionadas con el síndrome del decaimiento del espárrago en Andalucía. *Phytoma* 324: 2-9.
- Elena, K., Kranias, L. (1996). *Fusarium* spp. as a cause of crown and root rot of asparagus in Greece. *EPPO Bull* 26: 407-411.
- Elmer, W.H. (1996). Epidemiology and management of the diseases causal to asparagus decline. *Plant Dis.* 80: 117.
- Elmer, W.H. (2001). *Fusarium* diseases of asparagus. In: *Fusarium*: Paul, E. Nelson memorial symposium, B. Summerell, J. Leslie, D. Backhouse, W. Bryden, L. Burgess, (eds). APS Press, St. Paul, USA: 248-262.
- FAOSTAT. 2019. [http://www.fao.org/faostat/es/#rankings/countries\\_by\\_commodity](http://www.fao.org/faostat/es/#rankings/countries_by_commodity)
- Grogan, R.G., Kimble, K. (1959). The association of *Fusarium* wilt with the asparagus decline and replant problem in California. *Phytopathology* 49: 122-125.
- Hanschen, F.S., Winkelmann, T. (2020). Biofumigation for fighting replant disease- A Review. *Agronomy* 10: 425.
- Kathe, L., Krämer, R., Budahn, H., Pillen, K., Rabenstein, F., Nothnagel, T. (2019). Development of a bioassay to assess resistance to *Fusarium oxysporum* (Schlecht.) in asparagus (*Asparagus officinalis* L.). *J. Phytopathol.* 167: 558-566.
- Kumar, S., Stecher, G., Tamura, K. (2016). MEGA7: Molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Mol. Biol. Evol.* 33: 1870-1874.
- Lake, R.J., Falloon, P.G., Cook, D.W.M. (1993). Replant problem and chemical components of asparagus roots. *New Zeal. J. Crop Hortic. Sci.* 21: 53-58.
- Leslie, J.F., Summerell, B.A. (2006). *The Fusarium laboratory manual*, ed. by Blackwell, Wiley-Blackwell, Iowa, USA.
- Li, Y., Mao, L., Yan, D., Ma, T., Shen, J., Guo, M., Wang, Q., Ouyang, C., Cao, A. (2014). Quantification of *Fusarium oxysporum* in fumigated soils by a newly developed real-time PCR assay to assess the efficacy of fumigants for *Fusarium* wilt disease in strawberry plants. *Pest Manag. Sci.* 70: 1669-1675.
- MAPA. 2019. <https://www.mapa.gob.es/es/estadistica/temas/estadisticas-agrarias/agricultura/superficies-producciones-anuales-cultivos/>

- Marín-Guirao, J.I., de Cara-García, M., Tello-Marquina, J.C. (2019). Effect of soil biodisinfection on soil fungal communities associated to horticultural crops. *Ecosistemas* 28: 63-72.
- Matheron, M.E., Porchas, M. (2010). Evaluation of soil solarization and flooding as management tools for *Fusarium* wilt of lettuce. *Plant Dis.* 94: 1323-1328.
- Matthews, M.C., Mostert, D., Ndayihanzamaso, P., Rose, L.J., Viljoen, A. (2020). Quantitative detection of economically important *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* strains in Africa in plants, soil and water. *PLoS One* 15: 1-20.
- Moein, S., Mazzola, M., Ntushelo, N.S., McLeod, A. (2019). Apple nursery trees and irrigation water as potential external inoculum sources of apple replant disease in South Africa. *Eur. J. Plant Pathol.* 153: 1131-1147.
- Nelson, P.E., Toussoun, T.A., Marasas, W.F.O. (1983). *Fusarium* species. An illustrated manual for identification. University Park: Pennsylvania State University Press, Madison, USA.
- Noperi-Mosqueda, L.C., López-Moreno, F.J., Navarro-León, E., Sánchez, E., Blasco, B., Moreno, D.A., Soriano, T. (2020). Effects of asparagus decline on nutrients and phenolic compounds, spear quality, and allelopathy. *Sci. Hortic.* 261: 109029.
- O'Donnell, K., Kistlerr, H.C., Cigelnik, E., Ploetz, R.C. (1998). Multiple evolutionary origins of the fungus causing panama disease of banana: Concordant evidence from nuclear and mitochondrial gene genealogies. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95: 2044-2049.
- Palmero, D., Iglesias, C., De Cara, M., Lomas, T., Santos, M., Tello, J.C. (2009). Species of *Fusarium* isolated from river and sea water of southeastern Spain and pathogenicity on four plant species. *Plant Dis.* 93: 377-385.
- Pastrana, A.M., Basallote-Ureba, M.J., Aguado, A., Capote, N. (2017). Potential inoculum sources and incidence of strawberry soilborne pathogens in Spain. *Plant Dis.* 101: 751-760.
- Pollard, A.T., Okubara, P.A. (2019). Real-time PCR quantification of *Fusarium avenaceum* in soil and seeds. *J. Microbiol. Methods* 157: 21-30.
- Rodríguez, R., Jaramillo, S., Rodríguez, G., Espejo, J.A., Guillén, R., Fernández-Bolaños, J., Herredia, A., Jiménez, A. (2005). Antioxidant activity of ethanolic extracts from several asparagus cultivars. *J. Agric. Food Chem.* 53: 5212-5217.
- Schofield, P.E. (1991). Asparagus decline and replant problem in new zealand. *New Zeal. J. Crop Hortic. Sci.* 19: 213-220.
- Schreuder, W., Lamprecht, S.C., Marasas, W.F.O., Calitz, F.J. (1995). Pathogenicity of three *Fusarium* species associated with asparagus decline in South Africa. *Plant Dis.* 79: 177-181.

- Singh, N., Kapoor, R. (2018). Quick and accurate detection of *Fusarium oxysporum* f. sp. *carthami* in host tissue and soil using conventional and real-time PCR assay. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 34: 175.
- Tello, J.C., Vares, F., Lacasa, A. (1991). Análisis de muestras. En: Manual de laboratorio Diagnóstico de hongos, bacterias y nematodos fitopatógenos. Dirección General de Sanidad de la Producción Agraria, Madrid: 9-48.
- Wong, J.Y., Jeffries, P. (2006). Diversity of pathogenic *Fusarium* populations associated with asparagus roots in decline soils in Spain and the UK. *Plant Pathol.* 55: 331-342.
- Zitnick-Anderson, K., Simons, K., Pasche, J.S. (2018). Detection and qPCR quantification of seven *Fusarium* species associated with the root rot complex in field pea. *Can. J. Plant Pathol.* 40: 261-271.

Supplementary figures

ITS Alignment (A)

```

F. oxysporum          AGCGTCATTTCAACCCTCAAGCAC--AGCTTGGTGTGGGACTC-GCG---TTA-AT--TC-G-----CGTTC
F. redolens          AGCGTCATTTCAACCCTCAAGCCCTCGGGTTTGGTGTGGGGATCGGCG--AGCC-TTTCTG-G-C--A-AGCCGGCCCC
F. proliferatum      AGCGTCATTTCAACCCTCAAGCCCCCGGGTTTGGTGTGGGGATCGGCG--AGCC-CTTGC-G-C--A-AGCCGGCCCC
F. solani             AGCGTCATTACAACCCTCAGGCCCCCGGGCTGGCGTTGGGGATCGGCGGAAAGCCCTGCG-GGCACAACGCCCTCCCC
F. fujikuroi         AGCGTCATTTCAACCCTCAAGCCCCCGGGTTTGGTGTGGGGATCGGCG--AGCC-CTTGC-G-C--A-AGCCGGCCCC
F. concentricum      AGCGTCATTTCAACCCTCAAGCCCTCGGGTTTGGTGTGGGGATCGGCG--AGCC-CTTGC-G-C--A-AGCCGGCCCC
F. brachyibbosum     AGCGTCATTTCAACCCTCAAGCCCCCGGGTTTGGTGTGGGGATCGGCG-C-TGTA-CT----C-C-A-GCCCGCCCC
F. equiseti          AGCGTCATTTCAACCCTCAAGCTC--AGCTTGGTGTGGGACTC-GCG---GTA-AC--CC-G-----CGTTC
F. culmorum          AGCGTCATTTCAACCCTCAAGCCC--AGCTTGGTGTGGGAGCT-GCA--GTC-CT-GCT-G-----CACTCC
F. mangiferae        AGCGTCATTTCAACCCTCAAGCCCCCGGGTTTGGTGTGGGGATCGGCG--AGCC-CTTGC-G-C--A-AGCCGGCCCC
F. sambucinum        AGCGTCATTTCAACCCTCAAGCCC--AGCTTGGTGTGGGAGCT-GTC--GT--C---TG-A-----CACTCC
F. graminearum       AGCGTCATTTCAACCCTCAAGCCC--AGCTTGGTGTGGGAGCT-GCA--GTC-CT-GCT-G-----CACTCC
F. avenaceum         AGCGTCATTTCAACCCTCAAGCCCCCGGGTTTGGTGTGGGGATCGGCT-T-GC-CTG-G-C--GGTGCGCCCCCC
F. acuminatum        AGCGTCATTTCAACCCTCAAGCCCCCGGGTTTGGTGTGGGGATCGGCT-TGCC-CTTCTGG-G-C--GGTGCGCCCCCC
F. commune           AGCGTCATTTCAACCCTCAAGCCCTCGGGTTTGGTGTGGGGATCGGCG--AGCC-CTTGC-G-C--A-AGCCGGCCCC
F. nygamai           AGCGTCATTTCAACCCTCAAGCCCCCGGGTTTGGTGTGGGGATCGGA-----CG-G-C--A-AGCCGGCCCC
***** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

F. oxysporum          CAAATTGATTGGCGGTACGTCG-AGCTTCCATAGCGTAGTAGTAA-AACCCTCGTACTGG
F. redolens          GAAATCTAGTGGCGGTCTCGCTGCAGCTCCATTGCGTAGTAGTAA-AACCCTCGCAACTGG
F. proliferatum      GAAATCTAGTGGCGGTCTCGCTGCAGCTTCCATTGCGTAGTAGTAA-AACCCTCGCAACTGG
F. solani             CAAATACAGTGGCGGTCCCGCCGAGCTTCCATTGCGTAGTAGTAA-ACACCTCGCAACTGG
F. fujikuroi         GAAATCTAGTGGCGGTCTCGCTGCAGCTTCCATTGCGTAGTAGTAA-AACCCTCGCAACTGG
F. concentricum      GAAATCTAGTGGCGGTCTCGCTGCAGCTTCCATTGCGTAGTAGTAA-AACCCTCGCAACTGG
F. brachyibbosum     GAAATCTAGTGGCGGTCTCGCTGCAGCTTCCATTGCGTAGTAGTAA-ACACCTCGCAACTGG
F. equiseti          CAAATCGATTGGCGGTACGTCG-AGCTTCCATAGCGTAGTAATCATAACCTCGTACTGG
F. culmorum          CAAATACATTGGCGGTACGTCG-AGCTTCCATAGCGTAGTAATTT-ACACATCGTACTGG
F. mangiferae        GAAATCTAGTGGCGGTCTCGCTGCAGCTTCCATTGCGTAGTAGTAA-AACCCTCGCAACTGG
F. sambucinum        CAAATACATTGGCGGTACGTCG-AGCTTCCATAGCGTAGTAATTT-ACACATCGTACTGG
F. graminearum       CAAATACATTGGCGGTACGTCG-AGCTTCCATAGCGTAGTAATTT-ACACATCGTACTGG
F. avenaceum         GAAATACATTGGCGGTCTCGCTGCAGCTTCCATTGCGTAGTAGTAA-ACACCTCGCAACTGG
F. acuminatum        GAAATACATTGGCGGTCTCGCTGCAGCTTCCATTGCGTAGTAGTAA-ACACCTCGCAACTGG
F. commune           GAAATCTAGTGGCGGTCTCGCTGCAGCTTCCATTGCGTAGTAGTAA-AACCCTCGCAACTGG
F. nygamai           GAAATACAGTGGCGGTCTCGCTGCAGCTTCCATTGCGTAGTAGTAA-AACCCTCGCAACTGG
***** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
    
```

IGS Alignment (B)

```

F. redolens          CGATT-CTC--TGACCTTGC GGTTAGGGTAGGCTCATCTTACATTGTTGAAGC--GAGATGT-----GAGCGGTATAG
F. proliferatum      CGGTT-CTC--TGGCT-GA-----TGGGCTCGGACCGTCGAAAC--GAGATGC-----GGCGCTGCA
F. oxysporum          CGATT-CTC--CGGCT-GG-----CGGATCTGACACTGTCGAAAC--GAGATGC-----GAGCGGTATAG
F. solani             ATGTA-CCT---G-----ATCTGAGGTGGTATAGGG--TAGCTG-----GGTTTCTG
F. fujikuroi         CGGTT-CTC--TGGCT-GA-----TGGATCTGAGACCGTCGAAAC--GAGATGC-----GGGCGTGCAG
F. concentricum      CGGTT-CTC--TGGCT-GA-----TGGATCTGAGAGCGTCGAAAC--GAGATGC-----GGGCGTGCAG
F. brachyibbosum     CGATT-CTC--CGGCT-GG-----CGGATTTGACAC--TCGAAAC--GAGATGC-----GAGCGGTATAG
F. equiseti          CGAATTCGC--CGGC-AG-----GT-----GA-----TGGT-----ATAGGA-----CGGATACAG
F. sacchari          CGGTT-CTC--CGGCT-CA-----CGGATCTGAGAGCGTCGAGC--GAGATGC-----GGGCGCCGAG
F. mangiferae        CGGTT-CTC--TGGCT-GA-----TGGATCTGGGAGCGTCGAGC--GAGATGC-----GGGCGTGCAG
F. subglutinans      CGGTT-CTC--TGGCT-GA-----CGGATCCAGAGCTTCGAAAC--GAGATGC-----GAGTGGTGCAG
F. circinatum        CGGTT-CTC--TGGCT-GA-----CGGATCTCAGAGCTTTGAAAC--GAGATGG-----GAGTGGTGCAG
F. acuminatum        CCGTT-TCCCGCGGCT-AC-----CGGATAGGC-AGCTTTGGCTTGGCGGATTCCGCGGCTCGAGGTGCAG
F. commune           CGATT-CTC--CGGCT-GG-----CGGATCTGACACTGTCGAAAC--GAGATGC-----GAGCGGTGTAG
F. nygamai           CGGTT-CTC--TGA-CT-GA-----CGGCTGAGGTCTGTCGAAAC--GAGATGC-----GGGAGTGCAG
* * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

F. redolens          GGTAGGCCACTTTGTCT--GCCAGGCCGT-GAGTAT-GGCAGGCTGGGAGGTCTAGGGCAGG-TATAGGTAAGAGGAA
F. proliferatum      GGTAGGTAAGTCTTGTCTTTCGTCTAGGAAGC-GATTCTGTTGAGATGTATGGTCTAGGTTAGG-TACAGGGTAGGCAAGT
F. oxysporum          GGTAGGCTAGTTTCGTCTCGCCAGGTTGC-GATTTC-GACGAGATGTGGTGTAGGTTAGGCTCTAGGTAAGTAGAA
F. solani             CCTACCCTG-TACTCTG--TACTACGACTGGTCTGGCCGCTGCGGGTGTATG--GTA-G-TACAGGTAAGTCAA
F. fujikuroi         GGTAGGTAAGTCTTATCTTCGGCAGGAAGC-GATTCTGCTCAAATGTATGGTCTAGGTTAGG-TACAGGGTAGGCAAGT
F. concentricum      GGTAGGTAAGTCTTGTCTTTCGTCTAGGAAGC-GATTCTGTTGAGATGTGGTCTATGT--GG-TACAGGGTAGGCAAGT
F. brachyibbosum     GGTAGGCTAGTTTCGTCTCGCCAGGTTGC-GATTTC-GACGAGATATGCGGTTTGGGGTAGGCTCTAGGTAAGTAGAA
F. equiseti          GGTAGGCAAGGAT-TGTCTTGGTCGAGCTGG-GTGT---GTC---CGGTTGGT-----GGAAGCGATCGGGG
F. sacchari          GGTAGGTAAGTCTTATCTTTCGTCTAGGAAGC-AATTGGTGTGAGATGTGGTCTAGGTTAGG-TACAGGGTAGGCAAGT
F. mangiferae        GGTAGGTAAGTCTTACTATGTCAGGAAGC-GATTCTGTTGAGATGTGGTCTA-----GAGTGGTGTAGGTTAGG
F. subglutinans      GGTAGGCAACTTCTGTCTTTCGCAAGGATGC-GATTCTGCTTGGATGTGGCTAGGTTAGG-TACAGGGTAGGTAGAA
F. circinatum        GGTAGGCAACTTCTGTCTTTCGCAAGGATGC-GATTCTGCTTGGATGTGGCTAGGTTAGG-TACAGGGTAGGTAGAA
    
```

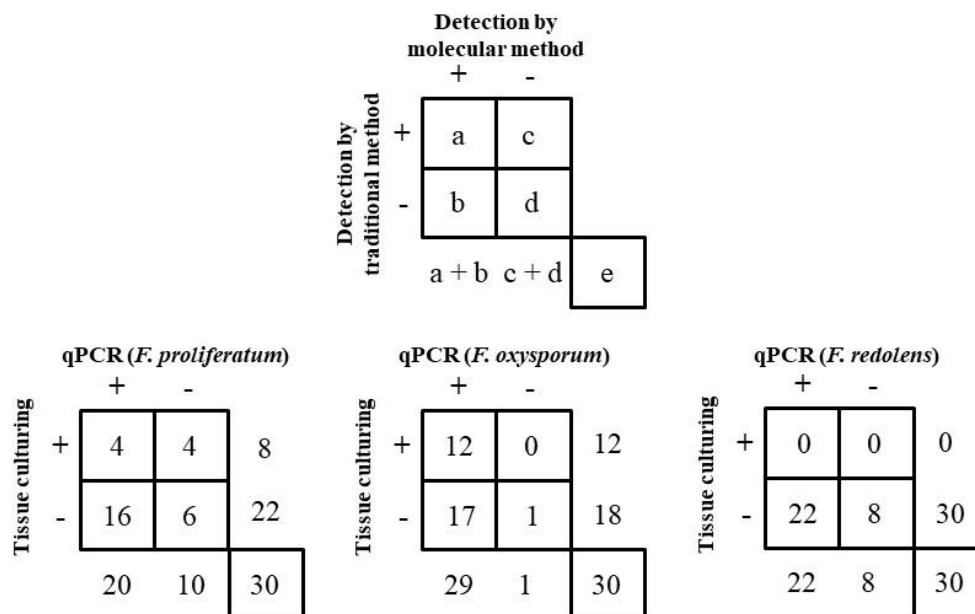


```

F. acuminatum      GGTAGGCAGCTT -TGACCG-----AGC-GGATTGCGGTA---C---TGCT-----G-TGGCCAAACAGGA
F. commune        GGTAGGCCAGTTTTGTCGTCGCCAGGTTGC -GATTCG -GACGAGATATGTGGTCTATGGTAGGGTCTAGGGTAAGTAGAG
F. nygamai        GGTAGGCAACTTCCGTCCTCCGCCAGGAAGC -GATTTGATTGAGATGTGAGGTCTAGGTTAGG -TACAGGGTAGGTGAA
                    **                               * *

F. redolens       CTTCAGTTTGGCCGCTCAGAGCTGGAAGTAGG-----TATAGGGTAGC
F. proliferatum  TCITTCCTACCAGAAATCGATTGGCAATGGGATATAGAGTCTAGGGTAGG
F. oxysporum     CTCGAGTTTCGTCGCCGACAGTTTTCTGTGGG-----TGATGGTAGG
F. solani        AGTGCCTACCCTGGAGCGCGCATAAAATCCCCTCTCCTGCCTCCACAGG
F. fujikuroi     TCTTTCTCTACCAGAAATCGATTGGCAATAGGATATATAGTCTAGGGCAGG
F. concentricum TCT---TTACCAGAAATCGATTGGCAGTAAGATATATGGTCTAGGATAGG
F. brachyibbosum TTCCGAGTTTCGTCGCCGATAGTTTTCTGTGGG-----TGAGGGTAGG
F. equiseti      TCT-GCTGCA-----GGGTAGG
F. sacchari      TCCTTCTCTGCCAGAAATCGATTGCTAATACGATATATAGTCTAGGGTAGG
F. mangiferae    -----TAGG
F. subglutinans TCTCAATTTTCGCTGCTACAGCTT -GCCATAGG-----TGAGGGTAGG
F. circinatum    TCTCAGTTTCGTCGCTA-CAGTTTGCCATAGG-----TGAGGGTAGG
F. acuminatum    TCT---TTA-----GGGAAGG
F. commune      TTCGAGTTTCGTCGCCAACAGTTTGCTGTATG-----TGAGGGTAGG
F. nygamai      TCCGAGTTTCGTCGCTGAAAGCTTGCGGCGGG-----CGTAGGGTAGG
    
```

**Supplementary Figure 1.** Multiple sequence alignments of the ITS (A) and IGS regions (B) from different *Fusarium* spp. Primers sequences are highlighted in grey, and probes sequences are underlined.



**Supplementary Figure 2.** Comparison of TaqMan duplex qPCR assays with plant tissue culturing methods for the detection of *Fusarium proliferatum*, *F. oxysporum* and *F. redolens* in asparagus plants from ADS affected fields.

**Supplementary Table 1.** Fungal isolates used in this study and qPCR assays specificity results.

Species	Isolates	Source	Origin	qPCR ( <i>F. oxysporum</i> )	qPCR ( <i>F. proliferatum</i> )	qPCR ( <i>F. redolens</i> )
<i>F. oxysporum</i>	GR_FOAc	Asparagus root	IFAPA Collection	+	-	-
	GR_FOA5	Asparagus root	IFAPA Collection	+	-	-
	GR_FOA8	Asparagus root	IFAPA Collection	+	-	-
	GR_FOA13	Asparagus root	IFAPA Collection	+	-	-
	GR_FOA14	Asparagus root	IFAPA Collection	+	-	-
	GR_FOA21	Asparagus root	IFAPA Collection	+	-	-
	GR_FOA125	Asparagus root	IFAPA Collection	+	-	-
	GR_FOA128	Asparagus root	IFAPA Collection	+	-	-
	GR_FOA141	Asparagus root	IFAPA Collection	+	-	-
	GR_FOA164	Asparagus root	IFAPA Collection	+	-	-
	GR_FOA168	Asparagus root	IFAPA Collection	+	-	-
	GR_FOA179	Asparagus root	IFAPA Collection	+	-	-
	GR_FOA230	Asparagus root	IFAPA Collection	+	-	-
	GR_FOA247	Asparagus root	IFAPA Collection	+	-	-
	GR_FOA249	Asparagus root	IFAPA Collection	+	-	-
<i>F. proliferatum</i>	GR_FPb	Asparagus root	IFAPA Collection	-	+	-
	GR_FP3	Asparagus root	IFAPA Collection	-	+	-
	GR_FP11	Asparagus root	IFAPA Collection	-	+	-
	GR_FP17	Asparagus root	IFAPA Collection	-	+	-
	GR_FP24	Asparagus root	IFAPA Collection	-	+	-
	GR_FP86	Asparagus root	IFAPA Collection	-	+	-
	GR_FP87	Asparagus root	IFAPA Collection	-	+	-
	GR_FP100	Asparagus root	IFAPA Collection	-	+	-
	GR_FP120	Asparagus root	IFAPA Collection	-	+	-
	GR_FP130	Asparagus root	IFAPA	-	+	-

			Collection			
	GR_FP172	Asparagus root	IFAPA Collection	-	+	-
	GR_FP178	Asparagus root	IFAPA Collection	-	+	-
	GR_FP182	Asparagus root	IFAPA Collection	-	+	-
	GR_FP234	Asparagus root	IFAPA Collection	-	+	-
	GR_FP248	Asparagus root	IFAPA Collection	-	+	-
<i>F. redolens</i>	GR_FRa	Asparagus root	IFAPA Collection	-	-	+
	GR_FR4	Asparagus root	IFAPA Collection	-	-	+
	GR_FR7	Asparagus root	IFAPA Collection	-	-	+
	GR_FR18	Asparagus root	IFAPA Collection	-	-	+
	GR_FR20	Asparagus root	IFAPA Collection	-	-	+
	GR_FR23	Asparagus root	IFAPA Collection	-	-	+
	GR_FR29	Asparagus root	IFAPA Collection	-	-	+
	GR_FR58	Asparagus root	IFAPA Collection	-	-	+
	GR_FR104	Asparagus root	IFAPA Collection	-	-	+
	GR_FR107	Asparagus root	IFAPA Collection	-	-	+
	GR_FR144	Asparagus root	IFAPA Collection	-	-	+
	GR_FR157	Asparagus root	IFAPA Collection	-	-	+
	GR_FR186	Asparagus root	IFAPA Collection	-	-	+
	GR_FR215	Asparagus root	IFAPA Collection	-	-	+
<i>F. solani</i>	GR_FS1	Asparagus root	IFAPA Collection	-	-	-
<i>F. equiseti</i>	FE52	Asparagus root	IFAPA Collection	-	-	-
<i>F. fujikuroi</i> (FFSC)	BBA69741	unknown	TMW*	-	+	-
<i>F. nygamai</i> (FFSC)	FE2	Asparagus root	IFAPA Collection	-	-	-
<i>F. concentricum</i> (FFSC)	BBA69858	unknown	TMW	-	+	-
<i>F. mangiferae</i> (FFSC)	BBA69662	unknown	TMW	-	-	-
<i>F. fractiflexum</i> (FFSC)	NRRL28853	<i>Cymbidium</i> spp. (Japan)	TMW	-	+	-
<i>F. sacchari</i> (FFSC)	BBA63320	unknown	TMW	-	+	-

qPCR detección y cuantificación de especies de *Fusarium* involucradas en el ADS

---

<i>F. culmorum</i>	Fcu	unknown	IFAPA Collection	-	-	-
<i>F. sambucinum</i>	Fsam-PA	Potatoe	IFAPA Collection	-	-	-
<i>F. acuminatum</i>	TOR-28	Strawberry	IFAPA Collection	-	-	-
<i>F. circinatum</i> (FFSC)	CECT 20568	<i>Pinus</i> spp.	CECT Collection	-	-	-
<i>F. commune</i>	TOR-58	Strawberry	IFAPA Collection	-	-	-
<i>F. verticillioides</i> (FFSC)	Fver-2982	Maize seeds	IFAPA Collection	-	-	-
<i>F. avenaceum</i>	FPOST-7	Strawberry	IFAPA Collection	-	-	-
<i>F. graminearum</i>	Fgr-6478	Cereal	IFAPA Collection	-	-	-
<i>F. brachygibbosum</i>	FE175	Asparagus root	IFAPA Collection	-	-	-
<i>Phoma</i> spp.	Phe-1	Strawberry	IFAPA Collection	-	-	-
<i>Rhizoctonia</i> spp.	TOR-380	Strawberry	IFAPA Collection	-	-	-
<i>Pythium</i> spp.	TOR-239	Strawberry	IFAPA Collection	-	-	-
<i>Botrytis</i> spp.	Bot-1	Maize	IFAPA Collection	-	-	-
<i>Phytophthora</i> spp.	PF-305	Strawberry	IFAPA Collection	-	-	-
<i>Trichoderma</i> spp.	TOR-13	Strawberry	IFAPA Collection	-	-	-
<i>Colletotrichum</i> spp.	CECT 20240	Strawberry	CECT Collection	-	-	-

---

\* Technische Mikrobiologie Weihenstephan

**Supplementary Table 2.** Detection of *Fusarium* species in artificially and naturally infected asparagus plants by qPCR and tissue culturing methods.

	Plant sample†	<i>F. proliferatum</i>			<i>F. oxysporum</i>			<i>F. redolens</i>		
		Tissue culturing detection	qPCR detection	qPCR quantification (pg DNA/mg fresh tissue)	Tissue culturing detection	qPCR detection	qPCR quantification (pg DNA/mg fresh tissue)	Tissue culturing detection	qPCR detection	qPCR quantification (pg DNA/mg fresh tissue)
<i>Artificially inoculated plants</i>	PI1	+	+	599.0	-	-	-	-	-	-
	PI2	+	+	387.5	-	-	-	-	-	-
	PI3	+	+	213.5	-	-	-	-	-	-
	PI4	+	+	0.1	-	-	-	-	-	-
	PI5	+	+	230.3	-	-	-	-	-	-
	PI6	+	+	312.2	-	-	-	-	-	-
	PI7	+	+	705.9	-	-	-	-	-	-
	PI8	+	+	33.8	-	-	-	-	-	-
	PI9	+	+	0.2	-	-	-	-	-	-
	PI10	+	+	105.9	-	-	-	-	-	-
	PI11	-	-	-	+	+	11984.2	-	-	-
	PI12	-	-	-	+	+	48614.0	-	-	-
	PI13	-	-	-	+	+	251.5	-	-	-
	PI14	-	-	-	+	+	1068.3	-	-	-
	PI15	-	-	-	+	+	567.3	-	-	-
	PI16	-	-	-	+	+	672.1	-	-	-
	PI17	-	-	-	+	+	175.9	-	-	-
	PI18	-	-	-	+	+	4471.7	-	-	-
	PI19	-	-	-	+	+	2288.7	-	-	-
	PI20	-	-	-	+	+	7947.5	-	-	-
	PI21	-	-	-	-	-	-	+	+	407.8
	PI22	-	-	-	-	-	-	+	+	78.9
	PI23	-	-	-	-	-	-	+	+	173.1
	PI24	-	-	-	-	-	-	+	+	62.3
	PI25	-	-	-	-	-	-	+	+	2.0
	PI26	-	-	-	-	-	-	+	+	202.4
	PI27	-	-	-	-	-	-	+	+	632.3
	PI28	-	-	-	-	-	-	+	+	326.9
	PI29	-	-	-	-	-	-	+	+	408.6
	PI30	-	-	-	-	-	-	+	+	16.7
<i>Naturally infected plants</i>	PE1	-	-	-	+	+	7638.9	-	+	$3.5 \times 10^{-2}$
	PE2	+	-	-	-	+	153.1	-	-	-
	PE3	-	-	-	+	+	36.0	-	+	$1.3 \times 10^{-3}$

qPCR detección y cuantificación de especies de *Fusarium* involucradas en el ADS

PE4	-	-	-	-	+	$3.0 \times 10^{-2}$	-	+	$1.5 \times 10^{-2}$
PE5	-	+	6.6	+	+	180.2	-	+	$5.5 \times 10^{-2}$
PE6	-	-	-	-	+	0.3	-	-	-
PE7	-	+	73.1	+	+	236.5	-	+	$3.2 \times 10^{-3}$
PE8	-	+	$4.2 \times 10^{-2}$	-	+	0.3	-	+	$1.9 \times 10^{-3}$
PE9	-	+	$1.5 \times 10^{-3}$	-	+	0.2	-	+	$3.2 \times 10^{-4}$
PE10	-	+	$1.6 \times 10^{-2}$	-	+	$7.0 \times 10^{-2}$	-	+	$2.3 \times 10^{-3}$
PE11	-	+	$1.6 \times 10^{-3}$	-	+	$1.0 \times 10^{-2}$	-	-	-
PE12	-	+	$1.4 \times 10^{-2}$	-	+	2.8	-	-	-
PE13	+	-	-	-	+	1.7	-	-	-
PE14	-	-	-	-	+	2.2	-	-	-
PE15	-	+	$1.1 \times 10^{-2}$	-	+	0.1	-	+	$4.6 \times 10^{-5}$
PE16	+	+	156.8	+	+	2842.2	-	+	$2.3 \times 10^{-2}$
PE17	-	+	2.3	+	+	21.5	-	+	$1.1 \times 10^{-3}$
PE18	-	+	0.1	+	+	1.2	-	+	$8.2 \times 10^{-4}$
PE19	+	-	-	+	+	4.4	-	+	$5.1 \times 10^{-4}$
PE20	+	+	$5.8 \times 10^{-2}$	+	+	0.3	-	+	$1.4 \times 10^{-3}$
PE21	+	-	-	-	-	-	-	-	-
PE22	-	+	$5.6 \times 10^{-2}$	-	+	0.2	-	+	$1.7 \times 10^{-3}$
PE23	-	+	45.4	-	+	361.3	-	+	$3.4 \times 10^{-3}$
PE24	-	+	1.4	+	+	534.7	-	+	$6.1 \times 10^{-4}$
PE25	+	+	0.5	-	+	0.5	-	+	$5.0 \times 10^{-4}$
PE26	-	+	$1.4 \times 10^{-2}$	-	+	1.0	-	+	$5.5 \times 10^{-4}$
PE27	-	-	-	-	+	0.2	-	+	$2.3 \times 10^{-3}$
PE28	-	+	$9.1 \times 10^{-3}$	-	+	$9.0 \times 10^{-2}$	-	+	$1.8 \times 10^{-3}$
PE29	+	+	3.9	+	+	2.6	-	+	$9.9 \times 10^{-4}$
PE30	-	+	$1.1 \times 10^{-2}$	+	+	0.9	-	-	-

†PI: asparagus plants artificially inoculated with *F. proliferatum* (PI1-PI10), *F. oxysporum* (PI11-PI20) and *F. redolens* (PI21-PI30).  
 PE: symptomatic asparagus plants collected from asparagus fields.

## **Capítulo IV**

**Bacterias del suelo como  
potenciales agentes de control  
biológico de especies de  
*Fusarium* asociadas al síndrome  
de decaimiento del espárrago**

\*Artículo en revisión





# **Resumen de los Resultados**



## RESUMEN DE LOS RESULTADOS

### **CAPÍTULO I: Diversidad genética y compatibilidad vegetativa del complejo de especies de *Fusarium solani* de fresa en España.**

En este trabajo se caracterizaron 100 aislados del complejo de especies de *Fusarium solani* (FSSC) de suelo y plantas de fresa procedentes de viveros de Castilla y León y de campos de producción de fruto de la provincia de Huelva, para comparar la composición de especies, la variabilidad genética y la compatibilidad vegetativa de los aislados de ambas áreas productoras.

En primer lugar, mediante análisis de secuenciación multilocus, se identificaron 7 especies filogenéticas distintas pertenecientes al Clado 3 del FSSC. Las dos áreas productoras presentaron una composición de especies diferente: en viveros se detectaron las especies FSSC 2 (*F. keratoplasticum*), FSSC 5 (*F. solani sensu stricto*), FSSC 9 y una especie no descrita, que se distribuyeron en 5 grupos de compatibilidad vegetativa (VCG) distintos, correlacionados con las especies filogenéticas. Los aislados procedentes de campos de producción de fruto se agruparon en 5 especies filogenéticas, FSSC 2, FSSC 3+4 (*F. falciforme*), FSSC 5, FSSC 6 (*F. metavorans* sp. nov) y FSSC 11, distribuidas en 29 VCGs no correlacionados con los grupos filogenéticos.

Todas las especies, a excepción de FSSC 6 y FSSC 9, presentaron aislados patógenos, siendo FSSC 3 + 4 la especie que mostró el mayor porcentaje de aislados patógenos (67%), seguida de FSSC 2 (46%), FSSC 5 (37%) y la especie no descrita (17%). En viveros, las especies FSSC 2 y FSSC 5 mostraron el 100 y el 32% de aislados patógenos, respectivamente. En campos de producción de fruto, las especies patógenas FSSC 2, FSSC 3+4 y FSSC 5 presentaron un 29, 67 y 57% de aislados patógenos, respectivamente. No se observó relación entre la patogenicidad de los aislados y su origen (planta o suelo).

FSSC 5 y FSSC 2 fueron las especies más abundantes en viveros y campos de producción, respectivamente, y las únicas especies compartidas por ambas áreas de cultivo. Los análisis de diversidad genética determinaron que las poblaciones de FSSC 5 y FSSC 2 de viveros y campos de producción estaban altamente diferenciadas con una baja tasa de migración entre ambas zonas. Se definieron un total de 47 haplotipos distintos (17 de viveros y 30 de campos de producción), ninguno de los cuales fue compartido por ambas áreas productoras. Algunos aislados obtenidos de

suelo y planta presentaron el mismo haplotipo. Excepto en un caso, no se observaron fenómenos de anastomosis entre los aislados de viveros y de campos de producción de fruto. Además, se observó una mayor diversidad en la población de FSSC procedente de los campos de producción de fresa de Huelva, con un mayor número de especies filogenéticas, una mayor diversidad genética (haplotípica y nucleotídica) y mayor número de VCGs que la población procedente de viveros.

## **CAPÍTULO II: Protocolo TaqMan de PCR cuantitativa en tiempo real para la detección y cuantificación precisa de *Fusarium solani* en plantas de fresa y suelo.**

En este trabajo se desarrolló una herramienta molecular, basada en PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR) para la detección y cuantificación de las especies de FSSC pertenecientes al Clado 3 en plantas de fresa y suelo. Se diseñaron un par de cebadores y una sonda TaqMan basados en el gen del factor de elongación de la traducción 1 alfa (*EF-1 $\alpha$* ), demostrando alta especificidad y sensibilidad de detección (hasta 50 fg de ADN genómico del hongo y hasta 100 conidias/g suelo). En la reacción de qPCR, se incluyó la detección en multiplex de un control interno positivo (CIP), basado en ADN del bacteriófago lambda ( $\lambda$ ), para aumentar la fiabilidad de la detección. El protocolo fue validado sobre muestras de plantas y suelo procedentes de viveros y campos de producción de fruto de fresa, comparándolo con los métodos tradicionales de cultivo en placa, donde se comprobó su mayor fiabilidad y sensibilidad.

Se demostró la aplicabilidad de la herramienta molecular mediante la evaluación de la eficacia del tratamiento de desinfestación de suelo, a través de biosolarización con gallinaza, sobre la reducción de los niveles de FSSC en el suelo. Los suelos biosolarizados experimentaron un descenso significativo de la densidad de inóculo del hongo en el suelo tras la desinfestación, lo que correlacionó con un aumento significativo de la producción de fruto.

## **CAPÍTULO III: Potenciales fuentes de inóculo de especies de *Fusarium* involucradas en el síndrome del decaimiento del espárrago y evaluación de métodos de desinfestación de suelo mediante protocolos de qPCR.**

En este trabajo se diseñaron protocolos de qPCR para la detección y cuantificación de las principales especies de *Fusarium* involucradas en el síndrome del decaimiento del espárrago (ADS) en España: *Fusarium oxysporum*, *F. proliferatum* y *F. redolens* y se demostró su aplicabilidad en el manejo de la enfermedad.

Los cebadores y las sondas TaqMan se diseñaron en la región ITS del ADN ribosomal, en el caso de *F. oxysporum*, y en la región IGS del ADN ribosomal para *F. proliferatum* y *F. redolens*, y demostraron alta sensibilidad de detección (hasta 1-10 fg de ADN genómico del hongo y hasta 10 conidias/g suelo). En la reacción de qPCR, se incluyó la detección en multiplex de un control interno positivo, basado en ADN de  $\lambda$ , para aumentar la fiabilidad de la detección. Las qPCRs para *F. oxysporum* y *F. redolens* fueron específicas, mientras que el protocolo diseñado para *F. proliferatum* presentó una reacción cruzada con otras especies pertenecientes al mismo complejo de especies (*Fusarium fujikuroi* species complex, FFSC), filogenéticamente muy cercanas: *F. fujikuroi*, *F. concentricum*, *F. fractiflexum* y *F. sacchari*.

Estos protocolos se validaron sobre plantas de espárrago sintomáticas y muestras de suelo procedentes de campos de producción con historial de decaimiento, demostrando ser más sensibles y fiables que los métodos de detección tradicionales de cultivo en placa. El análisis de las muestras mostró que en las plantas sintomáticas las especies más abundantes fueron *F. oxysporum* y *F. proliferatum*. También en las muestras de suelo *F. oxysporum* fue predominante, seguida de *F. redolens*. Estos protocolos se aplicaron para detectar las especies patógenas de *Fusarium* en el agua de riego de fincas de espárrago con síntomas de decaimiento, aunque no se detectaron en parcelas de espárrago sin problemas de ADS. Esto sugiere que, además del material vegetal de vivero y el suelo de cultivo, el agua de riego es una fuente de inóculo de las especies de *Fusarium* causantes de ADS.

A su vez, las herramientas moleculares diseñadas se aplicaron para evaluar la eficacia de tres tratamientos de desinfestación de suelo sobre la reducción de los niveles de *F. oxysporum*, *F. proliferatum* y *F. redolens*: tratamiento químico con dazomet, biosolarización con enmiendas orgánicas de pellet de gallinaza y de pellet de *Brassica carinata*. Se demostró que la biosolarización con pellet de *B. carinata* redujo los niveles de las tres especies de *Fusarium* en el suelo con la misma eficacia que el tratamiento químico. Esta disminución se reflejó en un aumento en la producción y el rendimiento del cultivo.

## **CAPÍTULO IV: Bacterias del suelo como potenciales agentes de control biológico de especies de *Fusarium* asociadas al síndrome de decaimiento del espárrago.**

Para buscar métodos sostenibles de control del síndrome del decaimiento del espárrago, se evaluaron cinco cepas bacterianas rizosféricas pertenecientes a los géneros *Bacillus*, *Brevibacterium* y *Streptomyces* como potenciales agentes de biocontrol de aislados patógenos de *F. proliferatum*, *F. oxysporum* f. sp. *asparagi*, y *F. redolens*. Se utilizaron dos aislados patógenos por especie de *Fusarium*.

Todas las cepas bacterianas evaluadas produjeron inhibición del crecimiento micelial de los aislados fúngicos en los enfrentamientos duales *in vitro*. Las cepas que mostraron mayor antagonismo fueron *Streptomyces fradiae* Hvs6, *Bacillus velezensis* Fc37 y *B. licheniformis* Hvs2. Estas cepas fueron utilizadas en los ensayos de coinoculación de plantas de espárrago con las bacterias rizosféricas y los aislados fúngicos. Fc37 mostró el mayor efecto protector, reduciendo el porcentaje de mortalidad de las plantas inoculadas con *F. proliferatum* y *F. oxysporum* f. sp. *asparagi* y aumentando la biomasa de las plantas. La cepa Hvs2 tuvo un efecto protector intermedio, redujo la mortalidad provocada por los aislados de *F. proliferatum*, aunque en menor medida que Fc37, y tuvo cierto efecto protector para el aislado FO14 de *F. oxysporum* f. sp. *asparagi*. La cepa Hvs6 mostró un menor efecto protector, disminuyendo la mortalidad de plantas inoculadas con los aislados de *F. proliferatum*. No se observó efecto de protección contra los aislados de *F. redolens* por parte de ninguna de las cepas bacterianas ensayadas.

Fc37 fue la cepa bacteriana que produjo los mayores niveles de actividad proteasa y amilasa, y presentó actividad solubilizadora de fosfato. Hvs2 fue la cepa que produjo la mayor diversidad de actividades ensayadas, destacando en la producción de  $\beta$ -glucosidasa y celulasa, además de producir ácido cianhídrico (HCN). La cepa Hvs6 tuvo una alta capacidad de producir sideróforos. El modo de acción de estas cepas se sugiere que se realiza a través de varios mecanismos: 1) mediante la producción de enzimas hidrolíticas de la pared celular de los hongos: quitinasa,  $\beta$ -glucosidasa, proteasa, amilasa y celulasa; 2) mediante la producción de compuestos volátiles tóxicos, como el HCN; y 3) mediante la promoción del crecimiento de las plantas, facilitando la captación de nutrientes, como hierro o fósforo.

# **Discusión General**





## DISCUSIÓN GENERAL

El **Capítulo I** de esta Tesis sobre la caracterización molecular de aislados de FSSC del cultivo de la fresa, completa los estudios previos realizados en colaboración con el grupo de la Dra. Antonieta de Cal del INIA de Madrid, sobre la caracterización morfológica y patogénica de estos mismos aislados recolectados de ambas áreas de producción (Villarino y col., 2019). Los resultados de ambos estudios sugieren que el trasplante de plantas desde viveros a los campos de producción de la provincia de Huelva no es una de las principales fuentes de inóculo de FSSC. Esta afirmación viene apoyada en las siguientes evidencias: 1) la composición de especies de FSSC es distinta en viveros y en campos de producción de fruto, existiendo especies que están presentes exclusivamente en una y otra región; 2) las especies que están presentes en ambas áreas (FSSC 2 y FFSC 5) están diferenciadas genéticamente y, dentro de cada especie, no se detectó flujo genético entre las poblaciones de ambas regiones; 3) no se comparten haplotipos entre las poblaciones de viveros y de campos de producción de fresa para ninguna de las especies; 4) excepto un caso aislado, no se detectó anastomosis entre los aislados de viveros y los de campos de producción de fruto. Estos resultados confirman los obtenidos por Villarino y col. (2019), donde los caracteres morfológicos indicaron dos poblaciones diferenciadas, y los aislados de planta procedentes de los campos de producción del fruto presentaron una mayor patogenicidad. Este aumento de patogenicidad podría deberse al monocultivo intensivo de la fresa en esta zona, que potenciaría la adaptación y especialización de cepas más patógenas. A pesar de que no se encontraron evidencias de flujo genético entre las poblaciones de FSSC de las dos regiones, el material vegetal de vivero está considerado como una de las potenciales fuentes de inóculo de otros hongos patógenos de fresa (Browne y Bhat, 2011; Oliveira y col., 2017; Pastrana y col., 2017).

Por otro lado, los resultados de este trabajo sugieren que la principal fuente de inóculo de FSSC en viveros y campos de producción es el suelo de cultivo, cuya desinfección no es lo suficientemente efectiva para controlar las poblaciones de FSSC. Son varios los resultados que nos han llevado a esta conclusión: 1) se detectaron aislados patógenos tanto en plantas de fresa como en el suelo de las fincas de ambas áreas de cultivo; 2) aislados procedentes de plantas y de suelo pertenecieron a la misma especie filogenética, el mismo VCG e incluso compartieron el mismo haplotipo. Estos resultados, además, confirman otros trabajos en los que el suelo es una de las principales fuentes de inóculo de hongos fitopatógenos de fresa (Pastrana y col., 2017; Villarino y

col., 2021). La capacidad de las especies de FSSC de permanecer en el suelo por largos periodos como estructuras de resistencia dificulta enormemente su control. A ello se une la prohibición por normativa europea de la mayoría de las sustancias activas usadas tradicionalmente en el cultivo de la fresa para la desinfestación del suelo, como el bromuro de metilo. La búsqueda de alternativas sostenibles de control es, por tanto, de alta prioridad. Los estudios de control *in vitro* desarrollados con cepas de los géneros *Bacillus* y *Pseudomonas* como potenciales agentes de control biológico de aislados patógenos de FSSC en fresa, realizados por nuestro equipo de trabajo en colaboración con la Dra. Dulce N. Rodríguez del IFAPA, es una primera aproximación a la consecución de este objetivo (Rodríguez-Navarro y col., 2019) (Anexo 2).

El síndrome del decaimiento del espárrago es uno de los principales problemas fitosanitarios que tiene este cultivo en todas las áreas de producción mundial (Elena, 2007). A pesar de que el decaimiento del espárrago es considerado un síndrome en el que intervienen distintos factores, tanto abióticos como bióticos, el papel del género *Fusarium* parece tener un rol fundamental, por lo que un mayor conocimiento de la etiología de la enfermedad es indispensable para implementar las adecuadas medidas de control. Nuestro equipo de trabajo, en colaboración con el grupo del Dr. Miguel de Cara del IFAPA Centro la Mojonera y del Dr. Daniel Palmero de la Universidad Politécnica de Madrid, demostró que las principales especies de *Fusarium* involucradas en el decaimiento del espárrago en España son *F. oxysporum* f. sp. *asparagi*, *F. proliferatum* y *F. redolens* (Brizuela y col., 2020). *F. oxysporum* f. sp. *asparagi* fue la especie de *Fusarium* más abundante en el suelo y en las plantas de espárrago analizadas, lo que apoya resultados de trabajos publicados anteriormente (Blok y Bollen, 1995; Wong y Jeffries, 2006), mientras que *F. proliferatum* fue la especie más agresiva.

Los análisis filogenéticos demostraron que, a diferencia de lo que ocurre en el cultivo de la fresa, las especies patógenas de *Fusarium* presentes en las tres regiones españolas de cultivo del espárrago forman una sola población y no existe diferenciación geográfica entre ellas, a pesar de que presentan notables diferencias en cuanto a la historia del cultivo, el manejo, el uso de variedades y las características edafoclimáticas. Esto sugiere que las garras de plantación procedentes de viveros podrían ser una fuente de inóculo de estas especies. La posible transmisión de *Fusarium* sp. a través de plantas de espárrago provenientes de viveros ha sido sugerida anteriormente (Blok y Bollen, 1996; Corpas-Hervias y col., 2006). Por otro lado, el hecho de que se detectaran aislados patógenos tanto en el suelo de los cultivos, como en el rizoma de las plantas, señala al suelo como otra posible fuente de inóculo.

Los resultados obtenidos en estos trabajos en el cultivo de la fresa y el espárrago apoyan que el análisis fitosanitario previo a la plantación, tanto del material vegetal como del suelo, es altamente recomendable como medida de control preventivo. Por ello, es de gran importancia disponer de métodos de detección fiables, rápidos y que permitan el análisis de un gran número de muestras, como los que se han desarrollado en esta tesis. Se han diseñado protocolos de qPCR para la detección específica y cuantificación de las especies de *Fusarium* implicadas en la podredumbre de raíz y corona de fresa (**Capítulo II**) y el síndrome del decaimiento del espárrago (**Capítulo III**). La técnica qPCR ha sido aplicada en numerosos trabajos para la detección y cuantificación de *Fusarium* en material vegetal (Carneiro y col., 2017; Zitnick-Anderson y col., 2018) y en suelo (Pollard y Okubara, 2019; Singh y Kapoor, 2018). A su vez, en el **Capítulo III** se han utilizado los protocolos de qPCR diseñados como métodos de control preventivo y análisis de riesgo, señalando al agua de riego como otra posible fuente de inóculo de las especies involucradas en el ADS, al detectarse especies patógenas de *Fusarium* en el agua de fincas con problemas de decaimiento del espárrago. La técnica de qPCR se ha utilizado previamente para la detección de especies de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* en agua de riego del cultivo de la banana (Matthews y col., 2020), debido a que varios estudios han demostrado la dispersión de *Fusarium* spp. a través de esta vía (Moein y col., 2019; Palmero y col., 2009).

En los **Capítulos II y III** de esta Tesis ha quedado demostrada la fiabilidad y mayor sensibilidad de los protocolos de qPCR diseñados para la detección de especies de *Fusarium* en muestras vegetales y de suelo, frente a las técnicas más tradicionales de cultivo en placa. Además, las técnicas de cultivo en placa son muy laboriosas, exigen un mayor tiempo para permitir el crecimiento del cultivo, no permiten detectar los microorganismos no cultivables y requieren la colaboración de un taxónomo experto para la identificación precisa de las especies fúngicas. Por estas múltiples ventajas, los protocolos de qPCR diseñados podrán facilitar el control de la podredumbre de raíz y corona de fresa ocasionada por FSSC y del decaimiento del espárrago como medida de control preventivo y como parte de una estrategia de control integrado. Numerosos trabajos han usado también la técnica qPCR como una herramienta de diagnóstico para plantas sintomáticas y como medida de control para *Fusarium* sp. (López-Mondéjar y col., 2012; Migliorini y col., 2015).

Asimismo, se ha demostrado la aplicabilidad de los protocolos diseñados de qPCR para la evaluación de la eficacia de diversos tratamientos fumigantes de suelo sobre la disminución de las

poblaciones de *Fusarium*, y el efecto de esta reducción de inóculo en la mejora de la producción del cultivo. Diversos trabajos apoyan el uso de qPCR como una herramienta fiable para ensayar la eficacia de fumigantes del suelo (Arjona-López y col., 2020; Li y col., 2014).

Los análisis realizados demostraron el éxito de la biosolarización en la reducción de inóculo de *Fusarium* spp. en el suelo, y el aumento de la producción en los suelos tratados. La eficacia del control dependió del tipo de cultivo: 1) la biosolarización con gallinaza en el cultivo de la fresa logró una importante disminución de la densidad de inóculo de FSSC; 2) la biosolarización con pellet de *B. carinata* fue el tratamiento que consiguió la mayor reducción de inóculo de *F. oxysporum*, *F. proliferatum* y *F. redolens* en el cultivo del espárrago, con niveles similares al de la fumigación química. La biosolarización con pellet de gallinaza no obtuvo el efecto deseado en el cultivo del espárrago, quizás porque la concentración usada ( $500 \text{ g/m}^2$ ) fue inferior a la utilizada en el cultivo de la fresa ( $2.500 \text{ g/m}^2$ ) y porque en este último caso se utilizó gallinaza fresca en vez de pellet. Además, se observaron pellets de gallinaza sin descomponer en el suelo del cultivo tres años después de su aplicación. La eficacia de los tratamientos del suelo depende, junto con la dosis aplicada, de la fórmula de aplicación y de las características físicas y químicas del suelo, lo que podría estar comprometiendo el éxito del tratamiento con pellet de gallinaza en el cultivo del espárrago. La eficacia de la biofumigación con pellet de gallinaza y *Brassica* sobre *Fusarium* y otros hongos de suelo ha sido demostrada con éxito en otros trabajos (Basallote-Ureba y col., 2016; Borrego-Benjumea y col., 2014; Hanschen y Wilkenmann, 2020; Prasad y Kumar, 2017).

Las ventajas del uso de biofumigantes en lugar de fumigantes químicos para la desinfestación del suelo son evidentes, ya que evitan el uso de sustancias nocivas para el medio ambiente y la salud humana. Además, el uso de estas enmiendas es más sostenible y resulta más económico que la mayoría de los pesticidas químicos, ya que pueden usarse residuos orgánicos reciclables procedentes de la industria agrícola y pesquera (Bello y col., 2000). A esto se suma la prohibición progresiva del uso de un gran número de sustancias activas por legislación europea, puesto de manifiesto en las estrategias del Protocolo de Montreal y el Pacto Verde Europeo. Por todo ello, es indiscutible la necesidad de buscar métodos alternativos a la fumigación química para el control de los hongos del suelo.

Por ello, en el **Capítulo IV** de esta Tesis se evaluaron cepas bacterianas rizosféricas de los géneros *Bacillus*, *Brevibacterium* y *Streptomyces* como potenciales agentes de control biológico de las enfermedades provocadas por *F. proliferatum*, *F. oxysporum* f. sp. *asparagi*, y *F. redolens* en el

cultivo del espárrago. Dos de las cepas pertenecientes al género *Bacillus* (Fc37 y Hvs2) obtuvieron resultados prometedores, mostrando actividades enzimáticas y producción de compuestos determinantes del potencial de biocontrol. Estos resultados, junto con los obtenidos con el grupo de la Dra. Dulce N. Rodríguez para el control de aislados patógenos de FSSC de fresa (Rodríguez-Navarro y col., 2019), son un primer acercamiento al uso de agentes biológicos para el control de las especies de *Fusarium* responsables de la Fusariosis de la fresa y el espárrago en Andalucía.

El uso de bacterias PGPR para contrarrestar el efecto pernicioso provocado por hongos patógenos de suelo ha sido ampliamente estudiado (Abed y col., 2016; Pastrana y col., 2016; Viejobueno y col., 2021). De nuevo, la búsqueda de métodos alternativos al control químico motiva la investigación en el uso de agentes biológicos que favorecen el crecimiento de la planta o protegen a la misma de forma directa o indirecta. Este método alternativo de control es más respetuoso con el medio ambiente y la salud humana, y potencialmente más económico, ya que, si los microorganismos se establecen de forma duradera, se consigue la protección del cultivo durante un mayor número de temporadas.

## **BIBLIOGRAFÍA DISCUSIÓN**

- Abed, H., Rouag, N., Mouatassem, D., Rouabhi, A. (2016). Screening for *Pseudomonas* and *Bacillus* antagonistic rhizobacteria strains for the biocontrol of Fusarium wilt of chickpea. Eurasian J. Soil Sci. 5: 182.
- Arjona-López, J.M., Capote, N., Melero-Vara, J.M., López-Herrera, C.J. (2020). Control of avocado white root rot by chemical treatments with fluazinam in avocado orchards. Crop. Prot. 131: 105100.
- Basallote-Ureba, M.J., Vela-Delgado, M.D., Capote, N., Melero-Vara, J.M., López-Herrera, C.J., Prados-Ligero, A.M., Talavera-Rubia, M.F. (2016). Control of Fusarium wilt of carnation using organic amendments combined with soil solarization, and report of associated *Fusarium* species in southern Spain. Crop Prot. 89: 184-192.
- Bello, A., López, J.A., Sanz, R., Escuer, M., Herrero, J. (2000). Biofumigation and organic amendments. In: Regional workshop on methyl bromide alternatives for North Africa and southern European countries. UNEP, Nairobi: 113-141.
- Blok, W.J., Bollen, G.J. (1995). Fungi on root and stem bases of asparagus in The Netherlands: Species and pathogenicity. Eur. J. Plant Pathol. 101: 15-24.
- Blok, W.J., Bollen, G.J. (1996). Inoculum sources of *Fusarium oxysporum* f. sp. *asparagi* in asparagus production. Ann. Appl. Biol. 128: 219-231.
- Borrego-Benjumea, A., Basallote-Ureba, M.J., Melero-Vara, J.M., Abbasi, P.A. (2014). Characterization of *Fusarium* isolates from asparagus fields in southwestern Ontario and influence of soil organic amendments on Fusarium crown and root rot. Phytopathology 104: 403415.
- Browne, G.T., Bhat, R.G. (2011). Phytophthora crown and root rot. California Strawberry Commission, Watsonville, CA: 1-4.
- Carneiro, G.A., Matic, S., Ortu, G., Garibaldi, A., Spadaro, D., Gullino, M.L. (2017). Development and validation of a TaqMan real-time PCR assay for the specific detection and quantification of *Fusarium fujikuroi* in rice plants and seeds. Phytopathology 107: 885-892.
- Corpas-Hervias, C., Melero-Vara, J.M., Molinero-Ruiz, M.L., Zurera-Muñoz, C., Basallote-Ureba, M.J. (2006). Characterization of isolates of *Fusarium* spp. obtained from asparagus in Spain. Plant Dis. 90: 1441-1451.
- Elena, K. (2007). Asparagus diseases. Eur. J. Plant Sci. Biotechnol. 1: 76-83.
- Hanschen, F.S., Winkelmann, T. (2020). Biofumigation for fighting replant disease- A Review. Agronomy 10: 425.
- Li, Y., Mao, L., Yan, D., Ma, T., Shen, J., Guo, M., Wang, Q., Ouyang, C., Cao, A. (2014). Quantification of *Fusarium oxysporum* in fumigated soils by a newly developed real-time

- PCR assay to assess the efficacy of fumigants for *Fusarium* wilt disease in strawberry plants. *Pest. Manag. Sci.* 70: 1669-1675.
- López-Mondéjar, R., Beaulieu, R., Ros, M., Pascual, J.A. (2012). SCAR-based real-time TaqMan PCR for early detection of *Fusarium oxysporum* in melon seedlings under greenhouse nursery conditions. *Crop. Prot.* 33: 1-6.
- Matthews, M.C., Mostert, D., Ndayihanzamaso, P., Rose, L.J., Viljoen, A. (2020). Quantitative detection of economically important *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* strains in Africa in plants, soil and water. *PLoS One* 15: 1-20.
- Migliorini, D., Ghelardini, L., Tondini, E., Luchi, N., Santini, A. (2015). The potential of symptomless potted plants for carrying invasive soilborne plant pathogens. *Divers. Distrib.* 21: 1218-1229.
- Moein, S., Mazzola, M., Ntushelo, N.S., McLeod, A. (2019). Apple nursery trees and irrigation water as potential external inoculum sources of apple replant disease in South Africa. *Eur. J. Plant Pathol.* 153: 1131-1147.
- Oliveira, M.S., Amiri, A., Zuniga, A.I., Peres, N.A. (2017). Sources of primary inoculum of *Botrytis cinerea* and their impact on fungicide resistance development in commercial strawberry fields. *Plant Dis.* 101: 1761-1768.
- Palmero, D., Iglesias, C., De Cara, M., Lomas, T., Santos, M., Tello, J.C. (2009). Species of *Fusarium* isolated from river and sea water of southeastern Spain and pathogenicity on four plant species. *Plant Dis.* 93: 377-385.
- Pastrana, A., Basallote-Ureba, M., Aguado, A., Akdi, K., Capote, N. (2016). Biological control of strawberry soil-borne pathogens *Macrophomina phaseolina* and *Fusarium solani*, using *Trichoderma asperellum* and *Bacillus* spp. *Phytopathol. Mediterr.* 55: 109-120.
- Pastrana, A.M., Basallote-Ureba, M.J., Aguado, A., Capote, N. (2017). Potential inoculum sources and incidence of strawberry soilborne pathogens in Spain. *Plant Dis.* 101: 751-760.
- Pollard, A.T., Okubara, P.A. (2019). Real-time PCR quantification of *Fusarium avenaceum* in soil and seeds. *J. Microbiol. Methods* 157: 21-30.
- Prasad, P., Kumar, J. (2017). Management of *Fusarium* wilt of chickpea using brassicas as biofumigants. *Legume Res.* 40: 178-182.
- Rodríguez-Navarro, D.N., Rodríguez-Berbel, N., Galiano, M., De la Lastra, E., Barrau, C., Basallote-Ureba, M.J., Capote, N. (2019). Estudios *in vitro* de la capacidad de biocontrol de hongos y oomicetos fitopatógenos por cepas de *Bacillus* y *Pseudomonas*. *Phytoma* 311: 1-7.
- Singh, N., Kapoor, R. (2018). Quick and accurate detection of *Fusarium oxysporum* f. sp. *carthami* in host tissue and soil using conventional and real-time PCR assay. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 34: 175.
- Viejobueno, J., Albornoz, P.L., Camacho, M., de los Santos, B., Martínez-Zamora, M.G., Salazar,

- S.M. (2021). Protection of strawberry slants against charcoal rot disease (*Macrophomina phaseolina*) induced by *Azospirillum brasilense*. *Agronomy* 11: 195.
- Villarino, M., Larena, I., Melgarejo, P., De Cal, A. (2021). Effect of chemical alternatives to methyl bromide on soil-borne disease incidence and fungal populations in Spanish strawberry nurseries: A long-term study. *Pest Manag. Sci.* 77: 766-774.
- Villarino, M., De la Lastra, E., Basallote-Ureba, M.J., Capote, N., Larena, I., Melgarejo, P., De Cal, A. (2019). Characterization of *Fusarium solani* populations associated with Spanish strawberry crops. *Plant Dis.* 103: 1974-1982.
- Wong, J.Y., Jeffries, P. (2006). Diversity of pathogenic *Fusarium* populations associated with asparagus roots in decline soils in Spain and the UK. *Plant Pathol.* 55: 331-342.
- Zitnick-Anderson, K., Simons, K., Pasche, J.S. (2018). Detection and qPCR quantification of seven *Fusarium* species associated with the root rot complex in field pea. *Can. J. Plant Pathol.* 40: 261-271.



# **Conclusiones**



## CONCLUSIONES

- 1.** La composición del complejo de especies de *Fusarium solani* (FSSC) presente en las dos áreas de producción de fresa de España, viveros de producción de planta del Norte y Centro y campos de producción de fruto del Suroeste, fue distinta. *F. keratoplasticum* (FSSC 2) y *F. solani sensu stricto* (FSSC 5) fueron las únicas especies compartidas por ambas áreas de cultivo y demostraron estar altamente diferenciadas entre sí, con una baja tasa de migración entre ambas zonas, lo que sugiere que las plantas de viveros no son la principal fuente de inóculo de FSSC en las áreas productoras de fruto de fresa.
- 2.** A excepción de FSSC 6 y FSSC 9, todas las especies de FSSC detectadas presentaron aislados patógenos procedentes indistintamente de planta sintomática de fresa y suelo. Algunos de estos aislados compartieron el mismo haplotipo y pertenecieron al mismo grupo de compatibilidad vegetativa (VCG). Esto sugiere que el suelo es una importante fuente de inóculo de FSSC.
- 3.** La población de FSSC procedente de campos de producción de fruto presentó mayor diversidad genética (nucleotídica y haplotípica) y diversidad biológica (VCG). Con el conjunto de estos resultados se ha aportado un mayor conocimiento sobre la estructura de la población de FSSC en el cultivo de la fresa en España, lo que ayudará a implementar estrategias efectivas de control.
- 4.** Se han desarrollado herramientas moleculares basadas en TaqMan qPCR, en las que se ha incluido la detección de un control interno positivo en multiplex, para detectar y cuantificar las especies de *Fusarium* implicadas en la podredumbre de raíz y corona de fresa, ocasionada por FSSC, y el síndrome del decaimiento del espárrago (ADS), en el que están involucrados *F. oxysporum*, *F. proliferatum* y *F. redolens*. La gran sensibilidad, fiabilidad y reproducibilidad de los protocolos de qPCR diseñados, convierten a esta técnica en una poderosa herramienta de diagnóstico y de control preventivo de las enfermedades.
  - i.** La qPCR permite un rápido y fiable diagnóstico de plantas infectadas por estos patógenos, por lo que puede ser aplicada para la certificación del material vegetal

de vivero de fresa y de espárrago.

- ii.** Se ha demostrado que el suelo y el agua de riego son potenciales fuentes de inóculo de las especies de *Fusarium* patógenas para fresa y espárrago, por lo que estos protocolos de qPCR se pueden aplicar para el análisis de riesgo (analizando el estado fitosanitario del suelo y del agua de riego de una finca previamente a su plantación) y de predicción del rendimiento de la cosecha.
- 5.** Se ha demostrado la aplicabilidad de la técnica qPCR para la evaluación de la eficacia de métodos de fumigación de suelo mediante biosolarización con enmiendas orgánicas de gallinaza y de *Brassica carinata* como alternativa sostenible a la fumigación química. El uso de biofumigantes redujo la concentración de inóculo en el suelo de las especies de *Fusarium* causantes de la podredumbre de raíz y corona de fresa (FSSC) y del síndrome del decaimiento del espárrago (*F. oxysporum*, *F. proliferatum* y *F. redolens*), lo que se tradujo en un aumento de la producción de ambos cultivos.
- 6.** Las cepas FC37 de *Bacillus velezensis* y Hvs2 de *B. licheniformis* son potenciales agentes de control biológico de las especies de *Fusarium* asociadas al ADS, las cuales podrían ejercer su antagonismo mediante la producción de enzimas hidrolíticas de la pared celular de los hongos, la producción de compuestos volátiles tóxicos (como el ácido cianhídrico en el caso de la cepa Hvs2) y de compuestos potenciadores del crecimiento de las plantas (solubilizadores de fosfato en el caso de la cepa FC37). Su uso permitirá disponer de tratamientos de control alternativos al uso de agentes químicos.
- 7.** Un mayor conocimiento sobre los hongos causantes de las enfermedades, junto a una estrategia de control integrado, hacen que esta Tesis represente un gran avance en el control de las enfermedades provocadas por *Fusarium* en el campo andaluz, mediante el uso de técnicas más sostenibles y respetuosas con el medioambiente.

## ABREVIATURAS

<b>ADN</b>	ácido desoxirribonucleico	<b>LDPE</b>	polietileno transparente de baja densidad (en inglés)
<b>ADNr</b>	ácido desoxirribonucleico ribosomal	<b>LSU</b>	subunidad grande (en inglés)
<b>ADS</b>	síndrome del decaimiento del espárrago (en inglés)	<b>m</b>	metro
<b>ARN</b>	ácido ribonucleico	<b>MGB</b>	aglutinante del surco menor (en inglés)
<b>AUDPC</b>	área del progreso de la enfermedad bajo la curva (en inglés)	<b>min</b>	minuto
<b>BBQ</b>	blackberry quencher	<b>ML</b>	máxima probabilidad (en inglés)
<b>BSA</b>	albúmina de suero bovino (en inglés)	<b>ml</b>	mililitro
<b>CFU</b>	unidades formadoras de colonia (en inglés)	<b>MLST</b>	identificación por secuencias multilocus (en inglés)
<b>CIP</b>	control interno positivo	<b>MM</b>	medio mínimo
<b>cm</b>	centímetro	<b>mM</b>	miliMolar
<b>Ct</b>	ciclo de detección	<b>NFQ</b>	non-fluorescent quencher (en inglés)
<b>cv.</b>	cultivar	<b>ng</b>	nanogramo
<b>CZ</b>	agar czapek	<b>nM</b>	nanoMolar
<b>dNTP</b>	deoxirribonucleotido trifosfato	<b>PCR</b>	reacción en cadena de la polimersa (en inglés)
<b>EF-1<math>\alpha</math></b>	factor de elongación - 1 $\alpha$	<b>qPCR</b>	reacción en cadena de la polimersa cuantitativa (en inglés)
<b>FAOSTAT</b>	base de datos de la FAO	<b>PDA</b>	agar-patata-dextrosa (en inglés)
<b>FCRR</b>	podredumbre de corona y raíz por <i>Fusarium</i> (en inglés)	<b>pg</b>	picogramo
<b>FFSC</b>	complejo de especies de <i>Fusarium fujikuroi</i> (en inglés)	<b>PGPR</b>	rizobacteria promotora del crecimiento vegetal (en inglés)
<b>FOSC</b>	complejo de especies de <i>Fusarium oxysporum</i> (en inglés)	<b>pp</b>	páginas
<b>FRSC</b>	complejo de especies de <i>Fusarium redolens</i> (en inglés)	<b>RPB1</b>	subunidad mayor de la ARN polimerasa II
<b>FSSC</b>	complejo de especies de <i>Fusarium solani</i> (en inglés)	<b>RPB2</b>	subunidad menor de la ARN polimerasa II
<b>f. sp.</b>	forma especial (en latín)	<b>rpm</b>	revoluciones por minuto
<b>Foa</b>	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>asparagi</i>	<b>s</b>	segundo
<b>Fof</b>	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>fragariae</i>	<b>SAR</b>	resistencia sistémica adquirida (en inglés)
<b>g</b>	gramo	<b>spp.</b>	especies
<b>ha</b>	hectárea	<b>t</b>	tonelada
<b>IGS</b>	espaciador intergénico (en inglés)	<b>VCG</b>	grupo de compatibilidad vegetativa (en inglés)
<b>ITS</b>	espaciador transcrito interno (en inglés)	<b>WA</b>	agar agua (en inglés)
		<b><math>\mu</math>g</b>	microgramo
		<b><math>\mu</math>M</b>	microMolar
		<b><math>\mu</math>l</b>	microlitro



# **Anexo I**





# Especies de *Fusarium* relacionadas con el síndrome del decaimiento del espárrago en Andalucía

Eduardo de la Lastra<sup>1</sup>,  
José Ignacio Marín-  
Guirao<sup>2</sup>,  
Francisco Javier  
López-Moreno<sup>3</sup>,  
Miguel de Cara<sup>2</sup>,  
Teresa Soriano<sup>3</sup> y  
Nieves Capote<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> IFAPA Centro Las Torres, Alcalá del Río, Sevilla;

<sup>2</sup> IFAPA Centro La Mojonera, Almería;

<sup>3</sup> IFAPA Centro Camino del Purchil, Granada

\*marian.capote@  
juntadeandalucia.es

El decaimiento del espárrago es un síndrome que provoca prematuramente el agotamiento productivo de las fincas dedicadas a este cultivo e impide su replantación. En este estudio se han identificado las principales especies de *Fusarium* relacionadas con este síndrome en fincas de producción de espárrago de la provincia de Granada. *Fusarium oxysporum* fue la especie más abundante en el suelo y en las raíces de plantas afectadas. Esta especie, junto con *F. proliferatum* y *F. redolens*, fueron patógenas para espárrago, siendo *F. proliferatum* la especie más agresiva.

Palabras clave: *Asparagus officinalis*, *Fusarium proliferatum*, *F. oxysporum*, *F. redolens*, patogenicidad, decaimiento.

## El cultivo del espárrago

El espárrago comestible cultivado actualmente es un vegetal vivaz, perenne, de la familia de las liliáceas *Asparagus officinalis* var. *Atilis* L. (Serrano, 2003). La planta de espárrago está formada por tallos aéreos ramificados y una parte subterránea constituida por un tallo denominado rizoma, raíces y yemas, que en conjunto se denomina comúnmente “garra”. La parte de la planta que se comercializa como alimento son los brotes jóvenes, llamados “turiones”, que, si se dejan madurar, forman los tallos de la planta. Comercialmente se distinguen 3 tipos de espárragos cultivables en función de su color: blanco, morado y verde (**Figura 1**). Los turiones de color blanco se consiguen enterrando los nuevos brotes para evitar que la luz del sol incida en ellos y sinteticen clorofila, los verdes y morados han estado expuestos al sol, por lo que adquieren el color verde y, en el caso de los morados, acumulan también antocianinas, lo cual les da su característica tonalidad.

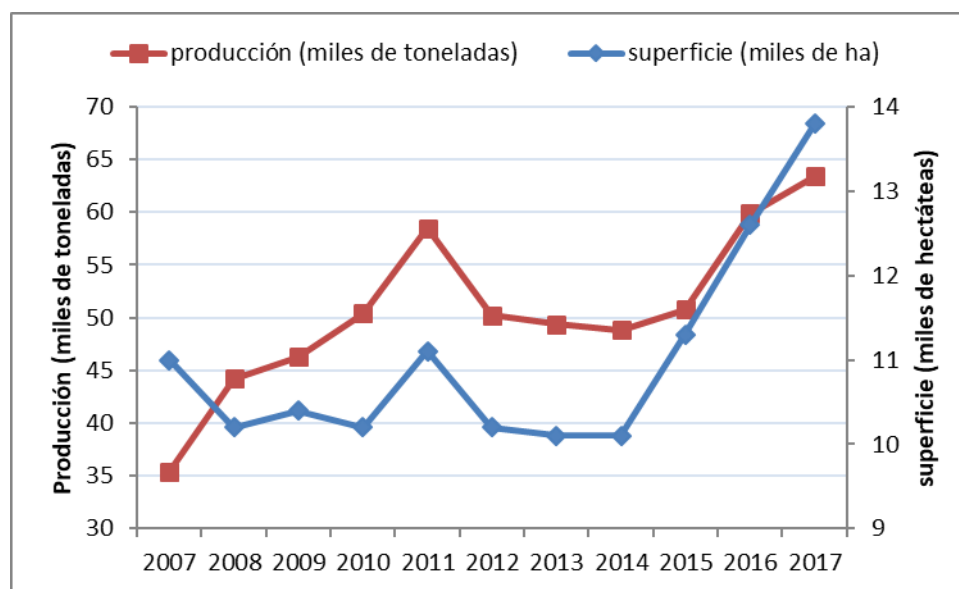


**Figura 1.** En la actualidad existen tres tipos de espárragos cultivables: morados, blancos y verdes.  
(Foto realizada por Pat Kight)

El espárrago es un alimento de alto valor nutricional y con propiedades altamente funcionales gracias a su alto contenido en antioxidantes naturales y otros componentes bioactivos (Rodríguez y col., 2005). Entre ellos destacan los ácidos fenólicos, flavonoides y ácido ascórbico (Lee y col., 2014).

El espárrago es un cultivo perenne que necesita pocos requerimientos. La fecha idónea para

establecer el cultivo es a principios de primavera y se realiza principalmente de dos formas: mediante siembra de semillas o mediante división vegetativa de las garras. Durante el verano, la planta tiene un período de acumulación de reservas, llamado desarrollo vegetativo. Cuando llega el invierno sufre una parada de su actividad y, finalmente, al entrar la primavera, produce los turiones. Una plantación es capaz de producir turiones de forma rentable durante 10 a 15 años, tras 1-3 años de establecimiento del cultivo. El cultivo del espárrago ha ido en aumento y cobrando importancia económica en España en los últimos años (**Figura 2**). Con 13.755 ha de superficie dedicada a su cultivo y 68.400 t de producción en 2018, es el quinto productor mundial y el segundo europeo, tras Alemania (FAOSTAT, 2018). Entre las regiones de España con mayor producción de este cultivo se encuentran: Andalucía con el 70% de la producción nacional (43.768 t), Castilla-La Mancha (6.961 t), Navarra (6.000 t) y Extremadura (5.028 t) (Ministerio de Agricultura Pesca y Alimentación, 2018). La provincia de Granada reúne alrededor del 70% de la superficie de cultivo de espárrago en Andalucía, con un papel destacado en los municipios de Huétor-Tájar, Ílora, Moraleda de Zafayona, Salar, Villanueva de Mesía y Loja que conforman la Indicación Geográfica Protegida (IGP) Espárrago de Huétor-Tájar.



**Figura 2.** Evolución de la superficie y producción de espárrago en los últimos años en España (Datos tomados del Anuario de Estadística, 2018).

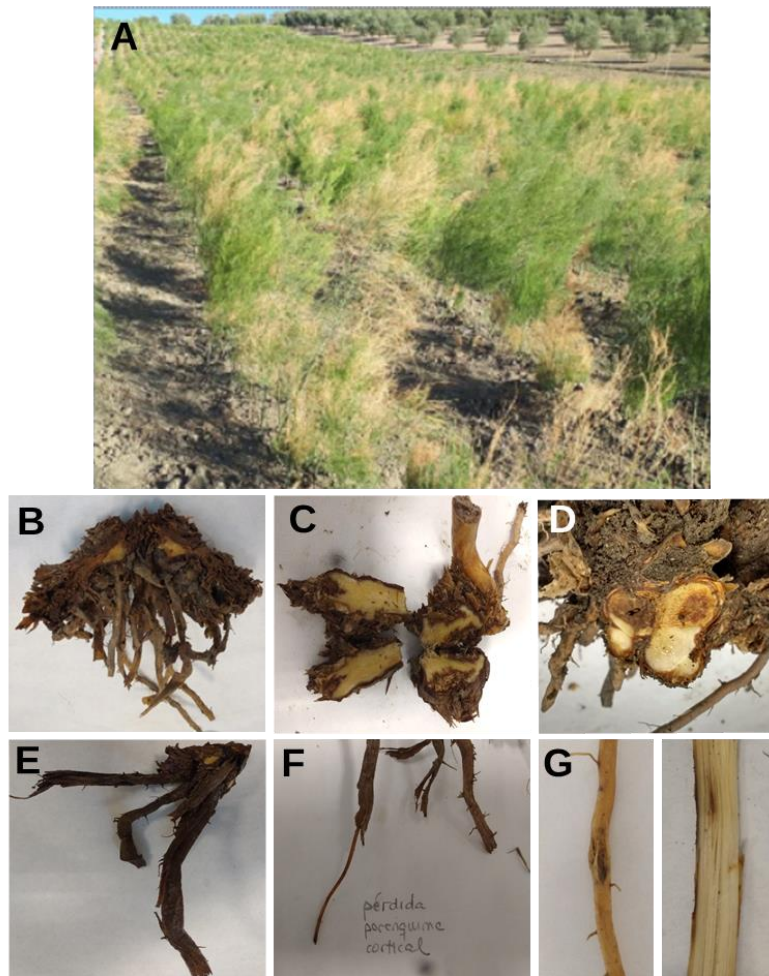
El importante aumento del cultivo de espárrago, sobre todo en Andalucía, se debe principalmente a las posibilidades de exportación, ya que la recolección de los turiones, a principios de marzo, se adelanta hasta dos meses respecto a otros países europeos como Alemania o Francia, gracias a temperaturas invernales menos severas. Además, la producción de turiones es de 1,5 a 2 veces mayor por unidad de superficie en Andalucía que en otras zonas de producción tradicionales europeas. Esto se debe a que la planta dispone de más tiempo para su desarrollo vegetativo, necesario para que la planta acumule reservas. En Andalucía el periodo vegetativo se prolonga desde mayo hasta noviembre mientras que en el resto de zonas productoras suele ser de junio a septiembre (Serrano, 1995).

El espárrago es un cultivo altamente social, capaz de generar un número considerable de empleos (recolección, embalaje y expedición del producto en fresco y en conserva), suficientes para mantener un medio rural y un futuro estable a la población. En nuestra región, además, sus labores se complementan muy bien con las de otro cultivo mayoritario, el olivar, ocupando el personal agrario a lo largo del año.

### **La problemática del cultivo del espárrago**

En las principales zonas de cultivo de espárrago se presentan cuatro problemas: el primero es la concentración de la producción de garras en viveros del centro de España que suministran la misma variedad (Grande F1) dioica, con abundantes pies femeninos, mucho menos productivos que los masculinos, y sin una trazabilidad que garantice su garantía sanitaria. El segundo problema es el control de las malas hierbas, puesto que cada vez existen menos materias activas autorizadas. En tercer lugar, la concentración de la producción en unos pocos meses que, debido a las condiciones climáticas adversas de la primavera algunos años, produce una caída de precios inasumible por los productores. Por último, el cuarto problema y el de mayor repercusión a largo plazo es el denominado síndrome del decaimiento del espárrago. Este síndrome provoca prematuramente el agotamiento productivo de las fincas dedicadas a este cultivo e impide su replantación. Fincas que podrían producir de forma rentable durante más de 10 años, deben ser levantadas antes de tiempo porque dejan de ser provechosas, con lo que se deben buscar nuevas localizaciones donde seguir desarrollando el cultivo. Además, debido al incremento que ha experimentado este cultivo en los últimos años, es menor la disponibilidad de tierras nuevas sin precedente de cultivo de espárrago y los productores se arriesgan a plantar en parcelas con historial de problemas fitosanitarios. Como

consecuencia, los síntomas de decaimiento prematuro aparecen tras 4-6 años de la plantación, o incluso antes. Son varios los factores que se han asociado a este síndrome. Entre los factores abióticos, se ha relacionado con la acumulación en el suelo de compuestos alelopáticos producidos por las propias plantas de espárrago, que pueden afectar negativamente al desarrollo de posteriores plantaciones (Blok y Bollen 1993; Schofield, 1991). Otras posibles causas del síndrome son los problemas derivados de la acumulación de residuos de herbicidas, el agotamiento de nutrientes o la alteración en la estructura del suelo (Schofield, 1991). Por otro lado, entre los factores bióticos, el síndrome se ha asociado estrechamente a la Podredumbre de rizomas y raíces (PRR), enfermedad producida por varias especies patógenas del hongo *Fusarium* (Elmer 2001; 2015). Los síntomas de esta enfermedad consisten en: reducción del tamaño de la planta, clorosis, marchitez de los frondes, podredumbres de turiones, rizomas y raíces, coloración vascular en la base del tallo y rizomas, y lesiones de color castaño en la superficie de tallos y raíces, pudiendo incluso provocar la muerte de la planta (Corpas-Hervias y col., 2006) (**Figura 3**). Estos síntomas pueden verse incrementados cuando el cultivo está sometido a factores de estrés como la plantación superficial de las garras, la sequía o suelos encharcados o con pH ácido.



**Figura 3.** Sintomatología en plantas de espárrago relacionada con la Podredumbre de rizomas y raíces (PRR) ocasionada por *Fusarium*. A) Imagen de una finca afectada; B) Garra con necrosis y escasez de raíces; C) Necrosis en corona; D) Necrosis en la base de los turiones; E) Ahuecamiento de raíces; F) Pérdida de parénquima cortical de la raíz; G) detalle de necrosis externa e interna de raíz.

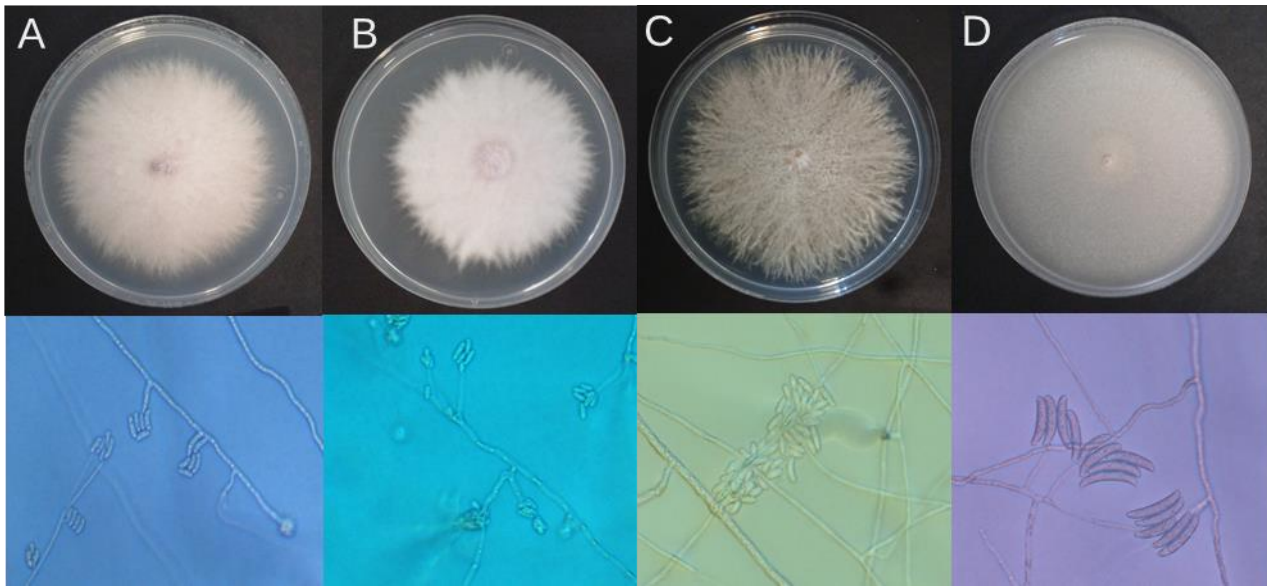
Las garras de plantación constituyen la principal vía de transmisión de la enfermedad, y juegan un importante papel en el desarrollo y la expansión de la misma (Corpas-Hervias y col., 2006; Elmer, 2001), en contraste con las semillas, cuya infección queda restringida a la superficie y, por lo tanto, puede ser fácilmente eliminada mediante desinfección de las mismas (Inglis, 1980). Sin embargo, la utilización de plantas de semillero, procedentes de semilla, retrasa la acumulación de reservas en la garra con el consiguiente retraso de dos o tres años en la entrada en plena producción. Esto hace que la forma de reproducción generalizada sea la plantación de garras con los

problemas derivados.

### **Especies de *Fusarium* involucradas en el decaimiento del espárrago**

Según los estudios realizados hasta ahora, las especies de *Fusarium* descritas como involucradas en la PRR son *Fusarium oxysporum* f. sp. *asparagi* (*Foa*), *F. proliferatum*, *F. redolens*, *F. solani* (**Figura 4**) (Baayen y col., 2000; Corpas-Hervias y col., 2006; Damicone y Manning, 1985; Elmer, 2001; LaMondia y Elmer, 1989; Schreuder, 1995) y, recientemente, *F. ershadii* (Papizadeh y col., 2018). Estas especies sobreviven en el suelo mediante estructuras de resistencia, llamadas clamidosporas, o en forma de micelio en restos de cultivo infectados (Blok y Bollen, 1996). Su distribución varía entre zonas geográficas y campos de cultivo, según las condiciones ambientales. Para evitar el uso de agentes químicos en el control de estos hongos, se han realizado diversas aproximaciones. Una de ellas es la rotación de cultivos. Se debe conocer la gama de huéspedes que pueden verse afectados por el patógeno. *F. oxysporum* f. sp. *asparagi* afecta al espárrago y al ajo, aunque puede colonizar las raíces de otros cultivos, como varias leguminosas y cereales, cebolla, girasol, patata, remolacha y zanahoria (Blok y Bollen, 1997; Molinero-Ruiz y col., 2011). Además, *F. proliferatum* y *F. solani*, patógenos de espárrago, lo son también de ajo y de cebolla (Molinero-Ruiz y col., 2011). Por tanto, es recomendable evitar rotaciones con estos cultivos. Otra estrategia de control es el uso de variedades de espárrago resistentes a estos patógenos. Sin embargo, los cultivares comerciales de espárrago tienen escasa resistencia, la obtención de cultivares tolerantes o resistentes es una tarea ardua y prolongada, y a todo ello se suma la dificultad de su obtención debido a la alta diversidad genética y patogénica de los hongos del género *Fusarium* (Blok y Bollen, 1997; Lassaga y col., 1998). Una alternativa con resultados positivos es la biosolarización del suelo mediante enmiendas orgánicas (especialmente pellet de gallinaza), capaces de disminuir los niveles de *Fusarium* en el suelo y la severidad de la enfermedad (Borrego-Benjumea y col., 2014).





**Figura 4.** Cultivo en PDA y estructuras a microscopio de aislados de *Fusarium oxysporum* f. sp. *asparagi* (A); *F. proliferatum* (B); *F. redolens* (C) y *F. solani* (D) procedentes de garras de espárrago.

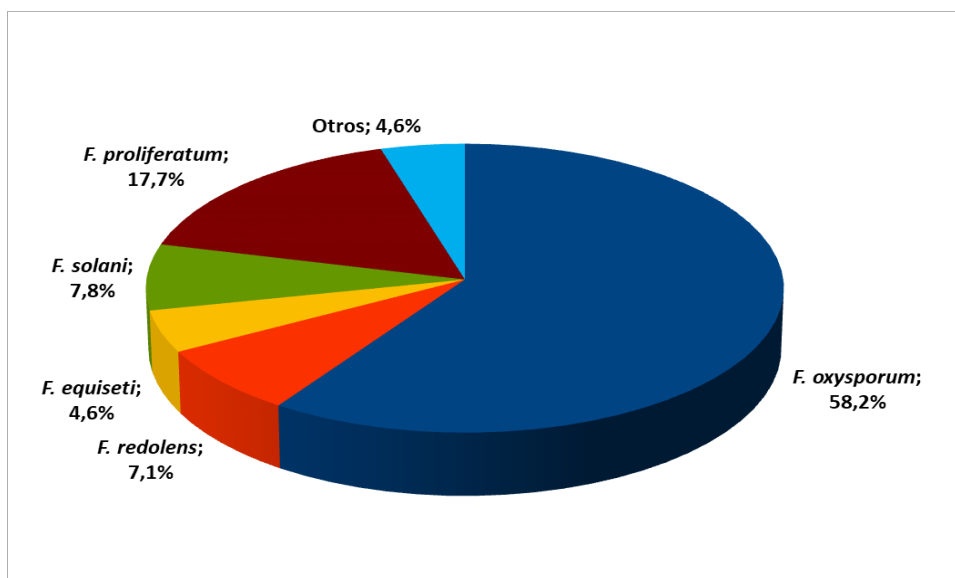
### **Caracterización de *Fusarium* en el cultivo del espárrago en la provincia de Granada**

El objetivo de este estudio fue estudiar la etiología del decaimiento del espárrago, centrándonos en las especies de *Fusarium* presentes en fincas productoras de la provincia de Granada. Se realizó una prospección tomando muestras de suelos de 19 fincas, en 15 de las cuales se tomaron también muestras de plantas sintomáticas. Las fincas fueron clasificadas atendiendo al historial de decaimiento: i) fincas no afectadas, ii) fincas con menos de cinco años de cultivo y presencia de decaimiento, y iii) fincas con más de cinco años de cultivo y presencia de decaimiento.

En cuanto a los análisis de material vegetal, de cada finca se tomaron 5-6 muestras de plantas sintomáticas. En primer lugar, se comparó la sintomatología de las garras procedentes de los tres tipos de finca. Las garras procedentes de fincas con decaimiento con más de 5 años de cultivo presentaron mayor severidad de síntomas, con mayor porcentaje de necrosis de raíz, y raíces absorbentes más cortas y escasas. Se llevaron a cabo aislamientos a partir de zonas afectadas de las garras en medio de cultivo Patata-dextrosa-agar (PDA) y posterior obtención de aislados monospóricos. Las especies de *Fusarium* se identificaron mediante observación de estructuras morfológicas a microscopio y mediante la secuenciación de dos regiones del genoma del hongo. Se



obtuvieron 295 aislados de *Fusarium* procedentes de rizomas y raíces de plantas de espárrago. Las especies más abundantes en las garras de espárrago fueron *F. oxysporum* (58,2%), *F. proliferatum* (17,7%), *F. solani* (7,8%), *F. redolens* (7,1%) y *F. equiseti* (4,6%) (**Figura 5**). Estas especies se aislaron principalmente de las raíces de reserva y absorbentes en similar proporción.



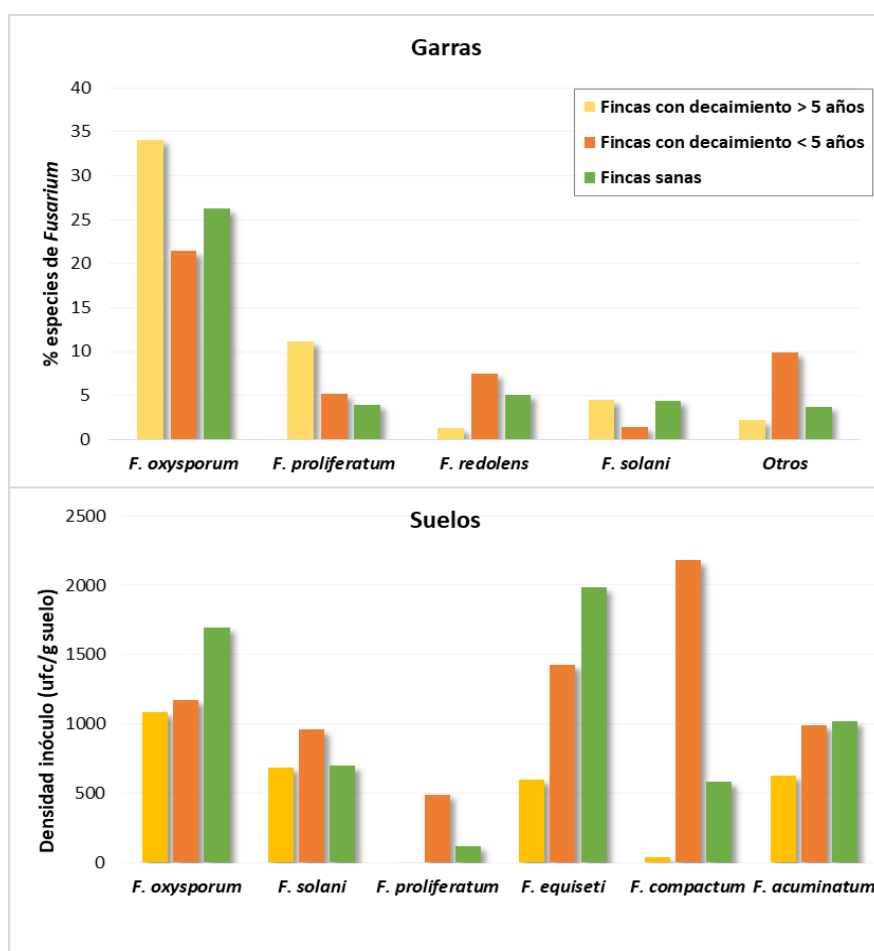
**Figura 5.** Porcentaje de especies de *Fusarium* detectadas en las garras de espárrago procedentes de las 15 fincas muestreadas en la provincia de Granada.

Respecto a la distribución de las especies de *Fusarium* según el estado fitosanitario de la finca muestreada, se observó que las fincas con decaimiento y más de 5 años de cultivo tenían mayor porcentaje de *F. oxysporum* y *F. proliferatum* que las fincas más jóvenes con decaimiento o las fincas sanas, al contrario que *F. redolens*, que apareció en un menor porcentaje en las fincas con decaimiento y más de 5 años de cultivo. La distribución del resto de las especies fue más homogénea (**Figura 6A**).

En relación a los suelos, se tomaron 10 puntos de muestreo por finca, seleccionados por estar en rodales con plantas afectadas. Las muestras se tomaron entre 5 y 30 cm de profundidad y fueron analizadas mediante la técnica de Warcup empleando medio semiselectivo de Komada, siguiendo el protocolo descrito por Tello y col. (1991). Los aislados de suelo se identificaron mediante taxonomía morfológica (Nelson y col., 1983; Gerlach y Nirenberg, 1982). En todos los suelos se detectaron *F. oxysporum* y *F. solani* con densidades de inóculo que oscilaron entre 162 y

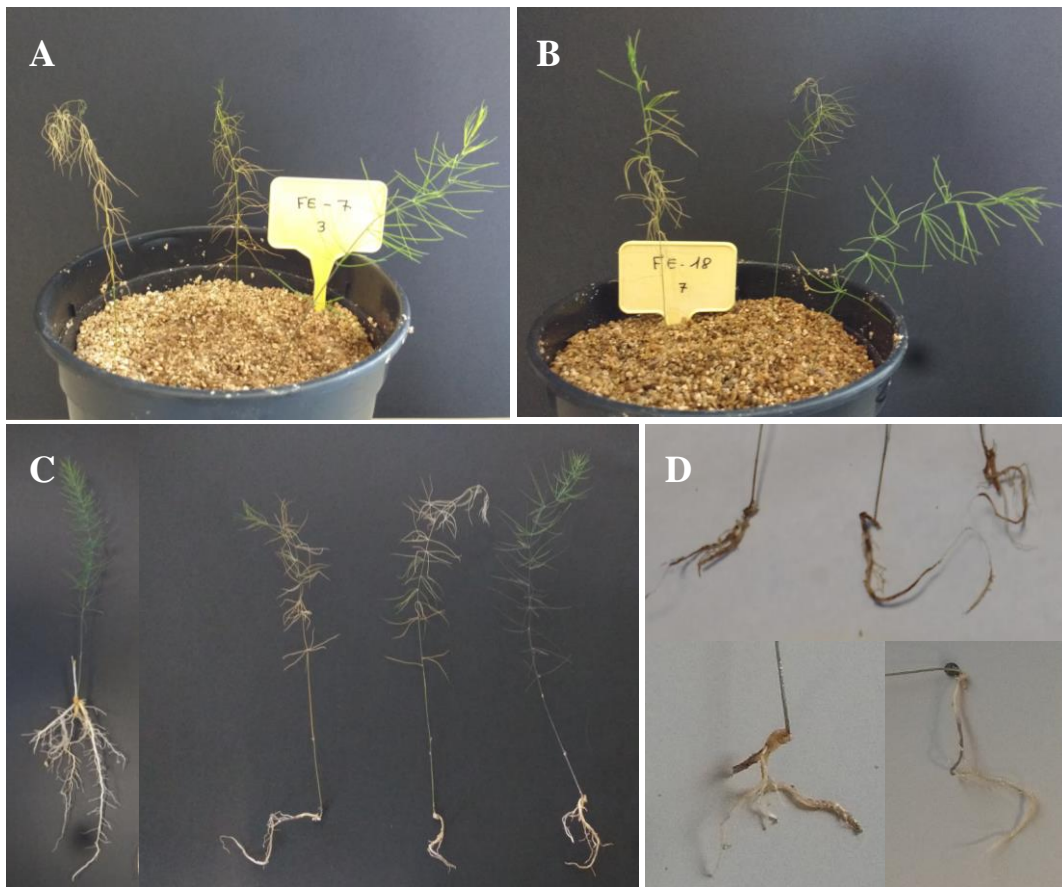
3.287 ufc/g de suelo, y 81 y 3.094 ufc/g de suelo, respectivamente. *F. equiseti* y *F. acuminatum* se presentaron en el 68% de las fincas, aunque no coincidieron siempre en las mismas, con poblaciones que oscilaron entre 1.496 y 3.796 ufc/g de suelo, y 150 y 2.771 ufc/g de suelo, respectivamente. *F. compactum* sólo se detectó en el 37% de las fincas, con poblaciones muy variables, entre 340 y 4.720 ufc/g de suelo. Por último, la menos prevalente de las especies fue *F. proliferatum* (24-2.442 ufc/g de suelo), que solo apareció en tres fincas, cada una con un historial distinto de enfermedad.

A pesar de la relativa alta presencia de *Fusarium* en los suelos analizados, y que estuvieran presentes tres especies patógenas para el cultivo de espárrago, no se ha podido relacionar la presencia de *Fusaria* patógenos con el grado de afectación de las fincas, ya que los hongos han estado presentes en las tres tipologías de finca muestreadas (**Figura 6B**).

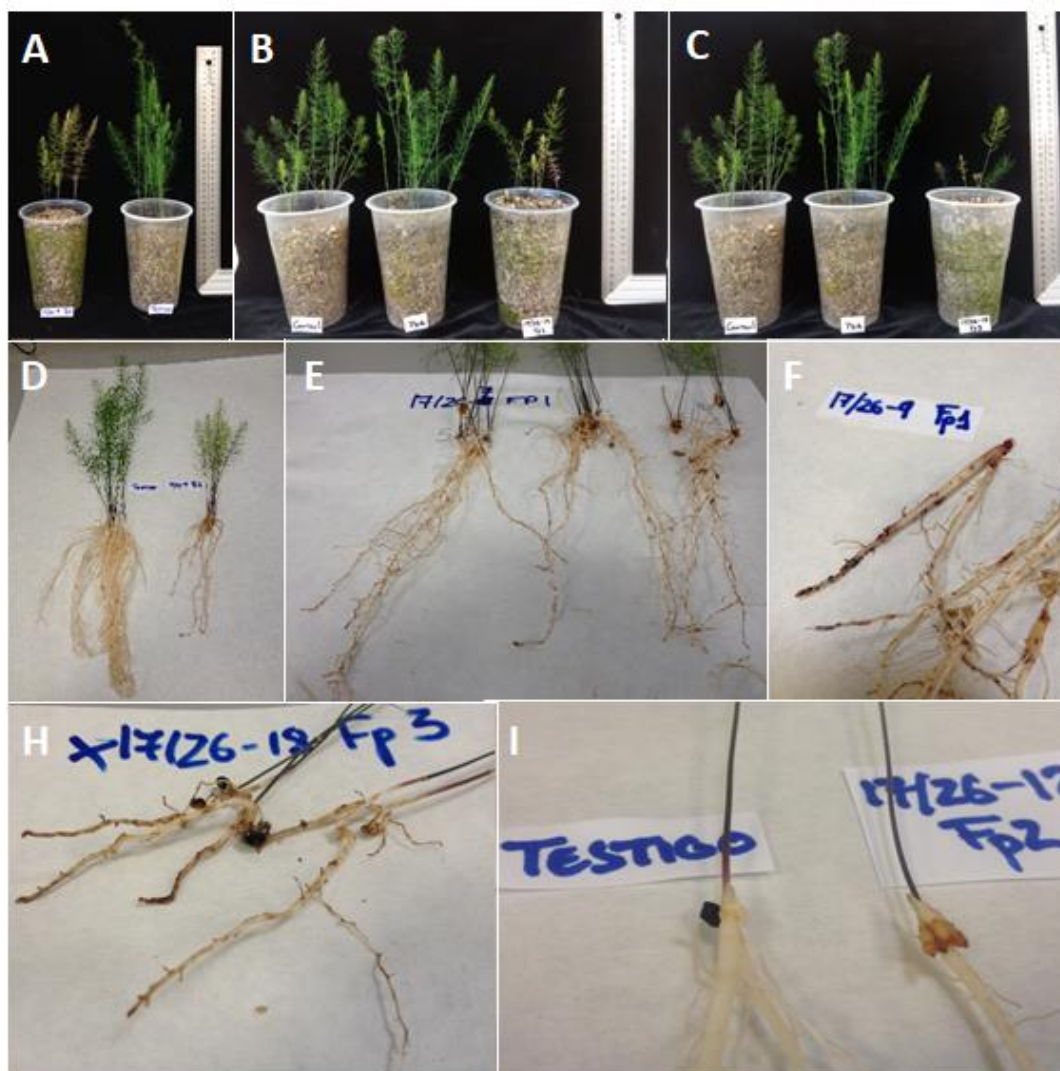


**Figura 6.** Porcentaje de detección de distintas especies de *Fusarium* en garras de espárrago (A) y densidad de inóculo en suelo (B) según el historial de síndrome de decaimiento de la finca.

Finalmente, se llevaron a cabo pruebas de patogenicidad con aislados seleccionados de cada una de las especies más abundantes, inoculando plántulas de espárrago germinadas a partir de semillas de la variedad ‘Grande F1’. Los ensayos se realizaron por duplicado, en condiciones controladas de fotoperiodo y temperatura. Respecto de los aislados de planta, el 90% de los aislados analizados de *F. proliferatum* y *F. redolens* y el 80% de los aislados de *F. oxysporum* mostraron patogenicidad. La especie más agresiva y que ocasionó los síntomas más severos y un mayor porcentaje de plantas muertas fue *F. proliferatum*, seguida de *F. oxysporum* y *F. redolens*. Estos aislados provocaron en las plantas afectadas los típicos síntomas asociados a PRR: pérdida de raíces secundarias, podredumbre de rizomas y raíces principales, lo cual se refleja en la parte aérea como clorosis de las frondes, marchitez e incluso muerte de la planta (**Figura 7**). Los aislados de *F. solani* y *F. equiseti* evaluados, no mostraron patogenicidad para la variedad de espárrago ‘Grande F1’. Respecto a los aislados de suelo, el 92,9% de los aislados estudiados de *F. proliferatum* resultaron patógenos. También lo fueron el 64,4% de los aislados de *F. oxysporum*, confirmándose la presencia de la forma patógena de espárrago en aislados obtenidos de suelo, sin contacto directo con raíces o rizomas. En las Figuras 8 y 9 se pueden apreciar los síntomas ocasionados por aislados de suelo de ambas especies. Ninguno de los aislados de suelo estudiados de *F. solani*, *F. equiseti*, *F. acuminatum*, y *F. compactum* fueron patógenos para espárrago.



**Figura 7.** Síntomas ocasionados por *F. redolens* en plantas de espárrago ‘Grande F1’ inoculadas artificialmente con el hongo, donde se aprecia A) marchitez de la planta; B) clorosis de las frondes; C) escasez de producción de raíces respecto a la planta no inoculada (izqda); D) necrosis de raíces.



**Figura 8.** Síntomas ocasionados por *Fusarium proliferatum* en plantas de espárrago ‘Grande F1’ inoculadas artificialmente con el hongo. A) B) y C) Síntomas en parte aérea, respecto a controles no inoculados; D) Síntomas en parte aérea y raíces, respecto al control no inoculado (izqda.); E) F) y H) Detalle necrosis en raíces primarias y secundarias; I) Detalle necrosis en raíces de reserva.





**Figura 9.** Síntomas ocasionados por *Fusarium oxysporum* en plantas de espárrago inoculadas artificialmente con el hongo. A) Síntomas en parte aérea y raíces, respecto al control no inoculado (izqda.); B) Necrosis alterna en raíces primarias, secundarias y de reserva, y yemas secas; C) Detalle necrosis en raíz primaria; D) Detalle necrosis en raíz primaria; E) Detalle necrosis apical en raíz de reserva; F) Detalle yemas secas respecto al control no inoculado (izqda.).

## Conclusiones

Los trabajos más profusos y recientes sobre la problemática de decaimiento del espárrago en España debida a *Fusarium* tuvieron lugar hace más de quince años. Dado el creciente interés por este cultivo y la reaparición del síndrome, parecía preceptivo describir la presencia de las distintas especies asociadas a este problema en la zona de cultivo más importante de la comunidad autónoma andaluza. En este trabajo se ha estudiado la distribución actual y patogenicidad de distintas especies de *Fusarium* detectadas en fincas de producción de espárrago según la afectación de la finca y la edad de la plantación. Las especies de *Fusarium* más abundantes en las garras de espárrago fueron *F. oxysporum* y, en menor medida, *F. proliferatum*. Ambas especies fueron más abundantes en las garras procedentes de fincas con decaimiento y más de 5 años de antigüedad que en fincas más jóvenes o fincas sanas. Se demostró la patogenicidad de *F. proliferatum* (la más agresiva), *F. oxysporum* y *F. redolens* en la variedad de espárrago ‘Grande F1’.

A pesar de que el decaimiento del espárrago es considerado un síndrome en el que intervienen distintos factores, tanto abióticos como bióticos, el papel del género *Fusarium* parece tener un rol fundamental. Como ha sido puesto de manifiesto, la presencia de aislados patógenos de *F. oxysporum* y *F. proliferatum* en los suelos, confirma la elevada persistencia y posible acumulación de estas especies en los suelos, independientemente del historial de enfermedad de la finca y de la edad del cultivo. Este hecho, unido a la dificultad de encontrar un método efectivo para su eliminación, motiva que un mayor conocimiento de la etiología de la enfermedad se antoje indispensable. Este trabajo actualiza y aumenta nuestro conocimiento sobre el síndrome del decaimiento del espárrago, lo que ayudará al desarrollo e implementación de futuras estrategias de control.

## Bibliografía citada

- Baayen, R.P., van den Boogert, P.H.J.F., Bonants, P.J.M., Poll, J.T.K., Blok, W.J., Waalwijk, C. (2000). *Fusarium redolens* f. sp. *asparagi*, causal agent of asparagus root rot, crown rot and spear rot. Eur. J. Plant Pathol. 106: 907-912.
- Blok, W.J., Bollen, G.J. (1993). The role of autotoxins from root residues of the previous crop in the replant disease of asparagus. Netherlands J. Plant Pathol. 99: 29-40.
- Blok, W.J., Bollen, G.J. (1996). Inoculum sources of *Fusarium oxysporum* f. sp. *asparagi* in asparagus production. Ann. Appl. Biol. 128: 219-231.

- Blok, W.J., Bollen, G.J. (1997). Host specificity and vegetative compatibility of Dutch isolates of *Fusarium oxysporum* f. sp. *asparagi*. *Can. J. Bot.* 75: 383-393.
- Borrego-Benjumea, A., Basallote-Ureba, M.J., Melero-Vara, J.M., Abbasi, P.A. (2014). Characterization of *Fusarium* isolates from asparagus fields in Southwestern Ontario and influence of soil organic amendments on *Fusarium* crown and root rot. *Phytopathology* 104: 403-415.
- Corpas-Hervias, C., Melero-Vara, J.M., Molinero-Ruiz, M.L., Zurera-Muñoz, C., Basallote-Ureba, M.J. (2006). Characterization of isolates of *Fusarium* spp. obtained from asparagus in Spain. *Plant Dis.* 90: 1441-1451.
- Damicone, J.P., Manning, W.J. (1985). Frequency and pathogenicity of *Fusarium* spp. isolated from first-year asparagus grown from transplants. *Plant Dis.* 69: 413-416.
- Elmer, W.H. (2001). *Fusarium* diseases of asparagus. In: *Fusarium*. Paul E. Nelson Memorial Symposium. B.A. Summerell, J.F. Leslie, D. Backhouse, W.L. Bryden, L.W. Burgess (eds.). American Phytopathological Society Press, St. Paul, MN: 248-262.
- Elmer, W.H. (2015). Management of *Fusarium* crown and root rot of asparagus. *Crop Pro.* 73: 2-6.
- Gerlach, W., Nirenberg, H. (1982). The genus *Fusarium*. A pictorial atlas. *Mitt. Biol. Bundesanst Land-Forstwirtschaft. Berlin-Dahlem*, 209: 1-406.
- Inglis, D.A. (1980). Contamination of asparagus seed by *Fusarium oxysporum* f. sp. *asparagi* and *Fusarium moniliforme*. *Plant Dis.* 64: 74-76.
- FAOSTAT. 2018. [http://www.fao.org/faostat/es/#rankings/countries\\_by\\_commodity\\_exports](http://www.fao.org/faostat/es/#rankings/countries_by_commodity_exports)
- LaMondia, J.A., Elmer, W.H. (1989). Pathogenicity and vegetative compatibility among isolates of *Fusarium oxysporum* and *F. moniliforme* colonizing asparagus tissues. *Can. J. Bot.* 67: 2420-2424.
- Lassaga, S.L., Camadro, A.L., Babinec, F.J. (1998). Assessing genetic variability for *Fusarium* resistance in three asparagus populations with an *in vitro* assay. *Euphytica* 103: 131-136.
- Lee, J.W., Lee, J.H., Yu, I.H., Gorinstein, S., Bae, J.H., Ku, Y.G. (2014). Bioactive compounds, antioxidant and binding activities and spear yield of *Asparagus officinalis* L. *Plant Foods Human Nutr.* 9: 175-181.
- Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente. 2017. Anuario de Estadística Avance 2018. 365-366 pp.
- Molinero-Ruiz, L., Rubio-Pérez, E., González-Domínguez, E., Basallote-Ureba, M.J. (2011). Alternative hosts for *Fusarium* spp. causing crown and root rot of asparagus in Spain. *J. Phytopathol.* 59: 114-116.
- Nelson, E., Toussoun, T.A., Marasas, W.F.O. (1983). *Fusarium* Species. An illustrated manual for identification. The Pennsylvania State University Press. 193 pp.



- Papizadeh, M., van Diepeningen, A.D., Zamanizadeh, H.R., Saba, F., Ramezani, H. (2018). *Fusarium ershadii* sp. nov., a pathogen on *Asparagus officinalis* and *Musa acuminata*. Eur. J. Plant Pathol. 151: 689-701.
- Rodríguez, R., Jaramillo, S., Rodríguez, G., Espejo, J.A., Guillén, R., Fernández-Bolaños, J., Herredia, A., Jiménez, A. (2005). Antioxidant activity of ethanolic extracts from several asparagus cultivars. J. Agric. Food Chem. 53: 5212-5217
- Schofield, P.E. (1991). Asparagus decline and replant problem in New Zealand. New Zeal. J. Crop Hort. 19: 213-220.
- Schreuder, W., Lamprecht, S.C., Marasas W.F.O., Calitz, F.J. (1995). Pathogenicity of three *Fusarium* species associated with asparagus decline in South Africa. Plant Dis. 79: 177-181.
- Serrano, Z. (1995). Cultivo del espárrago verde forzado en macrotúnel e invernadero. Junta de Andalucía. Consejería de Agricultura y Pesca n.º 34/95.
- Serrano, Z. (2003). El espárrago: técnicas de producción. Impresos Izquierdo S.L. Madrid. 280 pp.
- Tello, J.C., Vares, F., Lacasa, A. (1991). Análisis de muestras. En: Manual de Laboratorio. Diagnóstico de Hongos, Bacterias y Nematodos Fitopatógenos. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Madrid: 39-72.



## **Anexo II**



# Estudios *in vitro* de la capacidad de biocontrol de hongos y oomicetos fitopatógenos por cepas de *Bacillus* y *Pseudomonas*

Dulce N. Rodríguez-Navarro\*, Natalia Rodríguez-Berbel, María Galiano, Eduardo de la Lastra Alcalde, Carmen Barrau, M<sup>a</sup> José Basallote-Ureba y Nieves Capote  
IFAPA, Centro Las Torres, Alcalá del Río, Sevilla. dulcenombre.rodriguez@juntadeandalucia.es

Debido a la creciente prohibición de la mayoría de los fumigantes y otros agroquímicos para el control de plagas y enfermedades de plantas, es obligada la búsqueda de alternativas más respetuosas con el medio ambiente sin que eso conlleve una reducción de los rendimientos de los cultivos. El empleo de microorganismos como agentes de biocontrol es una práctica agrícola emergente que tendrá una gran implementación en un futuro inmediato, como alternativa al empleo de pesticidas y fungicidas químicos. Los resultados demuestran que mediante el uso de determinadas cepas bacterianas de los géneros *Bacillus* y *Pseudomonas* es posible un control muy eficaz del desarrollo *in vitro* de determinados agentes patógenos de plantas; como el hongo *Fusarium solani*, patógeno de fresa, o los oomicetos *Phytophthora cinnamomi* y *Pythium spiculum*, involucrados en la 'seca' de encinas y alcornoques.

Palabras clave: *Fusarium solani*, oomicetos, *Pseudomonas*, *Bacillus*, biocontrol.

## Introducción

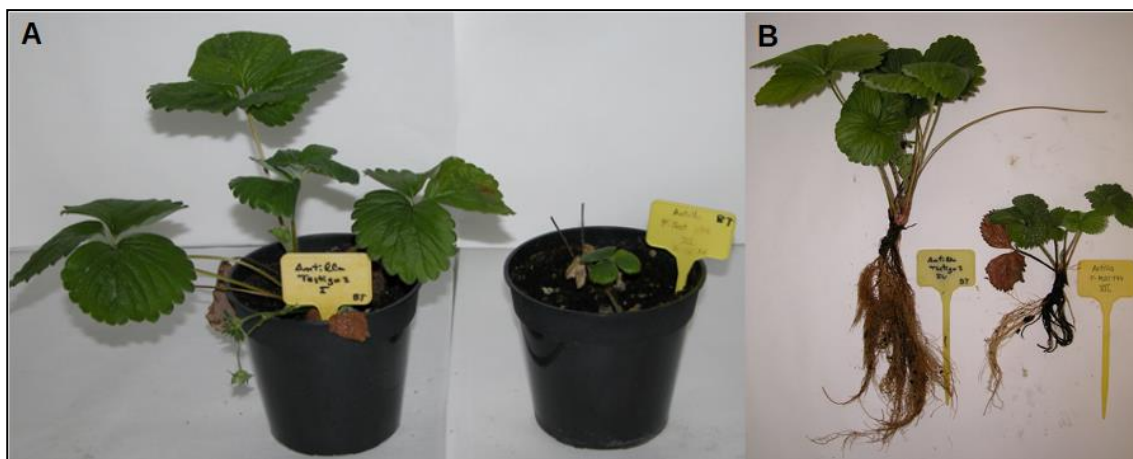
La necesidad de encontrar prácticas alternativas al control químico en la lucha contra agentes fitopatógenos, ha ido incrementándose en los últimos años, debido a la creciente prohibición de compuestos químicos de síntesis y a una mayor sensibilidad social con respecto al daño medioambiental que éstos ocasionan. Con el objetivo global de la conservación de la salud medioambiental y el específico de mantener la rentabilidad económica de los cultivos, se están introduciendo en la actividad agraria nuevas estrategias de control de las enfermedades. Una de las alternativas más importantes es la utilización de microorganismos rizosféricos, principalmente bacterias y hongos, con probada actividad de biocontrol (Bhattacharyya y Jha, 2012).

El aislamiento de microorganismos antagonistas (bacterias y hongos) de otros patógenos se realiza, en general, a partir de muestras de suelo, suelo rizosférico (la capa de suelo íntimamente ligada a las raíces) u otras fuentes, por ejemplo, agua y órganos vegetales (tanto de la filosfera como endófitos). Una vez purificados en el laboratorio, se estudian en ellos determinadas actividades enzimáticas y/o la producción de ciertos metabolitos que permiten clasificarlos como potenciales ‘agentes de biocontrol’. Los géneros bacterianos *Bacillus* y *Pseudomonas* destacan por su capacidad de biocontrol (Mardanova y col., 2017; Triverdi y col., 2008).

En muchas ocasiones, un mismo microorganismo con capacidad de biocontrol también puede clasificarse como ‘promotor del crecimiento vegetal’ debido a otras propiedades, como la producción de hormonas vegetales o la solubilización de fósforo; no obstante, el control de patógenos puede considerarse un mecanismo indirecto de promoción del crecimiento vegetal (Beneduzi y col., 2012).

Tanto el cultivo intensivo de producción de fresa, como el sistema extensivo de dehesa son de gran importancia en Andalucía y se encuentran amenazados por la presencia de hongos y oomicetos patógenos en el suelo. *Fusarium solani* (Mart.) Sacc. es un hongo de suelo patógeno de más de cien especies de plantas. Se ha descrito como patógeno en las dos fases del cultivo de la fresa en España: en viveros de altura, donde se cultivan las plantas de fresa en suelos al aire libre en condiciones agroclimáticas adecuadas para su desarrollo vegetativo, y en campos de producción de fruto, donde son trasplantadas las plantas procedentes de vivero y tiene lugar su desarrollo y fructificación (Redondo y col., 2012; Pastrana y col., 2014a). Los síntomas provocados por *F. solani* consisten en enanismo, marchitez, necrosis de corona y muerte ocasional de la planta (**Figura 1**). La emergencia de este patógeno en campos de fresa puede deberse, por un lado, a la retirada de la

mayor parte de las sustancias activas que se utilizaban en el cultivo de la fresa como fumigantes de suelo para combatir las plagas y enfermedades que le afectan (Pastrana y col., 2014b), y por otro, a la gran versatilidad y capacidad adaptativa de *F. solani* que tiene, entre otras características, la capacidad de sobrevivir en suelo en forma de estructuras de resistencia durante largos periodos de tiempo.



**Figura 1.** Síntomas de enanismo (A) y escaso desarrollo de raíces (B) en plantas de fresa inoculadas con *Fusarium solani*. A la izquierda se muestran las plantas control sin inocular y a la derecha las plantas inoculadas.

Con el término ‘seca’ se designa comúnmente a una enfermedad que provoca el decaimiento y muerte de las encinas y alcornoques en dehesas y montes. Normalmente se habla de seca en referencia a los síntomas que se observan en la parte aérea de los árboles, ya que la enfermedad provoca la pérdida progresiva de las hojas, con síntomas parecidos a los de la sequía (**Figura 2**). La mayoría de los expertos coinciden en el origen multifactorial de esta enfermedad (episodios de sequía, contaminación atmosférica o del suelo, manejo inadecuado, agentes biológicos patógenos, etc.) (Duque-Lazo y col., 2018). Entre los agentes biológicos asociados con la seca se han aislado e identificado los oomicetos *Phytophthora cinnamomi* y varias especies de *Pythium*. Además, *P. cinnamomi* ataca a más de mil especies vegetales, entre las que se encuentran muchas especies forestales (castaños, robles y diversas coníferas), así como frutales (aguacates, mangos) y plantas ornamentales (azaleas y brezos) (Zentmyer, 1983).



**Figura 2.** Encina afectada por el síndrome de la seca. (Solla, A.)

El objetivo de este estudio ha sido evaluar *in vitro* el efecto de cinco cepas de bacterias rizosféricas (dos pertenecientes al género *Bacillus* y tres a *Pseudomonas*) sobre el control del hongo *F. solani*, patógeno de fresa y de dos oomicetos, *Phytophthora cinnamomi* y *Pythium spiculum*, asociados a la seca de la dehesa. Para ello, se han llevado a cabo enfrentamientos duales *in vitro* y se ha determinado la tasa de esporulación de *F. solani* en presencia de las cepas bacterianas. Asimismo, se han determinado las actividades enzimáticas de estas cepas: celulasa,  $\beta$ -glucanasa, proteasa, amilasa, quitinasa y producción de ácido cianhídrico (HCN), como actividades determinantes del potencial de biocontrol.

## **Materiales y Métodos**

### *Microorganismos con acción de biocontrol de patógenos*

La descripción de los microorganismos potenciales agentes de control biológico y patógenos empleados se muestra en las Tablas 1 y 2. Se han utilizado dos cepas de *Bacillus* (BPA4 y RBA302) y tres cepas de *Pseudomonas* (RBA83, AMG66 y AMG77) del Departamento de Microbiología de



la Universidad de Sevilla (cedidas por el Prof. J. Ollero). Rutinariamente las cepas bacterianas se cultivan en medio agar nutritivo y se preservan a  $-70^{\circ}\text{C}$  en una solución peptona-glicerol. Se emplearon dos aislados de *F. solani*: TOR-393 (aislado procedente de planta enferma de una finca de producción de fresa de Palos de la Frontera, Huelva) y TOR-725 (procedente de suelo de fincas de producción de fresa de Moguer, Huelva). Los aislados de *Phytophthora cinnamomi* utilizados fueron: CECT2965 (Colección Española de cultivos Tipo), MYC 003 (Centro de Investigación y Ciencias Tecnológicas de Extremadura, CICYTEX) y PE 90 (CICYTEX). El aislado de *Pythium spiculum* fue cedido por la Universidad de Córdoba. Los aislados de *Fusarium* y los oomicetos se mantuvieron rutinariamente en medio APD (Agar-Patata-Dextrosa).

**Tabla 1.** Descripción de las bacterias empleadas y sus actividades metabólicas.

Cepas	Especie	Actividades enzimáticas					
		Celulasa	Proteasa	Lipasa	$\beta$ -glucosidasa	Amilasa	Ácido cianhídrico (HCN)
<b>BPA4</b>	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	+++	+++	-	++	++	-
<b>RBA302</b>	<i>Bacillus aryabhattai</i>	-	-	+	-	-	-
<b>RBA83</b>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	++	+	+++	-	++
<b>AMG66</b>	<i>Pseudomonas sp. (brassicacearum)</i>	-	+	nd	-	-	+++
<b>AMG77</b>	<i>Pseudomonas sp. (lini)</i>	-	+	nd	-	-	+++

**Tabla 2.** Aislados de *Fusarium solani* y de oomicetos empleados.

Especie	Aislado	Origen
<i>Fusarium solani</i>	TOR-393	Fresa (Huelva)
<i>Fusarium solani</i>	TOR-725	Suelo (Huelva)
<i>Phytophthora cinnamomi</i>	CECT2965	Castaño
<i>Phytophthora cinnamomi</i>	MYC 003	Alcornoque, CICYTEX*
<i>Phytophthora cinnamomi</i>	PE 90	Encina, CICYTEX
<i>Pythium spiculum</i>	PA 54	Alcornoque, UCO**

(\*) Centro de Investigación y Ciencias Tecnológicas de Extremadura

(\*\*) Universidad de Córdoba

*Enfrentamientos duales in vitro (ensayos de biocontrol)*

Se realizaron enfrentamientos duales (hongo u oomiceto vs. bacteria) en placas de Petri conteniendo medio APD. En el centro de la placa se depositó un disco de 5 mm de diámetro del micelio del hongo u oomiceto a ensayar, procedente de una placa de APD de siete días de incubación. A las 48 horas de incubación a 25°C en oscuridad, se depositaron cuatro gotas (15 µl) del cultivo bacteriano ( $10^8$  bacterias/ml) a ensayar (*Bacillus* o *Pseudomonas*), distribuidas en forma radial, a 3 cm de la zona de desarrollo del hongo. La cuantificación del desarrollo del hongo en presencia de la bacteria y en placas control (sin bacterias) se realizó a los tres, cinco, siete y nueve días de incubación. En cada ensayo se incluyeron cinco repeticiones (placas individuales) por tratamiento. Al final del ensayo, se determinó el diámetro de la colonia del hongo u oomiceto (en el caso de que ésta sea circular), o bien del eje mayor y menor, si se trata de un crecimiento romboidal para la estimación del área. Una vez calculada el área de crecimiento (círculo o rombo), se estimaron los porcentajes de inhibición inducidos por las bacterias, en relación a las placas control, al final del periodo de incubación. Para facilitar la lectura y el seguimiento de los datos, en las Tablas de este trabajo figuran los datos de las áreas de desarrollo de los hongos u oomicetos en presencia de las bacterias a lo largo del tiempo y se calcularon las tasas de crecimiento.

*Tasa de esporulación de aislados de Fusarium solani*

Se tomaron cuatro discos (5 mm de diámetro) de la zona de crecimiento de los aislados de *F. solani* que enfrenta a las bacterias, se colocaron en un tubo de ensayo y se añadieron 5 ml de agua destilada estéril. Los tubos se sonicaron durante 10 min a máxima potencia. En una cámara de Thoma se realizó el recuento total de conidias, por duplicado, en cuatro repeticiones individuales. La concentración medida como conidias/mm<sup>2</sup>, se estimó tras dividir el conteo total por la superficie de los cuatro discos (Área = 78,54 mm<sup>2</sup>).

*Determinación de actividades enzimáticas de las cepas bacterianas*

Producción de enzimas celulolíticas (Celulasas): como sustrato se empleó carboximetil celulosa (CMC) sódica al 0,5% como única fuente de carbono. Tras sembrar las cepas bacterianas en el medio de cultivo con CMC, las placas se incubaron cinco días a 28°C. Las placas se revelaron, tras su inundación, con una solución de Rojo Congo (1 mg/ml) durante quince minutos. Pasado este

tiempo, se eliminó el colorante y se inundó la placa con NaCl 1 M durante quince minutos. Tras eliminar la solución de NaCl, la aparición de un halo de color claro alrededor del crecimiento, correspondiente al halo de degradación, indica que la prueba es positiva (Teather y Wood, 1982) (**Figura 3A**).

Producción de enzimas  $\beta$ -Glucosidasas: se empleó el medio agar LB + 0,1% esculina + 0,05% de Citrato de hierro amónico. Se sembró una gota de 10  $\mu$ L de un cultivo fresco de la cepa a ensayar en una placa. Se incubaron las placas a 30° C durante 24 h o hasta que se observó crecimiento. Las cepas en las que se observa la aparición de un halo negro, debido a la formación de esculetina con los iones Fe presentes en el medio de cultivo, se consideran positivas para  $\beta$ -glucosidasa (Gong y col., 2012).

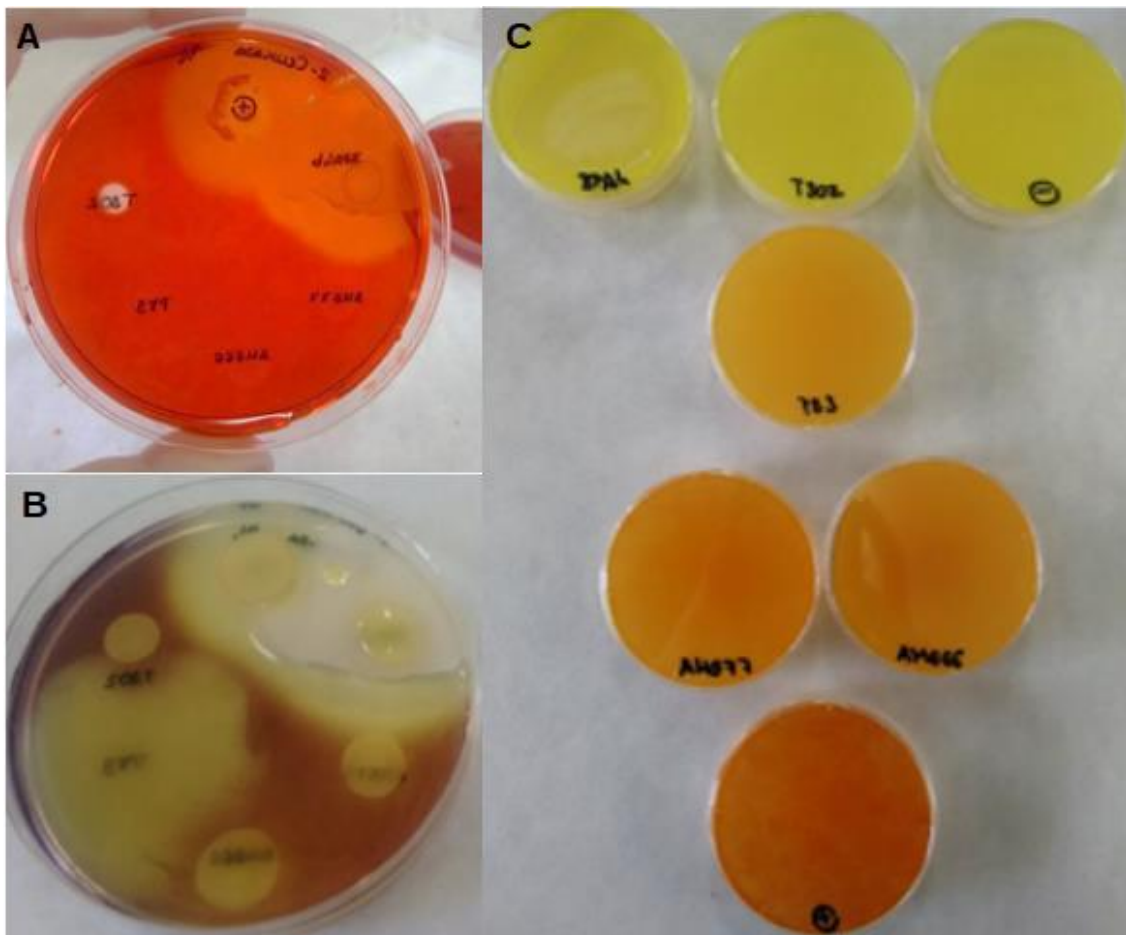
Producción de enzimas Proteasas/Peptidasas: la capacidad para hidrolizar la caseína se determinó de acuerdo con la metodología descrita en el manual de Harley y Prescott (2002). Las cepas se sembraron en el medio agar-caseína. Las placas se incubaron cinco días a 28°C. Esta prueba es de lectura directa, la hidrólisis de la caseína provoca la aparición de halos transparentes alrededor de la zona de crecimiento bacteriano, que contrasta con el medio de cultivo de color blanco.

Producción de enzimas Amilasas: se realizó en placas de medio agar NB (0,8 %) + 1 % almidón soluble. Se sembró una alícuota de 15  $\mu$ L de un cultivo fresco de cada bacteria. Las placas se incubaron a 28° C durante un periodo de tres a siete días. Transcurrido este tiempo, las placas se inundaron con una solución de Lugol. Se considera como resultado positivo, la aparición de un halo alrededor de la colonia (Cowan y Steel, 1965) (**Figura 3B**).

Producción de enzimas Quitinasas: las cepas bacterianas se sembraron e incubaron a 28°C durante siete días en placas con medio mínimo suplementado con quitina coloidal; la formación de un halo transparente de degradación, alrededor de la zona de crecimiento bacteriano, se considera un resultado positivo (Gong y col., 2012).

Producción de Cianuro o ácido cianhídrico (HCN): para la detección cualitativa de HCN se empleó el Medio King B modificado o Agar para el aislamiento de *Pseudomonas* suplementado con glicina (4,4 g/L). Se sembró una alícuota de 10  $\mu$ L de un cultivo fresco del microorganismo a testar en el centro de la placa. Posteriormente, se colocó sobre la tapa de la placa de Petri un papel de filtro esterilizado, saturado con una solución de ácido pícrico: 2,5 g/L ácido pícrico y 12,5 g/L carbonato de sodio. Tras sellar la placa con parafilm, las placas se incubaron a la temperatura

óptima de crecimiento del microorganismo a testar por un periodo de tres a siete días. Un cambio en el color del papel de filtro-ácido pícrico de amarillo a naranja, rojo, marrón o a marrón-rojizo se considera como resultado positivo débil (+), moderado (++) o fuerte (+++). (Bakker y Schippers, 1986) (Figura 3C).



**Figura 3.** Determinación de la actividad enzimática de las bacterias. (A) Producción de celulasa; (B) Producción de amilasa; (C) Producción de ácido cianhídrico. (Rodríguez-Berbel, N.)

## Resultados y Discusión

### *Control del desarrollo de aislados de Fusarium solani*

Todas las bacterias empleadas fueron capaces de controlar el desarrollo de ambos aislados de *F. solani*, aunque se observaron claras diferencias dependiendo de la combinación *Fusarium-*

bacteria, tanto en la capacidad de reducir el desarrollo miceliar como en el control de la esporulación.

En relación al aislado TOR-725, los mejores resultados de inhibición del crecimiento se alcanzaron con las estirpes de *Pseudomonas* RBA83 y AMG66 (77 y 67%, respectivamente) (Tabla 3a). Además, AMG66 redujo significativamente la esporulación de TOR-725, respecto al control (Tabla 3a, anexo). La cepa BPA4 de *B. amyloliquefaciens* presentó un menor porcentaje de inhibición (<50%) del aislado de *Fusarium* TOR-725, a pesar de sintetizar diferentes enzimas relacionadas con el potencial de biocontrol fúngico (celulasa (la única cepa que exhibió esta actividad),  $\beta$ -glucosidasa, proteasa y amilasa). En concordancia con los resultados del aislado TOR-725, las estirpes AMG66 y RBA83 fueron también las más eficaces en el control del aislado TOR-393 (**Figura 4A**); no obstante, el control de BPA4 sobre TOR-393 es semejante (80% de inhibición) al de la estirpe AMG66 de *Pseudomonas* (77% de inhibición) (Tabla 3b). No se encontraron diferencias significativas en la esporulación de TOR-393 en presencia de las bacterias. Cabe destacar que sólo las estirpes del género *Pseudomonas* produjeron HCN. Además, trabajos previos han demostrado que las cepas AMG de *Pseudomonas* son capaces de inhibir el crecimiento de *Fusarium oxysporum* entre otros hongos fitopatógenos (comunicación personal del Prof. J. Ollero).

**Tabla 3a.** Desarrollo miceliar de *Fusarium solani* TOR-725 en presencia de bacterias.

Cepa bacteriana	Área de crecimiento del micelio (mm <sup>2</sup> )			Tasa de crecimiento (mm <sup>2</sup> /día)
	Día 2	Día 5	Día 8	
<b>Control</b>	18,52 ± 7,65 a	41,07 ± 3,16 a	56,74 ± 0,0 a	7,64 R <sup>2</sup> (0,99)
<b>BPA4</b>	6,34 ± 0,20 b	19,22 ± 1,05 b	29,48 ± 2,07 bc	3,85 R <sup>2</sup> (0,92)
<b>RBA302</b>	7,11 ± 0,15 b	18,92 ± 0,63 b	26,32 ± 1,67 c	3,20 R <sup>2</sup> (0,92)
<b>RBA83</b>	6,67 ± 0,16 b	10,35 ± 0,38 c	12,99 ± 1,04 e	1,05 R <sup>2</sup> (0,79)
<b>AMG66</b>	5,19 ± 0,12 b	11,13 ± 1,02 c	18,88 ± 2,07 d	2,28 R <sup>2</sup> (0,81)
<b>AMG77</b>	6,16 ± 0,15 b	16,88 ± 0,54 b	31,55 ± 1,12 b	4,23 R <sup>2</sup> (0,97)

Dentro de cada columna, los datos seguidos de la misma letra no difieren significativamente, test LSD  $P < 0,05$ .

**Anexo Tabla 3a.** Esporulaci3n de *Fusarium solani* TOR-725 en presencia de bacterias.

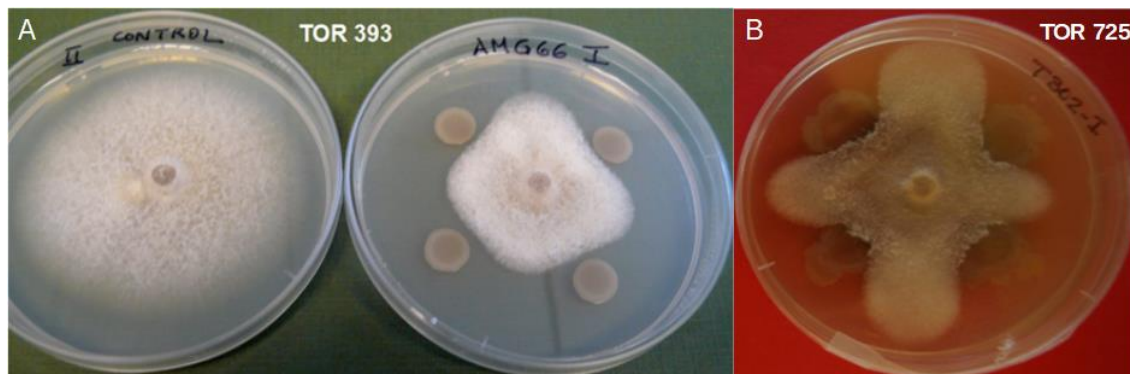
<b>TOR-725 Esporulaci3n (conidias/mm<sup>2</sup>) x 100</b>					
<b>Control</b>	<b>BPA4</b>	<b>RBA302</b>	<b>RBA83</b>	<b>AMG66</b>	<b>AMG77</b>
94,7 ± 7,1 ab	121 ± 13,6 a	88,8 ± 9.9 abc	63,2 ± 9,3 bc	54,9 ± 7,1 c	122 ± 10,7 a

Los datos seguidos de la misma letra no difieren significativamente, test LSD  $P < 0,05$ .

**Tabla 3b.** Desarrollo micelial de *Fusarium solani* TOR-393 en presencia de bacterias.

<b>Cepa bacteriana</b>	<b>Área de crecimiento del micelio (mm<sup>2</sup>)</b>		<b>Tasa de crecimiento (mm<sup>2</sup>/día)</b>
	<b>Día 5</b>	<b>Día 8</b>	
<b>Control-I</b>	39,04 ± 0,39 a	56,75 ± 0.0 a	5,90 R <sup>2</sup> (0,99)
<b>BPA4-I</b>	10,04 ± 0,77 c	11,31 ± 0,85 c	0,85 R <sup>2</sup> (0,32)
<b>RBA302-I</b>	16,53 ± 0,11 b	19,82 ± 0,43 b	1,10 R <sup>2</sup> (0,90)
<b>AMG66-I</b>	9,75 ± 0,18 c	13,0 ± 0,33 c	1,08 R <sup>2</sup> (0,92)
	<b>Día 7</b>	<b>Día 12</b>	
<b>Control-II</b>	6,45 ± 0,37 a	56,75 ± 0,0 a	10,06 R <sup>2</sup> (0,99)
<b>AMG77-II</b>	5,20 ± 0,31 b	13,01 ± 0,68 b	1,57 R <sup>2</sup> (0,95)
<b>RBA83-II</b>	3,62 ± 0,10 c	5,95 ± 0,09 c	0,47 R <sup>2</sup> (0,98)

Dentro de cada columna, para cada experimento (I 3 II), los datos seguidos de la misma letra no difieren significativamente, test LSD  $P < 0,05$



**Figura 4.** (A) Enfrentamiento dual entre *Fusarium solani* TOR-393 y *Pseudomonas* sp. AMG66. A la izquierda se observa el crecimiento de *F. solani* sin bacterias y a la derecha el crecimiento inhibido de *F. solani* en presencia de bacterias. (B) Crecimiento romboidal de la colonia de *F. solani* TOR-725 en presencia de *Bacillus aryabhatai* RBA302. (Rodríguez-Navarro, D.N.)

#### *Control del desarrollo de especies de oomicetos*

En las Tablas 4a-4d se presentan los resultados de inhibición del desarrollo de los oomicetos *Phytophthora cinnamomi* y *Pythium spiculum* en presencia de bacterias. Todas las cepas bacterianas inhibieron entre 80-94% el desarrollo miceliar de los tres aislados de *P. cinnamomi* evaluados, pero de manera consistente destacan por su eficacia las bacterias RBA83, AMG66 y AMG77, todas pertenecientes al género *Pseudomonas*. No obstante, se observó cierta interacción bacteria x oomiceto, pues al contrario que con el aislado CECT2965 (Tabla 4a), la cepa RBA302 de *Bacillus* ejerció sobre el aislado MYC 003 un control semejante al que presentaron algunas cepas de *Pseudomonas* (Tabla 4b). La tasa de crecimiento del aislado PE 90, en presencia de las cepas RBA302, RBA83, AMG66 y AMG77, no se ajusta a un crecimiento lineal (Tabla 4c), de hecho no hay diferencias significativas en los valores del área del micelio a lo largo del tiempo (indicados por letra mayúscula). De manera consistente, todas las bacterias detienen el crecimiento de los aislados *P. cinnamomi* a partir del quinto día de enfrentamiento (MYC 003 y PE 90) o del séptimo día (CECT2965), de ahí la falta de ajuste a un modelo lineal de crecimiento.

En el caso del aislado de *P. spiculum* PA 54, sólo se evaluó la actividad de biocontrol de las tres estirpes de *Pseudomonas* (Tabla 4d). Las placas control crecieron ocupando toda el área de la

placa de cultivo desde el primer día de la cuantificación, de modo que no es posible determinar la tasa de crecimiento de este aislado en ausencia de las bacterias. La estirpe RBA 83 fue la única efectiva en el control de este aislado, y no permitió desde el inicio su desarrollo, de ahí que la tasa de crecimiento estimada no sea significativa.

**Tabla 4a.** Desarrollo miceliar de *Phytophthora cinnamomi* CECT2965 en presencia de bacterias.

Cepa bacteriana	Área de crecimiento lo del oomiceto (mm <sup>2</sup> )			Tasa de crecimiento (mm <sup>2</sup> /día)
	Día 5	Día 7	Día 9	
<b>Control</b>	24,68 ± 2,02 a	30,30 ± 1,64 a	36,10 ± 0,0 a	2,88 R <sup>2</sup> (0,71)
<b>BPA4</b>	6,99 ± 0,25 b	13,08 ± 1,47 b	13,86 ± 1,75 c	1,72 R <sup>2</sup> (0,48)
<b>RBA302</b>	25,40 ± 0,53 a	30,30 ± 0,51 a	30,76 ± 0,52 b	1,34 R <sup>2</sup> (0,69)
<b>RBA83</b>	6,06 ± 0,30 b	7,79 ± 0,47 c	8,13 ± 0,42 d	0,51 R <sup>2</sup> (0,49)
<b>AMG66</b>	7,38 ± 0,43 b	7,12 ± 0,18 c	8,65 ± 0,30 d	0,32 n.s.
<b>AMG77</b>	6,47 ± 0,43 b	6,78 ± 0,43 c	9,19 ± 0,36 d	0,68 R <sup>2</sup> (0,57)

Dentro de cada columna, los datos seguidos de la misma letra no difieren significativamente, test LSD  $P < 0,05$ . n.s. no significativo.

**Tabla 4b.** Desarrollo miceliar de *Phytophthora cinnamomi* MYC 003 en presencia de bacterias.

Cepa	Área de desarrollo del oomiceto (mm <sup>2</sup> )				Tasa de crecimiento (mm <sup>2</sup> /día)
	3 días	5 días	7 días	10 días	
<b>Control</b>	16,86 ± 0,65 a	32,66 ± 2,28 a	45,37 ± 2,35 a	56,75 ± 0,0 a	5,65 R <sup>2</sup> (0,97)
<b>BPA4</b>	3,71 ± 0,42 bc	4,79 ± 0,15 b	4,95 ± 0,13 b	7,47 ± 1,09 b	0,51 R <sup>2</sup> (0,92)
<b>RBA302</b>	4,61 ± 0,38 b	5,13 ± 0,38 b	5,40 ± 0,27 b	5,71 ± 0,34 c	0,15 R <sup>2</sup> (0,95)
<b>RBA83</b>	3,74 ± 0,29 bc	4,34 ± 0,17 b	4,60 ± 0,17 b	5,00 ± 0,28 cd	0,17 R <sup>2</sup> (0,95)
<b>AMG66</b>	2,91 ± 0,29 c	3,91 ± 0,23 b	3,97 ± 0,19b	4,52 ± 0,17 cd	2,21 R <sup>2</sup> (0,86)
<b>AMG77</b>	2,84 ± 0,11 c	3,18 ± 0,19 b	3,45 ± 0,28 b	3,56 ± 0,29 d	0,10 R <sup>2</sup> (0,90)

Dentro de cada columna, los datos seguidos de la misma letra no difieren significativamente, test LSD  $P < 0,05$ .



**Tabla 4c.** Desarrollo miceliar de *Phytophthora cinnamomi* PE 90 en presencia de bacterias.

Cepa bacteriana	Área de desarrollo del oomiceto (mm <sup>2</sup> )			Tasa de crecimiento (mm <sup>2</sup> /día)
	Día 3	Día 5	Día 7	
<b>Control</b>	21,56 ± 0,38 a	47,90 ± 5,42 a	56,74 ± 0,0 a	8,79 R <sup>2</sup> (0,76)
<b>BPA4</b>	11,93 ± 0,60 c	16,15 ± 0,98 b	19,39 ± 0,87 b	1,87 R <sup>2</sup> (0,77)
<b>RBA302</b>	16,23 ± 0,38 b A	17,82 ± 0,57 b A	17,99 ± 0,49 c A	0,36 R <sup>2</sup> (0,25)
<b>RBA83</b>	7,71 ± 0,29 e A	9,25 ± 0,35 c A	9,25 ± 0,35 d A	0,12 R <sup>2</sup> (0,08)
<b>AMG66</b>	8,66 ± 0,28 de A	8,70 ± 0,29 c A	8,87 ± 0,30 d A	0,05 R <sup>2</sup> (0,02)
<b>AMG77</b>	9,17 ± 0,39 d A	7,78 ± 0,34 c A	8,09 ± 0,31 d A	0,01 R <sup>2</sup> (0,0008)

Dentro de cada columna, los datos seguidos de la misma letra minúscula, y dentro de cada fila los datos seguidos de la misma letra mayúscula, no difieren significativamente, test LSD  $P < 0,05$ .

**Tabla 4d.** Desarrollo miceliar de *Pythium spiculum* PA 54 en presencia de bacterias.

Cepa	Área de desarrollo del oomiceto (mm <sup>2</sup> )			Tasa de crecimiento (mm <sup>2</sup> /día)
	3 días	5 días	7 días	
<b>Control</b>	56,75	56,75	56,75	--
<b>RBA83</b>	4,88 ± 0,55 ab	5,07 ± 0,50 c	5,71 ± 0,67 c	0,21 R <sup>2</sup> (ns)
<b>AMG66</b>	3,96 ± 0,28 b	10,11 ± 0,97 b	23,77 ± 1,12 b	4,36 R <sup>2</sup> (0,82)
<b>AMG77</b>	5,44 ± 0,13 a	16,90 ± 1,15 a	34,85 ± 0,74 a	6,36 R <sup>2</sup> (0,86)

Dentro de cada columna, los datos seguidos de la misma letra no difieren significativamente, test LSD  $P < 0,05$ . Los datos del tratamiento control no se han incluido en el ANOVA.

En resumen, la inhibición del desarrollo *in vitro* de hongos y oomicetos patógenos puede alcanzarse con bacterias que presenten una alta actividad de enzimas hidrolíticas relacionadas con el biocontrol, sobre todo con estirpes del género *Pseudomonas*. No obstante, se ha observado que la inhibición del desarrollo del micelio puede presentar cierta especificidad bacteria-patógeno, así como la inhibición de la esporulación, en el caso de los aislados de *Fusarium*. Estas cepas

bacterianas podrían constituir un eficaz agente de control biológico en la lucha contra las enfermedades de la fusariosis en fresa y la ‘seca’ de encinas y alcornoques.

### **Bibliografía citada**

- Bakker, A.W., Schippers, B. (1986). Microbial cyanide production in the rhizosphere in relation to potato yield reduction and *Pseudomonas* spp. -Mediated plant growth-stimulation. *Soil Biol. Biochem.* 19: 451-457.
- Bhattacharyya, P. N., Jha, D. K. (2012). Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): Emergence in Agriculture. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 28: 1327-1350.
- Beneduzi, A., Ambrosini, A., Passaglia, L.M. (2012). Plant Growth-Promoting Rhizobacteria (PGPR): The potential as antagonist and biocontrol agents. *Gen. Mol. Biol.* 35: 1044-1051.
- Cowan, S.T., Steel, K.J. (1965). In: *Manual for the identification of medical bacteria*. Cambridge University Press. New York.
- Duque-Lazo, J., Navarro-Cerrillo, R.M., van Gils, H., Groen, T.A. (2018). Forecasting oak decline caused by *Phytophthora cinnamomi* in Andalusia: Identification of priority areas for intervention. *Forest Ecol. Manag.* 417: 122-136.
- Gong, X., Gruninger, R.J., Qi, M., Paterson, L.; Forster, R.J., Teather, R.M., Mcallister, T.A. (2012). Cloning and identification of novel hydrolase genes from a dairy cow rumen metagenomic library and characterization of a cellulase gene. *BioMed Central* 5: 566-71.
- Harley, J.P., Prescott, L.M. (2002). In: *Laboratory Exercises in Microbiology*. 5th Ed. Boston, Mass. McGraw-Hil. ISBN: 007233456.
- Mardanov, A.M., Hadieva, G.F., Lutfullin, M.T., Khilyas, I.V., Minnulina, L.F., Gilyazeva, A.G., Bogomolnaya, L.M., Sharipova, M.R. (2017). *Bacillus subtilis* strains with antifungal activity against the phytopathogenic fungi. *Agric. Sciences* 8: 1-20
- Pastrana, A.M., Capote, N., De Los Santos B., Romero, F., Basallote-Ureba, M.J. (2014a). First report of *Fusarium solani* causing crown and root rot on strawberry crops in Southwestern Spain. *Plant Dis.* 98: 161-161.
- Pastrana, A.M., Basallote-Ureba, M.J., Capote, N. (2014b). *Fusarium solani*: un nuevo patógeno en el cultivo de la fresa (*Fragaria x ananassa* Duch.). *Phytoma-España*, 257: 42-46.
- Redondo, C., Larenas, J., López-Aranda, J.M., Soria, C., Martínez-Treceño, A., Melgarejo, P., De Cal, A. (2012). Comportamiento de variedades comerciales de fresa frente a enfermedades en viveros. XVI Congreso Nacional de la SEF. Málaga.
- Teather, R.M., Wood, P.J. (1982). Use of Congo red-polysaccharide interactions in enumeration and characterization of cellulolytic bacteria from the bovine rumen. *Appl. Environ. Microbiol.* 43:

777-780.

Triverdi, P., Pandey, A., Palni, L.M. (2008). *In vitro* evaluation of antagonistic properties of *Pseudomonas corrugata*. *Microbiol. Research* 163: 329-336.

Zentmyer, G.A. (1983). The world of *Phytophthora*. In: *Phytophthora*, its biology, taxonomy, ecology and pathology. D.C. Erwin, S. Bartnicki-Garcia, P.H. Tsao (Eds), APS, St Paul (US): 1-8.



**Junta de Andalucía**

Consejería de Agricultura, Ganadería,  
Pesca y Desarrollo Sostenible

Instituto Andaluz de Investigación  
y Formación Agraria, Pesquera, Alimentaria  
y de la Producción Ecológica



Instituto Nacional de Investigación  
y Tecnología Agraria y Alimentaria